

201318004B

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 23-25 年度 総合研究報告書

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 23-25 年度 総合研究報告書

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 23-25 年度 総合研究報告書

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

平成 23-25 年度

I. 総合総括研究報告

- 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. 分担研究総合報告

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 P. 17
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、北麻里子、
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、田中智子、小林匠、小花奈都子、
甘利昭一郎、生田陽二、林健太、村田岳哉、野田雅裕、石川涼子、内山健太郎、
吉田知広、野田絵理、小鍛治雅之、河野寿夫、高橋仁、高山郁代、中内美名、
影山努
2. インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系の構築 P. 27
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. 35
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. 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臨床
検体を用いた実験室レベルでの検討 P. 39
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. 薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築および 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. 49
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. 57

I . 総合総括研究報告

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 23-25 年度 総合総括研究報告書

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 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 Point of care (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、コンタミネーションのリスクもなく同時に多項目、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の際には、除外診断にも利用可能である。また、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 型の検出系も構築した。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。本研究では、診断・予防・医療水準の向上を図る事を目的に、医療現場で本システムを使用し、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。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。

A. 研究目的

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。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、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。

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。平成24年度にはH5亜型同定の陽性コントロールと流行株を識別する事ができる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。平成25年度にはH7亜型同定の識別マーカー付き陽性コントロールの配布を行った。

H1pdm09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に、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。そこで、さらにもっと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、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 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て、そのウイルスの性状を詳細に解析する事が重要である。そこで、本研究ではウイルス性呼吸器感染症を簡便に鑑別診断できる呼吸器ウイルス感染症の POC 遺伝子検査システムの構築を試みた。

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のため、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て、ベットサイドにおいて早期にインフルエンザウイルスの型・亜型やウイルス性呼吸器感染症

の病原体同定が行えるようになると、リアルタイム病原体サーベイランスを行う事が可能となる。地域の感染症流行状況をリアルタイムに把握できるようになる事で、大規模な感染症の流行予測やコミュニティー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。また、POC 遺伝子検査システムにおいて検査対象としている病原体が本システムで不検出となった場合は、不検出となったウイルスの存在を否定する、いわゆる除外診断に応用する事も可能である。このことから、新興感染症が出現した際に、その病原体を検出できるチップ作製を行えば、その病原体の早期診断が可能になるのはもちろんだが、季節性インフルエンザウイルスの型・亜型や既存の呼吸器感染症ウイルスを常に同定できる態勢を構築しておけば、新型インフルエンザや新興ウイルスが出現した際に、既存ウイルスとの鑑別診断を検体採取から 30 分以内に行えるため、新型インフルエンザや中東呼吸器感染症(MERS)などの新興再興感染症対策にも有用である。

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。

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とした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. A/H3 亜型および B 型インフルエンザウイルスおよび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。A/H3 亜型および B 型インフルエンザウイルス検出系に関しては HA 遺伝子上および

NS 遺伝子上に、C 型インフルエンザウイルス検出系に関しては、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. 2009/2010 年シーズンにインフルエンザ A/H1pdm2009 により肺炎に至って入院加療が必要であった症例におけるイムノクロマト法(クイックナビ TM-Flu、デンカ生研株式会社)による補助診断について後方視的に検討した。

3. 2010/2011 年シーズンにイムノクロマト法(クイックナビ TM-Flu;デンカ生研株式会社)で A 型陽性となった検体について Direct RT-LAMP 法を利用した Loopamp®A 型および H1pdm2009 インフルエンザウイルス検出試薬キット(栄研化学株式会社)の臨床的検証を小児科外来の一区画で検討した。

また 2010 年 1 月～2014 年 3 月までの間にインフルエンザ A 感染症で入院を要した小児のインフルエンザ A/H1pdm2009 亜型及び A/H3 亜型感染症の診断名を後方視的に比較検討した。

4. Direct RT-LAMP 法と小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップ(ソニー株式会社)を組み合わせ、煩雑な操作が必要ない POC 遺伝子検査システムを利用して、2011/2012 年シーズン、2012/2013 年シーズン、2013/2014 年シーズンの 3 シーズンに同意が得られた症例の臨床検体(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)を対象に、インフルエンザウイルスの型・亜型(A型、B型、C型、A/H1pdm2009 亜型、A/H3 亜型)の同時検出を行った。また、それに加えて、2012/2013年シーズンにはRSウイルスの同時検出、2013/2014年シーズンにはその他の呼吸器感染ウイルス(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)の同時検出も試みた。公立昭和病院小児科の外来の一区画ではインフルエンザ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。

5. 小児の呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスであるアデノウイルス(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)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(hPIV3)についてLAMPあるいはRT-LAMP法による検出法の構築を行った。また、リアルタイムRT-PCR法とで核酸検出の感度の比較を行い、RT-LAMP法が遺伝子診断に有用であるかどうかの検討を行った。

6. 呼吸器ウイルス遺伝子検出用のPOC遺伝子検査システムを用いて、AdV2、AdV4、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、大阪市環境科学研究所にて実施したマルチプレックス・リアルタイムPCR(MR-PCR)法において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。

7. 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(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。

8. 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。

9. 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。

10. 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. H3 亜型インフルエンザウイルス検出系について A/Uruguay/716/2007 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、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。B 型インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系について、B/Florida/4/2006 株の NS 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。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。これらはそれぞれ、他の型・亜型の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 A/H1pdm09 による肺炎に罹患した 64%の症例が発熱から 24 時間以内に入院加療が必要な状態となったが、発熱から 24 時間以内にイムノクロマト法で A 型陽性と診断できた症例は 54%しかなかった。

3. 全例がインフルエンザ A 型陽性となり、22 例中 15 例は H1pdm2009 亜型陽性となった。これらの結果は、リアルタイム RT-PCR 法による型・亜型同定検査結果と完全に一致した。また、H1pdm2009 亜型が陰性であった 7 例は、リアルタイム RT-PCR 法により全て H3 亜型と判定された。しかし、研究開始前の検査手技習熟のために検査の反復練習を行ったが、コ

ンタミネーションによる偽陽性が頻発したため、正しい結果を得る事ができず、汚染したウイルス核酸や遺伝子増幅産物などの除去を繰り返すことで、正常に検査が行えるようになるまで約 2 週間を要した。

また、A/H1pdm2009 亜型感染症で一番多かった入院の理由は肺炎で 47%あった。A/H3 亜型感染症では、肺炎が理由で入院した症例は 1 例もなかった。A/H3 亜型感染症で一番多かった入院の理由は熱性痙攣(複雑型)で 44%あった。A/H1pdm2009 亜型感染症でも熱性痙攣(複雑型)が理由で入院した症例が 23%あった。

4. ①2011/2012 年シーズン

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・特異度はインフルエンザ A 型で 100%・100%、A/H3 亜型で 91.7%・100%、インフルエンザ B 型で 75.0%・100%であった。イムノクロマト法の感度・特異度はインフルエンザ A 型で 91.7%・85.7%、インフルエンザ B 型で 87.5%・85.7%であった。

②2012/2013 年シーズン

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・特異度はインフルエンザ A 型で 90.9%・89.3%、A/H3 亜型で 96.6%・96.9%、A/H1pdm2009 亜型で 50.0%・100%、インフルエンザ B 型で 100%・100%であった。また、RS ウイルスで 80.0%・100%であった。イムノクロマト法の感度・特異度はインフルエンザ A 型で 84.9%・100%、インフルエンザ B 型で 100%・100%であった。また、RS ウイルスで 60.0%・100%であった。

③2013/2014 年シーズン

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・特異度は、インフルエンザ A 型で 94.4%・100%、A/H1pdm09 亜型で 87.5%・100%、A/H3 亜型で 100%・100%、インフルエンザ B 型で 89.5%・100%であった。

POC 遺伝子検査システムの陽性判定時間(中央値)は、インフルエンザ A 型で 16 分、A/H1pdm09 亜型で 13 分、A/H3 亜型で 14 分、インフルエンザ B 型で 15 分であった。C 型インフルエンザウイルスは検出されなかった。

また、リアルタイム RT-PCR 法でアデノウイルス 2 型が 3 例陽性、ヒトボカウイルスが 1 例陽性であった。呼吸器系の 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 例ずつ陽性であった。

5. 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、hPIV3 は hemagglutinin - neuraminidase 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。

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、hPIV3 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; 2×10^3 、HCoV 229E; 2×10^2 、hMPV; 2×10^3 、hPIV3; 5×10^2 であった。

6. MR-PCR 法において各呼吸器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 法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 法において 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。

7. 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。

8. 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、real-time RT-PCR 検査系と比較し、ほぼ同等から 10 倍~50 以内の感度差であることが示された。

9. 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。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。また、検出感度の検討を 10 倍段階希

釈した各 NA 遺伝子の合成 RNA を用いて行った結果、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、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。また、S247 および N247 保有株のウイルス培養上清を使用して、本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。

10. 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 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、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。

これまで臨床現場では、インフルエンザ A 型の亜型について、どの亜型であろうと治療薬は同じであるため、亜型を判別する必要性はないと考えられてきた。しかし、2009 年のパンデミックの時に小児で見られた発症早期より急速に呼吸障害が進行し重症化する肺炎は A/H1pdm2009 亜型に特有とされ、また、鳥インフルエンザのヒトへの感染例が国外で散発的に発生していることも考えると、今後のインフルエンザ感染症診療においては、亜型診断が必須になるものと考えられる。また、3 シーズンのインフルエンザ A の亜型同定結果と小児入院症例の臨床像との比較検討結果を踏まえると、インフルエンザ流行期における小児の呼吸障害を診察した際には、免疫クロマト法による抗原迅速検査が陰性であったとしても、インフルエンザ A/H1pdm2009 亜型によるウイルス性肺炎を常に念頭に置きながら診療にあたらなければならないことが分かった。

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。

[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。

[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。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。これまで、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てきたが、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。

[薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築]

今回構築した 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。

[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、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。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、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う事ができるようになるため、

インフルエンザの流行および治療に早期対応でき、診断、治療、予防等に大きく貢献できるツールとなる。

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ド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。

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。

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。

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性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も必要と考えられた。

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、黒田友顯

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) Mina Nakauchi, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Miho Ejima, Kunihiro Oba, Nami Konomi, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama, the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology* 83(7):1121-7.2011
- 2) Yuichi Harada, Ai Ninomiya-Mori, Yoshimasa Takahashi, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Tsutomu Kageyama, Yoshikazu Tada, Masato Tashiro, Takato Odagiri. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades

- of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine* 29(46):8330-8337, 2011
- 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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.
 - 7) 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
 - 8) 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.
 - 9) 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.

- 10) 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)
 - 11) 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.
 - 12) 影山 努. インフルエンザ診断における進歩. *臨床とウイルス*. 40(4):201-208. 2012
 - 13) 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(12):2635-2641, 2012.
 - 14) 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
2. 学会発表
- 国内会議
- 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
 - 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. 東京. 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. 大阪. 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. 大阪. 2012 年 11 月
 - 5) 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
 - 6) 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. 2013 年 10 月
 - 7) 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
 - 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 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

国外会議