

表 1-2. 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 B 型

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	0	0
POCNATs(-)	0	55
	陽性一致率	陰性一致率
POCNATs	-	100.0%

陽性判定までの反応時間: 該当なし

発熱から検体採取までの時間: 該当なし

PCR 陽性検体の種類: 該当なし

RS ウイルス

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	4	0
POCNATs(-)	1	13
IC(+)	3	0
IC(-)	2	13
	陽性一致率	陰性一致率
POCNATs	80.0%	100.0%
IC	60.0%	100.0%

陽性判定までの反応時間: 中央値 8 分(範囲 7~12 分)

発熱から検体採取までの時間: 中央値 17 時間(範囲 1~72 時間)

PCR 陽性検体の種類: 吸引液: 5 例

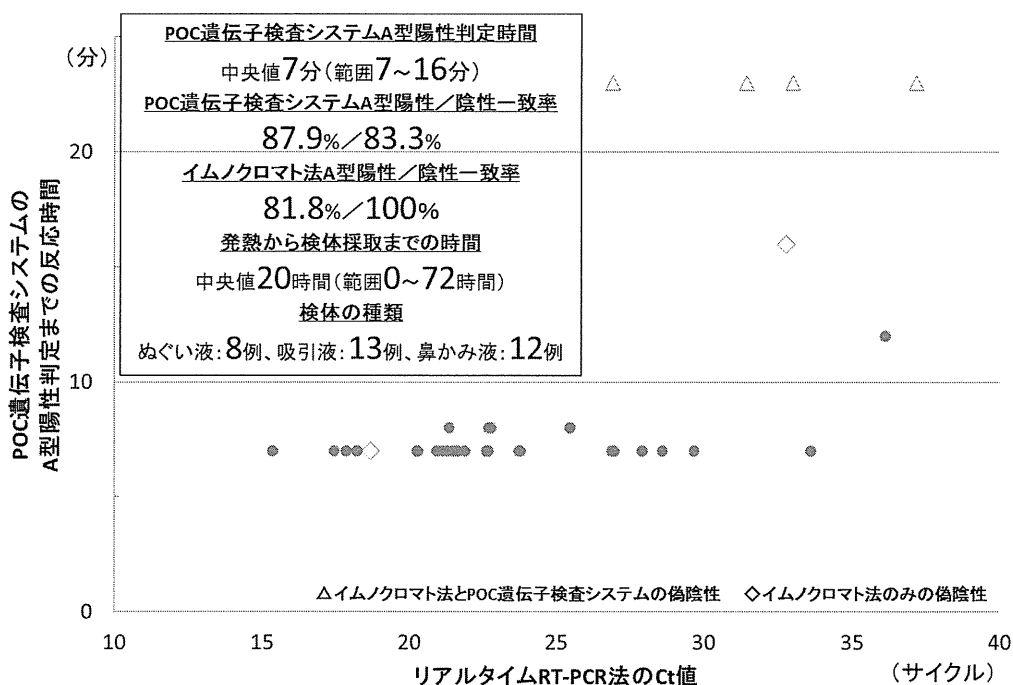


図1-1. インフルエンザA型におけるリアルタイムRT-PCR法のCt値とPOC遺伝子検査システムの陽性判定時間との関係

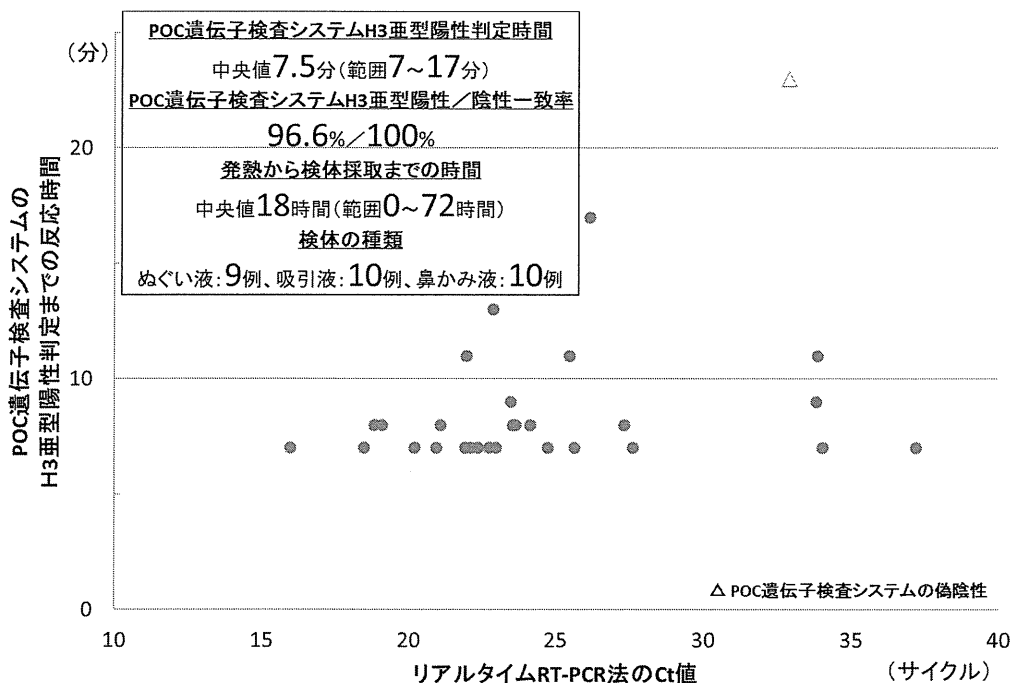


図1-2. インフルエンザA/H3N2型におけるリアルタイムRT-PCR法のCt値とPOC遺伝子検査システムの陽性判定時間との関係

## インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系の構築および改良

研究分担者 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

研究協力者 高山 郁代、高橋 仁、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** 高感度なインフルエンザウイルスの型、亜型別診断をベッドサイドで行うことを目指し、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせた簡便なインフルエンザの POC 遺伝子検査システムの開発を進めている。

本研究では、各型・各亜型検出系の検出感度向上、非特異反応の減少、および昨年度の検討において問題点が指摘された H3 亜型検出系については陽性判定時間の短縮を目指し、一部の RT-LAMP プライマー配列の変更もしくは RT-LAMP プライマーセット変更などの改良を試みた。

### A. 研究目的

現在、臨床現場でのインフルエンザの診断には、イムノクロマト法を利用した迅速診断キットが広く使用されている。しかし、そのほとんどは A 型、B 型の型別診断しかできず、A 型インフルエンザウイルスの亜型同定はできないものが主流なうえ、検出感度がそれ程高くないために、病初期などは偽陰性となる場合がある。そこで、我々は、臨床現場において迅速診断キット並の簡便な操作で、より高感度にインフルエンザの診断が行えるように、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、インフルエンザウイルスを型、亜型別に検出できる Point of care (POC) 遺伝子検査システムの開発を進めている。

昨年度、臨床現場で実施したインフルエンザの POC 遺伝子検査システムを使用した検討では、H3 亜型検出系において陽性判定時間の長さが問題となった。また、A 型及び B 型検出系に用いたプライマーにおい

ては、最近の流行株に対して遺伝子配列上に多少の違いが見られた。そこで、本年度の検討を行うにあたり、これら検出系についてプライマーの変更を行い、インフルエンザの POC 遺伝子検査システムの更新を図った。

### B. 研究方法

#### 1. H3 亜型 RT-LAMP 検出系の改良

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 亜型検出系では、既存の検出系（重本ら 感染症学会誌 84(4), 2010) (H3-1 primers) と昨年度当所で構築した検出系 (H3-2 primers) の 2 組の RT-LAMP プライマーセットを混合して使用していた。しかし、昨年度の流行株に対して、A 型検出系 (MP 遺伝子を標的とする) に比べると H3 亜型検出系の陽性判定までの時間が長くかかるため、2011 年 9 月から 2012 年 10 月に日本国内で分離された H3 亜型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子

配列と比較し、昨年度に使用した H3 亜型検出系の RT-LAMP プライマー配列を再評価した結果、H3-1 primers 内に配列が一致しないプライマーが多く含まれている事が判明したため、このプライマーセットの代わりに他の新たな領域に RT-LAMP 用 H3 亜型検出系プライマーセットを設計した (H3-60 primers)。

## 2. 新規 H3 亜型 RT-LAMP 検出系の検出感度および特異性の検討

新たに設計した H3-60 primers は、H3-2 primers と混合し、新規の H3 亜型 RT-LAMP 検出系として、検出感度および陽性判定時間(蛍光が検出されるまでの時間)の検討を行った。RT-LAMP 反応は、全量 25 $\mu$ L で行い、反応組成は 20mM Tris-HCl(pH.8.8)、8mM MgSO<sub>4</sub>、70mM KCl、15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Tween20、0.8M Betaine、1.4mM dNTPs、8U Bst2.0 DNA polymerase、0.25U AMV Reverse transcriptase、160nM Yo-Pro-1 iodide とし、反応テンプレートに A/Uruguay /716/2007(H3N2)を鋳型とした HA 遺伝子全長の合成 RNA を用いて、LightCycler 480(Roche)を利用した 63 $^{\circ}$ C の等温にて反応および蛍光検出を行い、検出感度について評価を行った。また、各型、各亜型の季節性インフルエンザウイルスから抽出した RNA を用いて、非特異的な反応について評価を行った。

## 3. RT-LAMP 検出系の近年流行株に対する評価

A 型検出系については、2011 年 9 月から 2012 年 10 月に分離された A 型インフルエ

ンザウイルスの MP 遺伝子配列と比較し、昨年度使用した RT-LAMP プライマー配列を再評価した。

B 型検出系については、同時期に分離された B 型インフルエンザウイルスの NS 遺伝子配列と比較し、昨年度使用した RT-LAMP プライマー配列を再評価した。

さらに、プライマーの更新前と更新後の検出系について、2011/2012 シーズン分離株のウイルス RNA を反応テンプレートとして RT-LAMP 反応を行い、検出感度の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### 1. H3 亜型 RT-LAMP 検出系の改良

昨年度のインフルエンザ POC 遺伝子検査システムに使用した H3 亜型 RT-LAMP 検出系を再評価した結果、H3-2 primers については、近年の流行株と FIP および LB primer のみにそれぞれ 1 塩基の相違が見られた。一方、H3-1 primers については、近年の流行株と比較するとほぼ全てのプライマーで配列の相違が数多く認められ、さらに H3-2 primers と混合すると非特異反応が反応開始 30 分以内に起きる事が明らかとなった。

再評価の結果、H3-2 primers については、相違が見られた配列について混合塩基に置き換え、RT-LAMP プライマーの更新を行った。また、H3-1 primers に代わり、新たに RT-LAMP プライマーセット (H3-60 primers) F3: AGCTGGTTCAGARTTCCT, B3: CGGCACATCATARGGGTAAC, FIP:

AGAGCATCTATTAGTGTGCAGTTTWC  
AAAYAGGTGAAATATGCRAC, BIP: TGG  
GAGACCCTCAGTGTGATAGTTGCTGT  
RGGCTTTGC, FL: CCATCAAGGATCTG  
ATGAGGACT, LB: AGAARTGGGACCTT  
TTTGTGAACG を新たに設計した。

## 2. 新規 H3 亜型 RT-LAMP 検出系の検出感度および特異性の検討

新規 H3 亜型 RT-LAMP 検出系について、HA 遺伝子全長の合成 RNA を用いて検出感度について検討を行った結果、100copies/reaction 程度のテンプレート濃度まで確実に検出できる感度を備えていることが示され、この時の陽性判定時間は 13 分であった。昨年度の H3 亜型検出系では、検出限界のテンプレート濃度の陽性判定時間が 18 分であったが、プライマー配列の変更により新規の H3 亜型 RT-LAMP 検出系では、陽性判定までにかかる時間を大幅に短縮できる事が明らかとなった。また、H3 亜型以外の季節性インフルエンザウイルスから抽出した RNA を反応テンプレートに使用して、特異性および非特異反応について確認を行ったところ、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ことから、今回更新した新規の H3 亜型検出系は、特異性が非常に高く、非特異反応による偽陽性がない検出系であることが明らかとなった。

## 3. RT-LAMP 検出系の近年流行株に対する評価

A 型検出系については、全 8 プライマーのうち 4 プライマーにおいて、近年流行株

と 1~3 塩基の相違が見られた。B 型検出系については、全 6 プライマーのうち 1 プライマーにおいて、近年流行株と 1 塩基の相違が見られた。相違が見られたプライマー配列は、混合塩基への変更または塩基の変更を行った。

また、プライマーの更新前と更新後の各型・亜型検出系について、2011/2012 シーズン分離株のウイルス RNA を使用して検出感度の比較検討を行ったところ、A 型および B 型検出系においては検出感度や陽性判定時間に大きな差は見られなかった。このことから、プライマー内の混合塩基が増えたことによる検出感度低下の影響は少ないと考えられた。

## D. 考察

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。

遺伝子変異の頻度が高いインフルエンザウイルスなどは、流行株に対する検出感度および特異性を維持するために、プライマーの更新を頻繁に行う必要があるものの、RT-LAMP 検出系では、最低でも 6 種類のプライマーが必要であることから、設計に技術が必要とされている。今回の検討では、A 型および B 型検出系において、プライマー領域の変更はせず、流行株との間で相違が見られた塩基のみの変更を行った。また、塩基の変更の際には、数か所であれば混合

塩基も使用可能であることが分かり、今後迅速にプライマーを更新するうえで有用な方法であると考えられる。

## E. 結論

本研究で、改良や更新を行った各検出系は、マイクロ流路チップに組み込み、本年度の臨床検体を使用した POC 遺伝子検査システムの検討に用いた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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: 73-75, 2013

大場邦弘, 小林匠, 甘利昭一郎, 生田陽二, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 野田絵理, 河野寿夫, 松井清彦, 高山郁代, 中内美名, 影山努

Reverse transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification(RT-LAMP)法を用いた A 型および H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出キットの臨床的有用性の検討

小児科臨床. 65(2): 275-279. 2012

### 2. 学会発表

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

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

田中智子, 大場邦弘, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山努

A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染により中枢神経症状をきたした 2 例

第 61 回日本感染症学会東日本地方学術集会、東京、2012 年 10 月

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学術集会、東京、2012 年 10 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

## 呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築

研究分担者 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

研究協力者

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

改田 厚、久保英幸：大阪市立環境科学研究所

### 研究要旨

本研究では核酸増幅法として知られている LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を用いて、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核酸検出系を構築し、ウイルス性呼吸器感染症診断に応用することを目的とする。本年度は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の決定、標的遺伝子部分を増幅させるプライマーセットの設計を行った。さらに、検出するウイルスの標的遺伝子を人工合成した陽性コントロールを作製し設計したプライマーセットを用いて、DNA ウィルスに対しては LAMP 法、RNA ウィルスに対しては RT-LAMP 法による核酸増幅・検出を行ったところ、陽性コントロール核酸の増幅が確認された。以上の結果から、今回設計したプライマーセットは呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系として有用であることが示唆された。今後、この検出系をマルチウェル搭載型のマイクロ流路チップと組み合わせ、ウイルス性呼吸器感染症診断に応用可能なシステムの構築を進める。

### A. 研究目的

呼吸器感染症の原因となるウイルスとしては、インフルエンザウイルス以外にも多くのウイルスが関与していることが知られている。現在、臨床現場での呼吸器感染症の診断には、迅速診断キットを用いたインフルエンザ診断が行われているが、それ以外のウイルス感染による呼吸器感染症の診断法の開発については発展途上である。今後、様々なウイルス感染による呼吸器感染症の診断が可能となれば、臨床現場におい

て患者への対処方法や薬剤選択の判断に有益な情報となる。そこで、本研究では核酸増幅法として知られている LAMP 法もしくは RT-LAMP 法を用いて、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核酸検出系を構築し、感染症診断に応用することを目的とする。

### B. 研究方法

インフルエンザウイルスを除く呼吸器感

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った。

検出候補としたウイルスの標的遺伝子を陽性コントロールとして作製した。大阪市立環境科学研究所より、候補ウイルス感染患者の検体中のウイルス核酸抽出物の分与を受け、これを鋳型として標的遺伝子の核酸増幅を行った。DNA ウイルスについてはこの増幅産物を、RNA ウイルスについては核酸増幅の際に T7 プロモーター配列を付加し、この増幅産物を用いて T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* RNA 合成を行い、これらを陽性コントロールとした。

段階希釈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い、各プライマーセットによる陽性コントロールの増幅の有無と、検出感度の確認を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

### C. 研究結果

検出候補となるウイルスとして、アデノウイルス (AdV) 2 型、4 型の 2 種類、ヒトボカウイルス (HBoV)、ヒト呼吸器合胞体ウイルス (RSV) A 型、B 型の 2 種類、ヒトコロナウイルス (HCoV) NL63、OC43、HKU1、229E の 4 種類、ヒトメタニューモウイルス (hMPV) の各ウイルスを候補として選択した。また、各ウイルスの標的遺伝子として、AdV は Hexon 領域、HBoV は NP-1 領域、RSV は Nucleocapsid 領域、HCoV は Nucleocapsid 領域、hMPV は Fusion 領域に決定した。これらの領域部分を 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を設計した。

DNA ウイルスである AdV、HBoV については、標的遺伝子の PCR 産物を陽性コントロールとして得た。RNA ウイルスである RSV、HCoV、hMPV については、T7 プロモーター配列を付加した標的遺伝子の RT-PCR 産物から T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* RNA 合成を行い、これを陽性コントロールとして得た。

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;  $1 \times 10^2$ 、AdV 4;  $1 \times 10^2$ 、HBoV;  $1 \times 10^2$ 、RSV A;  $1 \times 10^2$ 、RSV B;  $1 \times 10^2$ 、HCoV NL63;  $5 \times 10^3$ 、HCoV OC43;  $5 \times 10^3$ 、HCoV HKU1;  $> 5 \times 10^4$ 、HCoV 229E;  $2 \times 10^3$ 、hMPV;  $2 \times 10^3$  であった。

### D. 考察

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核酸検出系の構築において、本邦で比較的流行していると推測されるウイルス群を検出候補として選択した。しかしながら、これらのウイルス群が毎年流行するとは限らず、今後の本邦における流行状況も視野に入れて候補ウイルスの入れ替えも検討していく必要があると考えられる。

今回設計した各プライマーセットは、それぞれの陽性コントロールに対して LAMP 法もしくは RT-LAMP 法による増幅が確認され、呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系として有用であることが示唆された。さらに、AdV、HBoV、RSV については高い検出感



度を持つプライマーセットが設計できたが、HCoV、hMPV 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おり、より検出感度の高いプライマーセットを設計していく必要がある。

このように、本邦で流行しうる呼吸器感染症ウイルス群の高感度な核酸検出系の検討を行いつつ、この検出系を Direct RT-LAMP 法(栄研化学株式会社)とマルチウェル搭載型のマイクロ流路チップと組み合わせ、POC 遺伝子検査システム(ソニー株式会社)による呼吸器ウイルス感染症の診断システムの構築を進める。

## E. 結論

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 LAMP 法もしくは RT-LAMP 法を用いた核酸検出系を構築するために、アデノウイルス、ヒトボカウイルス、ヒト呼吸器合泡体ウイルス、ヒトコロナウイルス、ヒトメタニューモウイルスの遺伝子を検出するプライマーセットを設計した。これらのプライマーセットは、作製したそれぞれの陽性コントロールに対して LAMP 法もしくは RT-LAMP 法による核酸増幅反応を示し、核酸検出系として有用であることが示唆された。検出感度の点において検討課題も残るが、これらの点を改良しつつ感染症診断に応用可能なシステムの構築を進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami,

Takaji Wakita.

Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol, 86(19):10805-20, 2012

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard.

Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards.

Biologicals, 40(1):96-99, 2012

### 2. 学会発表

高橋 仁、原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村 繁之、田代 真人、山本 典生  
インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

原田 勇一、高橋 仁、中村 一哉、浜本 いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐 奈美、浅沼 秀樹、板村 繁之、田代 真人、山本 典生  
インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

浜本 いつき、原田 勇一、中村 一哉、高橋 仁、許斐 奈美、浅沼 秀樹、田代 真人、山本 典生  
無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分

離用細胞としての検討  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、  
2012 年 11 月

浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中  
内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、  
長谷川 秀樹、田代 真人  
細胞培養もしくは鶏卵で製造されたイン  
フルエンザワクチンの品質管理試験およ  
び免疫応答への影響

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、  
2012 年 11 月

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo  
Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko

Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro,  
Shigeyuki Itamura

Characterization of A/H1N1pdm09  
viruses isolated in egg from clinical  
specimens.

6th Orthomyxovirus Research  
Conference, Bromont-Canada, September  
2012

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |        |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得   | なし     |
| 2. 実用新案登録 | なし     |
| 3. その他    | 特記事項なし |

## 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

研究分担者 久保英幸 大阪市立環境科学研究所 研究主任

研究協力者 改田厚、入谷展弘、山元誠司：大阪市立環境科学研究所

高山郁代、高橋仁、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** ウイルス性呼吸器感染症の病原ウイルス遺伝子の迅速・簡便な検出法の構築を目的として、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開発が進められている。本研究では、大阪市感染症発生動向調査事業に供与され、かつ呼吸器ウイルスの検出が陽性となった検体を用いて、本システムで得られた結果についての実験室レベルでの比較検討を行った。その結果、多少の改良の余地はあるものの、本システムは概ね他のウイルス検出法と同様の結果を示すことが明らかとなった。

### A. 研究目的

臨床サイドでのウイルス性呼吸器感染症の診断においては、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RS ウイルスなどを対象としたいくつかの迅速診断キットが広く使用されている。これらの診断キットでは、1種類のキットで1種類の病原ウイルスの検査が可能となっている。臨床症状のみでの病原ウイルスの特定が困難な場合など、これらのうちの数種類の診断キットを組み合わせることで、病原ウイルスを特定できる可能性は高くなるが、効率的ではない。また、インフルエンザウイルス迅速診断キットの場合、A および B の型別は可能であるが、A の亜型までの区別は今のとこ

ろ不可能である。しかし、各シーズンのインフルエンザウイルス流行パターンを把握するためには、他の方法を用いて亜型までの確認を行う必要がある。実験室レベルでのウイルス性呼吸器感染症の病原ウイルスの特定手段としては、コンベンショナルおよびリアルタイムの各 PCR 法を用いたウイルス遺伝子の検出が広く行われている。さらに、複数の病原ウイルス遺伝子を一度に測定するマルチプレックス・リアルタイム PCR 法 (MR-PCR) による検出も近年応用されてきている。これらの PCR 法を用いた遺伝子検出を行うためには、煩雑な検査手技に精通した要員および専用機器を必要とすることから、実施可能な施設は限定的となってい

る。

現在開発が進められている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（本システム）は、各 PCR 法同様にウイルスの型・亜型までの特定をマルチプレックスに可能にし、また、測定に要する時間が上記各 PCR 法に比べて圧倒的に短く、さらに、操作が簡便で装置が小型であることから、臨床サイドにおける診断の補助および実験室レベルにおける迅速で簡便な病原ウイルスの特定に関して、有用性の高い遺伝子検査システムになることが予想される。本研究では、実験室レベルでの本システムの有用性についての評価を行うために、病原ウイルスが既に検出されている検体を用いて、本システムおよび既報の病原ウイルス検出法間の検査結果の比較検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. インフルエンザウイルスに対する特異性の検討

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て測定を行った。10 uL の各検体を 190 uL の専用抽出試薬に混合した後に測定を行った。また、この用量で遺伝子検出陰性となった検体に対しては、140 uL の検体から抽出した RNA を用いて測定を行い、さらに 50 uL の検体を 150 uL の専用抽出試薬に混合して測定を行った。さらに、

各検体について、インフルエンザウイルス迅速診断キット（クイックナビ<sup>TM</sup>-Flu、デンカ生研株式会社）での測定を行い、各測定結果の比較を行った。

### 2. 呼吸器ウイルスに対する特異性の検討

呼吸器ウイルス遺伝子検出用の本システムを用いて、Ad(7<sup>°</sup>ローブ<sup>2</sup>)、Ad(7<sup>°</sup>ローブ<sup>4</sup>)、HBoV、hMPV、HCoV NL63、HCoV HKU1、HCoV OC43、HCoV 229E、RSV A および RSV B に関する測定を行った。検体には、当所にて実施した MR-PCR において（改田ら、投稿準備中）、上記各ウイルス遺伝子が Ct 値 30 未満で検出された各 2 検体の計 20 検体を用いた。10 uL の各検体を 190 uL の専用抽出試薬に混合した後に測定を行った。

（倫理面での配慮）

使用した全検体は、大阪市感染症発生動向調査事業に供与されたもので、それ以外の使用に関しては、検体提供者の特定ができない状態であれば差し支えないことで、大阪市行政、医療機関および当所との間で合意している。

## C. 研究結果

### 1. インフルエンザウイルスに対する測定結果

10 uL のインフルエンザウイルス分離陽性検体を用いて測定を行った結果、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。10 uL の検体量で陰性と

なっとうがい液3検体の140 uLを用いてRNAを抽出した後に測定を行った結果、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。さらに、RNAを用いた測定でA型およびAH1pdm、また、B型遺伝子が陽性となった2検体について、50 uLの検体に150 uLの専用抽出試薬を混合した後に測定を行った結果、A型およびAH1pdm遺伝子が検出された検体ではA型遺伝子のみが、また、B型遺伝子が検出された検体では遺伝子は検出されなかった。本測定に用いた8検体のインフルエンザウイルス迅速診断キットの測定結果は、B型が分離された鼻汁3検体のみでB型陽性となった(表1)。

## 2. 呼吸器ウイルスに対する測定結果

MR-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検体について測定を行った結果、16検体においては、MR-PCRの結果と同様のウイルス遺伝子が検出されたが、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。また、MR-PCRにおいてHBoV、hMPVおよびRSV Aの遺伝子が検出された3検体においては、各特異的遺伝子の検出のほかにHCoV 229E遺伝子が非特異的に検出された(表2)。

## D. 考察

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測定では、ほぼウ

イルス分離結果と同様の遺伝子検出結果が得られたことから、本システムの特異性については検証できたものと思われる。また、迅速診断キットで陰性となっとうがい液2検体の10 uLを用いた測定においてAH1pdmが特異的に検出されたことから、本システムの検出感度は迅速診断キット以上であることが考えられた。なお、実験室レベルで本システムを応用する場合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。

呼吸器ウイルス遺伝子検出用の本システムを用いた測定では、10ウイルスのうちの6ウイルスにおいて、MR-PCRの検出結果と同様のウイルス遺伝子が検出された。このことから、これら6ウイルスに関する本システムは、MR-PCRと感度的に遜色がないものと思われた。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。

## E. 結論

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測定への応用を検討するために、インフルエンザウイルスAH1pdmまたはB型の分離が陽性となった8検体、およびMR-PCRにて各呼吸器ウイルス遺伝子が検出された計20検体を用いて、それぞれで既に得られている

結果および本システムでの測定結果についての比較検討を行った。その結果、今後の検討課題は多少存在するものの、インフルエンザウイルスおよび呼吸器ウイルスの実験室レベルでの遺伝子検出システムとして、迅速・簡便な点も含めて、本システムは有用であるものと思われた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Ohyama M, Goto K, Hase A, Iritani N: Detection of five rash-associated viruses using multiplex real-time PCR during 2006-2011. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65: 430-432, 2012
- 2) Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Hase A, Iritani N: Enterovirus 104 infection in adult, Japan, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 882-883, 2012
- 3) 改田厚, 久保英幸, 入谷展弘, 関口純一郎, 長谷篤: ヒトパラインフルエンザウイルス感染症. *臨床とウイルス*, 40: 142-149, 2012
- 4) 久保英幸, 改田厚, 入谷展弘, 関口

純一郎: 大阪市における 2011/12 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析. *大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報*, 74: 1-4, 2012

- 5) 改田厚, 関口純一郎, 久保英幸, 入谷展弘, 後藤薫, 長谷篤: 手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出. *大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報*, 74: 5-9, 2012

### 2. 学会発表

国内会議

- 1) 改田厚, 久保英幸, 関口純一郎, 入谷展弘: 呼吸器感染症患者からのエンテロウイルス 104 型の検出および遺伝子解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市, 2012

## H. 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

表 1. インフルエンザウイルス分離陽性検体を用いたインフルエンザウイルス遺伝子  
検出用マイクロ流路チップでの測定結果

検体番号	分離株の 型・亜型*	検体種類	検体使用量			迅速診断キットで の測定結果 <sup>§</sup>
			10 uL	50 uL	140 uL <sup>#</sup>	
12-1560	AH1pdm	うがい液	A+, H1pdm+	ND <sup>&amp;</sup>	ND	-
12-1632	AH1pdm	うがい液	-	ND	A+, H1pdm-	-
12-1633	AH1pdm	うがい液	-	A+, H1pdm-	A+, H1pdm+	-
12-1634	AH1pdm	うがい液	A+, H1pdm+	ND	ND	-
12-1493	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+
12-1538	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+
12-1761	B	うがい液	-	-	B+	-
12-1769	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+

\* : MDCK 細胞を用いて各検体から分離されたインフルエンザウイルス株の型・亜型

# : 検体 140 uL から RNA を抽出して測定を行った

§ : クイックナビ<sup>TM</sup>-Flu(デンカ生研株式会社) に検体 50 uL を混合し、測定を行った

& : 測定未実施

表 2. マルチプレックス・リアルタイム PCR 法でウイルス遺伝子が検出された検体を用いた  
呼吸器ウイルス遺伝子検出用マイクロ流路チップでの測定結果

検体番号	検出ウイルス*	検体種類	Ct値 <sup>#</sup>	特異的検出	非特異的検出
12-680	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 2)	咽頭ぬぐい液	22.9	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 2)+	-
12-1303	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 2)	咽頭ぬぐい液	23.8	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 2)+	-
12-626	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 4)	鼻汁	26.1	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 4)+	-
12-719	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 4)	鼻汁	24.0	Ad(7 <sup>°</sup> α-7 <sup>°</sup> 4)+	-
12-125	HCoV	鼻汁	23.2	HCoV +	HCoV 229E +
12-245	HCoV	咽頭ぬぐい液	22.7	HCoV +	-
12-195	hMPV	鼻汁	19.3	-	HCoV 229E +
12-240	hMPV	鼻汁	24.8	-	-
12-388	HCoV NL63	鼻汁	26.0	HCoV NL63 +	-
12-1506	HCoV NL63	鼻汁	26.7	HCoV NL63 +	-
11-1382	HCoV HKU1	鼻汁	25.0	-	-
11-1395	HCoV HKU1	鼻汁	21.0	-	-
12-28	HCoV OC43	鼻汁	22.0	HCoV OC43 +	-
12-1375	HCoV OC43	鼻汁	19.0	HCoV OC43 +	-
11-1486	HCoV 229E	鼻汁	23.9	HCoV 229E +	-
11-1514 <sup>§</sup>	HCoV 229E	鼻汁	28.1	HCoV 229E +	-
	RSV A			RSV A +	
12-129	RSV A	鼻汁	23.0	RSV A +	-
12-1359	RSV A	鼻汁	21.8	RSV A +	HCoV 229E +
12-814	RSV B	鼻汁	26.0	RSV B +	-
12-861	RSV B	鼻汁	20.8	RSV B +	-

\* : マルチプレックス・リアルタイム PCR で遺伝子が検出されたウイルス

# : マルチプレックス・リアルタイム PCR で得られた Ct 値

§ : マルチプレックス・リアルタイム PCR で HCoV 229E および RSV A が共検出された検体

## 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

研究分担者 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 研究員  
研究協力者 中内美名、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** インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の NA 遺伝子における新規薬剤耐性マーカー S247N 変異を検出する迅速、簡便な duplex one-step real-time RT-PCR 法を構築した。本方法は、既存の H275Y 変異検出系と併せて使用することが可能であり、近年報告された H275Y 変異と S247N 変異の両薬剤耐性マーカーを有し、非常に高度な薬剤耐性能を獲得した変異株をスクリーニングする上で有用である。

### A. 研究目的

現在、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。2009 年にパンデミックインフルエンザウイルス(A(H1N1)pdm09)が出現した後も、世界中で薬剤耐性株が散発的に検出されるも、大規模な薬剤耐性株の流行はない。しかし、日本は世界最大の NAI の使用国であるため、薬剤耐性株の出現をモニターするためにも持続的な薬剤耐性株サーベイランスを行う事が非常に重要である。2010/2011 シーズン以降、当所で構築した A(H1N1)pdm09 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) を検出する duplex one-step real-time RT-PCR 法は、主に全国の地方衛生研究所が行っているインフル

エンザウイルス A(H1N1)pdm09 の薬剤耐性株サーベイランスに用いられている。  
( Nakauchi et al. J. Med. Virol. 83:1121-1127, 2011)

最近、新たな薬剤耐性マーカーとして 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) が報告された。この S247N 変異は単独では薬剤耐性能をほとんど示さないが、H275Y と S247N の両方の変異があると、オセルタミビルに対して H275Y 変異単独よりも高度に耐性化する事が報告されている。また、S247N 変異を持つ株は、2010 年 12 月以降、アジア太平洋エリアで検出されており、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いる。本研究では、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



検出法の構築を行った。

## B. 研究方法

### 1. S247N 変異検出 duplex one-step RT-PCR 法の構築

H275Y 変異と同時に検出することを想定し、以前に当所で構築した、duplex one-step real-time RT-PCR 法を用いた A(H1N1)pdm09 の H275Y 変異検出系と同一の反応条件および解析方法を使用した。具体的には、QuantiTect Virus + ROX Vial Kit (Qiagen) を使用し、反応系 20  $\mu$ L 中 2  $\mu$ L をテンプレートとした。また、forward および reverse プライマーは H275Y 変異検出系と同じ配列を使用し、反応液中の最終濃度が各 600nM、S247N 変異検出用 TaqMan MGB プローブは、過去 3 年間にヒトで流行した A(H1N1)pdm09 亜型インフルエンザウイルスの NA 遺伝子配列のアライメントを元に、それらの共通領域内に S247(A(H1N1)pdm09 の NA 遺伝子の 740 番目の核酸が G) および N247(同じく A) の検出用プローブを各 1 本設計し、それぞれ反応液中の最終濃度が 100nM になるように使用した。反応および解析は、LightCycler 480 (Roche) を使用して行い、反応終了後に蛍光のエンドポイント解析を行った。

### 2. S247N 変異検出系の検出感度および特異性の確認

S247 および N247 の NA 遺伝子の合成 RNA を用いて S247N 変異検出系の検出感度および特異性の検討を行った。合成 RNA の作製にあたっては、A(H1N1)pdm09 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 増幅産物を鋳型とし、T7 RiboMAX Express Kit (Promega) を使用して in vitro 転写反応により合成を行っ

た後、TURBO DNase (Ambion) で鋳型 DNA およびプライマーを分解し、さらに残存する dNTPs および NTP を MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) によって取り除いた。合成 RNA のコピー数は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) により UV 吸光度測定を行い、測定した濃度から算出した。

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。その際の陽性コントロールには、前述の合成 NA 遺伝子をそれぞれ 3 点ずつ ( $2.0 \times 10^1$ 、 $2.0 \times 10^3$ 、 $2.0 \times 10^5$  copies/reaction) おいた。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### 1. S247N 変異検出 duplex one-step RT-PCR 法の構築

TaqMan MGB プローブは、A(H1N1)pdm09 の S247 薬剤感受性株を検出する VIC 標識プローブと N247 薬剤耐性株を検出する FAM 標識プローブをそれぞれ設計した。各プライマーの配列は、5'-(VIC)CCATYACTYGGTC(MGB)-3'、5'-(FAM)CCATYATTYGGTC(MGB)-3' である。この領域は、H275Y 変異検出系で用いる forward および reverse プライマーに挟まれているため、S247N 変異検出系でも同じプライマーが共用可能であった。

### 2. S247N 変異検出系の検出感度および特異性の確認

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  $2.0 \times 10^1$  から  $2.0 \times 10^8$

copies/reaction の範囲で直線性のある反応を示し、PCR 効率はそれぞれ 97.2%、96.7% と正確な対数線形関係を示した(図 1)。

また、S247 および N247 保有株のウイルス培養上清を使用して、S247N 変異検出系の特異性について検討を行った結果、N247 を保有する 3 株と S247 を保有する 4 株の全てにおいて NA タンパク質の 247 番目のアミノ酸が N247(740 番目の核酸が A)か S247(740 番目の核酸が G)であるかどうかの判定を正確に行うことができた(図 2)。

#### D. 考察

今回新たに構築した S247N 変異検出系は、以前、本所で構築した H275Y 変異検出系と同様に、迅速、簡便に S247N 変異を検出できる初めての方法である。また、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も可能であり、検出感度、特異性の検討においても、感度かつ特異度の高さが示され、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非常に有用と考えられた。

#### E. 結論

S247N 変異が H275Y 変異と同時に起こると、臨床的にも深刻な非常に高度な薬剤耐性能を獲得するため、S247N 変異も H275Y 変異と併せて監視すべきである。今回構築した S247N 変異株の検出方法は、現在全国の薬剤耐性株サーベイランスで使用している H275Y 変異を検出する duplex one-step RT-PCR 法に対して、S247N 変異検出用のプローブを新たに準備するだけで導入することが可能であり、S247N 変異株

のスクリーニングに非常に有用な方法であると言える。今後、国内での薬剤耐性株サーベイランスを強化するためにも、新たな薬剤耐性マーカーが同定された場合には、本研究で行ったように新規検査法を構築して、薬剤耐性株のモニターを直ぐに行える体制を整えておく事が非常に重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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: 73–75, 2013

##### 2. 学会発表

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

#### 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

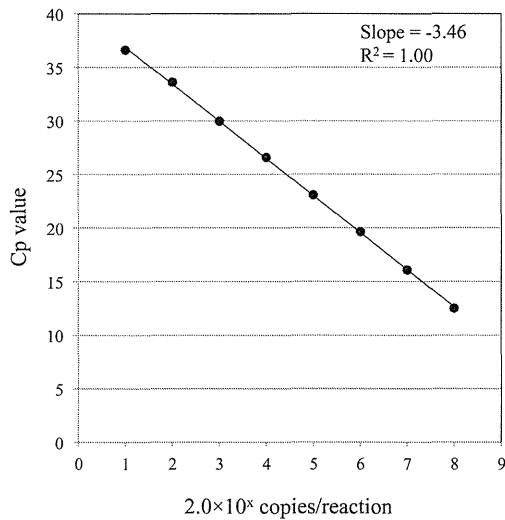
該当なし

##### 3. その他

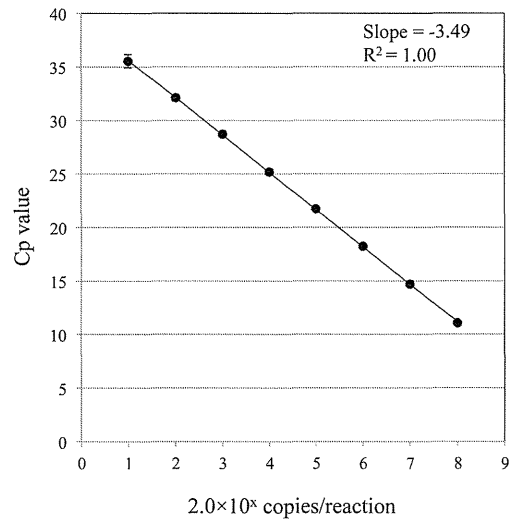
該当なし

図1 S247N 変異検出系の検出範囲

(A)

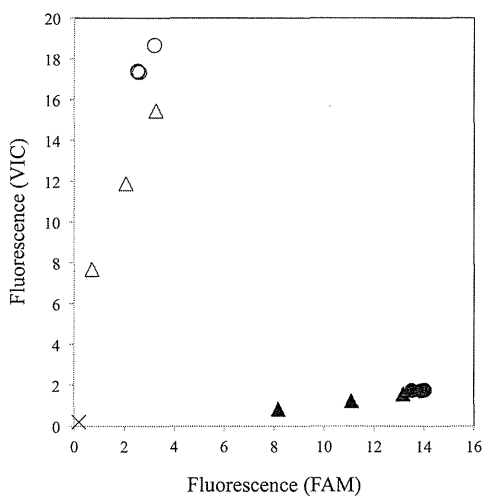


(B)



A/Perth/265/2009 (A) および A/Perth/29/2011 (B) の NA 遺伝子の合成 RNA を段階希釈したものをテンプレートとして描いた標準曲線 (Cp 値と log<sub>10</sub> の RNA 濃度を各軸においた)。Cp 値は 5 回の反応の結果の平均をとした。標準曲線の相関係数と傾きは、各グラフの右上に示した。

図2 ウイルス培養上清を使用した S247N 変異検出系の蛍光のエンドポイント解析



y 軸に S247 (VIC)、x 軸に N247 (FAM) の蛍光をそれぞれプロットした。S247 と判定されたウイルス上清は○で、N247 と判定されたウイルス上清は●で示した。陽性コントロールとした A/Perth/265/2009 (S247 保有株) および A/Perth/29/2011 (N247 保有株) はそれぞれ△、▲で示した。陰性コントロールは、×で示した。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表