

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。DNA ウイルスについてはこの増幅産物を、RNA ウイルスについては核酸増幅の際に 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

検出候補となるウイルスとして、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)、ヒト呼吸器合泡体ウイルス(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)の各ウイルスを候補として選択した。また、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。

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。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。

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 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。

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、アデノウイルス、ヒトボカウイルス、ヒト呼吸器合泡体ウイルス、ヒトコロナウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスの遺伝子を検出する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

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

Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol, 86(19):10805-20, 2012

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard.

Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. Biologicals, 40(1):96-99, 2012

2. 学会発表

高橋 仁、原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村 繁之、田代 真人、山本 典生
インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

原田 勇一、高橋 仁、中村 一哉、浜本 いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐 奈美、

浅沼 秀樹、板村 繁之、田代 真人、山本 典生
インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

浜本 いつき、原田 勇一、中村 一哉、高橋 仁、許斐 奈美、浅沼 秀樹、田代 真人、山本 典生
無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人
細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響
第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura
Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012

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 23-25 年度 分担研究総合報告書

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

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 ウイルス性呼吸器感染症の病原性ウイルス遺伝子の迅速・簡便な検出法の構築を目的として、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、大阪市感染症発生動向調査事業に供与され、かつ呼吸器病原性ウイルスの分離・検出が陽性となった患者臨床検体を用いて得られた POC 遺伝子検査システムでの測定結果について、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法での結果との、また、インフルエンザウイルスに関しては、さらに迅速診断キットでの結果との比較・検討を行った。

A. 研究目的

現在、臨床サイドでのウイルス性呼吸器感染症の診断においては、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RS ウイルスなどを対象としたいくつかの迅速診断キットが広く使用されている。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が可能となっている。臨床症状のみでの病原性ウイルスの特定が困難な場合には、これらのうちの数種類の診断キットを組み合わせ使用する事例も認められるが、あまり効率的ではない。また、インフルエンザウイルス迅速診断キットの場合、

A および B の型別は可能であるが、A 型の亜型までの同定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、さらに詳細な検査を行う必要がある。実験室レベルでのウイルス性呼吸器感染症の病原性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行われている。さらに、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)法による検出も近年応用さ

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、煩雑な検査手技に精通した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、ウイルス遺伝子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、実験室レベルでの POC 遺伝子検査システムの有用性についての評価を行うために、病原性ウイルスが分離・検出された臨床検体に対して、本システムを用いた遺伝子検出検査を行い、得られた結果について他法との比較・検討を行った。

B. 研究方法

1. インフルエンザウイルスに対する特異性の検討

2012/13 シーズンに、AH1pdm が分離された 4 検体 (すべてうがい液) および B 型が分離された 4 検体 (鼻汁 3 検体およびうがい液 1 検体) について、インフルエンザ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測定を行った。10 μ l の各検体を 190 μ l の専用抽出試薬に混合したものを測定に用いた。また、この用

量で遺伝子検出陰性となった検体に対しては、140 μ l の検体から抽出した RNA を用いて測定を行い、さらに 50 μ l の検体を 150 μ l の専用抽出試薬に混合して測定を行った。また、各検体について、インフルエンザウイルス迅速診断キット (クイックナビTM-Flu、デンカ生研株式会社) での測定を行った。検体 150 μ l を検体浮遊液に混合したものを測定に用いた。

2. 呼吸器ウイルスに対する特異性の検討

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、当所にて実施した 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。10 μ l の各検体を 190 μ l の専用抽出試薬に混合した後に測定を行った。

3. 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検出感度の検討

2013/14 シーズンに、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、インフルエンザウイルス遺伝子検出用の 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 μ l を専用抽出試薬 125 μ l に混合したものを測定に用いた。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™-Flu (デンカ生研株式会社) 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測定に用いた。

(倫理面での配慮)

使用した全検体は、大阪市感染症発生动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

1. インフルエンザウイルスに対する測定結果

10 μ l のインフルエンザウイルス分離陽性検体を用いて測定を行った結果、鼻汁では、B 型が分離された 3 検体すべてにおいて B 型遺伝子が検出された。また、うがい液では、AH1pdm が分離された 2 検体において A 型および H1pdm の遺伝子が検出された。10 μ l の検体量で陰性となったうがい液 3 検体の 140 μ l を用いて RNA を抽出した後に測定を行った結果、AH1pdm 分離陽性の 1 検体で A 型および H1pdm の遺伝子が、もう一方の同様検体で A 型のみ遺伝子が、また、B 型分離陽性のうがい液検体で B 型の遺伝子がそれぞれ検出された。さらに、RNA を用いた測定で A 型および H1pdm、また、B 型遺伝子が陽性となった 2 検体について、50 μ l の検体に 150 μ l の専用抽出試薬を混

合した後に測定を行った結果、A 型および H1pdm 遺伝子が検出された検体では A 型遺伝子のみが、また、B 型遺伝子が検出された検体では遺伝子は検出されなかった。本測定に用いた 8 検体のインフルエンザウイルス迅速診断キットの測定結果は、B 型が分離された鼻汁 3 検体のみで B 型が検出された (表 1)。

2. 呼吸器ウイルスに対する測定結果

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 HCoV 229E 遺伝子が非特異的に検出された (表 2)。

3. 季節性インフルエンザウイルス分離陽性うがい液に対する測定結果

各検査法による測定結果を表 3 に示した。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) が検出された。また、A 型の型または亜型のいずれかが検出されたものを含めると、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された。また、A 型の型または亜型のいずれかが検出されたものを含め

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 型が検出された。

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。

D. 考察

2012/13 シーズンに採取された臨床検体を用いた、インフルエンザウイルス遺伝子検出用の POC 遺伝子検査システムにおける測定では、ほぼウイルス分離結果と同様の遺伝子検出結果が得られたことから、本システムの特異性が確認されたものと思われる。また、迅速診断キットで陰性となったうがい液 2 検体の 10 µl を用いた測定において、AH1pdm が特異的に検出されたことから、本システムの検出感度は迅速診断キット以上であることが考えられた。

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た測定では、10 ウイルスのうちの 6 ウイルスにおいて、MR-PCR 法と同様のウイルス遺伝子が検出された。このことから、これら 6 ウイルスに関する本システムは、MR-PCR 法と感度的に遜色がないものと思われた。

なお、hMVP および HCoV HKU1 については、MR-PCR 法で陽性となった計 4 検体が本システムで陰性となったことから、検出系の再考が必要と思われた。また、測定した 3 検体において非特異的検出が認められた HCoV 229E についても、検出系の再考が必要と思われた。

2013/14 シーズンのインフルエンザウイルス分離陽性となった患者うがい液を用いた測定結果から、POC 遺伝子検査システムでは、うがい液においても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。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。また、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。なお、Ct 値が 38 近辺でも検出可能となった検体が存在すること、逆に Ct 値が 33 近辺でも検出不可能となった検体が存在することから、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。

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、インフルエンザウイルス

A(H7N9)型に罹患した可能性が考えられるインフルエンザウイルス A 型陽性患者が大阪市内で発生し、当患者の咽頭ぬぐい液検体を用いて、H7 を含むインフルエンザウイルスに対するリアルタイム RT-PCR 遺伝子検査を当所で実施した。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にお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

POC 遺伝子検査システムの実験室レベルでの測定への応用を検討するために、インフルエンザウイルスを含む呼吸器病原性ウイルスが分離・検出された検体を用いて、本システムでの測定を行った。その結果、今後の検討課題は多少存在するものの、インフルエンザウイルスおよび呼吸器ウイルスの実験室レベルでの遺伝子検出システムとして、迅速・簡便な点も含めて、本システムは有用であるものと思われた。また、2013/14 シーズンに、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。その結果、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

Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Ohya M, Goto K, Hase A, Iritani N: Detection of five rash-associated viruses using multiplex real-time PCR during 2006-2011. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65:430-432, 2012.

Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Hase A, Iritani N: Enterovirus 104 infection in adult, Japan, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 8: 882-883, 2012.

改田厚、久保英幸、入谷展弘、関口純一郎、長谷篤. ヒトパラインフルエンザウイルス感染症. *臨床とウイルス* 40:142-149, 2012.

久保英幸、改田厚、入谷展弘、関口純一郎.

大阪市における2011/12シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析. 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 74:1-4, 2012.

改田厚、関口純一郎、久保英幸、入谷展弘、後藤薫、長谷篤. 手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出. 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 74:5-9, 2012.

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シーズンに大阪府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

改田厚、久保英幸、関口純一郎、入谷展弘: 呼吸器感染症患者からのエンテロウイルス 104 型の検出および遺伝子解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月

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. 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

回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. インフルエンザウイルス分離陽性検体を用いたインフルエンザウイルス遺伝子検出用
POC 遺伝子検査システムでの測定結果

検体番号	分離株の型・ 亜型	検体種類	検体使用量			迅速診断キットでの 測定結果 [#]
			10 μ l	50 μ l	140 μ l [*]	
12-1560	AH1pdm	うがい液	A+, H1pdm+	ND [§]	ND	-
12-1632	AH1pdm	うがい液	-	ND	A+, H1pdm-	-
12-1633	AH1pdm	うがい液	-	A+, H1pdm-	A+, H1pdm+	-
12-1634	AH1pdm	うがい液	A+, H1pdm+	ND	ND	-
12-1493	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+
12-1538	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+
12-1761	B	うがい液	-	-	B+	-
12-1769	B	鼻汁	B+	ND	ND	B+

* : 検体 140 μ l から RNA を抽出して測定を行った

: クイックナビTM-Flu(デンカ生研株式会社) に検体 150 μ l を混合し、測定を行った

§ : 測定未実施

表 2. マルチプレックス・リアルタイム PCR 法でウイルス遺伝子が検出された検体を用いた
呼吸器ウイルス遺伝子検出用 POC 遺伝子検査システムでの測定結果

検体番号	検出ウイルス*	検体種類	Ct値 [#]	特異的検出	非特異的検出
12-680	AdV2	咽頭ぬぐい液	22.9	AdV2+	-
12-1303	AdV2	咽頭ぬぐい液	23.8	AdV2+	-
12-626	AdV4	鼻汁	26.1	AdV4+	-
12-719	AdV4	鼻汁	24.0	AdV4+	-
12-125	HBoV	鼻汁	23.2	HBoV +	HCoV 229E +
12-245	HBoV	咽頭ぬぐい液	22.7	HBoV +	-
12-195	hMPV	鼻汁	19.3	-	HCoV 229E +
12-240	hMPV	鼻汁	24.8	-	-
12-388	HCoV NL63	鼻汁	26.0	HCoV NL63 +	-
12-1506	HCoV NL63	鼻汁	26.7	HCoV NL63 +	-
11-1382	HCoV HKU1	鼻汁	25.0	-	-
11-1395	HCoV HKU1	鼻汁	21.0	-	-
12-28	HCoV OC43	鼻汁	22.0	HCoV OC43 +	-
12-1375	HCoV OC43	鼻汁	19.0	HCoV OC43 +	-
11-1486	HCoV 229E	鼻汁	23.9	HCoV 229E +	-
11-1514 [§]	HCoV 229E	鼻汁	28.1	HCoV 229E +	-
	RSV A			RSV A +	
12-129	RSV A	鼻汁	23.0	RSV A +	-
12-1359	RSV A	鼻汁	21.8	RSV A +	HCoV 229E +
12-814	RSV B	鼻汁	26.0	RSV B +	-
12-861	RSV B	鼻汁	20.8	RSV B +	-

* : マルチプレックス・リアルタイム PCR 法で遺伝子が検出されたウイルス

: マルチプレックス・リアルタイム PCR 法で得られた Ct 値

§ : マルチプレックス・リアルタイム PCR 法で HCoV 229E および RSV A が共検出された検体

表3. 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

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

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 本研究において、インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の NA 遺伝子における新規薬剤耐性マーカーS247N 変異を検出する迅速、簡便な duplex one-step real-time RT-PCR 法を構築した。本方法は、既存の H275Y 変異検出系と併せて使用することが可能であり、近年報告された H275Y 変異と S247N 変異の両薬剤耐性マーカーを有し、非常に高度な薬剤耐性能を獲得した変異株をスクリーニングする上で有用である。

また、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、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示された。

A. 研究目的

薬剤耐性マーカーS247N 変異検出系の構築

現在、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。日本は世界最大の NAI の使用国であるため、薬剤耐性株の出現をモニターするためにも持続的な薬剤耐性株サーベイランスを行う事が非常に重要である。2010/2011 シーズン以降、当所で構築した A(H1N1)pdm09 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）を検出する duplex one-step real-time RT-PCR 法は、主に全国の地方衛生研究所が行っているインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の薬剤耐性株サーベイランスに用いられている。（Nakauchi et al. J. Med. Virol. 83:1121-1127, 2011）

近年、H275Y 変異に加えて、新たな薬剤耐性マーカーとして 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）が報告された。この S247N 変異は単独では薬剤耐性能をほとんど示さないが、H275Y と S247N の両方の変異があ

ると、オセルタミビルに対して H275Y 変異単独よりも高度に耐性化する事が報告されている。また、S247N 変異を持つ株は、2010 年 12 月以降、アジア太平洋エリアで検出されており、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いる。本研究では、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行った。

POC 遺伝子検査システムの開発

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て、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。

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、平成 23 年度は、当所で構築した既存の real-time RT-PCR 検出系との相対比較を行った。さらに、平成 25 年度は、ウイルスもしくは臨床検体から抽出した RNA を用いて、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、より詳細な検討を行った。

B. 研究方法

薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築

H275Y 変異と同時に検出することを想定

し、以前に当所で構築した、duplex one-step real-time RT-PCR 法を用いた A(H1N1)pdm09 の H275Y 変異検出系と同一の反応条件および解析方法を使用した。具体的には、QuantiTect Virus + ROX Vial Kit (Qiagen) を使用し、反応系 20 μ L 中 2 μ L をテンプレートとした。また、forward および reverse プライマーは H275Y 変異検出系と同じ配列を使用し、反応液中の最終濃度は各 600nM とした。S247N 変異検出用 TaqMan MGB プローブは、過去 3 年間にヒトで流行した A(H1N1)pdm09 亜型インフルエンザウイルスの NA 遺伝子配列のアライメントを元に、それらの共通領域内に S247(A(H1N1)pdm09 の NA 遺伝子の 740 番目の核酸が G) および N247(同じく A) の検出用プローブを各 1 本設計し、それぞれ反応液中の最終濃度が 100nM になるように使用した。反応および解析は、LightCycler 480 II (Roche) を使用して行い、反応終了後に蛍光のエンドポイント解析を行った。

構築した検出系については、S247 および N247 の NA 遺伝子の合成 RNA を用いて検出感度および特異性の検討を行った。また、特異性の検討については、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た検討も行った。

POC 遺伝子検査システムの開発

平成 23 年度に構築した POC 遺伝子検査システムにおける A 型、B 型、A/H1pdm09 亜型および A/H3 亜型検出系と当所で構築した既存の real-time RT-PCR 検出系との間で検出感度の相対比較を行った。POC 遺伝子検査システムと既存の real-time RT-PCR 検出系では、1 回の検査系あたりの容量が異なるため、比較に際しては、ウイルスから抽出した RNA を使用し、1 回の検査系に含まれる総 RNA 量を揃えて比較検討を行

った。

また、臨床検体を使用した検出精度および特異性の確認も行った。計 30 検体を使用して、POC 遺伝子検査システムでインフルエンザウイルスの検出を行った。また、それぞれ同じ患者由来の検体から RNA を抽出し、既存の real-time RT-PCR 検出系を使用した検査を行い、結果の比較を行った。

平成 25 年度には新たに C 型および A/H7N9 亜型検出系も構築し、POC 遺伝子検査システムに組み込み、インフルエンザ検査系の各項目の検出感度の詳細な検討を行った。

検討は、A/California/7/2009 (H1N1pdm09)、A/Texas/50/2012(H3N2)、A/Anhui/1/2013

(H7N9)、B/Massachusetts/2/2012 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 検出系を用いて、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。

本検討は、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。

POC 遺伝子検査システムの判定は、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。

検出限界値については、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

薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築

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。各プライマーの配列は、5'-(VIC)CCATYACTYGGTC(MGB)-3'、5'-(FAM)CCATYATYGGTC(MGB)-3' である。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(図 1)。

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(図 2)。

POC 遺伝子検査システムの開発

平成 23 年度に構築した POC 遺伝子検査システムの A 型、B 型、A/H1pdm09 亜型および A/H3 亜型検出系について、ウイルス RNA を用いて、既存の real-time RT-PCR 検出系との検出感度の相対比較を行ったところ、約 10 倍低い検出感度であった。この検討において、型、亜型間での交差反応は認められなかった。

また、臨床検体を使用した検出精度および特異性の確認も行った。臨床検体 30 検体の POC 遺伝子検査システムを使用した判定では、A/H3 亜型陽性 19 検体、B 型陽性 2 検体、陰性 9 検体という結果だった。同じ患者由来の検体を既存の real-time RT-PCR 検出系で検査したところ、A/H3 亜型陽性 19 検体、B 型陽性検体 1 検体、陰性 10 検体という結果となった。これらの臨床検体を使用した検討においても、型、亜型間での交差反応は認められなかった。

平成 25 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各項目の検出感度の詳細な検討では、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。

この検討において、A 型検出系では、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 検出系と比較し、ほぼ同等か 10 倍以内の感度差であることが示された。また、他の検出系の検出限界値は、real-time RT-PCR 検出系と比較し、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 検出系と比較して 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、一連の検討において偽陽性は確認されなかった。

D. 考察

薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築

今回新たに構築した S247N 変異検出系は、以前、本所で構築した H275Y 変異検出系と同様に、迅速、簡便に S247N 変異を検出できる初めての方法である。また、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も可能であり、検出感度、特異性の検討においても、感度かつ特異度の高さが示され、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非常に有用と考えられた。

POC 遺伝子検査システムの開発

平成 23 年度に行ったウイルス RNA を使用した検出感度の相対的な検討では、POC 遺伝子検査システムは、既存の real-time RT-PCR 検出系と比較し、約 10 倍低い検出感度であった。しかし、既に Direct RT-LAMP 法自体が real-time RT-PCR 法と比較して、10～100 倍感度が低下することが知られていることを踏まえると、Direct RT-LAMP 法を使用した検出系をマイクロ流路チップに組み込んでも検出感度には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

また、臨床検体を使用した検討において、POC 遺伝子検査システムで B 型陽性となった 1 検体が既存の real-time RT-PCR 検出系の検査結果では陰性と判定された。しかし、この臨床検体は、発症後長期間経った後に採取した検体であったこと、また、同患者

の別に採取した検体で行った迅速診断キットでの結果が B 型陽性であったことから、ウイルス量が非常に少ない検体で、既存の real-time RT-PCR 検出系に対し、偶然、検出限界付近の RNA 量しか含まれなかったものと考えられた。この 1 検体以外の検体では、POC 遺伝子検査システムと既存の real-time RT-PCR 検出系での検査結果の間に齟齬はなかった。以上のことから、POC 遺伝子検査システムは、臨床検体を使用した検査において十分な検出感度を備えていると考えられた。

平成 25 年度には、新たに構築した 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各項目の検出感度について、より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、本検討では、10 倍以内の感度差となり、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も必要であると考えられた。

E. 結論

薬剤耐性マーカー S247N 変異検出系の構築

S247N 変異が H275Y 変異と同時に起こると、臨床的にも深刻な非常に高度な薬剤耐性能を獲得するため、S247N 変異も H275Y 変異と併せて監視すべきである。今回構築した S247N 変異株の検出方法は、現在全国の薬剤耐性株サーベイランスで使用している H275Y 変異を検出する duplex one-step RT-PCR 法に対して、S247N 変異検出用の

プローブを新たに準備するだけで導入することが可能であり、S247N 変異株のスクリーニングに非常に有用な方法であると言える。今後、国内での薬剤耐性株サーベイランスを強化するためにも、新たな薬剤耐性マーカーが同定された場合には、本研究で行ったように新規検査法を構築して、薬剤耐性株のモニターを直ぐに行える体制を整えておく事が非常に重要である。

POC 遺伝子検査システムの開発

平成 23 年度に行った検出感度についての相対的な比較検討では、POC 遺伝子検査システムが十分な感度と特異性を持っていることが示された。

さらに、平成 25 年度には、試薬を変更し、新たな検出系も加えた 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を行った。結果、各検出系が平成 23 年度の比較検討時より、さらに高感度になっていることが改めて示された。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、平成 25 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、POC 遺伝子検査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

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): 1121-1127, 2011

Ikuyo Takayama, Hiroki Sato, Akira Watanabe, Mio Omi-Furutani, Akihiro Sugai, Keita Kanki, Misako Yoneda, Chieko Kai; The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*. 424(1):45-55, 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

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

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

Ikuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato Tashiro; Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. *Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance*, Rio de Janeiro, November, 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

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、ケーパタウン、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、ケーパタウン、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

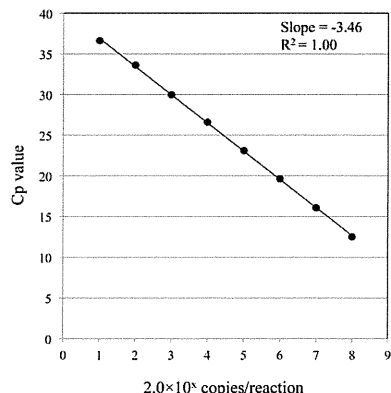
該当なし

3. その他

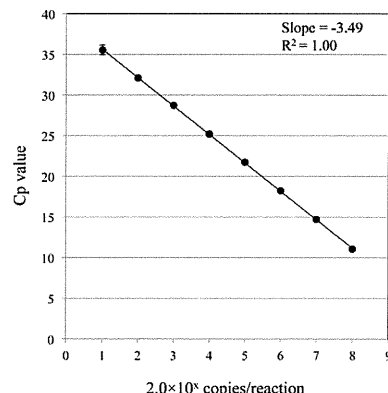
該当なし

図1 S247N 変異検出系の検出範囲

(A)

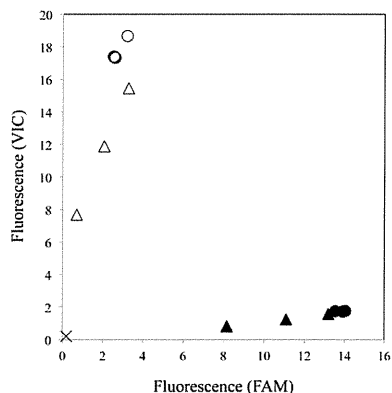


(B)



A/Perth/265/2009 (A) および A/Perth/29/2011 (B) の NA 遺伝子の合成 RNA を段階希釈したものをテンプレートとして描いた標準曲線(Cp 値と log₁₀ の RNA 濃度を各軸においた)。Cp 値は 5 回の反応の結果の平均をとした。標準曲線の相関係数と傾きは、各グラフの右上に示した。

図2 ウイルス培養上清を使用した S247N 変異検出系の蛍光のエンドポイント解析



y 軸に S247 (VIC)、x 軸に N247 (FAM) の蛍光をそれぞれプロットした。S247 と判定されたウイルス上清は○で、N247 と判定されたウイルス上清は●で示した。陽性コントロールとした A/Perth/265/2009 (S247 保有株) および A/Perth/29/2011 (N247 保有株) はそれぞれ△、▲で示した。陰性コントロールは、×で示した。

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/μL)	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/μL)		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