

#### D. 考案

ベトナムの国立ハノイ小児病院の PICU において、年齢・性別の切り口から、鳥インフルエンザを含むインフルエンザによる重症 ARDS 症例の特徴を、当研究班を通じてとらえることができた。インフルエンザは、他の重症 ARDS 症例と比べ、男児、一歳以上の群にインフルエンザ症例が多く分布していることが示された。

当研究班の大きな長所は、症例収集のデザインに有る。病原体を問わず、重症 ARDS を全て探知し収集することによって、バイアスが生じ難いデザインであると考えられる。つまり、いわゆる *test-negative design* (Jackson and Nelson 2013) 同様、医療アクセスした全ての（この場合重症 ARDS）症例を対象としている為、検査診断した時点で初めて病原体が示さることとなり、性別・年齢と起因病原体の相関に関しては、バイアスが生じにくい。

インフルエンザのこの様に顕著な性別・年齢分布に関しては、概ね 3 つの可能性が考えられる:1) 医療アクセスの差 2) 曝露歴の差 3) 生物学的な違い。医療アクセスの要因は、上記の考察により、考えにくいと思われる。他の病原体による重症 ARDS ではより女児に偏った、より若年層の分布であったことから、インフルエンザ重症 ARDS のみ年上の男児が医療アクセスをしていると言う状況は考えにくい。また、曝露歴の要因も考えにくいと思われる。鳥インフルエンザ A(H5N1) であれば、性別・年齢分布はリスク因子である鳥の曝露歴を反映している可能性

が有るが、頻繁に人一人感染する季節性インフルエンザでも同様の性別・年齢分布が見られることから、曝露による分布ということも考えにくい。

性別・年齢分布に関して最後に考えられるのが、生物学的な要因によるものである。スペイン、カナダ、デンマーク、日本等から、季節性・パンデミックインフルエンザの罹患率や死亡率が男児の方が高いと報告されており (Gabriel and Arck (JID 2014), Eshima et al (Plos One 2011)、免疫・生理的な理由が挙げられている。近年、性差と感染症の関係に関心が高まっており、この様に年齢・性別を疫学的に解析・評価することによって、重症化要因の解析など、今後の研究につながる可能性が有る。

最後に、2013 年末期から 2014 年には、麻しんの流行により重症 ARDS 症例の発生率が大きく上昇し、性別と年齢分布に大きな変化が認められた。

#### E. 結論

インフルエンザは他の重症 ARDS 症例とは異なる性差・年齢層を示し、性差・年齢層が起因病原体ごとの疫学を端的に表現するインジケータであることが示された。また、年齢・性別は容易に収集できる情報であり、この継時的変化を解析することにより、リソースが限られたセッティングにおいても、地域の疾患発生状況の変化を的確にかつ迅速にとらえることができる可能性が示唆された。性別と年齢を切り口に、重症化要因の解析など、今後の対応につながる研究を行っていくことも検討課題となろう。今後も重

症 ARDS に関する情報収集を継続し、疫学状況の変化に注意を払っておく必要がある。

**F. 健康危険情報**

特記すべきことなし

**G. 研究発表**

1. 論文発表 なし（論文作成中）
2. 学会発表 なし

**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

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
分担研究報告書

ハノイ国立小児病院 PICU における重症 ARDS 症例の病原体および  
バイオマーカー探索のためのオンサイト解析系の確立

研究分担者 鈴木忠樹 国立感染症研究所感染病理部 室長

研究要旨：

高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト感染例は重症 ARDS を生じ死亡率が高い。これらの症例の肺組織では肺胞障害を伴う部位において肺胞上皮細胞へのウイルス感染が見られ、ウイルス感染そのものが直接的に肺胞障害、重症 ARDS を惹起していると考えられている。しかしながら、このような病態形成機構が、他の呼吸器ウイルス感染症には見られず、H5N1 感染に特異的な事象であるのかを明らかにするためには、同様の環境下で起こる「H5N1 感染がなく、かつ明らかな肺以外の発症要因を持たない ARDS 症例」の詳細な解析を行う必要がある。そこで、我々は、2003 年から 2008 年のあいだに 10 例の H5N1 感染死亡例を経験しているベトナムのハノイ国立小児病院（NHP）において肺内要因による重症 ARDS 症例から採取した検体を用いて既知の呼吸器ウイルスを網羅的に検索し、ARDS の原因となりうる病原体の同定と分子病態解析を試みている。このような臨床研究のための臨床検体の輸送には煩雑な手続きが必要なことから、迅速な研究遂行のためには現地で検体を処理し、検査を実施することが望ましい。そのため、我々はオンサイトで簡便かつ感度が高い病原体検索を可能とする系を構築し、さらに、各症例の病態を分子レベルで理解するために、血清および気管洗浄液を用いたサイトカインマルチプレックスアッセイ定量解析の系を構築した。

A. 研究目的

H5N1 亜型等による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症は季節性インフルエンザ致死率が高いことが知られている。これは、ヒトの気道上皮細胞に馴化した季節性インフルエンザウイルスと

は異なり、ヒト肺胞上皮細胞へウイルス感染する事により直接的に肺胞を傷害し、重症 ARDS を惹起し重症化することが原因と考えられている。しかしながら、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の致死率は国や地域によってバラツキが

見られており、社会的要素を含むその他の重症化要因が存在することが考えられる。このような重症化要因を明らかにしておくことは、未だに高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の発症例のない本邦における現実的な対策を決定する上で重要であるが、現在のところ本疾患の発生は限られており、日本国内での要因対照研究の実施は困難である。そこで、本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の主要な病態である重症 ARDS に着眼し、患者発生国／地域において、「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染のない重症 ARDS 症例」と「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症例による重症 ARDS 症例」との比較検討を行うことにより、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症重症化の背景および特異的要因を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 研究の対象

2003 年から 2008 年のあいだに 10 例の H5N1 感染死亡例を経験しているベトナムのハノイ国立小児病院 (NHP) の PICU 入院患者のうち病原体検出の有無は問わず肺内要因による重症 ARDS を発症した症例。観察期間は 2013 年 11 月から 2014 年 10 月までとした。これらの症例から PICU 入院時に血清および気管洗浄液サンプルを採取し、病原体検索とバイオマーカー探索のためのサイトカイン／ケモカインの定量を実施した。臨床検体の国際輸送には煩雑な手続きが必要なことから、迅速な研究遂行のためにハノイ国立

小児病院での検体保管／処理および検査を実施した。

### 2) 呼吸器感染ウイルス検出キットによる網羅的解析

病原体検出検査のうち、細菌に対しては従来の培養法がハノイ国立小児病院においても利用できるが、ウイルスの同定に関しては個々のウイルスに対して個別に核酸検査を実施する必要がある、可能性のある全ての病原ウイルスについてスクリーニングを行うことは現実的でない。そこで、ウイルス検出検査としては、アメリカ、カナダ、EU 圏で対外診断薬として認可され、信頼度の高い検出結果を供出している xTAG RVP FAST v2 RUO キットを用いたスクリーニングを行った。xTAG RVP FAST v2 RUO キットは Influenza virus A/H1、Influenza virus A/H3、Influenza virus A/H1N1pdm09、Influenza virus B、Respiratory Syncytial Virus、Parainfluenza Virus 1、Parainfluenza Virus 2、Parainfluenza Virus 3、Parainfluenza Virus 4、Human Metapneumovirus、Enterovirus / Rhinovirus、Human Bocavirus、Corona Virus NL63、Corona Virus 229E、Corona Virus OC43、Corona Virus HKU1、Adenovirus の 19 種類のウイルスとそのサブタイプに対する特異的プライマーセットを含んでおり、これらのウイルスを検出可能である。各症例 200 $\mu$ L の気管支洗浄液から MinElute Virus Spin キットを用いて RNA/DNA を抽出し、抽出核酸を xTAG RVP FAST v2 RUO キットでキット付属の説明書に従い処理し Luminex 100 システムにて計測した。

### 3) 血清・気管洗浄液中のサイトカイン・ケモカインの定量

血清および気管洗浄液中のサイトカイン・ケモカインは Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen)を用いてプロトコールに従いサンプル処理を行い、Luminex100 システムにて計測を行った。

(倫理面からの配慮について)

臨床検体を用いた病原体およびバイオマーカーの検索は、ベトナム、ハノイ国立小児病院の倫理審査委員会の承認を得てハノイ国立小児病院にて実施した。

## C. 研究結果

### 1) 病原体検索

2013年11月から2014年10月の期間にハノイ国立小児病院 PICU に入院した重症 ARDS 患者として 51 例が本研究に登録された。そのうち、これまでに 33 症例について血清および気管支洗浄液について病原体検索検査を行ったところ、32 症例で何らかのウイルスゲノムが検出された。また、そのうち 15 症例で何らかの細菌が検出され、1 症例で真菌が検出された。気管支洗浄液中に検出されたウイルスとしては、23 例で麻疹ウイルス、16 例でアデノウイルス、13 例でサイトメガロウイルス、4 例で RS ウイルス、4 例でインフルエンザウイルス、2 例でパラインフルエンザウイルスであった。32 症例中 24 症例では、複数のウイルスゲノムが同時に検出されており、多重感染の可能性が考えられた。

### 2) 血清・気管洗浄液中のサイトカイン・ケモカインの定量

51 症例の登録症例のうち、これまで 18 症例について、血清および気管洗浄液中の IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-4、IFN $\gamma$ 、IL-8、IL-5 の定量を実施した。その結果、いくつかの症例において、血清および気管支洗浄液中のこれらのサイトカインの著明な上昇を認めた (図 1)。気管支洗浄液と血清との相関については症例毎のバラツキが大きく一定の傾向は認められず、気管支洗浄液採取の手技のバラツキが影響していると考えられた。血清サイトカインについては、致死経過をたどった症例において、PICU 入院時に血清 IL-6 と血清 IFN $\gamma$  が高値を示した (図 2)。特に血清 IL-6 と血清 IFN $\gamma$  の双方が高値を示す症例の予後が悪く、PICU 入院時に血清 IL-6>100 pg/mL、血清 IFN $\gamma$ >10pg/mL となった症例の致死率は 100% であった (図 3)。

## D. 考案

本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の重症化要因の一つである重症 ARDS 発症に着眼し、「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染のない重症 ARDS 症例」と「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に伴う重症 ARDS 症例」との比較検討を行うために、ハノイ国立小児病院にて、重症 ARDS 症例の病原ウイルス同定と病態と相関するバイオマーカー探索を試みている。ウイルス感染症疑いの臨床検体の国際輸送には煩雑な手続きが必要なことから、迅速な研究

遂行のために現地での検体処理および検査を実施することを基本方針とし、病原ウイルス検索のために Luminex システムを用いた呼吸器感染ウイルス検出キットによる網羅的解析を、重症化のバイオマーカー探索のために、Luminex システムを用いたマルチプレックスサイトカイン定量解析を行った。

これまでに集まった症例について病原ウイルス検索を行ったところ、32 症例で何らかのウイルスを検出した。また半数以上の症例で複数のウイルスが検出された。さらに、血清・気管支洗浄液中のサイトカイン定量解析により、PICU 入院時の血清 IL-6 および INF- $\gamma$  値が予後と関連していることを見出した。今後、この系を用いてハノイ国立小児病院 PICU に入院した重症 ARDS 症例について前向き観察研究を継続していく予定である。

#### E. 結論

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症による重症 ARDS の重症化機構を解明するために、鳥インフルエンザウイルス感染症発生国において、簡便かつ感度が高い病原体検索とバイオマーカー検索を可能とする系を構築した。これらの検査データを臨床データとすり合わせ、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症例との比較検討を行うことにより、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の重症化機構の背景および特異性が明らかになり、新たな予防・治療法開発のための礎となることが期待される。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

- 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）
  - Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 2014 Sep 28. doi: 10.1111/neup.12171.
  - van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Jul 30;74:28-34. doi: 10.1016/j.addr.2014.05.011.
  - Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J Virol*. 2014 Aug 1;88(15):8597-8614.
  - Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E,

Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16. doi: 10.1128/JVI.03677-13.

## 2. 学会発表

### 【国内会議】

- 1) 齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹：高病原性鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、神奈川県
- 2) 大原有樹、鈴木忠樹、中野哲郎、齊藤慎二、相内章、秋本和憲、長谷川秀樹：低毒性型合成二重鎖 RNA uPIC を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、神奈川県
- 3) 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代真人：経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
- 4) 齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、

小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡

- 5) 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡
- 6) 鈴木忠樹、大原有樹、中野哲郎、齊藤慎二、寺内芳彦、相内章、長谷川秀樹：合成二本鎖 RNA uPIC をアジュバントとする経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、2014 年 12 月、福岡

### 【国際会議】

該当無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

図1. 血清・気管支洗浄液中のサイトカイン定量

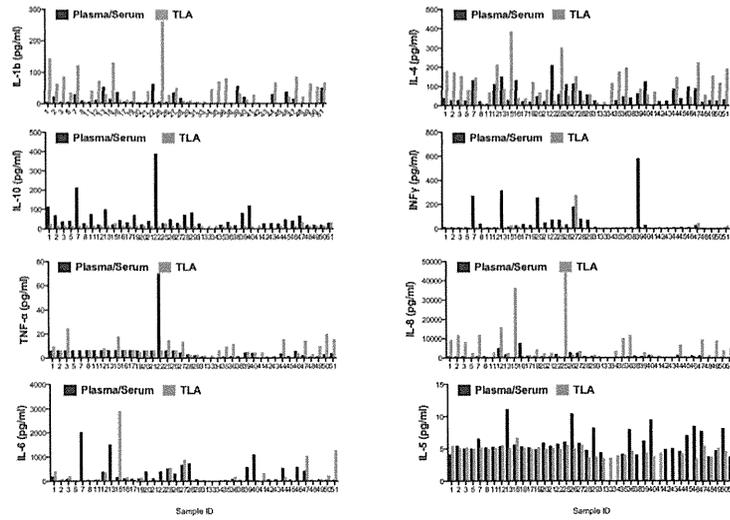


図2. 血清・気管支洗浄液中のサイトカイン量と予後

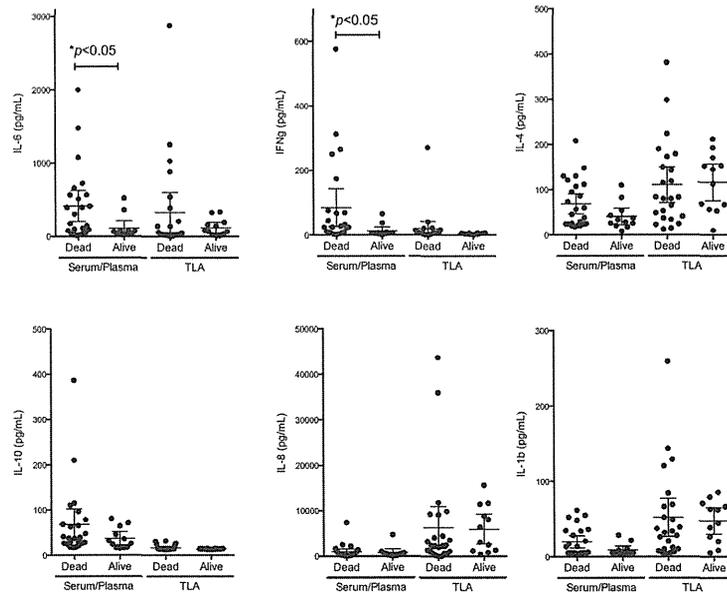
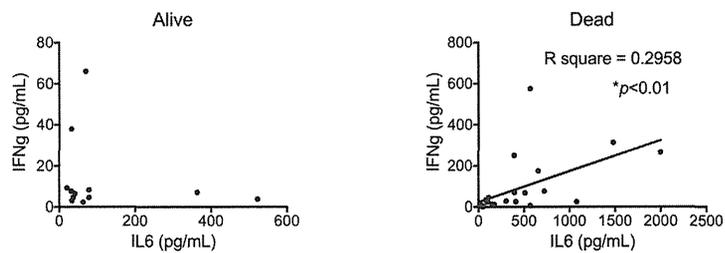


図3. 血清 IL6/IFN- $\gamma$  値と予後



厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
 高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究  
 (H25-新興-一般-011)

## 2014(H26)年度 第一回研究班 班会議 プログラム

日時:2014年7月4日(金)13:30-17:00

会場:国立感染症研究所 共用第三会議室

1. 新旧代表挨拶 河内 正治 (国立国際医療研究センター・苫小牧市立病院)  
 中島 典子 (国立感染症研究所)

厚生労働省健康局結核感染症課 新型インフルエンザ対策推進室  
 廣澤友也 室長補佐

2. 発表・質疑応答

発表者(所属)		発表課題
13:40-14:00	中島 典子 (国立感染症研究所・感染病理部)	研究班の概要と今後の方向性
14:00-14:20	本間 栄 (東邦大学医学部医学科 内科学講座呼吸器内科学分野)	ARDSおよび間質性肺炎急性増悪における次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体検出法の有用性
14:20-14:40	河内 正治 (国立国際医療研究センター) (苫小牧市立病院)	ハノイ国立小児病院PICUにおける肺内要因の重症ARDS症例の先行的研究 -Second Stage-
14:40-15:00	高崎 仁 (国立国際医療研究センター)	新型インフルエンザ等の呼吸器感染症に起因する重症ARDSの治療研究
15:00-15:30	休憩	
15:30-15:50	松井 珠乃 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)	重症急性呼吸促迫症候群の症例情報解釈における年齢・性別情報の重要性
15:50-16:10	鈴木 忠樹 (国立感染症研究所・感染病理部)	ハノイ国立小児病院PICUにおける重症ARDS症例の病原体検索系の確立
16:10-16:30	中島 典子 (国立感染症研究所・感染病理部)	ハノイ国立小児病院PICUにおける重症ARDS症例の病理学的解析

3. アドバイザーの先生より 布井 博幸 先生 (宮崎大学)  
 佐多徹太郎 先生 (富山衛生研究所)  
 小川 道雄 先生 (市立貝塚病院)

4. POの先生より

5. 事務連絡

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
 高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究  
 (H25-新興-一般-011)

2014(H26)年度 第二回研究班 班会議 プログラム

日時:2015年1月16日(金)13:30-17:00

会場:国立感染症研究所 共用第二会議室

1. 代表挨拶 中島 典子
2. 発表・質疑応答

発表者(所属)		発表課題
13:40-13:50	中島 典子 (国立感染症研究所・感染病理部)	研究班の概要と今後の方向性
13:50-14:10	鈴木 忠樹 (国立感染症研究所・感染病理部)	ハノイ国立小児病院PICUにおける肺内要因ARDS症例バイオマーカー探索のためのオンサイト解析系の確立
14:10-14:30	本間 栄 (東邦大学医学部医学科 内科学講座呼吸器内科学分野)	次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子検出方法を用いたARDS症例の基礎疾患検索
14:30-14:50	河内 正治 (国立国際医療研究センター) (苫小牧市立病院)	ハノイ国立小児病院PICUにおける肺内要因の重症ARDS症例の先行的研究 -Second Stage-
14:50-15:10	高崎 仁 (国立国際医療研究センター)	新型インフルエンザ等の呼吸器感染症に起因する重症ARDSの治療研究
15:10-15:30	休憩	
15:30-15:50	松井 珠乃 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)	重症急性呼吸促迫症候群の症例情報解釈における年齢・性別情報の重要性
15:50-16:10	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)	RT-LAMP法を利用した迅速・簡便なインフルエンザ診断法とリアルタイムRT-PCR法を用いたウイルス性呼吸器感染症の診断法について
16:10-16:30	中島 典子 (国立感染症研究所・感染病理部)	麻疹に併発した肺炎で死亡した19例の肺組織の分子病理学的解析

4. アドバイザーの先生より
  - 布井 博幸 先生 (宮崎大学)
  - 佐多徹太郎 先生 (富山衛生研究所)
  - 小川 道雄 先生 (市立貝塚病院)
5. 中山主幹より
6. 事務連絡

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Homma S, Sugino K, Sakamoto S	The usefulness of a disease severity staging classification system for IPF in Japan: 20 years of experience from empirical evidence to randomized control trial enrollment.	Respiratory Investigation,	53	7-12	2015
Kowada A, Takasaki J, Kobayashi N.	Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay for systematic tuberculosis screening of healthcare workers in low-incidence countries.	Journal of Hospital Infection	89	99-108	2015
Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N.	Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections.	Neuropathology	Sep 28.	doi: 10.1111/neurop.12171.	2014
Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y.	Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group.	Int J Hematol.	100(1)	Aug-70	2014
Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.	The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	J Virol	88(10)	5608-16	2014
Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y.	Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential.	Cell Host Microbe.	15(6)	692-705	2014
中島典子	オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション法	呼吸	33	152-159	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M.	The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. 816-27	J Infect Dis.	209(6)	816-27	2014
高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹(他)	脳炎脳症の病理	Neuroinfection 神経感染症	19	32-39	2014
Chikako Aoyama, Shoji Kawachi, Yoshihiro Ogawa, Norihiro Kato	Vascular complications and coagulation-related changes in the perioperative period in Japanese patients undergoing non-cardiac surgery.	J Atheroscler Thromb	21	414-434	2014
Junichi Hirahashi, Kimito Kawahata, Makoto Arita, Ryo Iwamoto, Keiichi Hishikawa, Mie Honda, Yoshifumi Hamasaki, Mototsugu Tanaka, Koshu Okubo, Miho Kurosawa, Osamu Takase, Masanori Nakakuki, Kan Saiga, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi, Akihiro Tojo, George Seki, Takeshi Marumo, Matsuhiko Hayashi, Toshiro Fujita.	Immunomodulation with eicosapentaenoic acid supports the treatment of autoimmune small-vessel vasculitis.	SCIENTIFIC REPORTS	4	6406   DOI: 10.1038/sre p06406	2014
Yuka Shiga, Fumiyo Nojiri, Atsuto Yoshizawa, Takuro Shimbo, Shoji Kawachi	Measurement of blood pressure in a thalidomide-impaired patient who required ovarian cystectomy: A case report.	International Journal of Surgery Case Reports	5	428-430	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuka Shiga, Ryuichi Sugamata, Chiaki Iwamura, Tomokazu Nagao, Jun Zao, Kazuyoshi Kawakami, Shoji Kawachi, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki	Effect of invariant natural killer T cells with IL-5 and activated IL-6 receptor in ventilator-associated lung injury in mice.	Experimental Lung Research	40	1-11	2014
河内正治	鳥インフルエンザ. In 内科疾患最新の治療-明日への指針	「内科」臨床雑誌	113	1269-1271	2014
Isobe K, Hata Y, Tochigi N, Kaburaki K, Kobayashi H, Makino T, Otsuka H, Sato F, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Iyoda A, Homma S	Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation.	J Thorac Oncol.	9(4)	483-7	2014
Kazuya Koyama, Go Sano, Yoshinobu Hata, Nobuyuki Shiraga, Hiroki Ota, Keishi Sugino, Kazutoshi Isobe, Susumu Sakamoto, Yujiro Takai, Satoshi Koezuka, Takashi Makino, Hajime Otsuka, Fumitomo Sato, Shuichi Sasamoto, Akira Iyoda, Atsuko Kurosaki and Sakae Homma	An anomalous unilateral single pulmonary vein associated with a bone morphogenetic protein receptor II gene mutation.	Intern Med	53	461-466	2014
Hirota N, Ito T, Miyazaki S, Ebina M, Homma S	Gene expression profiling of lung myofibroblasts reveals the anti-fibrotic effects of cyclosporine.	Tohoku J Exp Med	233	283-293	2014
Muramatsu Y, Isobe K, Sugino K, Kinoshita A, Wada T, Sakamoto S, Takai Y, Sato F, Hata Y, Wakayama M, Sibuya K, Uekusa T, Iyoda A, Homma S	Malignant pleural mesothelioma mimicking the intrapulmonary growth pattern of epithelioid hemangioendothelioma.	Pathol Intern (Letter to the Editor),	64	358-360	2014
Sugino K, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sano G, Sato K, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Homma S	Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone.	Respirology	19	239-245	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takai Y, Yamashiro Y, Satoh D, Fukunaga S, Kobayashi M, Sugiyama K, Hatakeyama Y, Moriyama K, Komagamine M, Takasaki Y, Homma S	Association of obstructive sleep apnea syndrome with trapezius muscle hardness.	J Med Soc Toho	61	224-231	2014
Yamamoto A, Sugino K, Kobayashi M, Hata Y, Homma S	Efficacy of nasal continuous positive airway pressure in tracheobronchomalacia.	J Med Soc Toho	61 (4)	166-171	2014
山元佳, 高崎仁, 森野英里子, 小林信之, 杉山温人.	MRIにより診断されたイソニアジド関連と考えられる手の腱鞘滑膜炎を生じた2症例.	Kekkaku	89(7)	659-665	2014
森野英里子, 柳川泰昭, 高崎仁, 新保卓郎, 杉山温人, 小林信之.	塗抹持続陽性肺結核患者の培養陰性化の定義に関する検討ー培養陰性による退院基準の見直しに関する提言ー.	Kekkaku	89(8)	697-702	2014
Ryutaro Tanizaki, Jin Takasaki.	Tuberculoma.	Internal medicine	53(13)	1457-1458	2014
Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama.	Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.	J Virol Methods.	Aug;204	101-104	2014
van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H.	Combating infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design.	Adv Drug Deliv Rev.	30;74	28-34	2014
Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N.	Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine.	J Virol.	88(15)	8597-8614	2014
中島典子	H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見	化学療法の領域	30	40-48	2014
中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹	ウイルス性肺炎	病理と臨床	32	1146-1153	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
河内正治	A 鳥インフルエンザについてB 高病原性鳥インフルエンザA (H5N1) について.	岡部信彦	医療機関における新型インフルエンザ等対策ミニマム・エッセンシャルズ	南山堂	東京	2014	120-130
高崎仁	第2章 新型インフルエンザ等診療のための基礎知識. 3. インフルエンザの診療、抗インフルエンザウイルス薬について.	岡部信彦、田辺正樹、大曲貴夫	医療機関における新型インフルエンザ等対策ミニマム・エッセンシャルズ	南山堂	東京	2014	54-62



## Short communication

## Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection



Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi,  
Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama\*

*Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan*

## A B S T R A C T

## Article history:

Received 6 December 2013  
Received in revised form 4 March 2014  
Accepted 7 March 2014  
Available online 18 April 2014

## Keywords:

Rapid diagnosis  
RT-LAMP  
H7N9  
Avian influenza virus

A genetic diagnosis system for detecting avian influenza A (H7N9) virus infection using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology was developed. The RT-LAMP assay showed no cross-reactivity with seasonal influenza A (H3N2 and H1N1pdm09) or influenza B viruses circulating in humans or with avian influenza A (H5N1) viruses. The sensitivity of the RT-LAMP assay was 42.47 copies/reaction. Considering the high specificity and sensitivity of the assay for detecting the avian influenza A (H7N9) virus and that the reaction was completed within 30 min, the RT-LAMP assay developed in this study is a promising rapid diagnostic tool for avian influenza A (H7N9) virus infection.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Many subtypes of avian influenza A viruses, including H7N2, H7N3, H9N2, H10N7, and H6N1, infect humans sporadically and cause respiratory illness (Arzey et al., 2012; Reperant et al., 2012; Shi et al., 2013). Cases of humans infected with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses have been reported from Asia to Europe and Africa, causing a total of 641 infections and 380 deaths as of October 8, 2013 ([http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/EN\\_GIP\\_20131008CumulativeNumberH5N1cases.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20131008CumulativeNumberH5N1cases.pdf)). In 2003 in the Netherlands, endemic highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus infections were reported in 90 cases, one of which was fatal (Fouchier et al., 2004; Koopmans et al., 2004).

The first human cases of infection with the avian influenza A (H7N9) virus (A/H7N9) were reported in late March 2013, and the virus was confirmed to have caused 137 infections and 45 deaths in mainland China as of October 25, 2013 ([http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/10u\\_ReportWebH7N9Number.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/10u_ReportWebH7N9Number.pdf)) (Gao et al., 2013; Li et al., 2013a). More than 200 human cases have been reported in China within the first 2 months of 2014. Considering that probable human-to-human transmission of the A/H7N9 virus between 2 patients was reported recently and that the airborne

transmissibility of the virus between ferrets (a mammalian model) has been reported by several groups, further spread of the infection is of increasing concern (Belser et al., 2013; Qi et al., 2013; Watanabe et al., 2013; Zhang et al., 2013b; Zhu et al., 2013).

A novel nucleic acid amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), was reported in the early 2000s and the reverse transcription (RT)-LAMP assay can be performed without the need for high-precision instruments and can detect viral genomes within 30 min (Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000). A/Shanghai/1/2013, A/Shanghai/2/2013, and A/Anhui/1/2013 were isolated from the first three human cases of A/H7N9 infection by using embryonated eggs at the Chinese Center for Disease Control and Prevention, and the sequences of the coding regions of all eight viral genes were deposited quickly in the influenza sequence database of the Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) on March 31, 2013. On the basis of these sequence data, several RT-PCR and RT-LAMP methods targeting A/H7N9 viruses have been developed (Corman et al., 2013; Ge et al., 2013; Hackett et al., 2013; Li et al., 2013b; Nie et al., 2013; Wong et al., 2013; Zhang et al., 2013a) ([http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/cnic\\_realtime\\_rt\\_pcr\\_protocol\\_a\\_h7n9.pdf](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf)). Previously, the direct RT-LAMP method was established to detect viral RNA directly from nasal or nasopharyngeal swabs dispensed in an extraction reagent without an RNA purification step (Nakauchi et al., 2011b). In the present study, with the aim of providing a highly specific and sensitive diagnostic

\* Corresponding author. Tel.: +81 42 561 0771; fax: +81 42 561 0812.  
E-mail address: [tkage@nih.go.jp](mailto:tkage@nih.go.jp) (T. Kageyama).

**Table 1**

Primer set.

Primer name	Sequence (5'–3')	Position <sup>c</sup>	Length (bp)
AH7N9-F3	TTCTGAGATTCCAAA	995–1010	16
AH7N9-B3	GGTTGGTTTTTCTATAAGCCG	1177–1198	22
AH7N9-FIP <sup>a</sup> (F1c + F2)	ACCAACCATCAATTAGGCCTT- CTATTTGGTGTATAGCGG	1061–1081 (F1c) 1021–1039 (F2)	40
AH7N9-BIP <sup>b</sup> (B1c + B2)	GGTTTCAGACACCAGAATGCACA- CCTGTTATTGATCAATTGCCG	1084–1106 (B1c) 1145–1166 (B2)	45
AH7N9-LF	CCCATCCATTTCAATGAAAC	1040–1060	21
AH7N9-LB	ACTGCTGCAGATTACAAAAG	1117–1136	20

<sup>a</sup> AH7N9-FIP primer consisted of F1c and F2.<sup>b</sup> AH7N9-BIP primer consisted of B1c and B2.<sup>c</sup> The nucleotide positions of the HA gene of A/Anhui/1/2013 are based on the cRNA sequence obtained from the GISAID database (isolate ID number: EPLISL138739).**Table 2**

The specificity of the RT-LAMP assay was tested using serial dilutions of viral RNA from H7 subtype avian influenza A viruses.

Virus	Viral RNA concentrations (copies/ $\mu$ L) <sup>a</sup>	Number of positive replicates/number of tests for each assay				
		Dilution rate of viral RNA				
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1.5 $\times$ 10 <sup>5</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7)	1.5 $\times$ 10 <sup>5</sup>	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	2.9 $\times$ 10 <sup>7</sup>	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9)	7.7 $\times$ 10 <sup>7</sup>	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/duck/Hong Kong/293/1978 (H7N2)	1.4 $\times$ 10 <sup>8</sup>	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/quail/Aichi/1/2009 (H7N6)	8.2 $\times$ 10 <sup>7</sup>	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/Netherlands/33/2003 (H7N7)	4.5 $\times$ 10 <sup>7</sup>	NT	NT	0/2	0/2	0/2

NT indicates "not tested."

<sup>a</sup> Viral RNA copy number was calculated based on the M gene of each virus as described in the text.

tool for the surveillance and early screening of cases infected with the A/H7N9 virus, and specifically for the method to be performed easily in quarantine conditions and clinics should an epidemic of A/H7N9 occur, a new assay was developed to detect the A/H7N9 virus by the RT-LAMP method.

Primer set for the RT-LAMP assay to detect specifically the HA gene of A/H7N9 was designed based on the HA genes of the A/H7N9 viruses deposited in the influenza sequence database of GISAID using Primer Explorer V4 software (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) (Table 1). RT-LAMP was carried out using an RNA Amplification Kit (RT-LAMP; Eiken Chemical). The reaction mixture contained 12.5  $\mu$ L of 2 $\times$  reaction mix, 1  $\mu$ L enzyme mix, 4  $\mu$ L distilled water, 2.5  $\mu$ L of 10 $\times$  primer mix (containing 16  $\mu$ M each of the FIP and BIP primers, 2  $\mu$ M each of the F3 and B3 primers, and 8  $\mu$ M each of the LoopF and LoopB primers), and 5  $\mu$ L template RNA. The mixture was incubated using a Loopamp Realtime Turbidimeter (LA-320C; Eiken Chemical) for 35 min at 62.5  $^{\circ}$ C and then for 5 min at 80  $^{\circ}$ C to terminate the reaction.

Seasonal influenza A and B viruses isolated from humans by using Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells, namely, A/Uruguay/716/2007 (H3N2), A/Perth/16/2009 (H3N2), A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, B/Florida/4/2006, B/Brisbane/60/2008, and B/Massachusetts/2/2012, were used to test the specificity of the RT-LAMP assay. The H5 subtype avian influenza A viruses A/chicken/Ibaraki/1/2005 (H5N2) and A/whooper swan/Hokkaido/4/2011 (H5N1) and H7 subtype avian influenza A viruses (listed in Table 2) isolated using embryonated eggs were also used. RNA was prepared from 140  $\mu$ L of the culture medium of MDCK cells or the allantoic fluid of embryonated eggs using a QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The yield of the purified viral RNA was checked by performing a type A real-time RT-PCR (rRT-PCR) assay for all viruses, and RNA copy number was calculated based on the M gene, as described previously (Nakauchi et al., 2011a). To evaluate the specificity of the assay, eight nasal swabs suspended in virus transport medium (two nasal swabs confirmed

to be positive for seasonal influenza A (H3N2), two positive for influenza A (H1N1pdm09), two positive for influenza B viruses, and two negative for both influenza viruses by real-time RT-PCR) were also used. RNA was extracted from 50  $\mu$ L of the nasal swabs suspended in virus transport medium using a MagMAX<sup>™</sup> 96 Viral Isolation Kit (Ambion, Austin, TX) with KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturers' instructions. The RT-LAMP assay did not cross-react with seasonal influenza A (H3N2 and H1N1pdm09) or influenza B viruses isolated from humans, with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses, with nasal swabs positive for seasonal influenza A (H3N2 or H1N1pdm09) or influenza B, or with nasal swabs negative for both influenza viruses (data not shown). The RT-LAMP assay also did not cross-react with five out of six H7 subtype avian influenza A viruses belonging to the Eurasian lineage (Table 2) (Kageyama et al., 2013). The assay reacted slightly with A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7); however, its sensitivity was approximately two orders of magnitude lower than that for A/Anhui/1/2013 (Table 2). On the basis of phylogenetic analysis (Takayama et al., under preparation), it was shown that the HA gene of A/duck/Fukui/1/2004 was closest to that of A/Anhui/1/2013 within the six Eurasian lineage H7 subtype avian influenza A viruses used in this study. As the RT-LAMP target region of the HA gene for A/Anhui/1/2013 showed the highest identity with that for A/duck/Fukui/1/2004 (five out of eight regions showed 100% similarity between these viruses, Fig. 1 and Table 2), the RT-LAMP assay may react slightly with A/duck/Fukui/1/2004. Given that the RT-LAMP assay showed little or no cross-reactivity with other Eurasian lineage H7 subtype avian influenza A viruses, the assay developed in this study is highly specific for the detection of the H7 gene of the A/H7N9 virus isolated from humans in China and is able to discriminate the A/H7N9 virus from not only seasonal influenza A and B viruses circulating in humans but also highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses.

To determine the detection limit of the RT-LAMP assay, RT-PCR was used to amplify the full-length HA gene of A/Anhui/1/2013(H7N9), and the resulting PCR product containing

```

A/Anhui/1/2013          F3          F2          LF          F1
A/Duck/Fukui/1/2004    TTCTTGAGATTCCAAA-----CTATTTGGTGCATAGCGGTTTCATTGAAATGGATGGCAAGGCCAATATGATGGTTGGT
A/Mallard/Netherlands/12/2000 *****C**A**C*****-----*****T**G*****G****
A/Duck/Gunma/466/2011 *****C**AC**C*****-----*****G*****T**G*****C**G****
A/Duck/Hong Kong/293/1978 *****A*****-----T*****T**GG*****A****
A/Quail/Aichi/1/2009   *C*****A*****-----T*****A**C**T*****T**G*****A****
A/Netherlands/33/2003  AAATCCCA*AGAGG*G-----T*****T*****T**G*****G****

--GGTTTCAGACACCAGAATGCACA-----ACTGTCGCAGATTACAAAAG-----CGGCAATTGATCAAAATAACAGG-----CGGCTTATAGAAAACCAACC
--*****G**A*****-----*C*****-----A*****-----*****T*****
--*C*****G**A*****-----*****-----T*****-----*****T*****
--*C*****A*****-----*****-----T*****-----*****T*****
--*C*****T**A*****-----*****-----T*****-----*****T*****
--*C*****A**T*****-----*****G*****C*****-----A**CG**C*****-----*****A*****G**T*****
--*C*****G**T**A*****-----*****-----A*****-----*****A*****T*****

```

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of the RT-LAMP target region of the HA gene. The F1, F2, F3, LF, B1, B2, B3, and LB regions are indicated above the sequences.

Table 3

Detection limits of the RT-LAMP assay using serial dilutions of *in vitro* transcribed control viral RNA.

Template RNA concentration (copies/reaction)	Number of positive replicates/number of tests for each assay (positive %)
500	6/6 (100)
50	6/6 (100)
5	1/6 (16.7)
0.5	0/6 (0)

the T7 promoter was then transcribed *in vitro*. The detailed procedure is described below. The primer Uni12 (5'-AGCAAAGCAGG-3') (Hoffmann et al., 2001) was used for RT with a SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The HA gene of A/Anhui/1/2013 was amplified using the following primer pair: H7HA-PC-SP6R (5'-ATTAGGTGACACTATAGAAAGCAAAGCAGGGGATA-3') and H7HA-PC-T7F (5'-TAATACGACTACTATAGGGAGTAGAAAACAGGGTGT-3'). PCR was performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). The PCR product was gel purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and transcribed using a MegaScript T7 *in vitro* transcription kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturers' instructions. After DNase digestion to remove residual RT-PCR products, the transcribed RNA was purified twice using the Trizol Reagent (Thermo Fisher Scientific) and quantified by spectrophotometric analysis. The detection limit of the RT-LAMP assay was 42.47 copies/reaction, as determined by performing serial dilutions of *in vitro*-transcribed control viral RNA for 6 replicates and then calculating the concentration where there was 95% positivity using the results shown in Table 3. The detection limit of the assay was highly sensitive and almost comparable to the general detection limit of rRT-PCR.

The assay developed in this study was shown to be highly specific and sensitive for detecting the A/H7N9 virus by using isolated viruses and may be applicable to direct RT-LAMP methods (Nakauchi et al., 2011b). Recently, a one-step rRT-PCR assay was developed to detect the A/H7N9 virus (Takayama et al., under preparation). In Japan, manuals prepared by the National Institute of Infectious Diseases for the use of these methods (including the RT-LAMP method) to detect the A/H7N9 virus have been shared with 74 prefectural and municipal public health institutes and 16 quarantine stations, and diagnosis systems have been established to detect cases infected with the A/H7N9 virus in preparation for the influenza season.

## Acknowledgments

We thank Ms. Shiho Nagata for technical support. We are grateful to Dr. Tsugunori Notomi and Mr. Syouhei Senba for helpful advice on performing the LAMP method. We thank Drs. Hiroshi Kida and Yoshihiro Sakoda, Hokkaido University, for providing A/whooper swan/Hokkaido/4/2011 (H5N1).

We thank Ms. Masako Nakamura, Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, for providing A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7) and Drs. Takehiko Saito and Yuko Uchida, National Institute of Animal Health, for providing A/chicken/Ibaraki/1/2005 (H5N2), A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9), and A/quail/Aichi/1/2009 (H7N6).

## References

- Arzey, G.G., Kirkland, P.D., Arzey, K.E., Frost, M., Maywood, P., Conaty, S., Hurt, A.C., Deng, Y.M., Iannello, P., Barr, I., Dwyer, D.E., Ratnamohan, M., McPhie, K., Selleck, P., 2012. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 814–816.
- Belsler, J.A., Gustin, K.M., Pearce, M.B., Maines, T.R., Zeng, H., Pappas, C., Sun, X., Carney, P.J., Villanueva, J.M., Stevens, J., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2013. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 501, 556–559.
- Corman, V.M., Eickmann, M., Landt, O., Bleicker, T., Brunink, S., Eschbach-Bludau, M., Matrosovich, M., Becker, S., Drosten, C., 2013. Specific detection by real-time reverse-transcription PCR assays of a novel avian influenza A (H7N9) strain associated with human spillover infections in China. *Eurosurveillance* 18, 20461.
- Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., Osterhaus, A.D., 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1356–1361.
- Gao, H.N., Lu, H.Z., Cao, B., Du, B., Shang, H., Gan, J.H., Lu, S.H., Yang, Y.D., Fang, Q., Shen, Y.Z., Xi, X.M., Gu, Q., Zhou, X.M., Qu, H.P., Yan, Z., Li, F.M., Zhao, W., Gao, Z.C., Wang, G.F., Ruan, L.X., Wang, W.H., Ye, J., Cao, H.F., Li, X.W., Zhang, W.H., Fang, X.C., He, J., Liang, W.F., Xie, J., Zeng, M., Wu, X.Z., Li, J., Xia, Q., Jin, Z.C., Chen, Q., Tang, C., Zhang, Z.Y., Hou, B.M., Feng, Z.X., Sheng, J.F., Zhong, N.S., Li, L.J., 2013. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N. Engl. J. Med.* 368, 2277–2285.
- Ge, Y., Wu, B., Qi, X., Zhao, K., Guo, X., Zhu, Y., Qi, Y., Shi, Z., Zhou, M., Wang, H., Cui, L., 2013. Rapid and sensitive detection of novel avian-origin influenza A (H7N9) virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow device. *PLoS One* 8, e69941.
- Hackett, H., Bialasiewicz, S., Jacob, K., Bletchly, C., Harrower, B., Nimmo, G.R., Nissen, M.D., Sloots, T.P., Whitley, D.M., 2013. Screening for H7N9 influenza A by matrix gene-based real-time reverse-transcription PCR. *J. Virol. Methods* 195, 123–125.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275–2289.
- Kageyama, T., Fujisaki, S., Takashita, E., Xu, H., Yamada, S., Uchida, Y., Neumann, G., Saito, T., Kawaoka, Y., Tashiro, M., 2013. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Eurosurveillance* 18, 20453.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenberghe, J., Fouchier, R., Osterhaus, A., Bosman, A., 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363, 587–593.
- Li, Q., Zhou, L., Zhou, M., Chen, Z., Li, F., Wu, H., Xiang, N., Chen, E., Tang, F., Wang, D., Meng, L., Hong, Z., Tu, W., Cao, Y., Li, L., Ding, F., Liu, B., Wang, M., Xie, R., Gao, R., Li, X., Bai, T., Zou, S., He, J., Hu, J., Xu, Y., Chai, C., Wang, S., Gao, Y., Jin, L., Zhang, Y., Luo, H., Yu, H., Gao, L., Pang, X., Liu, G., Shu, Y., Yang, W., Uyeki, T.M., Wang, Y., Wu, F., Feng, Z., 2013a. Preliminary report: epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in China. *N. Engl. J. Med.* 370, 520–532.
- Li, Y., Wu, T., Qi, X., Ge, Y., Guo, X., Wu, B., Yu, H., Zhu, Y., Shi, Z., Wang, H., Cui, L., Zhou, M., 2013b. Simultaneous detection of hemagglutinin and neuraminidase genes of novel influenza A (H7N9) by duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 194, 194–196.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223–229.
- Nakauchi, M., Yasui, Y., Miyoshi, T., Minagawa, H., Tanaka, T., Tashiro, M., Kageyama, T., 2011a. One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *J. Virol. Methods* 171, 156–162.

- Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M., Kageyama, T., 2011b. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J. Med. Virol.* 83, 10–15.
- Nie, K., Zhao, X., Ding, X., Li, X.D., Zou, S.M., Guo, J.F., Wang, D.Y., Gao, R.B., Li, X.Y., Huang, W.J., Shu, Y.L., Ma, X.J., 2013. Visual detection of human infection with influenza A (H7N9) virus by subtype-specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E372–E375.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, E63.
- Qi, X., Qian, Y.H., Bao, C.J., Guo, X.L., Cui, L.B., Tang, F.Y., Ji, H., Huang, Y., Cai, P.Q., Lu, B., Xu, K., Shi, C., Zhu, F.C., Zhou, M.H., Wang, H., 2013. Probable person to person transmission of novel avian influenza A (H7N9) virus in Eastern China 2013 epidemiological investigation. *BMJ* 347, f4752.
- Reperant, L.A., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., 2012. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine* 30, 4419–4434.
- Shi, W., Shi, Y., Wu, Y., Liu, D., Gao, G.F., 2013. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan. *Protein Cell* 4, 846–853.
- Watanabe, T., Kiso, M., Fukuyama, S., Nakajima, N., Imai, M., Yamada, S., Murakami, S., Yamayoshi, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Sakoda, Y., Takashita, E., McBride, R., Noda, T., Hatta, M., Imai, H., Zhao, D., Kishida, N., Shirakura, M., de Vries, R.P., Shichinohe, S., Okamatsu, M., Tamura, T., Tomita, Y., Fujimoto, N., Goto, K., Katsura, H., Kawakami, E., Ishikawa, I., Watanabe, S., Ito, M., Sakai-Tagawa, Y., Sugita, Y., Uraki, R., Yamaji, R., Einfeld, A.J., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E.A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J.C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y., 2013. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501, 551–555.
- Wong, C.K., Zhu, H., Li, O.T., Leung, Y.H., Chan, M.C., Guan, Y., Peiris, J.S., Poon, L.L., 2013. Molecular detection of human H7N9 influenza A virus causing outbreaks in China. *Clin. Chem.* 59, 1062–1067.
- Zhang, J., Feng, Y., Hu, D., Lv, H., Zhu, J., Cao, M., Zheng, F., Gong, X., Hao, L., Srinivas, S., Ren, H., Qi, Z., Li, B., Wang, C., 2013a. Rapid and sensitive detection of H7N9 avian influenza virus by use of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3760–3764.
- Zhang, Q., Shi, J., Deng, G., Guo, J., Zeng, X., He, X., Kong, H., Gu, C., Li, X., Liu, J., Wang, G., Chen, Y., Liu, L., Liang, L., Li, Y., Fan, J., Wang, J., Li, W., Guan, L., Li, Q., Yang, H., Chen, P., Jiang, L., Guan, Y., Xin, X., Jiang, Y., Tian, G., Wang, X., Qiao, C., Li, C., Bu, Z., Chen, H., 2013b. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science* 341, 410–414.
- Zhu, H., Wang, D., Kelvin, D.J., Li, L., Zheng, Z., Yoon, S.W., Wong, S.S., Farooqui, A., Wang, J., Banner, D., Chen, R., Zheng, R., Zhou, J., Zhang, Y., Hong, W., Dong, W., Cai, Q., Roehrl, M.H., Huang, S.S., Kelvin, A.A., Yao, T., Zhou, B., Chen, X., Leung, G.M., Poon, L.L., Webster, R.G., Webby, R.J., Peiris, J.S., Guan, Y., Shu, Y., 2013. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science* 341, 183–186.

