

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 72/2012
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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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. 分担研究総合報告

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 分担研究総合報告書

## 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

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：

公立昭和病院呼吸器内科：村瀬享子、野田一成、大滝美浩、安田順一、青木茂行

公立昭和病院産婦人科：北麻里子

公立昭和病院救急科：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

公立昭和病院感染症科：小田智三

公立昭和病院小児科：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

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：高橋仁、高山郁代、中内美名、影山努

研究要旨：今回我々は、マルチウェル搭載のマイクロ流路チップおよび小型リアルタイム検出器と Direct RT-LAMP 法（蛍光検出法）を組み合わせ、ピペッター操作が全く必要のない簡便な操作で、複数のウイルス遺伝子を同時に検査できるポイント・オブ・ケア遺伝子検査システム（以下、POC 遺伝子検査システム）を新たに構築した。本研究では、3シーズンのインフルエンザ流行期間を中心に、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、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便な操作性を確保し、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ことが実証できた。また、POC 遺伝子検査システムにおいて、インフルエンザ A 型陽性、H1pdm2009 亜型・H3 亜型がともに陰性であった場合、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た場合には、検査の特異性が更に担保され、より精確な結果が得られる検査であると考えられる。

## A. 研究目的

現在、インフルエンザ感染症の診断には簡便なイムノクロマト法による抗原迅速検査が多用されており、一部に A/H1pdm2009 亜型を識別できるものがある。しかし RT-PCR 法などの遺伝子検査法と比べると検出感度は低く、特にウイルス排出量が少ない病初期は偽陰性となる可能性が高い。一方、リアルタイム RT-PCR 法などの遺伝子検査は、インフルエンザの型・亜型の同定が可能な高感度検出法であるが、結果が出るまで長時間を要するうえ、検査手技が煩雑で特別な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でしか検査ができない。一方、従来の RT-LAMP 法を一部改良した Direct RT-LAMP 法は、検体からの核酸精製を必要とせず、反応に必要な乾燥試薬があらかじめ反応チューブに入っているため、プライマーと検体抽出液を加えるだけの簡単な操作で、目的の遺伝子を約 45 分以内に検出できる診断系であり、病院等の臨床現場でも煩雑な手技を必要とせずに、遺伝子検査を行う事が可能である。しかし、この診断系においてもプライマーと検体抽出液の添加操作にマイクロピペッターが必要であるため、遺伝子検査を熟練していないとコンタミネーションを起こして偽陽性が出現するなど、正しい結果が得られない場合がある。そこで、今回我々は、マルチウェル搭載のマイクロ流路チップおよび小型リアルタイム検出器と Direct RT-LAMP 法（蛍光検出法）を組み合わせ、ピペッター操作が全く必要のない簡便な操作で、複数のウイルス遺伝子を同時に検査できるポイント・オブ・ケア遺伝子検査システム（以下、POC 遺伝子検査シス

テム）を新たに構築した。本研究では、3 シーズンのインフルエンザ流行期間を中心に、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ので報告する。

## B. 研究方法

### 1. イムノクロマト法による検査の評価

2009/2010 年シーズンにインフルエンザ A/H1pdm2009 によって肺炎にまで至り、当院小児科で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。

### 2. Direct RT-LAMP 法による検査の評価

Loopamp<sup>®</sup>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）を使用して、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 型陽性となり同意が得られた症例の鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液を対象に、診療現場である当院小児科外来の一区画で、A 型および H1pdm2009 亜型の同時検出（蛍光目視判定法）を行った。

### 3. POC 遺伝子検査システムによる検査の評価

新たに構築した POC 遺伝子検査システム（ソニー株式会社）を使用して、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、診療現場である当院

小児科外来の一区画で、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。

#### 4. インフルエンザウイルス A の亜型同定結果と小児における臨床像の検討

2010 年 1 月～2014 年 3 月までの間に当院小児科にインフルエンザ 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。

### C. 研究結果

#### 1. イムノクロマト法による検査の評価

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ていたが（図 1）、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（図 2）。

#### 2. Direct RT-LAMP 法による検査の評価

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、同一検体を用いて国立感染症研究所で実施したリアルタイム 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。

### 3. POC 遺伝子検査システムによる検査の評価（表 1）

#### 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。A/H1pdm2009 亜型は検出されなかった。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 11 分、A/H3 亜型で 15.5 分、インフルエンザ B 型で 8.5 分であった。

#### 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。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 7 分、A/H3 亜型で 7.5 分、インフルエンザ B 型で 8 分であった。また RS ウイルスで 8 分であった。

### 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。

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。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。ヒトコロナウイルス 229E は、POC 遺伝子検査システムですべてが偽陽性であった。

## 4. インフルエンザウイルス A の亜型同定結果と小児における臨床像の検討

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（図 3）。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（図 4）。

## D. 考案

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。実際、当院小児科で 2009/2010 年シーズンに経験したインフルエンザ A/H1pdm2009 亜型によるウイルス性肺炎症例においては、発熱早期からの強い呼吸障害で入院加療が必要となったにも関わらず、入院時のイムノクロマト法による検査が陰性であったため、結果としてインフルエンザとの診断が遅れて早期に抗インフルエンザ薬を投与できなかった症例も経験した。このような経験から、臨床現場において高感度な検査法が必要であると考え、Direct RT-LAMP 法による A 型および A/H1pdm2009 亜型同定検査を当院小児科外来の一画で実施した。しかし、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てしまった。Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査は、マイクロピペッターによるプライマー・検体懸濁液の分注操作が必要なため、コンタミネーションのリスクが高く、検査環境や検査する人の技量によっては、正しい結果とならず、ポイント・オブ・ケア検査としてベッドサイドで利用するには難しい場合もあると考えるに至った。このよう

な経緯から、今回、新たに POC 遺伝子検査システムを構築した。操作性はイムノクロマト法と同等で簡便な仕様となっている。また、遺伝子検査で一番問題になるコンタミネーションに関しては、ピペッターを使用せずに検査を行うこと、検査後の遺伝子増幅産物はチップに密閉されたまま廃棄できるため、リスクがほとんど無くなった。実際、同じ外来の画において POC 遺伝子検査システムで検査を 3 シーズン実施したが、コンタミネーションによる偽陽性は出現しなかった。

そして、3 シーズンの検討結果から、POC 遺伝子検査システムは、イムノクロマト法と同等またはより高い感度・特異性で、インフルエンザの型・亜型の同定が可能であった。しかし、POC 遺伝子検査システムの抽出時の検体希釈度が高いため、ウイルス量が少ない検体ではリアルタイム RT-PCR 法と比べて 10~100 倍検出感度が低くなる場合があることが判明しており、実際、リアルタイム RT-PCR 法で検出限界付近の検体は、POC 遺伝子で検査システムでは検出できない場合も見受けられた。

3 シーズンを通して、POC 遺伝子検査システムの検出感度向上や検査時間短縮などの改良に取り組み、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イムノクロマト法と同等まで短縮することができたが、その反面、偽陽性が出現するようにもなった。最終的に、本研究としては遺伝子検査の利点である特異性を担保することに検査としての重みを置いた。2013/2014 年シーズンの検討結果では、インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の特異度を全て 100%にすることができた。そして、陽性

判定までの反応時間もおおよそ 15 分前後と、イムノクロマト法よりは長くなったが、遺伝子検査としては、迅速性を保つこともできた。また、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、インフルエンザ流行期に鑑別が必要となるその他の呼吸器感染ウイルスの検出も試みた。今回は、アデノウイルス 2 型、ヒトボカウイルスを 1 例ずつ検出することができた。しかし、偽陰性・偽陽性例も存在したため、その他の呼吸器感染ウイルスの検出については、今後の検討課題である。

最後に、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、イムノ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。

今後、POC 遺伝子検査システムのような遺伝子検査法が導入され、高感度・特異的かつ簡便に短時間で感染症の原因がリアルタイムに同定できるようになると、臨床現場における感染症診断の技術水準の向上が期待でき、患者に対してはより高い医療水準で治療に貢献できるようになるものと考えられる。また、新型インフルエンザのみならず、他の新興・再興感染症の出現や感染の広がりを実リアルタイムにモニターする事も可能となり、感染症サーベイランスへの応用も考えられる。

## 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 型陽性、H1pdm2009 亜型・H3 亜型がともに陰性であった場合、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考えられる。今後、POC 遺伝子検査システムのような感度と特異性に優れた遺伝子検査法が可及的速やかに臨床現場に普及することで、感染症の診断や治療、予防に大きく貢献できるようになる日が来る事を期待したい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 生田陽二、甘利昭一郎、小田新、石川涼子、滝有希子、内山健太郎、吉田知広、大場邦弘、野田絵理、河野寿夫. 2009/2010 年シーズンパンデミックインフルエンザ A (H1N1) 2009 肺炎 25 症例の検討. 小児科臨床 64; 2349-2354, 2011.
- 2) 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; 275-279, 2012.
- 3) 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; 2635-2641, 2012.
- 4) 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、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会学術集会. 東京. 2012 年 10 月
- 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、田代眞人、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. 大阪市. 2012 年 11 月
- 4) 影山努、高山郁代、中内美名、田代眞人、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. 大阪市. 2012 年 11 月
- 5) 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
- 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. 札幌市. 2013 年 10 月
- 7) 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
- 8) 中内美名、高山郁代、高橋仁、大場邦弘、田代眞人、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
- 9) 影山努、高山郁代、中内美名、田代眞人、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

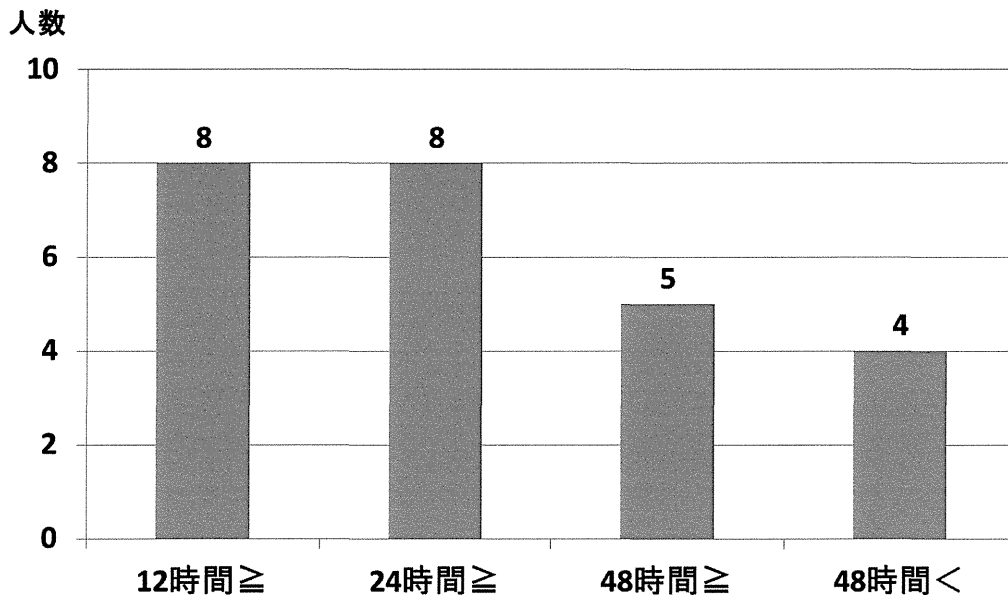


図 1. インフルエンザ A/H1pdm2009 亜型肺炎 25 症例の発熱から入院までの時間

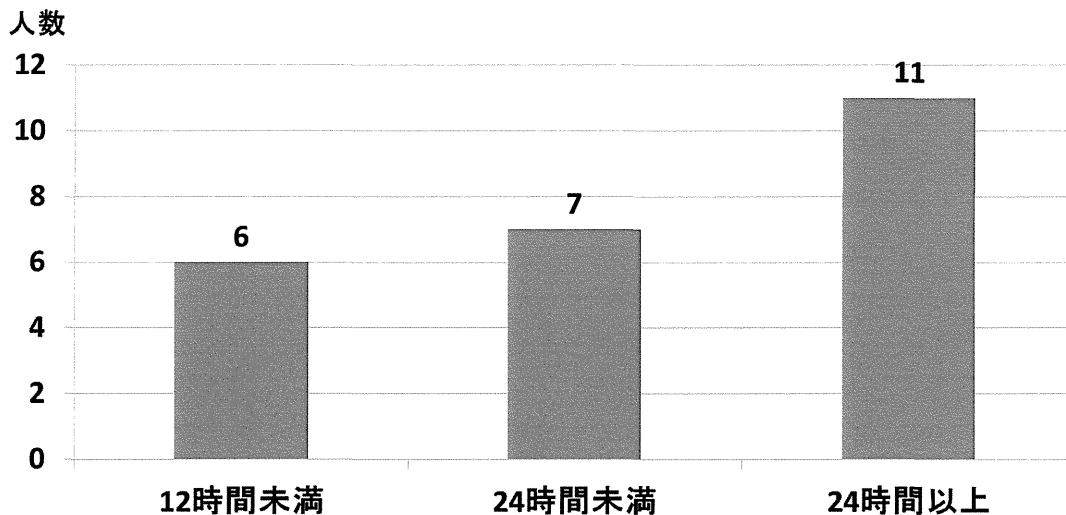


図 2. インフルエンザ A/H1pdm2009 亜型肺炎 24 症例の発熱から免疫クロマト法陽性までの時間（免疫クロマト法が陰性であったが兄弟に罹患者がおり臨床診断した 1 例を除く）

表 1. リアルタイム RT-PCR 法に対するインフルエンザウイルス型・亜型検出系 POC 遺伝子検査システムの感度・特異度と陽性判定までの反応時間(中央値)

インフルエンザ A 型

	n	感度	特異度	陽性判定時間
2011/2012 年シーズン	24	100%	100%	11 分
2012/2013 年シーズン	33	90.9%	89.3%	7 分
2013/2014 年シーズン	17	94.4%	100%	16 分

インフルエンザ A/H1pdm2009 亜型

	n	感度	特異度	陽性判定時間
2011/2012 年シーズン	0	-	-	-
2012/2013 年シーズン	2	50.0%	100%	15 分
2013/2014 年シーズン	14	87.5%	100%	13 分

インフルエンザ A/H3 亜型

	n	感度	特異度	陽性判定時間
2011/2012 年シーズン	24	91.7%	100%	15.5 分
2012/2013 年シーズン	29	96.6%	96.9%	7.5 分
2013/2014 年シーズン	2	100%	100%	14 分

インフルエンザ B 型

	n	感度	特異度	陽性判定時間
2011/2012 年シーズン	10	75.0%	100%	8.5 分
2012/2013 年シーズン	1	100%	100%	8 分
2013/2014 年シーズン	17	89.5%	100%	15 分

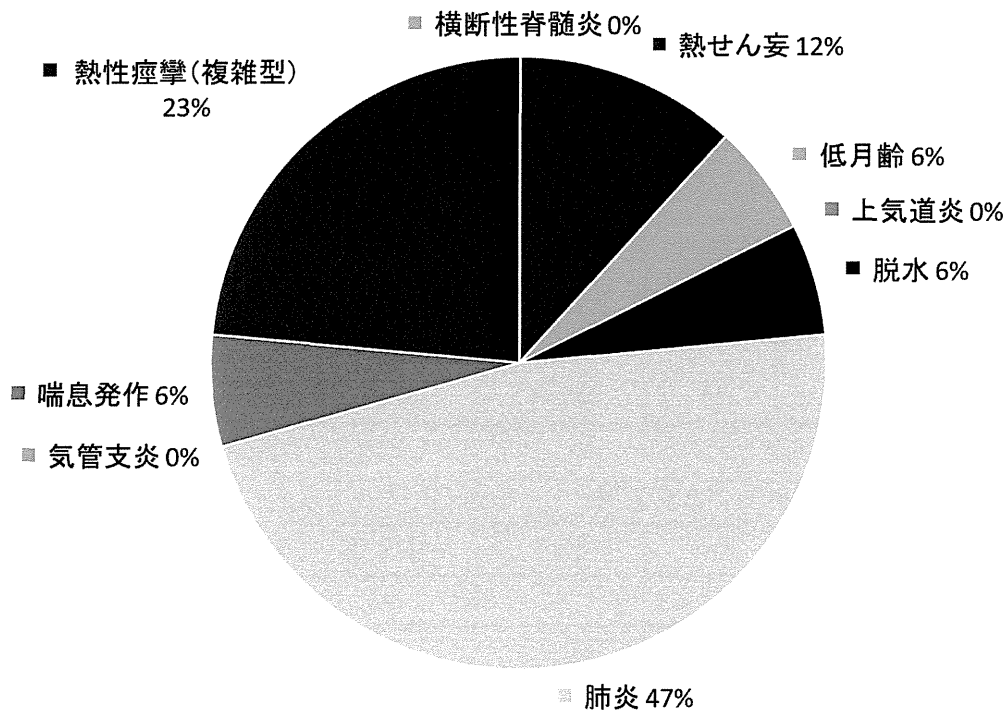


図 3. インフルエンザ A/H1pdm2009 亜型感染症で入院を要した小児の診断名の内訳

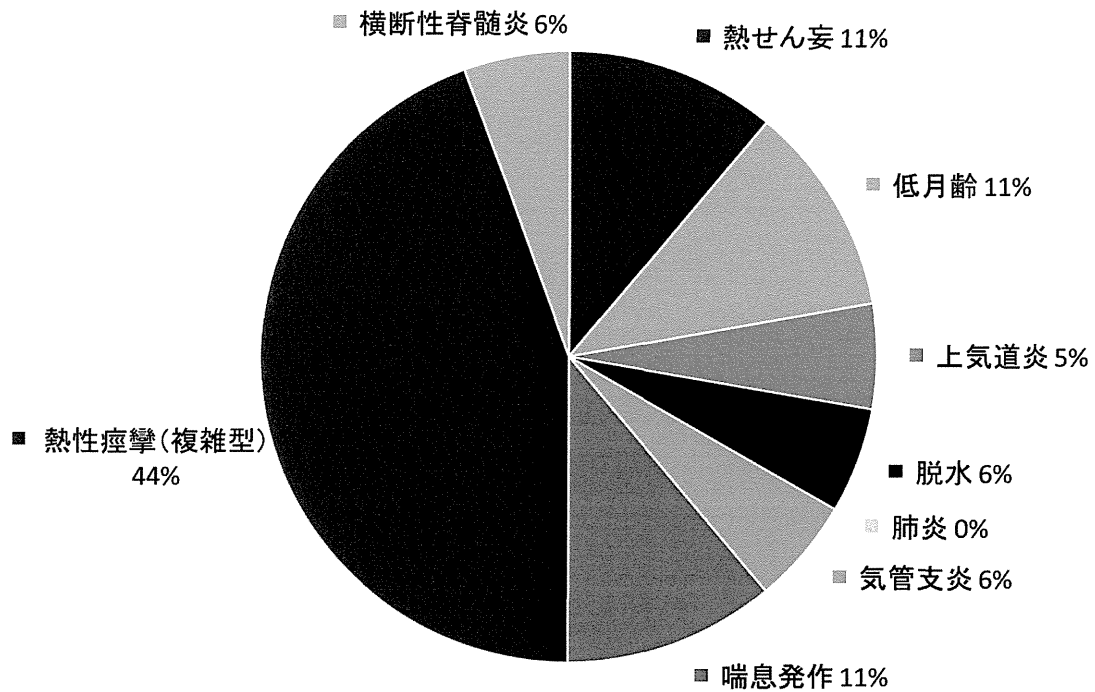


図 4. インフルエンザ A/H3 亜型感染症で入院を要した小児の診断名の内訳

## 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。これまで A 型インフルエンザウイルス、A/H1pdm 亜型インフルエンザウイルスを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法を構築してきた。

本研究ではインフルエンザ感染症を包括的に診断するために新たに A/H3 亜型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルス、A/H7 亜型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ており、これまでに A 型インフルエンザウイルス、A/H1pdm09 亜型

インフルエンザウイルスを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法を構築した。インフルエンザ感染症を包括的に診断するために、本研究では現在ヒトの間で流行する A/H3 亜型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する RT-LAMP 法の構築および改良、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を特異的に検出する RT-LAMP 法の構築を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. プライマーの設計

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過去 5 年間に流行した株の HA 遺伝子配列（A/H3 亜型検出系）

および NS 遺伝子配列 (B 型検出系) のアライメントを作成し、比較的保存されている領域を元にプライマーセットを設計した。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

A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット (H3-2)、

F3: CCTTGATGGAGAAAAGCTGCA

B3: CGTTTTGAGTGAAGTCCAGTC

FIP:

GCGTTCAACAAAAAGGTCCCATTTTTCT

AATAGATGCTCTATTGGGAGAC

BIP:

GTTACCCTTATGATGTGCCGGATTTTCTT

TCATTGTTAAACTCCAGTG

FL: TTGGAAGCCATCACACTGAG

LB: TCACTAGTTGAATCATCCGG

A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット (H3-60)、

F3: AGCTGGTTCAGARTTCCT

B3: CGGCACATCATARGGGTAAC

FIP:

AGAGCATCTATTAGTGTGCAGTTTWCAA

YAGGTGAAATATGCRAC

BIP:

TGGGAGACCCTCAGTGTGATAGTTGCTG

TRGGCTTTGC

FL: CCATCAAGGATCTGATGAGGACT

LB: AGAARTGGGACCTTTTTGTTGAACG

B 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット、

F3: GCAACCAATGCCACCATA,

L3: TTCTCTCTTCAAGRGACATC,

FIP:

TAGTCAAGGGCTCTTTGCCA/CTTTGAAG

CAGGAATTCTGGA,

BIP:

CAAGACCGCCTAAACAGACTAAA/CTTT

TACTTTCAGGCTCACTT,

FL: TGAAAGYCTTTCATAGCAC,

LB: GARTCAAGAATAAAGACTCACAAC

C 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット、

F3: CCAAATAATGGAAATGGTTGAAG

B3: CAGTAATACCAGCAATTTCGT

FIP:

CTCAACCAAGCTGTGATTGTTCCCTATAT

GATCACCCAGACGAC

BIP:

ACAGGAGTAATGTCTCAGAAAGTGGTG  
CTGGCTTTTCTTACTTCA

LF: ATTCGGATGTCTGGTGTGT

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

F3:

TTCCTGAGATTCCAAAA

B3: GGTTGGTTTTTCTATAAGCCG

FIP:

ACCAACCATCAATTAGGCCTTCTATTTG  
GTGCTATAGCGG

BIP:

GGTTTCAGACACCAGAATGCACACCTGT  
TATTTGATCAATTGCCG

LF: CCCATCCATTTTCAATGAAAC

LB: ACTGCTGCAGATTACAAAAG

2. A/H3 亜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  
の検討と検出系の改良

平成23年度まではH3亜型インフルエンザウイルス検出系では、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、流行株に対してA型インフルエンザウイルス検出系(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なるため、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、他の新たな領域に

プライマーセットを設計した (H3-60 primers)。

新たに構築した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。また、A/H3亜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やC型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、A/H3亜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. B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

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。また、B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やC型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、B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。

#### 4. 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、ヒトの間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、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。

#### 5. 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

A/H3 亜型、B 型、C 型 A/H7 亜型インフルエンザウイルス RT-LAMP 検出系の検出感度は 50-100opies/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、構築した 4 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、4 つの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から、先に構築された A 型、A/H1pdm 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。今回構築された全て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

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; 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):1121-1127, 2011

Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S; Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*. In press, 2012

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

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

Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Koichiro Iha, Mina Nakauchi, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa: Establishment of

serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

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会学術集会、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会学術集会、東京、2012 年 10 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、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した。そのために、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 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。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

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