

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。今回の検討では、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、偽陽性が出現することもなくなった。

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する。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、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、偽陰性・偽陽性例も存在した。

今後、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や、その他の呼吸器感染ウイルスの特異的プライマーの更なる改良、および、非特異反応が起きにくい抽出試薬や反応試薬の開発が必要と考えられた。

## E. 結論

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迅速検査であるため、保健所や 1 次医療を担う診療所でも実施可能な遺伝子検査である。また、POC 遺伝子検査システムにおいて、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でき、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。そして、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、検査の特異性を更に担保できるものとする。検査精度を更に上げるためにも、今後、抽出試薬や反応試薬の改良、自動判定プログラムの開発が必要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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. 感染症学雑誌 87;618-619,2013.

### 2. 学会発表

国内会議

- 1) 大場邦弘, 高橋仁, 高山郁代, 中内美名, 影山努. 新規マイクロ流路チップを用いたポイント・オブ・ケア遺伝子検査法によるインフルエンザウイルス型・亜型同定の臨床的有用性. 第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 札幌市. 2013 年 6 月
- 2) 林健太, 加藤昭生, 大場邦弘, 小鍛治

- 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. 札幌市. 2013 年 10 月
- 3) 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
- 4) 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. 神戸市. 2013 年 11 月
- 5) 影山努, 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同定について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市. 2013 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

表1. インフルエンザ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との比較

**インフルエンザ A 型**

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	17	0
POCNATs(-)	1	30
	感度	特異度
POCNATs	94.4%	100%

陽性判定までの反応時間: 中央値 16 分(範囲 12~25 分)

**インフルエンザ A/H3 亜型**

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	2	0
POCNATs(-)	0	52
	感度	特異度
POCNATs	100%	100%

陽性判定までの反応時間: 中央値 14 分(範囲 14~14 分)

**インフルエンザ A/H1pdm09 亜型**

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	14	0
POCNATs(-)	2	33
	感度	特異度
POCNATs	87.5%	100%

陽性判定までの反応時間: 中央値 13 分(範囲 11~30 分)

**インフルエンザ B 型**

	PCR(+)	PCR(-)
POCNATs(+)	17	0
POCNATs(-)	2	33
	感度	特異度
POCNATs	89.5%	100%

陽性判定までの反応時間:中央値 15 分(範囲 10~19 分)

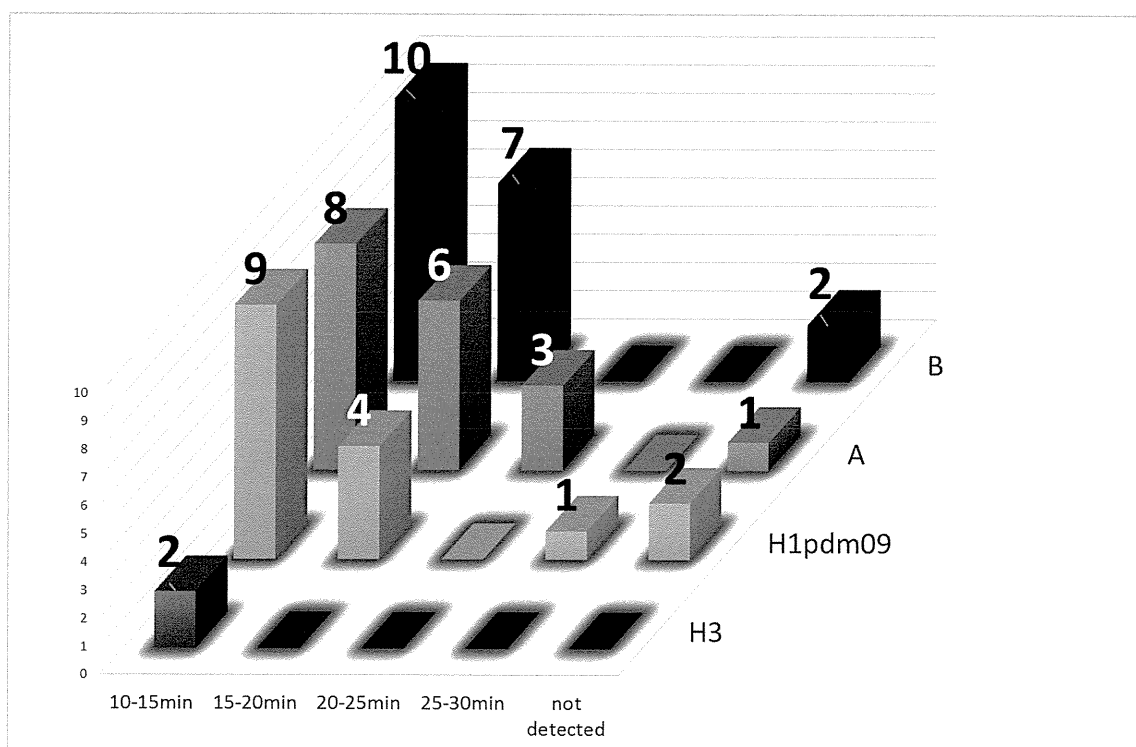


図 1. POC 遺伝子検査システムにおける陽性判定までの反応時間 (インフルエンザ A 型、H1pdm09 亜型、H3 亜型、インフルエンザ B 型)

## 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

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の特異的検出法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 亜型の A 型トリインフルエンザウイルスの特異的検出法を Direct RT-LAMP 法を用いて構築する事を目的とする。

#### 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。そこで我々は病院や診療所等の臨床現場でのインフルエンザ遺伝子検査を可能とするため、従来の RT-LAMP 法を一部改良し、検体からの核酸精製を必要としない 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きた。昨年度までに A 型インフルエンザウイルス、A/H1pdm09 亜型、

A/H3 亜型インフルエンザウイルス、および B 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法の構築および改良を行ってきた。一方現在ヒトの間で流行するインフルエンザウイルスには、上記に加え、主に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が存在する。また、2013 年 4 月より中国大陸においてヒトでの感染が拡大している H7N9 亜型の A 型トリインフルエンザウイルスの日本への侵入が懸念されている。インフルエンザ感染症を包括的に診断するためには、上記のインフルエンザウイルスそれぞれを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法が必要なため、C 型および A/H7 亜型インフルエンザウイルス検出法の構築を行った。

#### B. 研究方法

## 1. プライマーの設計

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 遺伝子配列のアライメントを作成し、比較的保存されている領域をもとにプライマーセットを設計した。A/H7 亜型インフルエンザウイルス検出系に関しては A/Anhui/1/2014 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。

## 2. 検出感度および特異性の検討

それぞれの検出系のターゲット遺伝子全長の合成 RNA を用いて構築したプライマーセットを用いた Direct RT-LAMP 法の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。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### 1. 設計したプライマーセット

C 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット

FLUC F3:

CCAAATAATGGAAATGGTTGAAG

FLUC B3: CAGTAATACCAGCAATTTTCGT

FLUC FIP:

CTCAACCAAGCTGTGATTGTTCCCTATAT  
GATCACCCAGACGAC

FLUC BIP:

ACAGGAGTAATGTCTCAGAAAGTGGTG

CTGGCTTTTCTTACTTCA

FLUC LF: ATTCGGATGTCTGGTGTGT

FLUC LB: AGAACAGCTTTAAAAATTC

A/H7 亜型インフルエンザウイルス検出用  
プライマーセット

AH7N9-F3:

TTCCTGAGATTCCAAAA

AH7N9-B3:

GGTTGGTTTTTTTCTATAAGCCG

AH7N9-FIP:

ACCAACCATCAATTAGGCCTTCTATTG

GTGCTATAGCGG

AH7N9-BIP:

GGTTTCAGACACCAGAATGCACACCTGT

TATTTGATCAATTGCCG

AH7N9-LF:

CCCATCCATTTTCAATGAAAC

AH7N9-LB:

ACTGCTGCAGATTACAAAAG

## 2. C 型インフルエンザウイルス RT-LAMP

検出系の検出感度および特異性の検討

C 型インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系について、MP 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、C 型インフルエンザウイルス以外の型・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、今回構築した C 型イン

フルエンザウイルス検出系は、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. A/H7 亜型 RT-LAMP 検出系の検出感度および特異性の検討

A/H7 亜型 RT-LAMP 検出系について、A/Anhui/1/2014 株の 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、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 亜型のトリインフルエンザウイルスや他の A/H7 亜型のトリ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、特異性について確認を行ったところ、今回構築した 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 遺伝子を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、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ことから、今回構築した A/H7 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。

### D.& E. 考察と結論

構築した C 型インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系および H7 亜型 RT-LAMP 検出系の検出感度は、それぞれ

100copies/reaction および 50copies/reaction であったが、RT-LAMP 法は real-time RT-PCR 法と比較して 10 から 100 倍程度検出感度が低い事が知られており、今回構築した 2 つの検出系は RT-LAMP 法としては十分な検出感度であると考えられる。また、両検出法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から、先に構築された A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型 RT-LAMP 検出系と合わせてマイクロ流路チップへの応用が可能と考えられる。今回構築された 2 つの系はベットサイド診断可能な遺伝子検査システムの開発へ向けた検出系として大変有用であると考えている。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

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、大阪、2013 年 11 月

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)検出系の構築および喀痰検体の前処理方法についての検討

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2013 年 11 月

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

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

#### 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、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  
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、感染症診断に応用することを目的とする。本年度は新たな検出候補としてヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3) を選択し、LAMP 法による検出系の構築を行った。また、昨年度評価を行った中で検出感度の低かったヒトコロナウイルス (HCoV) の HKU1、229E の 2 種類について検出系の改良を行った。その結果、今回構築および改良を行った LAMP 法を用いた検出系は、高感度に各ウイルスの遺伝子を検出できることが確認された。このことから、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。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で、感染症診断に使用可能なシステムの構築が期待される。

### 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。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

ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3) およびヒトコロナウイルス (HCoV) の HKU1、229E の 2 種類について核酸増幅の標的となる遺伝子を決定した。また、これらの標的遺伝子を LAMP 法により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。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

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。

陽性コントロールを作製するために、hPIV3およびHCoVはRNAウイルスであるのでT7プロモーター配列を付加した標的遺伝子のRT-PCRを行った。このRT-PCR産物からT7RNA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、hPIV3;  $5 \times 10^2$ 、HCoV HKU1;  $2 \times 10^3$ 、HCoV 229E;  $2 \times 10^2$ 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、検出するウイルス群の選択は重要となる。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)を選択した。

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高感度に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。また、ヒトコロナウイルス(HCoV)においては、昨年度の検討での検出感度(copies/reaction)はHCoV HKU1;  $>5 \times 10^4$ 、HCoV 229E;  $2 \times 10^3$ であったが、プライマーセットの改良を行ったことでその感度はHCoV HKU1;  $2 \times 10^3$ 、HCoV 229E;  $2 \times 10^2$ となり、それぞれ10倍以上の感度向上が確認された。

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

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法を用いた核酸検出系を構築するために、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(hPIV3)およびヒトコロナウイルス(HCoV)のHKU1、229Eの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高感度に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。今後これらの検出系を応用

した感染症診断システムの構築が期待される。

## F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura,  
I Takayama, M Nakauchi, S Nagata,  
Y Tsunetsugu-Yokota, M Tashiro, T 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-South Africa, September 2013

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

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

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

杉村 哲、高橋 仁、城内 健太、大塩 木乃実、  
金山 雅也、田墨 恭子、谷畑 葉子、三浦 裕、  
藤原 大介、山本 典生

L. lactis JCM5805 株摂取によるプラズマサイ  
トイド樹状細胞活性化を介したウイルス性呼  
吸器感染症抑制効果の検証  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、  
2013 年 11 月

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

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

## 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

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 分担研究報告書

## 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

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、中内美名、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** 呼吸器系病原性ウイルスの遺伝子を高感度、かつ迅速・簡便に検出可能な装置として、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（POC 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、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、インフルエンザウイルスの分離が陽性となった患者うがい液に対して、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を用いて、それぞれの検出感度に関する解析を実施した。その結果、POC 遺伝子検査システムでの遺伝子検出率は、A 型の型・各亜型までおよび B 型が検出可能となった場合は 57.9 %、さらに A 型の型または亜型のいずれかが検出可能となった場合を含めた場合は 78.9 %となった。これらの検出率は、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法における場合のそれぞれ 0.68 および 0.81 倍、また、迅速診断キットの場合の 6.0 倍（A 型の型または亜型のいずれかが検出可能となった場合を含めた場合との比較）の値であった。以上の結果から、POC 遺伝子検査システムは、インフルエンザ様疾患患者のうがい液を用いた場合においても、高感度でインフルエンザウイルス遺伝子の検出が可能であることが示唆された。

### A. 研究目的

現在、複数の呼吸器系病原性ウイルスに対する迅速診断キットが市販され、実際の臨床診断に広く利用されている。これらの診断キットのほとんどは、1 種類のキットで 1 種類の病原性ウイルスの検査のみ

が可能となっていることから、臨床症状のみで病原性ウイルスの特定が困難な場合などは、数種類の診断キットを組み合わせる使用事例も少なからず存在することから、あまり経済的・効率的とは言えない。また、インフルエンザウイルス迅速

診断キットにおいては、A および B の型別は可能ではあるが、A 型の亜型までの区別はほとんどが不可能である。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ことから、さらに詳細な検査が要求されている。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実施されている。また、複数の病原性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 (MR-PCR)法を用いた遺伝子検出も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、専門性を有する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 (POC 遺伝子検査システム)は、ウイルス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性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、季節性インフルエンザウイルスの分離が可能となった患者うがい液を用いて、POC 遺伝子検査システム、MR-PCR 法および迅速診断キットでの測

定を行い、それぞれのインフルエンザウイルス検出感度についての比較・検討を行った。

## B. 研究方法

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、MR-PCR 法および迅速診断キットを用いてそれぞれの検出感度の測定を行った。

POC 遺伝子検査システムでは、患者うがい液 50  $\mu$ l を専用抽出試薬 125  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l から QIAcube (キアゲン) を用いて、RNA を 60  $\mu$ l の専用試薬にて抽出し、そのうちの 15  $\mu$ l を用いて逆転写反応を行い、得られた cDNA 液 30  $\mu$ l 中の 2  $\mu$ 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<sup>TM</sup>-Flu (デンカ生研株式会社) を使用し、患者うがい液 150  $\mu$ l を検体浮遊液に混合したものを検査材料とした。

(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

各検査法による測定結果を表 1 に示した。今回使用したうがい液計 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。これらの検体を用いて実施した各検査法における非特異的反応は認められなかった。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）が検出可能となった。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 %)でインフルエンザウイルスの遺伝子が検出可能となった。MR-PCR 法では、32 検体(84.2 %)において各型および A 型の各亜型までが検出可能となった。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可能となった。迅速診断キットでは、5 検体(13.2 %)で A 型の検出が可能となった。

POC 遺伝子検査システムにおいて各遺伝子の検出が可能となった検体の MR-PCR 法における各 Ct 値を比較した場合、検出可能となる Ct 値を明確に決定することは困難ではあるが、いずれの遺伝子においても、Ct 値がおおよそ 36 以下で POC 遺伝子検査システムでの遺伝子検出が可能になることが示唆された。また、迅速診断キットにおいては、上記同様に Ct 値がおおよそ 30 以下で検出可能になることが示唆された。

AH1pdm が分離されたうがい液検体のうち、MR-PCR 法での Ct 値が 33 前後であ

るにも関わらず、POC 遺伝子検査システムで遺伝子検出陰性となった 13-1001 および 13-1197 の 2 検体について、各うがい液原液を PBS(-)にて 10 倍希釈した検体を用いて POC 遺伝子検査システムでの再測定を行った。その結果、13-1001 では H1pdm が、また、13-1197 では A 型の検出が可能となった（表 2）。

### D. 考察

大阪市感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザ様疾患患者検体として、患者うがい液が供与される事例は、特に学級閉鎖などの集団発生事例においては数多く認められていることから、今回うがい液における各検査法での検出感度の比較・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ことが十分予想されるが、今回の POC 遺伝子検査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で遺伝子検出可能となった検体について、MR-PCR 法で得られた各検出遺伝子の Ct 値との比較を

行った場合、おおよそ Ct 値が 36 以下の検体で本システムでの遺伝子検出が可能になることが示唆された。ただし、Ct 値が 36 を越える検体においても型および亜型が検出された検体 (13-1073、13-1176 および 13-1228) が存在し、逆に Ct 値が 33 付近であっても POC 遺伝子検査システムにおいて遺伝子検出が不可能となる検体 (13-1001 および 13-1197) が存在した (表 1)。これらの相違の原因として、POC 遺伝子検査システムに対する何らかの阻害物質が、うがい液中に存在する可能性が考えられた。上記の 13-1001 および 13-1197 の 2 検体を 10 倍希釈して行った POC 遺伝子検査システムにおいては、それぞれ H1pdm および A 型の遺伝子検出が可能となったことから (表 2)、この可能性は十分に考えられることが示唆された。

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、非常に有用であることが考えられる。

## E. 結論

季節性インフルエンザウイルスが分離された患者うがい液を用いて、POC 遺伝子検査システム、MR-PCR 法および迅速診断キットにおける各検出感度の比較・検討を行った結果、POC 遺伝子検査システムでの各遺伝子検出は、MR-PCR 法での検出遺伝子の Ct 値がおおよそ 36 以下の場合に可能であることが示唆された。また、POC 遺伝子検査システムでの検出感度は、迅速診断キットの場合を大幅に上回ることが示唆されたことから、POC 遺伝子検査システムの臨床診断応用は、うがい液においても有用であることが考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tetsuo Nakayama, Akihito Sawada,  
Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida,  
Toshimitsu Tanaka, Naoki Shigemoto,

Katsuhiko Komase, Makoto Takeda. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology* 57:246-251, 2013.

Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hideyuki Kubo, Vu Tri Le, Hung Van Vo, Hoa Thi Do, Dang Hoang Nguyen, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology* 158: 859-876, 2013.

倉田貴子、上林大起、駒野淳、西村公志、加瀬哲男、高橋和郎、大平文人、松井陽子、伊達啓子、熊井優子、久保英幸、改田厚、後藤薫、長谷篤、廣川秀徹、吉田英樹、内野清子、三好龍也、田中智之、森嘉生、大槻紀之、坂田真史、駒瀬勝啓、竹田誠. 大阪府内における 2012 年の風疹患者発生状況. 病原微生物検出情報 34:97-98, 2013.

改田厚、久保英幸、平井有紀、山元誠司、後藤薫、廣川秀徹、入谷展弘、長谷篤. 大阪市内の麻疹診断例における麻疹ウイルス検出と分子疫学解析(2012-2013 シーズン). 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 75:6-10, 2013.

久保英幸、改田厚、入谷展弘、山元誠司、長谷篤. 2012/13 シーズンに大阪市で分離されたインフルエンザウイルスの解析. 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 75: 11-17, 2013.

改田厚、久保英幸、平井有紀、山元誠司、廣川秀徹、入谷展弘、長谷篤. 発疹性感染症のマルチプレックス・リアルタイム PCR. 臨床とウイルス (印刷中)

## 2. 学会発表

Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Minoru 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. 5th European Congress of Virology, フランス、リヨン、2013 年 9 月

改田厚、久保英幸、山元誠司、天羽清子、影山努、入谷展弘. 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、神戸市、2013 年 11 月

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  
会日本ウイルス学会学術集会、神戸市、  
2013 年 11 月

廣川秀徹、改田厚、久保英幸、山元誠司、  
入谷展弘、後藤薫、辻本光広、松本珠美、  
青木直美、森宏美、藤森良子、伯井紀隆、  
亀本昌幸、石黒正博、半羽宏之、長谷  
篤、吉田英樹、松本健二、甲田伸一。  
大阪市の麻しん、風しんにおける疫学的  
検査とその考察. 第 200 回大阪小児科学

会、大阪市、2013 年 12 月

#### 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、マルチブックス・

表 1. インフルエンザ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での測定結果

検体番号	分離同定結果	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		迅速診断 キット結果
		測定結果(検出率)	判定	測定結果 (Ct値)	判定	
13-784	AH3	-	-	H3 (35.04)	AH3*	-
13-800	AH3	A (5/5), H3 (5/5)	AH3	A(28.10), H3(25.09)	AH3	A+
13-868	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (4/5)	AH1pdm	A(33.27), H1pdm(34.67)	AH1pdm	-
13-915	AH3	A (5/5), H3 (5/5)	AH3	A(28.93), H3(25.37)	AH3	A+
13-916	B(V)	B (3/5)	B	B(36.05)	B	-
13-962	AH1pdm	A (1/5), H1pdm (1/5)	AH1pdm	A(32.13), H1pdm(33.87)	AH1pdm	A+
13-963	AH3	H3 (2/5)	AH3*	H3 (37.62)	AH3*	-
13-964	AH1pdm	A (2/5)	A*	A(39.31)	A*	-
13-967	B(V)	B (2/5)	B	B(35.70)	B	-
13-997	AH1pdm	-	-	-	-	-
13-998	AH3	A (1/5)	A*	A(37.53), H3(35.96)	AH3	-
13-999	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (5/5)	AH1pdm	A(31.59), H1pdm(32.43)	AH1pdm	-
13-1000	AH1pdm	A (3/5), H1pdm (3/5)	AH1pdm	A(35.48), H1pdm(36.14)	AH1pdm	-
13-1001	AH1pdm	-	-	A(33.60), H1pdm(33.36)	AH1pdm	-
13-1002	AH3	A (1/5)	A*	A(38.05), H3(33.45)	AH3	-
13-1072	AH3	A (1/5), H3 (4/5)	AH3	A(34.58), H3(31.37)	AH3	-
13-1073	AH1pdm	A (2/5), H1pdm (2/5)	AH1pdm	A(38.18), H1pdm(36.16)	AH1pdm	-
13-1074	AH3	A (5/5), H3 (4/5)	AH3	A(34.24), H3(30.74)	AH3	-
13-1076	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (5/5)	AH1pdm	A(24.52), H1pdm(24.50)	AH1pdm	A+
13-1077	AH1pdm	A (1/5)	A*	A(36.92), H1pdm(36.67)	AH1pdm	-
13-1172	AH1pdm	-	-	A(39.81)	A*	-
13-1173	AH1pdm	A (2/5)	A*	A(37.02), H1pdm(39.80)	AH1pdm	-
13-1174	AH1pdm	A (4/5), H1pdm (4/5)	AH1pdm	A(32.25), H1pdm(33.06)	AH1pdm	-
13-1175	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (5/5)	AH1pdm	A(34.16), H1pdm(35.46)	AH1pdm	-
13-1176	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (3/5)	AH1pdm	A(36.43), H1pdm(37.71)	AH1pdm	-
13-1192	AH1pdm	-	-	A(39.13)	A*	-
13-1193	AH1pdm	A (1/5)	A*	A(39.29), H1pdm(39.82)	AH1pdm	-
13-1194	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (4/5)	AH1pdm	A(33.50), H1pdm(34.61)	AH1pdm	-
13-1195	AH1pdm	A (3/5)	A*	A(36.46), H1pdm(39.35)	AH1pdm	-
13-1196	AH1pdm	A (5/5), H1pdm (2/5)	AH1pdm	A(30.67), H1pdm(32.30)	AH1pdm	-
13-1197	AH1pdm	-	-	A(31.79), H1pdm(33.31)	AH1pdm	-
13-1228	AH1pdm	A (1/5), H1pdm (3/5)	AH1pdm	A(37.78), H1pdm(38.83)	AH1pdm	-
13-1229	AH1pdm	A (4/5), H1pdm (2/5)	AH1pdm	A(35.70), H1pdm(35.52)	AH1pdm	-
13-1257	B(Y)	-	-	B(35.37)	B	-
13-1259	AH3	A (5/5), H3 (5/5)	AH3	A(28.51), H3(24.52)	AH3	A+
13-1260	B(V)	B (5/5)	B	B(31.58)	B	-
13-1284	B(Y)	B (5/5)	B	B(31.26)	B	-
13-1288	B(Y)	-	-	B(36.12)	B	-
検出率#	38/38		22/38 (30/38)		32/38 (37/38)	5/38
%	100		57.9 (78.9)		84.2 (97.4)	13.2

\* : A 型の型または亜型のいずれかが検出された場合

# : POC 遺伝子検査システムおよびマルチプレックス・リアルタイム PCR 法における検出率は以下の通り

括弧外 ; A 型の型・亜型および B 型が検出可能であった場合のもの

括弧内 ; 上記括弧外に、A 型の型または亜型のいずれかが検出可能であった場合を含めたもの

表 2. うがい液原液および 10 倍希釈うがい液を用いた POC 遺伝子検査システムでの測定結果

検体番号	分離同定結果	マルチプレックス・リアルタイムPCR法でのCt値	POC遺伝子検査システム	
			うがい液原液	10倍希釈うがい液(検出率)
13-1001	AH1pdm	A:33.60, H1pdm:33.36	-	H1pdm (1/5)
13-1197	AH1pdm	A:31.79, H1pdm:33.31	-	A (1/5)

## 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

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、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** POC 遺伝子検査システムは、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て開発を進めている、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせた簡便な検査システムである。

本研究では、今年度に構築した 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検出感度の検討をウイルスもしくは臨床検体から抽出した RNA を用いて行った。結果、本方法は簡便かつ非常に高感度な遺伝子検出方法であることが改めて示された。

#### 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、A 型、B 型の型別診断しかできないものがほとんどで、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、検出感度が十分でないため病初期などは偽陰性となる場合がある。そこで、我々は、臨床現場等でのインフルエンザ診断において迅速診断キットと同等の簡便な操作で、より高感度な遺伝子検出検査が行えるように、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。

今年度は新たに A/H7N9 亜型および C 型インフルエンザウイルスに対しても

RT-LAMP 検出系を構築し、これらの検出系についても POC 遺伝子検査システムに組み込み、臨床現場や地衛研における検討を行った。

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検出感度については、今までの検討から、既存の real-time RT-PCR 検出系と比較して約 10 倍低い検出感度であることが分かっているものの、詳細な検討は行っていなかった。そこで、本研究では、本年度構築した 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の検出感度について詳細な検討を行った。

#### B. 研究方法

インフルエンザ検査系の各項目の検出感度の検討は、A/California/7/2009

(H1N1pdm09)、A/Texas/50/2012(H3N2)、

A/Anhui/1/2013(H7N9)、B/Massachusetts/2/