

2012 の各ウイルスから抽出した RNA を用いて行った。また C 型検出系については、臨床検体から抽出した RNA を用いて行った。これらの RNA は、あらかじめ既存の real-time RT-PCR 検査系を用いて、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 遺伝子を各ターゲット遺伝子の合成 RNA をもとに定量して検討に用いた。

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検査チップを使用し、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検査チップを使用して行った。これら両検査チップに搭載された A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型検出系については、同一のものである。また、ウイルスもしくは臨床検体から抽出した 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った。判定は、各項目 1well 以上で消光が見られた場合に、その検査チップでの検査系の結果は陽性とし、反応条件は 63℃の等温で 30 分とした。

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。

(倫理面への配慮)

臨床検体については、インフォームドコンセントを取り、採取を行ったものである。

C. 研究結果

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、添付の表の通りとなった。

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 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 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。これらの検出系における検討では、低濃度の RNA を用いた際に陽性検査チップ数が安定しなかったことから、求めた検出限界値が他の検出系と比較して高めになってしまったと考えられた。

なお、全ての検討において偽陽性は確認されなかった。

D. 考察

本年度新たに構築した A/H7N9 亜型および C 型検出系も組み込んだ 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。結果、以前の検討では既存の real-time RT-PCR 検査系と比較して約 10 倍低い検出感度であるとされていたものの、実際には、10 倍以内の感度差であり、A 型および B 型検出系にいたっては、ウイルスの種類によっては、real-time RT-PCR 検査系とほぼ同等の検出感度を備えていることが明らかとなった。

一方、C 型および A/H1pdm 亜型検出系では、低濃度の RNA に対して反応が安定しな

いことがあった。今後、反応試薬と各検出系の primer とのバランスがより一層よくなるよう、反応試薬の組成を見直すなどの検討が必要であると考えられた。

E. 結論

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の詳細な検討から、各検出系が高感度であることが示された。また、偽陽性も確認されず、本方法は、臨床現場等で高感度かつ迅速に遺伝子検出検査を行うにあたって、非常に有用な検査法であることが改めて示された。

また、本年度から成田空港検疫所と関西空港検疫所においても、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た。この方法では、試薬調製手順を可能な限り簡便になるよう工夫したものの、検疫所での検査時には、より一層の確実性や迅速性が求められるため、改善すべき点が多い。今回、POC 遺伝子検査システムの有用性が示されたことから、今後、検疫所でのインフルエンザの検査においても、本システムを導入することは非常に有意義であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miho Kobayashi, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Hiroyuki Tsukagoshi, Mika Saitoh, Taisei Ishioka, Yoko Yokota, Hirokazu Kimura, Masato Tashiro; Novel Reassortant Influenza A (H1N2) Virus Derived from A (H1N1) pdm09 Virus Isolated from Swine, Japan, 2012 Emerging Infectious Diseases, 19(12), 2013

2. 学会発表

M Shirakura, V Setiawaty, HA Pawestri, I Takayama, T Arita, M Imai, A Kawaguchi, K Nakamura, T Kageyama, OD Sampurno, E Nobusawa, M Tashiro

International collaboration on the characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from humans in Indonesia during 2011-2012 for developing the vaccine candidate viruses
Options for the Control of Influenza VIII、ケープタウン、2013 年 9 月

H Takahashi, K Ohnishi, 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 and specific detection of influenza A/H5N1 virus

Options for the Control of Influenza VIII、ケープタウン、2013 年 9 月

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

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方法についての検討

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

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

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 法を用いた鑑別検出法の構築

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

高橋仁、大西和夫、西村研吾、高山郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、横田恭子、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

小林美栄、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

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	158(4)	859-876	2013
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
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
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

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 Fukushi, 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
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(3)	246-251	2013
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
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(5)	618-619	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。	大阪府内における2012年の風疹患者発生状況	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	大阪市内の麻しん診断例における麻しん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P CR.	臨床とウイル			印 刷 中

