

201318004A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 努

平成 26(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 努

平成 26 (2014) 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）

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

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

所属施設：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 室室長

氏名：影山 努

研究分担者

所属施設：公立昭和病院小児科 医長

氏 名：大場邦弘

所属施設：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

氏 名：高山郁代

所属施設：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

氏 名：高橋 仁

所属施設：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

氏 名：中内美名

所属施設：大阪市立環境科学研究所 研究主任

氏 名：久保英幸

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3) P. 13

研究分担者：大場邦弘

研究協力者：澄田奏子、渡邊隆明、今村剛朗、松吉健夫、佐々木庸郎、山口和将、
小島直樹、稲川博司、岡田保誠、小田智三、加藤昭生、古谷智子、小花奈都子、
林健太、村田岳哉、野田雅裕、石川涼子、吉田知広、野田絵理、小鍛治雅之、
高橋仁、高山郁代、中内美名、影山努

2. C型インフルエンザウイルスおよびA/H7N9鳥インフルエンザウイルス RT-LAMP

検出系の構築 P. 21

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. 25

研究分担者：高橋 仁

研究協力者：高山郁代、中内美名、影山 努、改田 厚、久保英幸

4. 季節性インフルエンザウイルス分離陽性うがい液を用いた POC 遺伝子検査システム、
マルチプレックス・リアルタイム PCR 法、および迅速診断キットにおける検出感度の
比較 P. 29

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、中内美名、高橋 仁、影山 努

5. POC 遺伝子検査システムによるインフルエンザの型・亜型同定法の開発 P. 37

研究分担者：高山郁代

研究協力者：中内美名、高橋 仁、影山 努

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P. 43

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および H7N9 亜型鳥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。また複数のインフルエンザウイルス遺伝子を同時に型・亜型毎に検出する事が可能であるため、季節性インフルエンザおよび H7N9 亜型鳥インフルエンザの診断が可能である。また、これらインフルエンザを鑑別診断できることから、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスなどを由来とするパンデミックインフルエンザウイルスの出現時には、除外診断にも利用可能である。また、本システムを使用すれば、新型インフルエンザや新興・再興感染症発生時における病原体診断への活用、呼吸器ウイルス感染症診断への活用、リアルタイムサーベイランスへの活用も可能である。本研究では、診断・予防・医療水準の向上を図る事を目的に、医療現場で検体採取から 20 分以内に、高感度かつ迅速診断キットと同程度の簡単な操作で、コンタミネーションリスクがない同時に多項目かつ簡便に特異的かつ高感度な Point of care (POC) 遺伝子検査システムを構築し、季節性インフルエンザ、鳥インフルエンザ、呼吸器ウイルス感染症の鑑別診断に応用するための臨床的研究を行った。

A. 研究目的

東南アジアや中東では、A/H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が今もなお報告され続けている。中国では H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスによる初のヒト感染例が 2013 年 3 月に報告され、またそれ以外にも他にも 2013 年だけで H6N1、H7N7、

H8N2、H10N8 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が報告されている。この年カナダでは北米初の A/H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス輸入感染例が報告されている。

さらに、北米では A/H1N2、A/H3N2 豚インフルエンザウイルスのヒトへの感染例も毎年報告

されており、これら鳥もしくは動物インフルエンザウイルスを起源としたパンデミックインフルエンザウイルスの出現や、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などが危惧されており、パンデミック発生時の感染拡大防止のための緊急対応が必要である。

このような鳥もしくは動物インフルエンザウイルスを起源とするパンデミックインフルエンザウイルスの出現に備え、これまでリアルタイム 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行ってきた。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 (H1pdm09) 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。同様にして、2013 年に H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が中国で拡大した際には、全国規模での検査体制を短期間のうちに確立している。

しかし、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。

そこで、病院や診療所等の臨床現場でも簡便にインフルエンザウイルスの型・亜型同定を行えるように、検体からの核酸精製を必要としない Direct RT-LAMP 法(Journal of Medical Virology 83:10-15, 2011)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 Point of care (POC)遺伝子検査システムの開発を行った。

病院やクリニック等の臨床現場で鳥インフルエンザウイルスなど感染の疑いがある場合は、季節性インフルエンザウイルスとの鑑別診断が有用である。しかし、病院やクリニック等の臨床現場では、インフルエンザウイルスの A 型(一部のキットでは H1pdm09 も判別可能)および B 型しか同定する事ができず、H7N9 や H5N1 亜型の鳥インフルエンザウイルスと区別することができない。さらに、インフルエンザの迅速診断キットは、ウイルス抗原検出系のため感度・特異性が低く、ウイルス排出量が少ない病初期の検出は困難である。また、各シーズンのインフルエンザウイルス流行パターンを正確に把握するためには、亜型までの確認を行う必要があるため、型・亜型を高感度・特異的に、かつ核酸精製を必要としない簡便な方法で遺伝子検査により同定できる方法の開発は重要である。

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、医療現場で迅速診断キットが普及しているインフルエンザウイルス、RS ウイルスなどを除き、ウイルス性呼吸器疾患の詳細はほとんど不明であり、特に乳幼児のウイルス性呼吸器感染症における実態を把握するためには、同時に多項目の呼吸器ウイルスを検出可能な診断法を構築しそのウイルスの性状を解析する事が重要である。

POC 遺伝子検査システムは臨床現場で迅速な病原体同定が可能なため、本システムを呼吸器ウイルス感染症の鑑別診断に応用し、ベットサイドにおいて早期にウイルス性呼吸器感染症の診断が可能になれば、リアルタイム病原体サーベイランスを行う事も可能となり、地域の感染症流行状況をこのリアルタイムに把握できるようにもなり、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や入院患者の院内感染の予防などにも役立つと

考えられる。

本研究では、医療現場でも簡便に特異的かつ高感度に、例えばインフルエンザウイルスであれば型・亜型同定可能な Point of care (POC) 遺伝子検査システムの構築を目指し、検体採取から 20 分以内に、高感度かつ迅速診断キットと同程度の簡単な操作で、コンタミネーションリスクのない多項目の POC 遺伝子検査を行える病原体診断システムを構築し、季節性インフルエンザや鳥インフルエンザの鑑別診断あるいは新型インフルエンザや新興・再興感染症発生時における病原体診断への活用、ウイルス性呼吸器感染症診断への活用、リアルタイムサーベイランスへの活用を目的に臨床的評価を行った。

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. 小児における風邪の一因である C 型インフルエンザウイルスおよび新たに中国においてヒトでの感染が拡大している H7N9 亜型鳥インフ

ルエンザウイルスについて Direct RT-LAMP 法による特異的検出法の構築を行った。C 型インフルエンザウイルス検出系に関しては、これまでに流行したウイルス株の MP 遺伝子上の保存領域にプライマーセットを設計した。A/H7 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系に関しては A/Anhui/1/2014 (H7N9) 株の HA 遺伝子配列をもとにプライマーセットを設計した。

それぞれの検出系のターゲット遺伝子全長の合成 RNA を用いて検出感度の検討を行った。また、近年ヒト間で流行しているインフルエンザウイルスや他の H7 亜型および H5 亜型のトリインフルエンザウイルスから抽出した RNA を用いて特異性の検討を行った。

2. 2013/14 シーズンに採取された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、Direct RT-LAMP 法を利用したインフルエンザウイルスの型・亜型同定が可能な[A 型・B 型・C 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型]マイクロ流路チップ・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・C 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型)の検出感度・特異性について比較検討を行った。公立昭和病院小児科の外来の一区画でインフルエンザ POC 遺伝子検査システム(インフルエンザウイルスの型・亜型同定)およびイムノクロマト法(亜型同定はなし)の評価検討を行い、国立感染症研究所では採取検体より RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR 法により型・亜型の同定およびウイルス分離を行った。

3. インフルエンザ流行期に鑑別が必要となるアデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RS ウイルス A 型・B 型の呼吸器ウイルスを検出できる検出系を Direct RT-LAMP 法により構築し、これをマイクロ流路チップに搭載し、POC 遺伝子検査シス

テムを用いて臨床検体からこれらウイルスが検出できるかどうかの検討を、公立昭和病院小児科の外来の一区画で行った。また、国立感染症研究所では採取検体より抽出した核酸を用いてリアルタイム RT-PCR 法によりウイルスの同定を行い POC 遺伝子検査システムの評価を行った。なお、対象検体は、2012/13 シーズンに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、咽頭ぬぐい液、気管吸引液)のうち、インフルエンザウイルス陰性であった検体を無作為に抽出して本研究に用いた。

4. 2013/14 シーズンに大阪市感染症発生動向調査事業に供与され、さらに季節性インフルエンザウイルスが分離可能となった患者うがい液計 38 検体について、POC 遺伝子検査システム、Multiplex RT-PCR (MR-PCR)法および迅速診断キットを用いて検出感度の検討を行った。POC 遺伝子検査システムでは、患者うがい液 50 μ l を専用抽出試薬 125 μ l に混合したものを検査材料とした。また、一部の検体については、うがい液原液を PBS(-)で 10 倍希釈した液 50 μ l を上記同様に混合したものについても測定を行った。MR-PCR 法では、患者うがい液 140 μ l から QIAcube (キアゲン)を用いて、RNA を 60 μ l の専用試薬にて抽出し、そのうちの 15 μ l を用いて逆転写反応を行い、得られた cDNA 液 30 μ l 中の 2 μ l (1ウェル)を測定に用いた。迅速診断キットの測定には、クイックナビTM-Flu (デンカ生研)を使用し、患者うがい液 150 μ l を検体浮遊液に混合したものを検査材料とした。

5. 昨年度までに構築した呼吸器感染症ウイルス群の POC 遺伝子検査システムのヒトコロナウイルス(HCoV)の HKU1、229E 検出系は、検出感度が低く、交差反応が見られる事もあったため、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 法を用いたこれらウイルスおよび新たに構築したヒトパラインフルエンザウイルス 3 型(hPIV3)の検出系について検出感度および特異性の評価検討を行った。

6. 新たに構築した A/H7N9 亜型および C 型インフルエンザウイルスの RT-LAMP 検出系を POC 遺伝子検査システムに組み込み、POC 遺伝子検査システムにおけるインフルエンザ検査系の各項目(A 型・B 型・C 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型・H7 亜型)の検出感度について詳細な検討を行った。各型・亜型のウイルスもしくはウイルスが含まれる臨床検体から抽出した RNA を用い、A 型および C 型インフルエンザウイルスについては M 遺伝子、B 型インフルエンザウイルスについては NS 遺伝子を real-time RT-PCR 検査系で定量しておき、検出感度の比較検討を行った。

POC 遺伝子検査システムの検出感度の検討は、C 型インフルエンザ検査系については、A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型、C 型の 5 検出系が搭載されたマイクロ流路チップを使用し、その他の検査系については、A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型、A/H7N9 亜型の 5 検出系が搭載されたマイクロ流路チップを使用して行った。抽出 RNA は蒸留水で 5 倍～10 倍階段希釈を行い、各濃度 5 枚ずつの検査チップを用いて検討を行い、得られた結果から、陽性検出率が 95%となる RNA 濃度をプロビット法により求め、この値を各項目の検出限界値とした。

C. 研究結果

1. C 型インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系の検出感度は 100copies/reaction 程度である事が示された。また、C 型インフルエンザウイルス以外の季節性インフルエンザウイルスとの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。

A/H7 亜型 RT-LAMP 検出系の検出感度に

ついて検討を行った結果、50copies/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た。また、A/H5 亜型や他の A/H7 亜型鳥インフルエンザウイルスから抽出した RNA を用いて特異性の検討を行ったところ、今回新たに構築した A/H7 亜型 RT-LAMP 検出系は、現在中国大陸でヒトでの感染が拡大している A/H7N9 亜型のトリインフルエンザウイルスの HA 遺伝子の特異的に検出することが明らかとなった。また、ヒトで流行している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、特異性および非特異反応の検討を行ったところ、他の型・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. インフルエンザチップに関しては、49 症例のうちリアルタイム RT-PCR 法でインフルエンザ A 型は 18 症例が陽性であり、そのうち 16 症例が H1 pdm 09 亜型陽性、2 例が H3 亜型陽性であった。インフルエンザ B 型は 19 症例が陽性であった。リアルタイム RT-PCR 法に対する POC 遺伝子検査システムの感度は、インフルエンザ A 型が 94.4%、H1pdm09 亜型が 87.5%、H3 亜型が 100%であった。インフルエンザ B 型は 89.5%であった。特異度は、インフルエンザ A 型、H1pdm09 亜型、H3 亜型、インフルエンザ B 型のすべてが 100%であった。C 型インフルエンザウイルスは検出されなかった。

2013/2014 シーズンはインフルエンザ A 型と H1pdm09 亜型が偽陰性の症例が 1 例あったが、発症 5 日目で抗インフルエンザ薬の投与がない検体であり、リアルタイム RT-PCR 法の結果は、共に検出限界付近の検体であった。インフルエンザ A 型は陽性であったが H1pdm09 亜型が偽陰性の症例が 1 例あったが、発症日が不明で、抗インフルエンザ薬の投与がなされた後の検体であった。インフルエ

ンザ B 型が偽陰性の症例が 2 例あったが、発症 7 日目、13 日目に採取されており、いずれも発症後長時間経過してからの検体であった。

3. 呼吸器系チップに関しては、5 症例について検討を行った。その結果、リアルタイム RT-PCR 法で 3 症例がアデノウイルス 2 型陽性、1 症例がヒトボカウイルス陽性であった。POC 遺伝子検査システムではアデノウイルス 2 型、ヒトボカウイルスが 1 症例ずつ陽性であった。

4. うがい液計 38 検体から分離されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm が 23 株、AH3 亜型が 9 株、および B 型が 6 株 (Yamagata 系統 3 株および Victoria 系統 3 株)であった。POC 遺伝子検査システムでは、22 検体(57.9 %)において A および B 型 (A 型の場合は各亜型まで)が検出できた。また、A 型の型または亜型のいずれかが検出可能となったものを含めると、30 検体(78.9 %)で検出が可能であった。MR-PCR 法では、32 検体(84.2 %)において各型および A 型の各亜型まで検出できた。また、A 型の型または亜型のいずれかが検出可能となったものを含めると、37 検体(97.4 %)でインフルエンザウイルス遺伝子が検出できた。迅速診断キットでは、5 検体(13.2 %)で A 型の検出が可能であった。

5. 各ウイルスの標的遺伝子として、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3) は hemagglutinin - neuraminidase 領域、ヒトコロナウイルス(HCoV)の HKU1、229E の 2 種類については Nucleocapsid 領域に決定した。これらの領域部分を LAMP 法により増幅させるプライマーセットを設計した。

in vitro RNA 合成した陽性コントロールを用いて、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、hPIV3; 5x102、HCoV HKU1; 2x103、HCoV 229E; 2x102 であった。

6. 各 RNA 濃度における陽性検査チップ数および、その結果から求めた検出限界値は、表の通りとなった。A 型検出系に対する検討では、A/Anhui/1/2013(H7N9)のウイルス RNA を用いた際に、一部 10 倍階段希釈でテンプレートの調製を行ったため、その結果については参考結果となるものの、その他 2 株のウイルス RNA を使用した結果から、検出限界値は、real-time RT-PCR 検査系と比較し、ほぼ同等から 10 倍以内の感度差であることが示された。

他の検出系の検出限界値は、real-time RT-PCR 検査系と比較し、B 型検出系では、ほぼ同等から 2 倍以内の感度差であることが示され、A/H3 亜型ならびに A/H7 亜型検出系では 10 倍以内の感度差であることが示された。

一方、C 型および A/H1pdm 亜型検出系では、real-time RT-PCR 検査系と比較して 30~50 倍の感度差となった。

D. 考察

[インフルエンザ POC 遺伝子検出システム]

今回新たに構築した Direct RT-LAMP 法による A/H7 亜型インフルエンザウイルスおよび C 型インフルエンザウイルス検出系は、どちらも特異性が高く非特異反応による偽陽性のない検出系である事が明らかとなった。また、POC 遺伝子検出システムに搭載した場合でも、real-time RT-PCR 検査系と比べて検出感度差は 30 倍以内であり、以前に構築した A 型、B 型、H1pdm09 亜型、H3 亜型検出を搭載したマイクロ流路チップを POC 遺伝子検出システムに導入すれば、臨床検体のインフルエンザウイルス型・亜型同定を高感度かつ特異的に行う事が可能となる。また、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

い検査であることが確認でき、本手法による遺伝子検査はポイント・オブ・ケア検査として保健所や 1 次医療を担う診療所でも実施できる遺伝子検査と考えられた。

なお、昨年度の本検討では、POC 遺伝子検査システムの陽性・陰性判定までの反応時間を短縮することができたが、その反面、偽陽性が出現する検出系も存在したため、試薬組成を変更して特異性を上げる必要があった。今回の試薬組成の変更により、インフルエンザウイルスの型・亜型同定は、臨床検体を用いた場合、陽性判定までの反応時間はおおよそ 15 分前後と前年度より長くはなったが、検査の迅速性を保ったまま、偽陽性が出現する事もなくなった。今後は、検出感度をこのまま維持しつつ、より短い反応時間で済むように試薬改良が必要である。

また、実験室診断において今回はうがい液についても検討を行った。うがい液においては、咽頭ぬぐい液や鼻汁液検体などとは異なり、液中のインフルエンザウイルス濃度が希薄な状態であるが、今回の POC 遺伝子検出システムにおいては高感度で各遺伝子の検出が可能になることが示唆された。A 型の型・亜型および B 型が検出可能となった場合の検出率は 57.9 %、さらに A 型の型または各亜型のいずれかが検出可能となった場合を含めた検出率は 78.9 %であった。現行の迅速診断キット同様の判定基準を用いた場合、その検出率 (78.9 %)は迅速診断キットの検出率(13.2 %)を大幅に上回ることから、うがい液においても POC 遺伝子検査システムの臨床診断応用は有用であることが考えられた。

POC 遺伝子検査システムは、マルチプレックスな病原性ウイルスの遺伝子検出検査を迅速・簡便に実施可能であることが、これまでの遺伝子検査法とは異なるメリットである。2013 年 4 月に、中国渡航からの帰国者でインフルエンザ様疾患を発症し、迅速診断キットでの検査の結果、インフルエンザウイルス A 型と診断

された患者が大阪市内で発生した。この患者はインフルエンザウイルス A(H7N9)型に罹患した可能性が考えられるとして、当患者の咽頭ぬぐい液検体を採取し、当所において A、H7、H1pdm および H3 に対するリアルタイム RT-PCR 遺伝子検査が実施された。このリアルタイム RT-PCR 検査に平行して POC 遺伝子検査システムを用いても検査を実施したところ、本システムにおいて AH3 亜型が数 10 分後に先行して検出されたことから、その約 2 時間後に得られたリアルタイム RT-PCR 検査結果は、POC 遺伝子検査システムでの検査結果を確認するものとなった(結果は示していない)。また、POC 遺伝子検査システムにおいて検査可能としている病原性ウイルスの遺伝子が本システムにおいて不検出となった場合は、検査可能ウイルスの存在を否定する、いわゆる除外診断が可能であることから、本システムは新興・再興感染症に対する緊急的な迅速診断法として、非常に有用であると考えられた。

[呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築および臨床的評価]

POC 遺伝子検査システムはマルチウェル搭載のためインフルエンザが陰性であっても他の呼吸器感染ウイルスを網羅的に検出できれば、検査の更なる特異性を担保できるものと考えられる。そのため、今回、インフルエンザ流行期に鑑別が必要となるアデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RSウイルス A 型・B 型の検出系をマイクロ流路チップに搭載し、臨床検体を用いて検出を試みた。その結果、アデノウイルス 2 型、ヒトボカウイルスを 1 例ずつ同定することができた。しかし HCoV 229E では、非特異反応が見られることが多かったため、HCoV 229E と検出感度が低い HCoV HKU1 の検出系について改良を行った。また、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、検出するウイルス群の選択は重要であり、本研究では本邦における流行状況や感染による重篤度を指標として候補ウイルス群の選択をこれまで行ってきた。このような指標をもとに、今年度は新たな検出候補として、乳幼児や高齢者に感染すると肺炎や気管支炎などの重篤な症状を引き起こすことがあるヒトパラインフルエンザウイルス 3 型(hPIV3)を選択し、検出系の構築を行った。

今回の検討により、改良した各検出系および新規の検出系がそれぞれ高感度・特異的であり、これらの検出系も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。

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構築を行った。この検出系をマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと組み合わせることにより、感染症診断に使用可能なシステムの構築が期待される。

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せず、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(A 型・B 型・C 型)、亜型(H1pdm09 亜型・H3 亜型・H7 亜型)診断を同時に行う事ができるインフルエンザ POC 遺伝子検査システムを構築した。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、免疫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迅速検査である。また同時に複数の検査を行う事も可能であるため、季節性インフルエンザの診断のみならず、鳥インフルエンザウイルスの同定やインフルエンザ A 陽性、H3 亜型・H1pdm09 亜型が陰性であった場合、他の亜型である事も類推する事ができ、保健

所や1次医療を担う診療所などの臨床現場で鳥インフルエンザなどに由来する他の亜型同定にも応用可能である。また、インフルエンザが陰性であっても、今回構築した他の呼吸器感染ウイルスを網羅的に検出できる検出系を用いれば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に有用と考えられる。

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内での感染拡大の防止にも役立つと考えられる。

また、POC 遺伝子検査システムのベースとなっている蛍光 RT-LAMP 法は、検疫所や地方衛生研究所が所有しているリアルタイム PCR 機器の利用が可能である。POC 遺伝子検査システムが市販されてこれらの施設で使えるようになるまでまだ時間がかかるため、それまでの間は本研究で構築した各検出系について、蛍光 RT-LAMP 法による汎用機器を用いた遺伝子検査を行う事が可能である。本年度から成田空港検疫所と関西空港検疫所において、汎用のリアルタイム PCR 装置と8連チューブを使用した RT-LAMP 法によるインフルエンザの各型・亜型同定法の検討を開始し、これら検疫所では迅速遺伝子検査によるインフルエンザウイルスの型・亜型同定が可能となっている。今後、他の検疫所や地方衛生研究所での活用が期待される。

研究協力者

成田空港検疫所と関西空港検疫所での検討は、検査課の職員のほか、以下の検疫課の職員の協力により行っていた。

成田空港検疫所

本馬恭子、牧江俊雄、磯田貴義、古市美絵子

関西空港検疫所

浜田勝、京極郁夫、近藤環、上野健一、佐野友美、石原園子、黒田友顕

F. 研究発表

(研究代表者分のみ、分担研究者発表分については各項参照)

1. 論文発表

- 1) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama 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 158(4):859-876, 2013
- 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) Miho Kobayashi, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Hiroyuki Tsukagoshi, Mika Saitoh, Taisei Ishioka, Yoko Yokota, Hirokazu Kimura, Masato Tashiro, Kunihisa Kozawa. Novel Reassortant Influenza A(H1N2) Virus Derived from A(H1N1)pdm09 Virus Isolated from Swine, Japan, 2012. Emerg Infect Dis. 19(12):1972-1974, 2013
- 4) Tsutomu Kageyama, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Hong Xu, Shinya Yamada, Yuko Uchida, Gabriele Neumann, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. Euro

Surveill. 18(15). 20453-20468, 2013. Erratum in: Euro Surveill. 18(16):20459, 2013.

- 5) Atsushi Yamanaka, Akira Iwakiri, Kouji Sakai, Singh Harpal, Daisuke Himeji, Ikuo Kikuchi, Akira Ueda, Shogo Yamamoto, Miho Miura, Yoko Shioyama, Mikiko Kawano, Kazunori Iryouda, Hideo Yakamatsu, Takeshi Kobayashi, Yuta Kanai, Takehiro Kawagishi, Noriyo Nagata, Shuetsu Fukushima, Tetsuya Mizutani, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Ichiro Kurane, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Acute respiratory tract infection caused by a novel orthoreovirus classified into the Nelson Bay orthoreovirus group. PLoS ONE 9(3): e92777, 2014.
- 6) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. Journal of Virological Methods (in press)

2. 学会発表

国内会議

- 1) 大場邦弘, 田中智子, 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および RS ウイルス感染症診断の臨床的検討. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2013 年 10 月
- 2) 林 健太, 加藤昭生, 大場邦弘, 小鍛冶雅之, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名,

- 影山 努. インフルエンザ A/H3N2 感染を契機に発症した横断性脊髄炎の 4 歳男児. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013 年 10 月
- 3) 影山 努, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 田代真人, 大場邦弘, 改田 厚, 久保英幸. Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルスの同定について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 4) 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 天羽清子, 影山 努. 乳幼児呼吸器感染症からのコロナウイルス検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 5) 高橋 仁, 田中仁喜, 西村研吾, 高山郁代, 中内美名, 永田志保, 小林美栄, 藤博幸, 大西和夫, 横田(恒次)恭子, 田代真人, 影山 努. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 6) 高山郁代, 中内美名, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理についての検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 7) 小林(石原)美栄, 高橋 仁, 西村研吾, 高山郁代, 大西和夫, 板村繁之, 影山 努, 横田(恒次)恭子. H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 8) 中内美名, 高山郁代, 高橋 仁, 大場邦弘, 田代真人, 影山 努. B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 国外会議
- 1) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Minori Ohyama, Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Seiji P Yamamoto, Kaoru Goto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyama. High Proportion of Multiple Infections with Respiratory Viruses in Young Children with Acute Respiratory Tract Infections. European Congress of Virology 2013. Lyon. September. 2013
- 2) Hitoshi Takahashi, Kazuo Ohnishi, Kengo Nishimura, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi1, Shiho Nagata, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, 5-10 September 2013.
- 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

表 各RNA濃度における陽性検査チップ数と検出限界値

テンプレートRNA		臨床検体	A/California/7/2009 (H1N1pdm09)		A/Texas/50/2012 (H3N2)		A/Anhui/1/2013 (H7N9)		B/Massachusetts /2/2012
検査項目		C型	A型	A/H1亜型	A型	A/H3亜型	A型	A/H7亜型	B型
濃度 (copies/ μ L)	50	-	-	-	-	-	5	5	-
	25	5	5	5	5	5	-	-	-
	5	2	4	4	5	1	2	5	5
	1	3	3	0	4	0	0	3	2
	0.2	0	0	2	1	0	0	0	0
検出限界 (copies/ μ L)		36.0	8.51	38.9	1.99	11.5	(12.0)	6.32	2.11

- : 未実施

検出限界は四捨五入により、有効数字3桁で求めた

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3）

研究分担者 大場邦弘 公立昭和病院小児科 医長

研究協力者

澄田奏子、渡邊隆明、今村剛朗、松吉健夫、佐々木庸郎、山口和将、小島直樹、稲川博司、
岡田保誠：公立昭和病院救急科
小田智三：公立昭和病院感染症科
加藤昭生、古谷智子、小花奈都子、林健太、村田岳哉、野田雅裕、石川涼子、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、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： 昨年度、我々は同時に複数のウイルス遺伝子が検出できる POC 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、インフルエンザウイルスの型・亜型および RS ウイルスを同時に検出できる事を報告した。しかし、陽性・陰性判定までの反応時間を短縮することができた反面、偽陽性が出現する検出系も存在したため、遺伝子検査の利点である特異性を上げる必要性があった。本年度は、インフルエンザの型・亜型検出系の試薬組成を変更することで特異性を上げること、また、新規に開発したインフルエンザ C 型、アデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RS ウイルス A 型・B 型の検出系をマイクロ流路チップに搭載し、臨床検体を用いて POC 遺伝子検査システムの臨床的評価を診療現場である外来の一画で行った。その結果、インフルエンザウイルスの型・亜型同定に関しては、陽性判定までの反応時間はおおよそ 15 分前後と前年度より長くなったが、偽陽性判定例はなくなった。また、その他の呼吸器感染ウイルスでは、アデノウイルス 2 型、ヒトボカウイルスを 1 例ずつ同定することができた。

A. 研究目的

平成 24 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）および RS ウイルスを同時に検出できる 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・亜型および RS ウイルスを同時に検出できることを実証した。また、A 型、A/H3 亜型、RS ウイルスの陽性判定までの反応時間はいずれも 7~8 分間（中央値）と短縮することもできた。しかしその反面、平成 23 昨年度には問題とならなかった偽陽性がインフルエンザ A 型の検出系で確認された。

本研究では、遺伝子検査の利点である特異性を上げることを目的に、偽陽性が出現しない検出系に試薬を変更し、再度、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（A および B 型）・亜型（H1pdm09 および H3 亜型）の検出系の再評価を診療現場である外来の一画で臨床検体を用いて行った。

また、インフルエンザ流行期に鑑別が必要となるインフルエンザ C 型、アデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RS ウイルス A 型・B 型の検出系を新規に開発し、マイクロ流路チップに搭載したものを作製した。それらの検出系で、いずれかのウイルスが臨床検体で検出可能かどうかの検討も行った。

B. 研究方法

複数のウイルスを同時検出できるマイクロ流路チップを 2 種類（インフルエンザチップ；インフルエンザウイルス A 型・B 型・C 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型、および、呼

吸器系チップ；アデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RS ウイルス A 型・B 型）を用いた POC 遺伝子検査システム（ソニー株式会社）とインフルエンザ A 型・B 型・C 型・H1pdm09 亜型・H3 亜型、アデノウイルス 2 型・4 型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルス NL63・HKU1・OC43・229E、RS ウイルス A 型・B 型を検出できるリアルタイム RT-PCR 法を用いて評価を行った。POC 遺伝子検査システムは診療現場である外来の一区画で、リアルタイム RT-PCR 法は国立感染症研究所で実施した。インフルエンザチップを用いた POC 遺伝子検査システムには 2013 年 12 月から 2014 年 3 月までの間に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、咽頭ぬぐい液、気管吸引液）を使用した。呼吸器系チップを用いた POC 遺伝子検査システムには、2012/2013 シーズンに採取され、昨年度の本研究に用いたインフルエンザウイルス陰性であった検体を無作為に抽出し使用した。

また、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、リアルタイム RT-PCR：1mL の Universal Transport Medium, UTM™（COPAN）に懸濁し 140 μ L から RNA を抽出）に懸濁して（リアルタイム RT-PCR 法では QIAGEN 社の QIAamp Viral RNA mini kit による RNA 抽出を行った後に）検査を行った。POC 遺

伝子検査システムでは陰性判定時間を 30 分とした。

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。

C. 研究結果

インフルエンザチップに関しては、2013/2014 シーズンに同意が得られたのは 49 症例であった。リアルタイム RT-PCR 法でインフルエンザ A 型は 18 症例が陽性であり、そのうち 16 症例が H1 pdm 09 亜型陽性、2 例が H3 亜型陽性であった。インフルエンザ B 型は 19 症例が陽性であった。

リアルタイム RT-PCR 法に対する POC 遺伝子検査システムの感度は、インフルエンザ A 型が 94.4%、H1pdm09 亜型が 87.5%、H3 亜型が 100%であった。インフルエンザ B 型は 89.5%であった。特異度は、インフルエンザ A 型、H1pdm09 亜型、H3 亜型、インフルエンザ B 型のすべてが 100%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でインフルエンザ A 型 16 分、H1pdm09 亜型 13 分、H3 亜型 14 分、インフルエンザ B 型 15 分であった。(表 1、図 1)。

2013/2014 シーズンに、POC 遺伝子検査システムとリアルタイム RT-PCR 法でインフルエンザ C 型が検出される検体はなかった。インフルエンザ A 型と H1pdm09 亜型が偽陰性の症例が 1 例あったが、発症 5 日目で抗インフルエンザ薬の投与がない検体であり、リアルタイム RT-PCR 法の結果は、共に検出限界付近の検体であった。インフルエン

ザ A 型は陽性であったが H1pdm09 亜型が偽陰性の症例が 1 例あったが、発症日が不明で、抗インフルエンザ薬の投与がなされた後の検体であった。インフルエンザ B 型が偽陰性の症例が 2 例あったが、発症 7 日目、13 日目に採取されており、いずれも発症後長時間経過してからの検体であった。

呼吸器系チップに関しては、2012/2013 シーズンに採取され、昨年度の本研究に用いたインフルエンザウイルス陰性であった 5 症例を無作為に抽出した。リアルタイム RT-PCR 法でアデノウイルス 2 型は 3 症例が陽性であり、ヒトボカウイルスは 1 症例が陽性であった。POC 遺伝子検査システムではアデノウイルス 2 型、ヒトボカウイルスが 1 症例ずつ陽性であった。ヒトコロナウイルス 229E は、POC 遺伝子検査システムで 5 症例すべてが偽陽性であった。

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、免疫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、2012/2013 シーズン、そして今回の 2013/2014 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・ケア検査として保健所や 1 次医療を担う診療所でも実施できる遺伝子検査と考えられた。

平成 24 年度の本検討では、POC 遺伝子検査システムの陽性・陰性判定までの反応時間を短縮することができたが、その反面、偽陽性が出現する検出系も存在したため、