

201225026A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 努

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 努

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究 P. 1
研究代表者：影山 努

II. 分担研究報告

1. マイクロ流路チップを用いた遺伝子診断システムの臨床的評価(その2) P. 10
研究分担者：大場邦弘
研究協力者：村瀬享子、野田一成、大滝美浩、安田順一、青木茂行、小田智三、加藤昭生、田中智子、小林 匠、小花奈都子、林 健太、村田岳哉、野田雅裕、内山健太郎、吉田知広、野田絵理、小鍛治雅之、高橋 仁、高山郁代、影山 努
2. インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系の構築および改良 P. 18
研究分担者：中内美名
研究協力者：高山郁代、高橋 仁、影山 努
3. 呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築 P. 22
研究分担者：高橋 仁
研究協力者：高山郁代、影山 努、改田 厚、久保英幸
4. マイクロ流路チップおよび Direct LAMP 法を組み合わせた遺伝子検査システムの実験室レベルでの検討 P. 26
研究分担者：久保英幸
研究協力者：改田厚、入谷展弘、山元誠司、高山郁代、高橋 仁、影山 努
5. インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 における薬剤耐性マーカー-S247N 変異検出系の構築 P. 31
研究分担者：高山郁代
研究協力者：中内美名、影山 努

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P. 35

I. 総括研究報告

感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究

研究代表者 影山 努

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第 2 室長

研究要旨

Direct RT-LAMP 法とマルチウェル搭載のマイクロ流路チップを組み合わせ、季節性インフルエンザウイルスの型・亜型診断を同時に行う事ができる POC 遺伝子検査システムの開発を行った。本システムは、煩雑な操作なしで遺伝子検査が行え、従来の遺伝子検査に必要な高度なスキルが無くても、高感度かつ特異性の高い遺伝子検査を臨床現場で行う事が可能である。また同時に複数の遺伝子を検出する事も可能になるため、季節性インフルエンザの診断のみならず、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスあるいは呼吸器ウイルス感染症の診断にも利用可能である。本研究では、診断・予防・医療水準向上を図るために、POC 遺伝子検査システムを用いたインフルエンザウイルスの型・亜型検出キットおよび 10 種類の呼吸器ウイルス感染症診断キットを構築して、実験室診断および臨床診断により本システムの評価を行った。また、地方衛生研究所における薬剤耐性株サーベイランスの強化および診断技術向上を図るため、新たな薬剤耐性株検出法の構築およびマーカー入りの陽性コントロールの作製および診断技術研修会の実施を行った。

A. 研究目的

現在、東南アジアや中東では高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒトへの感染が依然として続いており、高病原性鳥インフルエンザウイルスを由来とした新型インフルエンザの出現や、ヒトで流行しているインフルエンザウイルスやブタインフルエンザウイルスとの混合感染により、遺伝子再集合が起きて、より強い病原性を獲得した変異ウイルスの出現が危惧されている。このような高病原性鳥インフルエンザ

(H5N1)を由来とする新型インフルエンザの出現に備え、リアルタイム RT-PCR 法等の遺伝子検査系の構築および全国の検疫所・地方衛生研究所への検査技術の普及・確立および検査系の標準化および精度管理を実施し、これまで新型インフルエンザ対策に深く寄与してきた。

2009 年にブタインフルエンザに由来する新型インフルエンザ(H1pdm)が出現した際には、リアルタイム RT-PCR 法を用いた診断法をいち早く開発し、検疫所・地方衛生

研究所へ診断用試薬、陽性コントロール、診断マニュアルなどを配布して、全国規模での検査体制を短期間のうちに確立している。

リアルタイム RT-PCR 法等による遺伝子検査系は、マイクロピペッターによる試薬・検体の分注操作が必要なためコンタミネーションリスクも高く、検査手技が煩雑であり、また特殊機器を必要とするため、遺伝子検査に精通した人員と検査設備が整った施設以外の病院や診療所等の臨床現場で検査を行う事が難しいと考えられる。また、新型インフルエンザが出現した際に、検査を担う地方衛生研究所や検疫所においては、平時における事前準備が非常に重要である。特にリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検査法においては、コンタミネーションが起きにくい環境を整え、検査精度の維持向上を図る事は重要であるため、今年度は識別マーカー付き陽性コントロールの配布とこれを利用した診断に関する技術研究会を開催した。

H1pdm は幸運な事に、病原性が強毒性ではなかったものの、特に 5~9 歳の小児では病初期に急速に進行する呼吸傷害の発現率が高く、治療開始が遅れてウイルス性肺炎により重症化するケースが多く見られた。そこで、病院や診療所等の臨床現場でも簡便に遺伝子診断を行えるように、従来の RT-LAMP 法を一部改良して、検体からの核酸精製を必要とせず、約 45 分で H1pdm および A 型インフルエンザウイルスを検出できる Direct RT-LAMP 法による遺伝子診断薬を栄研化学株式会社と共同開発し (Journal of Medical Virology 83:10-15, 2011)、病院や診療所等の臨床現場でも H1pdm および A 型インフルエンザウイルスの検出が行えるようになった。しかし、試薬・検体の分注操作にまだマイクロピペッターが必要なため、コンタミネーションのリスクも

高く、遺伝子検査に熟練しないと正しい結果が得られない可能性があった。インフルエンザ診断に多用されているイムノクロマト法を用いた迅速診断キットの大部分は、型の同定だけで亜型の同定はできできない。また核酸検出法に比べ検出感度が低く、特にウイルス排出量が少ない病初期は H1pdm09 感染を見逃されるケースも多くあると考えられた。

そこで、本研究では、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作なしで遺伝子検査(同時に亜型診断)を行う事ができる高感度で簡便な検査システムの開発に着手した。地方衛生研究所や検疫所などで、例えば新型インフルエンザ感染疑い例があった際には、季節性インフルエンザウイルスなのか H5N1 亜型を含む新型インフルエンザウイルスなのかを迅速に鑑別する必要があるため、本システムを用いて簡便に特異的かつ高感度に H5N1 亜型を含むインフルエンザの型・亜型同定法の構築を目指す。

また、呼吸器感染症の原因となるウイルスは多く報告されているが、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなどを除き、その大部分の実態は不明である。乳幼児のウイルス性呼吸器感染症における実態把握のため、多項目の呼吸器ウイルス検出とその解析が必要である。また、呼吸器ウイルス感染症の鑑別診断を行うために、本システムを利用した呼吸器感染症を早期にベットサイド診断が行える POC 遺伝子検査システムの構築を試みた。

本システムは臨床現場で迅速に病原体を同定する事が可能なため、診断のみならず、本システムを用いて地域の病原体サーベイランスを行う事で、感染症の流行状況をリアルタイムに把握できるようになり、大規模な感染症の流行予測やコミュニティ単位での感染症予防などにも大いに役立つと

考えられる。

一方、インフルエンザの治療、予防にはオセルタミビル、ザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) が世界中で広く使用されているが、最近 H1pdm の NA タンパク質の 275 番目のヒスチジンからチロシンへのアミノ酸変異 (H275Y) NA タンパク質の 247 番目のセリンからアスパラギンへのアミノ酸変異 (S247N) が同時に起こる事で、オセルタミビルに対して非常に強い耐性能を獲得する事が報告された。今後、わが国においてもこの高度薬剤耐性株の流行が懸念されており、本研究において、薬剤耐性株サーベイランスのさらなる強化を目的として、S247N 変異株の迅速、簡便な検出法の構築を試みた。

研究組織

[研究代表者]

影山 努 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
第 2 室長

[研究分担者]

大場邦弘 公立昭和病院小児科
医長

高山郁代 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
第 2 室研究員

高橋 仁 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
主任研究官

中内美名 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
主任研究官

久保英幸 大阪市立環境科学研究所
研究主任

B. 研究方法

1. 昨年度構築したインフルエンザの POC 遺伝子検査システムの H3 亜型検出系は、昨

年度の流行株に対して、A 型検出系に比べると H3 亜型検出系の陽性判定時間が長かったため、検出感度・特異性の向上および時間短縮を目指し、プライマーの見直しを行い、改良後の Direct RT-LAMP 法を用いた H3 亜型検出系について検出感度および特異性について評価検討を行った。

2. インフルエンザウイルスの型・亜型(A 型・B 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型)の同定と RS ウイルスの検出を同時に行う事ができる Direct RT-LAMP 法(栄研化学株式会社)を利用したマイクロ流路チップおよび Point of Care (POC)遺伝子検査システム(ソニー株式会社)とリアルタイム RT-PCR 法 (A 型・B 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型)、イムノクロマト法による迅速診断キット(クイックナビTM-Flu、クイックナビTM-RSV:デンカ生研)を用いて、インフルエンザウイルスの型・亜型(イムノクロマト法では亜型判定なし)および RS ウイルスの検出感度について比較を公立昭和病院小児科の外来の一區画で、インフルエンザ様症状を呈する患者から採取した臨床検体(鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、鼻かみ液)を用いて比較検討を行った。

3. 大阪市立環境科学研究所にて 2012/13 シーズンにインフルエンザウイルス A/H1pdm09 (AH1pdm)が分離された 4 検体(すべてうがい液)および B 型が分離された 4 検体(鼻汁 3 検体およびうがい液 1 検体)について、インフルエンザウイルス遺伝子検出用の本システムを用いた検出を試み、インフルエンザウイルス迅速診断キット(クイックナビTM-Flu、デンカ生研株式会社)を用いた検出結果と比較検討を行った。

4. インフルエンザウイルスを除く呼吸器

感染症ウイルス群の中で、検出候補となるウイルスの選択と核酸増幅の標的となる遺伝子を決定した。また、この標的遺伝子を LAMP 法もしくは RT-LAMP 法を用いて増幅させるプライマーセットの設計を行い、ウイルス毎に作製した陽性コントロールを用いて、検出感度および特異性について評価検討を行った。

5. 呼吸器ウイルス遺伝子検出用チップを利用して、臨床検体から Ad(7[°]ローブ 2)、Ad(7[°]ローブ 4)、HBoV、hMPV、HCoV NL63、HCoV HKU1、HCoV OC43、HCoV 229E、RSV A および RSV B について POC 遺伝子検出システムを用いて検出を試みた。

6. H275Y 変異と同時に S247N 変異を検出するために、duplex one-step RT-PCR 法を用いた S247N 変異検出系の構築を試みた。S247N 変異検出系の検出感度および特異性の確認は S247 および N247 の NA 遺伝子の合成 RNA を用いて検討を行った。合成 RNA は、H1pdm09 ウイルスの A/Perth/265/2009 (S247 保有株) および A/Perth/29/2011 (N247 保有株) の NA 遺伝子全長の PCR 増幅産物より、T7 polymerase を用いた in vitro 転写反応にて合成を行った。また、S247N 変異検出系の特異性については、日本で分離された S247 および N247 保有株のウイルス培養上清を反応テンプレートに用いて検討を行った。

7. 多項目呼吸器ウイルス感染の実態把握を試みるため、乳幼児呼吸器感染症検体(約 500 検体)について、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を用いた 19 ウイルスの遺伝子検出検査を実施し、各検出状況の解析を行った(ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス[A, A(H1N1)2009, B, C]、コロナウイルス(OC43, NL63, HKU1, 229E)、パラインフルエンザウイルス(1~

4 型)、RS ウイルス(A, B)、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヒトボカウイルス 1 型、アデノウイルス)。

8. リアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型同定検査用の識別マーカ付き陽性コントロールの作製およびリアルタイム PCR 法を用いた簡便な陽性コントロール識別法の構築を行い、全国の地方衛生研究所(75 カ所)にこの陽性コントロールを配布するとともに、H5 亜型インフルエンザ検出に関する診断技術研究会を 3 回に分けて開催した。

C. 研究結果

1. 新規に構築した H3 亜型 RT-LAMP 検出系は 100copies/reaction 程度のテンプレート濃度まで検出できる感度を備えており、この時の陽性判定時間は従来よりも早くなる事が判明した。H3 亜型以外の型・亜型に対する交差反応は見られず、またプライマーダイマーによる非特異反応も確認されなかった。

2. 臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法とインフルエンザおよび RS ウイルスの POC 遺伝子検出システムの陽性一致率および陰性一致率は概ね良好であった。しかし、数例でインフルエンザの POC 遺伝子検出システムにおいて偽陽性が生じた。

3. インフルエンザの POC 遺伝子検出システムにて検査を行った結果、鼻汁では、B 型が分離された 3 検体すべてにおいて B 型遺伝子が検出された。また、うがい液では、AH1pdm が分離された 2 検体において A 型および AH1pdm の遺伝子が検出された。陰性となったうがい液 3 検体より RNA を抽出した後に測定を行うと、AH1pdm 分離陽性の 1 検体で A 型および AH1pdm の遺伝子が、もう一方の同様検体で A 型のみ遺伝子が、また、B 型分離陽性のうがい液検体で B 型

の遺伝子がそれぞれ検出された。

4. 作製した陽性コントロールと、設計したプライマーセットを用いて LAMP 法もしくは RT-LAMP 法による核酸増幅と検出を行ったところ、設計したプライマーセットで標的遺伝子の増幅が確認された。また、各プライマーセットの検出感度 (copies/reaction) について検討を行ったところ、AdV 2; 1×10^2 、AdV 4; 1×10^2 、HBoV; 1×10^2 、RSV A; 1×10^2 、RSV B; 1×10^2 、HCoV NL63; 5×10^3 、HCoV OC43; 5×10^3 、HCoV HKU1; $>5 \times 10^4$ 、HCoV 229E; 2×10^3 、hMPV; 2×10^3 であった。

5. マルチプレックス・リアルタイム PCR において各該当ウイルスの遺伝子検出が陽性となった計 20 検体について、呼吸器ウイルス遺伝子検出用チップを使った POC 遺伝子検出システムにて測定を行った結果、16 検体においては、マルチプレックス・リアルタイム PCR の結果と同様のウイルス遺伝子が検出された。しかし、hMPV および HCoV HKU1 の検出が陽性となった 4 検体においては、本システムでは遺伝子検出陰性となった。

6. 10 倍段階希釈した各 NA 遺伝子の合成 RNA を用いて S247N 変異検出系の感度の検討を行った結果、S247 および N247 検出系の両方で 2.0×10^1 から 2.0×10^8 copies/reaction の範囲で直線性のある反応を示し、高感度に S247N 変異を検出できる事が明らかとなった。また、本方法はウイルス培養上清でも S247N 変異を正確に検出できる事が明らかとなった。

7. 6 歳未満の乳幼児検体では、複数ウイルス同時検出率が約 40% であり、他の年齢層と比較して高値であった。低年齢層の乳

幼児については、呼吸器ウイルスへの感染リスクが高いことが示唆された。

8. 新たに構築した H5/TypeA 陽性コントロールには、インフルエンザウイルス遺伝子に存在しない人工的な遺伝子配列を挿入した。そのためリアルタイム RT-PCR 増幅産物について、Duplex リアルタイム PCR 法(陽性コントロールチェック用の TaqMan Probe を利用)により、その増幅産物が陽性コントロール由来のものであるかどうか(検体で陽性となった場合、陽性コントロールがコンタミネーションしていないかどうか)を簡便に確認する事が可能となった。また、人工的な遺伝子配列には制限酵素 BamH I による切断配列が挿入されており、リアルタイム RT-PCR 増幅産物を対象に制限酵素(BamH I)処理とアガロース電気泳動による確認でも、その増幅産物が陽性コントロール由来のものであるかどうかを確認する事が可能となった。これらの方法については、全国の地方衛生研究所(75 カ所)に対して技術移転を行うとともに、診断技術研究会を通じてリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 亜型同定法に関する検査技術の向上を図った。

D. 考察

[インフルエンザの POC 遺伝子検出システム]

非特異反応が起きにくい検出系にすることで、新規 H3 亜型 RT-LAMP 検出系においては、反応速度に改善が見られ、陽性判定時間の大幅な時間短縮が可能となった。また、A 型および B 型検出系の更新では、1 つのプライマー内に数か所の混合塩基を加えても、大幅な検出感度低下や反応速度の遅延は起こらない事が明らかとなった。

本システムを用いて臨床的評価を行った結果、リアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等

の検出感度にも関わらず、イムノクロマト法と同等の簡単な操作性を確保し、原理的にも遺伝子検査で問題になるコンタミネーションが起きる可能性がほとんどない検査であることを 2011/2012 シーズンの臨床的評価に引き続き今回の検討でも確認しており、本手法による遺伝子検査はポイント・オブ・ケア検査として利用可能であると考えられた。なお、実験室レベルで本システムを応用する際の至適検体量については、特にうがい液の場合、今後の検討課題であるものと思われた。

また、昨年度の検討では問題とならなかった偽陽性が、本 POC 遺伝子検査システムのインフルエンザ A 型で確認されたが、反応試薬の組成変更により、反応時間が短くなると同時に、臨床検体由来の核酸に対する非特異反応や Primer dimer 形成による非特異反応などが早期に出現するようになり、これが偽陽性と見間違える原因となったと考えられる。非特異反応が起きにくい抽出試薬や反応試薬の検討およびカットオフ値の変更、自動判定プログラムの修正が必要で、更なる改良を行う必要がある。

[呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築および実験室診断での評価]

インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の RT-LAMP 法による核酸検出系の構築を試みた。AdV、HBoV、RSV A および RSV B については高い検出感度を有する事が分かったが、hMPV、HCoV HKU1、HCoV OC43、HCoV 229E、HCoV NL63 についてはそれより 20 倍から 100 倍以上低い検出感度となってしまったため、より検出感度の高い検出系を今後構築していく必要がある。また、この検出系を POC 遺伝子診断システムに導入して実験室診断により評価を行ったが、10 ウイルスのうちの 6 ウイルスにおいて、マルチプレックス・リアルタ

イム PCR の検出結果と同様のウイルス遺伝子が検出された。なお、hMVP および HCoV HKU1 については、MR-PCR で陽性となった計 4 検体が本システムで検出陰性となったことから、検出系の再考が必要と思われた。また、測定した 3 検体において非特異的検出が認められた HCoV 229E についても、検出系の再考が必要と思われた。呼吸器感染症ウイルス群の POC 遺伝子診断システムについては、更なる特異性、検出感度の向上を図る必要がある。

[薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築]

今回新たに構築した S247N 変異検出系により、H275Y 変異検出系と同様に、迅速、簡便に S247N 変異を検出する事が可能となった。本方法は、RNA 抽出を行わずにウイルス培養上清を直接反応系に添加することが可能であり、薬剤耐性株サーベイランスにおける S247N 変異株のスクリーニングに有用で、薬剤耐性株サーベイランスの強化にも役立つと考えられた。

[多項目呼吸器ウイルス感染の実態把握]

6 歳未満の乳幼児では同時複数ウイルス検出率は約 40% と他年齢層に比較して高値であり、低年齢層の乳幼児は呼吸器ウイルスへの感染リスクが高い事が判明した。しかし、感染パターンと病態との関連についての解析はデータ不足のため、まだ十分な解析が行えない。臨床現場において簡便に検査が行える本 POC 遺伝子診断システムを利用したり、あるいは全国レベルでの呼吸器感染症のサーベイランスを広げて地方衛生研究所で詳細解析を行ったりするなどして、多項目呼吸器ウイルス感染の実態調査を行う必要があると考えられた。

[H5 亜型インフルエンザ検出に関する診断

技術向上について]

全国の地方衛生研究所において、リアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型同定検査用の識別マーカー付き陽性コントロールを用いた検査を行う事により、コンタミネーションによる偽陽性判定などの可能性が少なくなり、検査技術および検査精度の向上が期待される。

E. 結論

Direct RT-LAMP 法とマルチウェル搭載のマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作を必要としないで迅速診断キット並の簡便な操作で、高感度に季節性インフルエンザウイルスの型・亜型診断を同時に行う事ができる POC 遺伝子検査システム(A 型 B 型の型別ならびに A/H1pdm09 亜型 A/H3 亜型を同時に型、亜型診断が可能)を構築した。

従来よりも煩雑な操作なしで遺伝子検査ができるようになり、従来の遺伝子検査に必要な高度なスキルが無くても、高感度かつ特異性の高い遺伝子検査が臨床現場で可能であり、また同時に複数の遺伝子を検出する事も可能になるため、季節性インフルエンザの診断のみならず、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの診断にも利用可能である。特に小児科で臨床的に実用性が高いと考えられる呼吸器感染症の早期診断法の開発にも有用と考えられる。

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザなど従来の迅速診断法では同定できなかった亜型同定可能な信頼性の高い遺伝子検査を、コンタミネーションフリーで迅速・簡便にベッドサイドで行え、インフルエンザの流行および治療に早期対応できるようなるなど、診断、治療、予防等に大きく貢献する技術である。

また、新型インフルエンザ等の新興・再興感染症が発生した場合に診断法が無くて

も、従来からある病原体を本診断キットで診断できるようにしておけば、除外診断への応用も可能で、新興・再興感染症対策のための有用なツールとなる。もちろんすぐに診断法を構築すれば、本キットは診断のための有用なツールとなる。

さらに、感染症の同定検査が高感度・迅速に行えるため、検疫所における機内検疫など、ヒトおよび動物に対する輸入感染症対策のためのツールにもなり、農場などにおいて動物病原体サーベイランス(人獣共通感染症など)への活用も可能であり、国内への感染症流入の予防対策等に役立てる事も可能である。

従来、地方衛生研究所や感染研等の実験室で行っていた病原体の同定検査が必要なくなるため、その分、分離した病原体等についてより詳細に性状などの解析を行うなど、時間および人的活用も可能になる技術である。また、これまでの病原体サーベイランスは検体を地衛研等に送付して解析を行うため、解析結果の情報共有に 1 週間単位の時間がかかっていた。本研究を活用し迅速かつ高感度な遺伝子診断が全国の病院やクリニックで利用可能になれば、臨床現場でリアルタイムに感染症サーベイランスや薬剤耐性株サーベイランスを行う事が可能となり、わが国のリアルタイムな感染症対策にも大きく貢献する事ができるようになる。

本システムを用いる事により、精度の高い病原体同定がベットサイドでできるようになれば、医師等の感染症診断能力の向上が期待でき、患者に対しては予後を予測した適切な医療を早期に提供できるようになる。また、臨床現場では検査や問診にかかる時間や人員を大幅に少なくする事ができるため、特に医療崩壊につながる医師等の疲弊の軽減にもつながり、特に医師不足が深刻な小児科などではその分人的資産の活

用ができるようになる。同時に院内感染やコミュニティー内での感染拡大の防止にも役立つと考えられる。

インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症については、呼吸器ウイルス感染の実態調査およびサーベイランスを行う上でも、地方衛生研究所および病院等において本 POC 遺伝子検査システムの活用に向け、高感度かつ特異性の高いマルチプレックス呼吸器ウイルス感染症診断チップの開発が必要不可欠と考える。

一方、インフルエンザの治療、予防にノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) が世界中で広く使用されているが、わが国での使用量は世界でも最も多く、薬剤耐性株の出現が危惧されている。本研究では、S247N 変異株の検出法を新たに構築したが、薬剤耐性株の出現をモニターするためにも、さらなる薬剤耐性株サーベイランスの強化を目的とした薬剤耐性株の検出法について、研究開発を継続的に実施する必要があると考えられる。

また、新型インフルエンザが出現した際に、検査を担う地方衛生研究所や検疫所においては、平時における事前準備が非常に重要であり、特にリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検査法においては、コンタミネーションが起きにくい環境を整え、検査精度の維持向上を図る事が重要であるため、陽性コントロールの配布や定期的な技術研究会の実施など、地方衛生研究所および検疫所に対する技術的サポートが今後必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu,

Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Japanese Journal of Infectious Diseases 65(1):19-27, 2012.

- 2) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. Journal of Virological Methods 188(1-2):73-75, 2013.
- 3) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. Archives of Virology. (in press)
- 4) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山 努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版) 国立感染症研究所 2012, http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf
- 5) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、

松井清彦、影山 努、小田切孝人、押部智宏、小渕正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明.インフルエンザ診断マニュアル(第2版) 国立感染症研究所 2012,
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf

2. 学会発表

- 1) 影山 努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第33回研究会. 2012年6月
- 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
- 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の2例. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会.

東京. 2012年10月

- 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
- 5) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

II. 分担研究報告

マイクロ流路チップを用いた遺伝子診断システムの臨床的評価(その 2)

研究分担者 大場邦弘 公立昭和病院小児科

研究協力者

村瀬享子、野田一成、大滝美浩、安田順一、青木茂行：公立昭和病院呼吸器内科

小田智三：公立昭和病院感染症科

加藤昭生、田中智子、小林匠、小花奈都子、林健太、村田岳哉、野田雅裕、内山健太郎、
吉田知広、野田絵理、小鍛冶雅之：公立昭和病院小児科

高橋仁、高山郁代、影山努：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

研究要旨 昨年度、我々はインフルエンザウイルスに対する新規遺伝子検査システムを開発し、臨床現場においてもイムノクロマト法と同等の簡単な操作性で、コンタミネーションもなく、リアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度で、型・亜型を同時に検出できる事を報告した。しかし、陽性判定がなされるまでの反応時間に各型・亜型で差があることが判明したため、今年度は各型・亜型の判定時間の差を改善する目的で、反応試薬の組成および A/H3 亜型プライマー配列の変更を行い、さらにインフルエンザと同時期に流行し鑑別が必要となる RS ウイルスを同時に検出する目的で、RS ウイルスの検出系も搭載したマイクロ流路チップを用いて、診療現場である外来の一面にて臨床検体を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型および RS ウイルス同定遺伝子検査システムの臨床的評価を行った。

A. 研究目的

平成 23 年度に、マルチウェル搭載のマイクロ流路チップに Direct RT-LAMP 法を組み合わせ、小型リアルタイム検出機でインフルエンザウイルスの型(A および B 型)・亜型(H1pdm09 および H3 亜型)を同時に検出できる新規の Point of Care (POC) 遺伝子検査システムを開発した。本 POC 遺伝子検査システムは、イムノクロマト法と同等の簡単な操作性が確保さ

れ、コンタミネーションもなく、リアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度で、臨床現場においてもインフルエンザウイルスの型・亜型を同時に検出できることが前回の検討で確認できた。一方で、抗ウイルス薬の投与がない症例において、A 型、H3 亜型、B 型の陽性判定がなされるまでの反応時間は、A 型：中央値 9 分（範囲 7～15 分）、H3 亜型：中央値 15 分（範囲 11～18 分）、B 型：中央値 8 分（範囲 7～

9分)であり、各型・亜型間で判定時間に差があることが判明した。

本研究では、各型・亜型間の判定時間の差を改善する目的で反応試薬の組成およびA/H3 亜型検出用プライマー配列を変更し、また、インフルエンザと同時期に流行し鑑別が必要となるRSウイルスをインフルエンザウイルスの型・亜型と同時に検出する目的で、新規に構築したRSウイルス(A型/B型)の検出系を追加搭載したマイクロ流路チップを用いて、本POC遺伝子検査システムの有用性について、昨年度と同様に、診療現場である外来の一画で臨床検体を用いて検証を行った。なお、臨床検体は、国立感染症研究所および公立昭和病院の医学研究倫理委員会による倫理審査の承認を得てから提供者に十分な説明を行い、自由意思による同意を得て採取し本研究に用いた。

B. 研究方法

インフルエンザウイルスの型・亜型の同定とRSウイルスの検出を同時に行う事ができるマイクロ流路チップおよびPOC遺伝子検査システム(ソニー株式会社)とリアルタイムRT-PCR法(A型・B型・H1pdm09 亜型・H3 亜型)、イムノクロマト法(クイックナビTM-Flu、クイックナビTM-RSV; デンカ生研。陰性判定時間8分)により、インフルエンザA型、インフルエンザA/H3 亜型、インフルエンザA/H1 pdm 2009 亜型、インフルエンザB型、RSウイルスの検出系(イムノクロマト法では亜型判定なし)についての評価を2013年1月から2013年3月までの間、診療現場である外来の一画で、抗ウイル

ス薬投与のないインフルエンザ様症状を呈する患者から採取した臨床検体(鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、鼻かみ液)を用いて行った。なお、どの種類の検体も均一量の検体が付着するように、医科用捲綿子Exスワブ02(デンカ生研)のスワブでサンプリングし、採取した検体は各検査法の抽出試薬(POC 遺伝子検査システム: 10mLの検体抽出液(新規開発)、リアルタイムRT-PCR: 1mLのUniversal Transport Medium, UTMTM(COPAN)に懸濁し140 μ LからRNAを抽出、クイックナビ: 添付バッファー)に懸濁して(リアルタイムRT-PCR法ではQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)によるRNA抽出を行った後に)検査を行った。なおPOC遺伝子検査システムでは判定時間20分の自動判定プログラムを用いて検査を実施した。

C. 研究結果

2012/2013 シーズンに同意が得られた49症例、延べ55検体(鼻腔ぬぐい液10例、鼻腔吸引液30例、鼻かみ液15例を対象として、インフルエンザウイルスの型・亜型の同定を行った。また、RSウイルスの検出については、17症例、延べ18検体(鼻腔ぬぐい液2例、鼻腔吸引液14例、鼻かみ液2例を対象とした。うち、17検体については、インフルエンザウイルスの型・亜型の同定とRSウイルスの検出を同時に行った。

インフルエンザA型に関して(表1-1)は、発熱から検体採取までの時間が中央値20時間(範囲0~72時間)で、32検体がリアルタイムRT-PCR法で陽性と判定された。その内29検体がPOC遺伝子検査

システムで陽性であり、28 検体がイムノクロマト法で陽性であった。また、POC 遺伝子検査システムで陽性判定がなされるまでの反応時間は中央値 7 分（範囲 7～16 分）であった。リアルタイム RT-PCR 法との陽性一致率は POC 遺伝子検査システムが 90.6%、イムノクロマト法が 87.5%、陰性一致率は POC 遺伝子検査システムが 91.3%、イムノクロマト法が 100%であった。POC 遺伝子検査システムが陰性であった 3 検体のリアルタイム RT-PCR 法の Cp 値は 26.91、31.43、32.77 であり、内 2 例はリアルタイム RT-PCR 法の検出限界付近の検体であった。また、Type A の POC 遺伝子検査システムで偽陽性が 2 検体で認められた。

インフルエンザ A/H3 亜型に関して（表 1 - 1）は、発熱から検体採取までの時間が中央値 18 時間（範囲 0～72 時間）で、29 検体がリアルタイム RT-PCR 法で陽性と判定された。その内 28 検体が POC 遺伝子検査システムで陽性であった。また、POC 遺伝子検査システムで陽性判定がなされるまでの反応時間は中央値 7.5 分（範囲 7～17 分）であった。POC 遺伝子検査システムのリアルタイム RT-PCR 法との陽性一致率は 96.6%であった。リアルタイム RT-PCR 法では陽性で POC 遺伝子検査システムで陰性であった 1 検体のリアルタイム RT-PCR 法の Cp 値は 32.88 であり、リアルタイム RT-PCR 法の検出限界付近の検体であった。また、リアルタイム RT-PCR 法の検出限界以下であった検体 1 検体を POC 遺伝子検査システムでは陽性と判定した。この検体の TypeA に対するリアルタイム RT-PCR 法での Cp 値は、

36.12 で、この検体はウイルス濃度が非常に低い、本検討ではリアルタイム RT-PCR 法では陰性、POC 遺伝子検査システムでは陽性と判定されたものと考えられる。A/H3 亜型の POC 遺伝子検査システムで偽陽性は認められなかった。

インフルエンザ A/H1 pdm 2009 亜型に関して（表 1 - 1）は、発熱から検体採取までの時間が中央値 72 時間（範囲 72～72 時間）で、2 検体がリアルタイム RT-PCR 法で陽性と判定された。その内 1 検体が POC 遺伝子検査システムで陽性であった。また、POC 遺伝子検査システムで陽性判定がなされるまでの反応時間は 15 分であった。POC 遺伝子検査システムのリアルタイム RT-PCR 法との陽性一致率は 50.0%、陰性一致率は 100%であった。陰性であった 1 検体のリアルタイム RT-PCR 法の Ct 値は 32.35 であり、リアルタイム RT-PCR 法の検出限界付近の検体であった。

インフルエンザ B 型に関して（表 1 - 2）は、2012/2013 シーズンに、POC 遺伝子検査システム、リアルタイム RT-PCR 法、イムノクロマト法で検出される検体はなかった。

RS ウイルスに関して（表 1 - 2）は、発熱から検体採取までの時間が中央値 17 時間（範囲 1～72 時間）で、5 検体がリアルタイム RT-PCR 法で陽性と判定された。その内 4 検体が POC 遺伝子検査システムで陽性であり、3 検体がイムノクロマト法で陽性であった。また、POC 遺伝子検査システムで陽性判定がなされるまでの反応時間は中央値 8 分（範囲 7～12 分）であった。リアルタイム RT-PCR 法との陽

性一致率は POC 遺伝子検査システムが 80.0%、イムノクロマト法が 60.0%、陰性一致率は POC 遺伝子検査システム、イムノクロマト法共に 100%であった。POC 遺伝子検査システムで偽陽性は認められなかった。

D. 考案

POC 遺伝子検査システムは、リアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度にも関わらず、イムノクロマト法と同等の簡単な操作性を確保し、原理的にも遺伝子検査で問題になるコンタミネーションが起きる可能性がほとんどない検査であることを 2011/2012 シーズンに臨床検体を用いて確認しており、本手法による遺伝子検査はポイント・オブ・ケア検査として利用可能であると考えた。しかし、インフルエンザの各型・亜型の陽性判定がなされるまでの反応時間に判定時間に差があることが判明し、また陰性判定には 30 分間の時間が必要であるため、ポイント・オブ・ケア検査として利用するために、これらの点を改善する必要があった。そのため、今回は反応時間の短縮を目的に、反応試薬の組成および A/H3 亜型のプライマー配列を変更し、さらにインフルエンザが散發的に流行している時期に RS ウイルスも同時流行することがあり、発熱早期の症状からでは、臨床的に両者を区別することが難しいため、新規に開発した RS ウイルスの検出系を追加搭載したマイクロ流路チップを用いて、臨床的評価を行った。

本 POC 遺伝子検査システムの検討結果から、研究期間中に患者の発生がなかったインフルエンザ B 型、リアルタイム

RT-PCR 法で全検体が検出限界付近であったインフルエンザ A/H1 pdm 2009 亜型を除いた、A 型、A/H3 亜型 RS ウイルスの陽性判定までの反応時間の中央値はいずれも 7~8 分間、陰性判定時間も 20 分間であり、反応試薬の組成および A/H3 亜型検出用のプライマー配列を変更する事で、陽性・陰性までの反応時間を短縮でき、反応時間のばらつきを解消することができた。

リアルタイム RT-PCR 法で陽性となり、本 POC 遺伝子検査システムで陰性となった検体のうち、1 検体を除いた全てで、リアルタイム RT-PCR 法で検出限界付近の低濃度のウイルス量である事が判明した。昨年度までの基礎的検討により、Direct RT-LAMP 法はリアルタイム RT-PCR 法に比べると、抽出時における検体の希釈度が高く、検出感度が低くなってしまいうため、検体中のウイルス量が少ない場合は、リアルタイム RT-PCR 法では検出できても、Direct RT-LAMP 法では検出できないケースが出てくると考えられる。本 POC 遺伝子検査システムで陰性となった 3 検体については、このような理由で検出できなかったと考えられる。POC 遺伝子検査システムの検出感度をさらに上げるために、検体抽出液の量を減らす、臨床検体由来の反応阻害物の影響を少なくした抽出液を開発するなどの工夫が必要である。

また、昨年度は問題とならなかった偽陽性が本 POC 遺伝子検査システムのインフルエンザ A 型で確認されたが、反応試薬の組成変更により、反応時間が短くなると同時に、臨床検体由来の核酸に対する非特異反応や Primer dimer 形成による非特

異反応などが早期に出現するようになり、これが偽陽性と見間違ふ原因となったと考えられる。非特異反応が起きにくい抽出試薬や反応試薬の検討およびカットオフ値の変更、自動判定プログラムの修正が必要である。

E. 結論

本 POC 遺伝子検査システムでは、コンタミネーションのリスクの回避と簡単な操作性が確保されたまま、ある一定以上のウイルス量がある検体においては、陽性・陰性判定までの反応時間を短縮することができた。今後、遺伝子検査の利点である特異性を上げるためにも、偽陽性が出現しない試薬組成の開発や自動判定プログラムの修正が必要と考えられた。

また、今回初めて本 POC 遺伝子検査システムによる RS ウイルスの検出を試みた結果、臨床検体においても問題なく検出できており、同時に複数のウイルス遺伝子が検出できる遺伝子検査システムである事が確認できた。今後、本 POC 遺伝子検査システムを用いて、他の呼吸器感染ウイルスを同時に検出できるシステムを検討する事で、ウイルス性の呼吸器感染症診断への利用はもちろん、将来の本邦における精確なリアルタイム感染症サーベイランスの実現につながるものと考えられた。

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 大場邦弘, 影山努: インフルエンザウイルス型・亜型同定検査—既存の検査法と新規マイクロ流路チップを用いたポイント・オブ・ケア遺伝子検査法の臨床的有用性の比較について—. 小児科臨床 65; 2635-2641, 2012

2. 学会発表

1) 大場邦弘, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山努: マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2012 年 10 月

2) 田中智子, 大場邦弘, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山努: 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の 2 例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2012 年 10 月

3) 高山郁代, 中内美名, 大場邦弘, 田代真人, 影山努: 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月

4) 影山努, 高山郁代, 中内美名, 田代真人, 大場邦弘: マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月

表1-1. 各ウイルスのリアルタイム RT-PCR 法と POC 遺伝子検査システム (POCNATs)との比較

インフルエンザ A 型

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	29	2
POCNATs(-)	3	21
IC(+)	28	0
IC(-)	4	23
	陽性一致率	陰性一致率
POCNATs	90.6%	91.3%
IC	87.5%	100.0%

陽性判定までの反応時間:中央値 7 分(範囲 7~16 分)

発熱から検体採取までの時間:中央値 20 時間(範囲 0~72 時間)

PCR 陽性検体の種類:ぬぐい液:8 例、吸引液:12 例、鼻かみ液:12 例

インフルエンザ A/H3 亜型

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	28	1
POCNATs(-)	1	25
	陽性一致率	陰性一致率
POCNATs	96.6%	96.2%

陽性判定までの反応時間:中央値 7.5 分(範囲 7~17 分)

発熱から検体採取までの時間:中央値 18 時間(範囲 0~72 時間)

PCR 陽性検体の種類:ぬぐい液:7 例、吸引液:11 例、鼻かみ液:11 例

インフルエンザ A/H1pdm 亜型

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	1	0
POCNATs(-)	1	53
	陽性一致率	陰性一致率
POCNATs	50.0%	100.0%

陽性判定までの反応時間:中央値 15 分(範囲 15~15 分)

発熱から検体採取までの時間:中央値 72 時間(範囲 72~72 時間)

PCR 陽性検体の種類:ぬぐい液:1 例、鼻かみ液:1 例