

201447003A

厚生労働科学研究委託費

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

感染症の診断機能向上のための研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 影山 努

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（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）による委託業務として、影山 努が実施した平成26年度「感染症の診断機能向上のための研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

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

感染症の診断機能向上のための研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 影山 努

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費
(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業)
平成 26 年度 委託業務成果報告書

感染症の診断機能向上のための研究

業務主任者

所属施設：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
第二室室長
氏名：影山 努

担当責任者

所属施設：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官
氏 名：高山 郁代
所属施設：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官
氏 名：中内 美名
所属施設：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官
氏 名：高橋 仁
所属施設：公立昭和病院小児科 医長
氏 名：大場 邦弘
所属施設：国立感染症研究所ウイルス第三部 第一室室長
氏 名：駒瀬 勝啓
所属施設：国立感染症研究所ウイルス第三部 第二室室長
氏 名：森 嘉生
所属施設：国立感染症研究所ウイルス第三部 第四室室長
氏 名：松山 州徳
所属施設：大阪市立環境科学研究所 研究主任
氏 名：久保 英幸

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

感染症の診断機能向上のための研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P. 1

業務主任者：影山 努

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 蛍光 RT-LAMP 法を使用した POC 遺伝子検査システムによるウイルス同定法の開発・・・P.17

担当責任者：高山 郁代

研究協力者：中内美名、高橋 仁、影山 努

2. インフルエンザウイルスの性状解析およびウイルス遺伝子の基盤的解析・・・・・・・・・・ P.23

担当責任者：中内 美名

研究協力者：久保 英幸、改田 厚、高山 郁代、影山 努

3. 呼吸器感染症ウイルスの核酸検出系の構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P.27

担当責任者：高橋 仁

研究協力者：高山 郁代、中内 美名、影山 努、改田 厚、久保 英幸

4. マイクロ流路チップを用いた遺伝子診断システムの臨床的評価・・・・・・・・・・ P.31

担当責任者：大場 邦弘

研究協力者：永井 剛、松岡 緑郎、小田 智三、名井 栄実菜、加藤 昭生、古谷 智子、秋山
聡香、小花 奈都子、川口 隆弘、林 健太、野田 雅裕、石川 涼子、吉田 知広、
野田 絵理、小鍛冶 雅之、高橋 仁、高山 郁代、中内 美名、影山 努

5. 蛍光 RT-LAMP 法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系の開発に関する研究・・・・・・・・・・ P.37

担当責任者：駒瀬 勝啓

6. 新規風疹ウイルス遺伝子検出法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P.41

担当責任者：森 嘉生

研究協力者：大槻 紀之、岡本 貴世子、坂田 真史

7. 蛍光 RT-LAMP 法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系の開発に関する研究・・・P.45

担当責任者：松山 州徳

8. マイクロ流路チップ-LAMP 法を用いた季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検出の検
討ならびに小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析・・・P.51

担当責任者：久保 英幸

研究協力者：改田 厚、入谷 展弘、山元 誠司、高山 郁代、中内 美名、高橋 仁、

影山 努

III. 学会等発表実績・・・P.59

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・P.63

I. 委託業務成果報告（総括）

感染症の診断機能向上のための研究

業務主任者 影山 努 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第二室室長

研究要旨 Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作なしで同時に多項目の遺伝子検査を行う事が可能な、Point of care 遺伝子検査システムを開発した。本システムは、医療現場で多用されているインフルエンザ迅速診断キットと同程度の簡便な操作性で、従来の遺伝子検査法とほぼ同程度の感度と特異性を有しており、陽性の場合には検体中のウイルス量にもよるが5-15分程度の短時間で判定が可能であり、簡便、迅速、高感度・高精度なウイルス遺伝子検査が可能である。本研究ではH7N9鳥インフルエンザを含むインフルエンザウイルスの型・亜型同定およびRSウイルス同定用のマイクロ流路チップを試作して検出感度や特異性の検討を行い、臨床および検査地現場において本システムの臨床的有用性について検証を行った。本システムの活用により、我が国の感染症対策に大きく寄与する事ができると考えられる。

[業務主任者]

影山 努:国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第二室室長

久保 英幸:大阪市立環境科学研究所 研究主任

[担当責任者]

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 主任研究官

中内 美名:国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官

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

大場邦弘:公立昭和病院小児科 医長

駒瀬 勝啓:国立感染症研究所ウイルス第三部 第一室室長

森 嘉生:国立感染症研究所ウイルス第三部 第二室室長

松山 州徳:国立感染症研究所ウイルス第三部 第四室室長

A. 研究目的

鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例は、これまで主にH5N1亜型、H7N7亜型、H7N9亜型、H9N2亜型などによるものが知られている。特にH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスによるヒト感染事例は、1997年に香港で初めて報告され、2003年以降は東南アジアや中東を中心にヒトへの感染事例が相次ぎ、世界保健機関(WHO)の集計では、2015年1月現在、世界16カ国で718人が感染し、413人が亡くなった事が確認されている。また、鳥に対しては低病原性のH7N9亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例が、2013年3月31日に世界で初めての中国で報告され、以降も中国を中心に、香港、台湾、マレーシア、カナダでの輸入感染

例を含め、WHO の集計では 2015 年 1 月現在、486 人が感染し、185 人が亡くなっていることが確認されている。また、最近では H5N2 亜型、H5N3 亜型、H5N6 亜型、H5N8 亜型など、H5N1 亜型以外の H5 亜型ウイルスが、ヨーロッパ、北アメリカ、アジアの家禽でも広がっており、中国では H5N6 亜型のヒト感染例も報告されている。他にも H6N1 亜型、H10N8 亜型など H5 亜型、H7 亜型以外の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例も報告されている。ただし、これらの鳥インフルエンザウイルスは、未だにヒト-ヒト間で持続的な感染伝播は認められていない。しかし、ヒト感染事例より分離したウイルスの中には、哺乳動物のウイルス受容体に対して高い親和性を持つ HA 遺伝子の変異や、哺乳動物の体温でも増殖できる RNA ポリメラーゼ複合体の 1 つである PB2 遺伝子の変異などが認められ、ヒトへの親和性が増してきていると考えられている。

さらに近年、北米では H1N2 亜型、H3N2 亜型ブタインフルエンザウイルスのヒト感染事例が毎年のように報告されている。これらの鳥もしくは動物インフルエンザウイルスの中で、ヒトへの感染ポテンシャルが高いインフルエンザウイルスを起源としたパンデミックインフルエンザウイルスの出現、もしくはヒトやブタの中で、ヒトで流行している季節性のインフルエンザウイルスとブタインフルエンザウイルスとの混合感染、もしくはブタの中で鳥インフルエンザウイルスとブタインフルエンザウイルスの混合感染が起きた場合など、遺伝子再集合やウイルス遺伝子の変異により、より強い病原性を獲得した変異ウイルスの出現も危惧されている。こうしたウイルスが効率よくヒトからヒトへ感染するようになると、世界中のほとんどの人々は、これら新しく出現したウイルスに対する免疫がないためパンデミックとなる可能性がある。

一方、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) は 2012 年にサウジアラビアで発見された重症肺炎を引き起こす病原体であり、

WHO の集計では 2015 年 2 月現在、971 人が感染し、少なくとも 356 人が亡くなっていることが確認されている。アラビア半島全域では、現在も散発的な発生がみられており、中東以外にも、オーストリア、フランス、ドイツ、ギリシャ、イタリア、オランダ、トルコ、イギリス、マレーシア、フィリピン、アメリカにて輸入感染例が報告されており、鳥インフルエンザと同様に、MERS-CoV も旅行者を通じるなどして、我が国に持ち込まれる事が懸念されている。なお、MERS-CoV はヒトコブラクダの集団に蔓延していることが分かっており、中東とアフリカの広範囲に棲息する大多数の個体から MERS-CoV に対する抗体が検出されている。それぞれの患者発生地域でヒトから見つかるウイルス遺伝子の特徴と、ラクダから見つかるウイルス遺伝子の特徴が一致することから、ラクダが感染源の一つであることは、疑いのない事実であるが、ほとんどの感染者はラクダとの接触歴がない事も分かっており、また、不顕性感染者も多く見つかっている事から、感染に気づかないうちにヒトからヒトへウイルスが広がっている可能性もある。

鳥またはブタインフルエンザウイルス、MERS などの新興感染症の輸入感染例や、これらのウイルスを起源とし、容易にヒト-ヒト感染するように変異してパンデミックを引き起こす、新たなウイルスの出現に備えて、感染拡大を防ぐための対応策の一つとして、全国規模で検査体制を整備しておく事は重要である。全国の検疫所・地方衛生研究所では、既にリアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検査法の導入が進んでおり、技術研修会等による検査方法の技術移転や検査法の標準化や外部精度管理等の実施により、H5 亜型、H7 亜型を含むインフルエンザウイルス型・亜型同定について精度の高い遺伝子検査を行う事が既に可能となっている。MERS-CoV についても同様に、全国の検疫所・地方衛生研究所でリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検査体制が整備されている。

しかし、リアルタイム RT-PCR 法を含め、一般に遺伝子検査法は検体からの核酸精製や核酸増幅反応に、マイクロピペッターによる試薬・検体等の分注操作が必須であるため、検体間あるいは陽性コントロール等のコンタミネーションリスクも高く、検査結果が偽陽性や偽陰性となり、誤った結果となる可能性がある。また、検査手技が非常に煩雑で、特殊機器を必要とするため、検疫所や地方衛生研究所のように遺伝子検査に精通した人員と検査設備が整った施設以外では遺伝子検査を行う事が非常に難しい。病院や診療所等で、これらの遺伝子検査を行うためには、精度の高いより簡便な検査法の導入が必要である。

現在、日本の病院やクリニック等では抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法により、インフルエンザウイルス A 型(一部のキットでは H1pdm09 も判別可能)および B 型が同定可能な迅速診断キット、また、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルスおよびアデノウイルスなどの各ウイルスが検出可能な迅速診断キットが利用可能である。しかし、インフルエンザ迅速診断キットは、A 型インフルエンザウイルスの亜型までは同定することができず(一部のキットでは H1pdm09 亜型も判別可能)、H3N2 亜型の季節性インフルエンザウイルスなのか H7N9 亜型や H5N1 亜型の鳥インフルエンザウイルスなのかを区別する事ができない。また、他のウイルス性呼吸器感染症については、先に記載した一部のウイルスが迅速診断キットで検出できるのみで、その他のウイルス性呼吸器感染症については臨床現場では鑑別診断ができない状況である。また、迅速診断キットは、抗体を用いてウイルス抗原を検出するため、その原理から感度および特異性が遺伝子検査法よりも低く、特にウイルス排出量が少ない病初期は、偽陰性となり検出できなかったり、また、検体によっては、非特異反応による偽陽性が出現することがあるため、これらの迅速診断キットのみでウイルス感染の確定診断を行う事は難しい。

そこで、高感度で特異性の高い遺伝子検査を病院や診療所等の臨床現場でも簡便に行えるように、検体からの核酸精製を必要としない Direct RT-LAMP 法 (Journal of Medical Virology 83:10-15, 2011)とマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作なしで同時に多項目の遺伝子検査を行う事が可能な、Point of care (POC) 遺伝子検査システム (小児科臨床 65:2635-2641, 2012)を開発した。この方法は、臨床検体からの核酸抽出が簡便で、医療現場で多用されているインフルエンザ迅速診断キットと同程度の簡便な操作性で、従来の遺伝子検査法とほぼ同程度の感度と特異性を有しており、陽性の場合には検体中のウイルス量にもよるが 5-15 分程度の短時間で判定が可能(陰性確認は 30 分間必要)であり、簡便、迅速、高感度・高精度なウイルス遺伝子検査が可能となっている。

麻疹・風疹については、世界的にワクチンによる制御ならびに排除活動が活発化しており、国内での流行はかなり制御されているものの、最近では海外流行国からの輸入感染例およびそれに続く集団感染事例も増えてきり、特に感染力の強い麻疹を効果的に制御していくには、正確で迅速な検査診断法の確立が求められる。もし、鳥インフルエンザウイルスや MERS-CoV などの感染事例の診断を行う場合は、季節性インフルエンザウイルスや他のウイルス性呼吸器感染症との鑑別診断が必要であるが、麻疹・風疹のように初期症状がインフルエンザ様疾患と類似している疾患もあり、臨床的診断のみで診断することは非常に難しい。現在、麻疹・風疹の確定診断は、民間検査センターで実施される IgM 抗体検査と地方衛生研究所において実施される RT-PCR 法による遺伝子検査が主流であり、ともに結果が得られるまで 1 日～3 日程度の時間がかかっており、医療機関において迅速に検査診断が可能な POC 検査法が存在しない。そのため、麻疹・風疹など感染力の強い感染症が疑われる際には、診断が臨床診断のみによって行わ

れる、もしくは検査結果を待つて診断が行われるため、診断の正確性や迅速性に問題があり、例えば入院病棟では結果が判明するまで、院内感染を阻止するための予防措置を取り続ける必要があり、もし陰性だった場合は、その感染制御対策が無用となるため、臨床現場スタッフの業務負担が大きくなってしまふのが現状である。従つて麻疹・風疹など特に感染性が強い感染症の場合、診断機能の向上のため医療現場で診断可能な POC 検査の確立が重要である。

本研究では、まずは初期症状がインフルエンザ様症状を示して臨床的診断が困難な場合でも、ウイルス性呼吸器感染症の鑑別診断が行えるよう POC 遺伝子検査システムを利用した病原体診断システムを構築する事を目的とした。これまでにインフルエンザウイルス(A, B, C 型、A/H1pdm09, A/H3, A/H5, A/H7 亜型)、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、RS ウイルス B 型については、RT-LAMP 法を用いた検出系を既に構築しているが、今回は、新たに麻疹、風疹、MERS-CoV について、また他のウイルス性呼吸器感染症を引き起こすウイルスの中から、ヒトパラインフルエンザウイルスについて RT-LAMP 法を用いた検出系の構築を試みた。

次に、POC 遺伝子検査システムを用いた同時多項目検出系の検証を行うため、これまでに構築した検出系の中から、季節性インフルエンザウイルスの H1N1pdm09 亜型、H3N2 亜型、鳥インフルエンザウイルスの H7N9 亜型、およびインフルエンザウイルスの A 型、B 型を同定できるマイクロ流路チップと、季節性インフルエンザウイルスの H1N1pdm09 亜型、H3N2 亜型、およびインフルエンザの A 型、B 型と RS ウイルスの A 型、B 型を同定できるマイクロ流路チップを試作し、検出感度や特異性等の検証を行った。また、これまでに構築した検出系を組み合わせて、POC 遺伝子検査システムによる同時多項目の検出系

を構築し、臨床現場あるいは地方衛生研究所にてその臨床的有用性について検討を行う必要があるため、東京都小平市と大阪市にて、地域の中核病院を核とする地域クリニックネットワークを構築して、季節性インフルエンザ、鳥インフルエンザ、MARS、麻疹、風疹を含むウイルス性呼吸器感染症の診断実証試験を経て、医療現場でのウイルス性呼吸器感染症の診断のみならず、地域の病原体流行状況をリアルタイムに把握すること目的とし、病原体リアルタイムサーベイランス網の構築に向けた調査研究を行った。

POC 遺伝子検査システムは臨床現場で簡便、迅速かつ高感度に病原体を同定する事が可能なため、本システムを呼吸器ウイルス感染症の鑑別診断に応用し、ベットサイドにおいて早期にウイルス性呼吸器感染症の診断が可能になれば、リアルタイム病原体サーベイランスを行う事も可能となり、地域の感染症流行状況をこのリアルタイムに把握できるようにもなり、大規模な感染症の流行予測やコミュニティー単位での感染症予防や入院患者の院内感染の予防などにも役立つと考えられる。

また、医療機関のみならず、保健所、検疫所、地方衛生研究所などでも迅速・簡便・低コストに同時多項目の遺伝子検査が可能な本システムを新型インフルエンザや MERS など新興・再興感染症が発生した際に使用することができれば、これらの感染症診断ができる検出系がまだ構築されていなくても、除外診断が可能となり、早期にその発生源を突き止め、それ以上病原体が拡散しないように封じ込めを行うなど、流行拡大防止策を講じる事も可能となり、わが国の新興感染症対策にも大きく寄与できる。

B. 研究方法

1. [1. 蛍光 RT-LAMP 法を使用した POC 遺伝子検査システムによるウイルス同定法の開発]

まず、最初に RT-LAMP 反応試薬を従来の濁度による検出から Q-primer を使用した蛍光消光による検出法の確立を行った。季節性インフルエンザウイルス(A 型、B 型、H1pdm09 亜型、H3 亜型)および鳥インフルエンザウイルス(H7N9 亜型)の 8 連 PCR チューブを用いた蛍光 RT-LAMP 検出系の検討を A/Narita/1/2009(H1N1pdm09) 、 A/Texas/50/2012(H3N2) 、 A/Anhui/1/2013 (H7N9)、B/Massachusetts/2/2012 を鋳型とした各検出系のターゲット遺伝子の合成 RNA を鋳型に、また RSV ウイルスの 8 連 PCR チューブを用いた蛍光 RT-LAMP 検出系の検出感度の検討については、臨床検体から抽出したウイルス RNA を鋳型とした各検出系のターゲット遺伝子の合成 RNA 鋳型に、従来使用していた RT-LAMP 反応液の組成変更を行った改良反応試薬を用いて、蛍光 RT-LAMP 反応による各検出系の検出感度を検討した。テンプレート量を 5 μ L とする全量 25 μ L にて、LightCycler 480 (Roche)を使用し、63°C の等温にて 30 分以内に蛍光消光が見られたものを陽性と判定した。

また、マイクロ流路チップでの蛍光 RT-LAMP 法による各検出系の検出感度の検討は、A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型の 4 検出系が 5 well ずつ、RSV A が 2 well、RSV B が 3 well 搭載された試作の「インフル 1 チップ」と A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型、A/H7 亜型の 5 検出系が 5 well ずつ搭載された試作の「インフル 3 チップ」について実施した。マイクロ流路チップには試薬や primer 類が all in one になって各 well に乾燥化され、マイクロ流路チップ内は真空となっており、各 well の総量は 5 μ L である。検討は、インフル 1 チップに対しては、A 型、A/H3 亜型、RSV A、RSV B 検出系に対するテンプレートを混合してマイクロ流路チップ内に注入し、インフル 3 チップに対しては、A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H7 亜型検出系に対するテンプレートを混合してマイクロ流路チップ内に注入

し、反応条件は 63°C の等温で 30 分として、各検出系において 1 well 以上で蛍光消光が見られた場合に、その検査マイクロ流路チップでの検査系の結果は陽性として、蛍光 RT-LAMP 反応系をマイクロ流路チップ化した場合の検出感度への影響を検討した。

[2. インフルエンザウイルスの性状解析およびウイルス遺伝子の基盤的解析]

これまでに構築した季節性インフルエンザウイルス H1N1pdm09 亜型、H3N2 亜型、H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスおよびインフルエンザウイルスの A 型、B 型、C 型の Direct RT-LAMP 法による検出系については、ウイルス変異により検出感度低下の可能性があるので、常に改良の必要性を検討しなければならない。これまで、臨床検体よりインフルエンザウイルスの分離およびウイルスの性状解析を行っており、また、分離株のシーケンス配列と既存の遺伝子データベースに登録された配列を用いて、その必要性について検討を行ってきた。今回は、2011/2012 シーズンより変更を行っていない A/H1pdm09 亜型検出系のプライマー配列について詳細に検討を行った。また、C 型インフルエンザウイルスの各遺伝子のシーケンスを行うための方法がまだ整備されていなかったため、シーケンスを行うためのプライマー設計を新たに行って、C 型インフルエンザウイルスの各遺伝子のシーケンス方法について検討した。

[3. 呼吸器感染症ウイルスの核酸検出系の構築]

今回は、新たに乳幼児や高齢者に感染すると肺炎や気管支炎などの重篤な症状を引き起こすことがあるヒトパラインフルエンザウイルス(1 型、2 型、4a 型、4b 型)について RT-LAMP 法による検出系の構築を試みた。

[4. 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]

インフルエンザウイルスの型(A型、B型)、季節性インフルエンザウイルスの亜型(A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型)および鳥インフルエンザウイルスの、A/H7 亜型、もしくは季節性インフルエンザウイルスの型・亜型(A型、B型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型)とRSウイルスの型(A型、B型)を同時検出可能なマイクロ流路チップを試作し、POC遺伝子診断システムを用いて、リアルタイムRT-PCR法、イムノクロマト抗原検査(クイックナビ TM-Flu、クイックナビ TM-RSV:デンカ生研; 判定時間 8分)との比較評価を、診療現場である外来の一区画で行った。

また、現行の医療体制における診断までの検査や現場での感染制御について検証し、医療機関での問題点やPOC遺伝子診断システム導入後の有用性について検討を行った。さらに、東京都小平市、小平市医師会、公立昭和病院とで、新型インフルエンザ等対策行動計画の策定するための会議を4回開催し、地域の医療現場における問題点やPOC遺伝子診断システム導入後の有用性について検討した。

[5. 蛍光RTLAMP法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系の開発に関する研究]

RT-LAMP法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系を開発するために必要である最近の麻疹流行株の遺伝子配列情報を蓄積するため、2009年～2014年に分離された遺伝子型D4、D8、D9、B3、H1、G3の麻疹ウイルス、計30株を収集して、N、P、M、F、H遺伝子の解析を行った。

また、Fujinoらが報告しているRT-LAMP法(J. Med. Virol., 76, 406-413, 2005)を用いて、最近の流行株が検出できるかどうかの確認を行った。

[6. 新規風疹ウイルス遺伝子検出法の開発]

風疹ウイルス遺伝子検出RT-LAMP法としてはMoriら(J. Clin. Microbiol., 44:3268-3273,

2006)が既に発表しているが、現在流行している遺伝子型2Bウイルスに対して検出感度が低いことが明らかとなっている。そのため、高感度かつ世界中で流行している全ての遺伝子型の風疹ウイルスを検出可能なRT-LAMP法の確立が必要である。そこで、風疹ウイルス内で良く遺伝子配列の保存された領域内に、RT-LAMP法用のプライマーを新たに設計し、合成RNAを鋳型にして検出感度の検討と各遺伝子型ウイルスを用いての検出効率の検討を行った。

[7. MERSウイルス検出系の開発に関する研究]

現在MERS-CoVの検査は、主にリアルタイムRT-PCRによる遺伝子検出によって行われている。MERS-CoVの発生後、直ちにCormanら(Euro Surveill. 7(49), 2012)によってTaqManプローブを用いたMERS-CoV検出法が報告され、中でもE蛋白質上流(upE)およびORF1a遺伝子を標的とする2つのアッセイが、世界で主に利用されている。2013年7月3日に世界保健機構(WHO)から発表されたMERS-CoVの症例定義では、陽性とするためには少なくとも2種の異なる遺伝子ターゲットによって検出されることが必要とされているため、MERS-CoVの診断効率を上げるためには、上記の2種のTaqManアッセイ以外にも多くの遺伝子検出法を開発することが有用と考えられる。そこで本研究では、日本国内で広く利用されているRT-LAMP法を利用したMERS-CoV検出法の開発を行った。RT-LAMP法用のプライマーセットは、ウイルスのNucleocapsid (N) proteinの保存領域に設定した。

[8. マイクロ流路チップ-LAMP法を用いた季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検出の検討ならびに小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析]

インフルエンザウイルスA、B型およびA/H1pdm09、A/H3およびA/H7亜型を検出可

能な試作のマイクロ流路チップを利用して、POC 遺伝子診断システムを用いた遺伝子検出検査を実施した。検体として、平成 26 年 9 月以降に大阪市感染症発生動向調査事業に供与され、MDCK 細胞での継代 1 または 2 代において、インフルエンザウイルス分離陽性となった鼻汁希釈液 20 件を用いた。各鼻汁希釈液 30 μ l を LAMP 装置専用核酸抽出試薬 120 μ l と混合した後に、上記マイクロ流路チップ内に注入して専用ミキサーにて攪拌後、専用の POC 遺伝子診断システムで 30 分間反応させ、蛍光消光の得られた well の結果を解析して、各遺伝子検出の有無を判定した。

また、平成 26 年 4 月～平成 27 年 1 月の期間に、大阪市感染症発生動向調査事業に供与された臨床検体のうち、インフルエンザ様疾患を除く 10 歳未満の呼吸器由来検体 220 件について、マルチプレックス・リアルタイム(RT-)PCR 法を用いて、以下に示す計 19 の呼吸器病原ウイルス(サブタイプ)の遺伝子検出検査を実施した: アデノウイルス、コロナウイルス(OC43、229E、NL63、HKU1)、エンテロウイルス、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス(A、H1pdm09、B、C)、パラインフルエンザウイルス(1～4 型)、ライノウイルス、RS ウイルス(A、B)。遺伝子検出方法は、既報の Kaida らの方法に従った(Jpn J Infect Dis, 67:469-475, 2014)。

(倫理面への配慮)

公立昭和病院および国立感染症研究所で使用した臨床検体は、公立昭和病院、国立感染症研究所の医学研究倫理委員会による倫理審査の承認を得てから提供者に十分な説明を行い、自由意思による同意を得て採取し、本研究に用いた。また、大阪市立環境科学研究所で用いた全検体は、大阪市感染症発生動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、検体供与者の特定ができない状態であれば差支えないことで、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. 蛍光 RT-LAMP 法を使用した POC 遺伝子検査システムによるウイルス同定法の開発]

Q-primer を用いた蛍光 RT-LAMP 反応では、陽性の場合には消光していく蛍光波形が得られるため、その波形を目視して判定を行うことができる。検討の結果、多くの検出系では、リアルタイム RT-PCR 法と同等程度の高い検出感度を有していた。しかし、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型、RSV B 検出系では、同時に行った他の検出系より少し検出感度が低い傾向が見られ、また RSV A 検出系では、陰性コントロールに対する非特異反応が見られたものの、従来使用していた反応試薬と比べて、反応時間の短縮化、特異性の向上、高感度化する事ができた。

また、マイクロ流路チップでの各検出系の検出感度を検討した結果、プレート濃度 10 コピー/ μ L (50 コピー/反応) の低濃度であっても、全ての検出系で検出可能であった。

なお、蛍光 RT-LAMP 反応系をチップ化した場合の検出感度への影響を検討した結果、検出感度は同等もしくはそれ以上となることが示された。

[2. インフルエンザウイルスの性状解析およびウイルス遺伝子の基盤的解析]

H1pdm09 亜型検出系については、2013/2014、2014/2015 シーズンの分離株のアライメントの結果、検出系 1 において 5 塩基、検出系 2 においても 5 塩基が 10% 以上の分離株で変異が入っている事が確認され、プライマー配列の更新の必要性があることが明らかとなった。また蛍光 RT-LAMP 法では、これら 2 種類のプライマーセットを混合して反応させると非特異反応が起きやすいことが分かったため、プライマー配列を一部更新し、1セットのみを蛍光 RT-LAMP 法で使用

することとした。

C 型インフルエンザウイルスの分離株情報および各遺伝子配列情報は非常に少なく、これまで構築した Direct RT-LAMP 法による C 型インフルエンザウイルス検出系の有用性についての検討も難しい状況だったため、新たに2株のC型インフルエンザウイルス全長遺伝子配列を決定した。

[3. 呼吸器感染症ウイルスの核酸検出系の構築]

ヒトパラインフルエンザウイルスの1型(hPIV1)、2型(hPIV2)、4a型(hPIV4a)、4b型(hPIV4b)の各血清型ウイルスの標的遺伝子として、hPIV1 および hPIV2 は Hemagglutinin - Neuraminidase 領域、hPIV4a および hPIV4b は Nucleocapsid 領域に決定した。これらの領域を RT-LAMP 法により増幅させるプライマーセットを設計した。

各領域について T7 RNA ポリメラーゼを用いて RNA を合成し、各血清型の検出感度と特異性について反応性を検討したところ、100～200 コピー/反応以上の感度で検出可能であった。また、hPIV1 および hPIV4a のプライマーセットは高濃度の hPIV4b に対しても反応性を示し、hPIV2 および hPIV4b のプライマーセットは高濃度の hPIV4a に対しても反応性を示した。

[4. 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]

2014/2015 シーズンに同意が得られた呼吸器感染症を呈した患者から採取した 31 検体(鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、鼻かみ液)を対象とし、イムノクロマト抗原検査でインフルエンザウイルス A 型が検出された 12 例につき、POC 遺伝子診断システムとリアルタイム RT-PCR 法の二種類の遺伝子検査について検討した結果、全例が同じ結果となった(11 例は A 型と H3 亜型陽性、1 例は陰性)。

イムノクロマト抗原検査で RS ウイルスが検出さ

れた 5 例については、POC 遺伝子診断システムでは 4 例で RS ウイルス A 型が検出され、1 例で RS ウイルス B 型が検出された。

POC 遺伝子診断システムの平均検出時間は、インフルエンザウイルス A 型で 11.7 分、H3 亜型で 11.3 分、RS ウイルス A 型で 10.8 分、RS ウイルス B 型で 13 分であった。

東京都小平市、小平市医師会、公立昭和病院とで、新型インフルエンザ等対策行動計画の策定について地域の医療現場における問題点や POC 遺伝子診断システム導入後の有用性について検討した結果、第二種感染症指定医療機関である公立昭和病院では、地域発生早期においては全例、疑い患者の結果が判明するまで留め置きの措置を行うため、迅速に結果が判明する POC 遺伝子診断システム導入する事で、患者の留め置きを必要最小限する事ができ、地域感染期においては、患者を集中して対応にあたる小平市医師会応急診療所に POC 遺伝子診断システムを導入すれば、リアルタイムに診断結果を所管の東京都多摩小平保健所と共有することができ、細分化された地域の流行状況も把握できる事が分かった。

[5. 蛍光 RT-LAMP 法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系の開発に関する研究]

麻疹ウイルスはその遺伝子配列から 24 の遺伝子型に分類されている。日本においては 2006 年～ 2008 年の流行時には遺伝子型 D5 のウイルスが多く検出されていたが、2010 年 5 月以降は検出されておらず、遺伝子型 D4, D8, D9, B3, H1, G3 等のウイルスが検出されている。近年、分離された遺伝子型 D8 株 7 株、D9 型 10 株、H1 型 4 株、B3 型 4 株、D4 型 3 株、G3 型 1 株、D5 型 1 株を入手し、N,P,M,F,H 遺伝子を解析し、遺伝子情報を蓄積した。また、遺伝子型 D4, D8, D9, B3, H1, G3 ウイルスの培養上清からウイルス RNA を抽出し、real-time PCR で含まれる RNA 量を定量した。それぞれ約 103copy/反

応液になるようにウイルス量を調整し、Fujino らの方法で RT-LAMP 法を実施した。Fujino らの方法でも近年のすべての遺伝子型のウイルスを検出できたが H1, G3 は検出にはやや感度がひくい傾向が見られた。

[6. 新規風疹ウイルス遺伝子検出法の開発]

風疹ウイルスの非構造蛋白質コード領域の 5' 末端は、ウイルス株間で遺伝子配列の相同性が高く、様々な遺伝子型のウイルスを検出するためのプライマーセットの認識部位として適当であると考え、この部位にプライマーセットを設計して、検出感度の検討を行ったところ、50%検出濃度は 380 コピー/反応であった。Mori らの RT-LAMP 法は、株間で遺伝子配列の変異が比較的多い E1 遺伝子にプライマーセットが設定されており、現在世界的に流行している遺伝子型 2B ウイルスの検出効率が著しく悪い。今回構築した方法は、遺伝子型 2C ウイルスを除いて全ての遺伝子型のウイルス株が検出可能であった。さらに、蛍光 RT-LAMP 法を行うため、蛍光プライマーを導入したところ、約 10 コピー/反応まで検出可能であった。

[7. MERS ウイルス検出系の開発に関する研究]

今回開発した RT-LAMP 法は、MERS-CoV ウイルス RNA を 3.4 コピーまで検出することが可能であった。検出感度は既報の TaqMan アッセイと同程度であった。またインフルエンザやヒト RS ウイルスなど他のヒト呼吸器ウイルスとの交差反応は見られなかった。更に三重県保健環境研究所でおこなった、様々なウイルスの陽性検体を用いた検査においても交差反応は見られなかった。

[8. マイクロ流路チップ-LAMP 法を用いた季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検出の検討ならびに小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析]

平成 27 年 2 月 25 日現在、平成 26 年 9 月以降に大阪市で分離されたインフルエンザウイルスは、ほぼすべての株が A/H3 亜型で、1 株のみが B 型(Yamagata 系統)であった。本検出検査に用いた 20 検体のうち、19 検体は A/H3 亜型が分離され、1 検体は B 型が分離されている。これら検体に対する POC 遺伝子診断システムの結果は、A 型および A/H3 亜型遺伝子が検出されたものが 17 検体、A 型のみ検出されたものが 1 検体、遺伝子検出陰性が 1 検体であった。また、B 型が分離された 1 検体では、B 型遺伝子が検出され、検査した 95.0 % (19/20)の鼻汁希釈液検体において、本システムによりインフルエンザウイルスの型・亜型別遺伝子検出が可能であった。また、A/H3 亜型が分離された検体に関しては、89.5 % (17/19)の検体で A 型および H3 亜型の遺伝子検出が可能となった。なお、A 型遺伝子のみが検出された 1 検体および遺伝子検出陰性となった 1 検体の MDCK 細胞での分離継代数は、いずれも 2 代であった。

また、大阪市における小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析を行い、168 検体(76.4 %)から 228 ウイルスを検出した。51 検体(30.4 %)からは複数のウイルスが検出された。調査対象とした 19 の病原ウイルス(サブタイプ)のうち、インフルエンザウイルス C 型、インフルエンザウイルス AH1pdm09, コロナウイルス HKU1 を除いた 16 ウイルス(サブタイプ)が検出された。検出数はライノウイルスが最多の 75 件となり、全検出ウイルスの 32.9 % を占めた。次いで、RS ウイルス(A, B 合計) 33 件 (14.5 %)、パラインフルエンザウイルス 3 型 20 件 (8.8 %)、ヒトメタニューモウイルス 17 件 (7.5 %) となった。

D. 考察

[1. 蛍光 RT-LAMP 法を使用した POC 遺伝子検査システムによるウイルス同定法の開発]

これまでに改良した試薬と各検出系を組み合わせた蛍光 RT-LAMP 反応系による検出感度の

検討では、多くの検出系で非常に高い感度と反応時間の短縮が示され、従来法の濁度法よりも非常に有用であると考えられた。一方で、非特異反応が出やすい検出系もあり、更なる Primer 配列の変更が必要な検出系もあると考えられた。

なお、蛍光 RT-LAMP 反応系をマイクロ流路チップ化した場合、従来法の PCR チューブを使用した場合よりも、検出感度は同等もしくはそれ以上となることが示されたが、これはマイクロ流路チップ化で反応槽が分割される事により、特にプレート濃度が低いサンプルでは、マイクロ流路チップチップのウェル間でプレートの濃度勾配が生じやすくなるため、PCR チューブを使用して 1 つのチューブで反応した時よりも、マイクロ流路チップ上で5分割して反応した方が、陽性(5well 中1well でも陽性となれば陽性と判断する)となる確率が高くなる。以上のことから、蛍光 RT-LAMP 反応系をマイクロ流路チップに搭載するだけでも、さらに高感度な診断が可能となる事が示された。

[2. インフルエンザウイルスの性状解析およびウイルス遺伝子の基盤的解析]

H1pdm09 亜型のインフルエンザウイルスは 2011/2012 シーズン以降日本においてヒトでの大きな流行がなく、流行の主流は A/H3 亜型のインフルエンザウイルスであったが、2009 年のヒトで大流行以降大きな抗原性の変異はないものの、A/H1pdm09 亜型のインフルエンザウイルスの HA 遺伝子には多様性が見られるようになった。蛍光 Direct RT-LAMP 法による H1pdm09 亜型検出系で使用するプライマーについても、流行株とのミスマッチが生じており、プライマー配列を更新して、特異性と感度を上げる必要がある。他の亜型や型の検出系についても、プライマー配列の変更が必要かどうかチェックしプライマーの変更が必要な場合は、変更後の検出系をチェックする事が、RT-LAMP 法による高い特

異性と検出感度を維持するためには重要である。

また、C 型インフルエンザウイルスの全長シーケンス法の確立により、C 型インフルエンザウイルスの遺伝子配列情報の蓄積に資する事が可能となった。C 型インフルエンザウイルスの分離株情報および各遺伝子配列情報は非常に少なかったため、これまでに構築した RT-LAMP 法による C 型インフルエンザウイルス検出系についての有用性の検討が難しい状況であったが、今後より多くの株についてシーケンス解析を進める事で、より高感度で特異的な RT-LAMP 法を用いた C 型インフルエンザウイルス検出系の検証が可能となる。

[3. 呼吸器感染症ウイルスの核酸検出系の構築]

インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築において、検出するウイルス群の選択は重要であり、本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うことは非常に重要である。ヒトパラインフルエンザウイルスは乳幼児や高齢者に感染すると肺炎や気管支炎などの重篤な症状を引き起こすことがあるため、他のウイルス性呼吸器感染症との鑑別診断を行うためにも、このウイルス検出系の構築は重要であった。今回構築した RT-LAMP 法による各血清型の検出系は、高感度に各血清型を検出でき、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。しかしながらプレート量が高濃度である場合、他の血清型に対して多少交差反応する場合があった。ヒトパラインフルエンザウイルスを血清型に関係なく検出するのであれば、特に問題はないが、厳密に血清型を区別する場合は、特異性を向上させるための更なるプライマーの改良が必要である。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、感染症診断に利用可能な診

断システムへ応用される事が期待される。

[4. 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]

POC 遺伝子診断システム検出できたインフルエンザ A 型および H3 亜型に関しては、全例がリアルタイム RT-PCR 法と結果が一致しており、POC 遺伝子診断システムは迅速、高感度かつ特異的にインフルエンザウイルスの型・亜型が同定可能な診断システムであると考えられた。なお、イムノクロマト抗原検査でインフルエンザ A 型が検出されたが、POC 遺伝子診断システムでもリアルタイム RT-PCR 法でも陰性となった 1 例に関しては、イムノクロマト抗原検査の偽陽性も否定はできないが、遺伝子検査用に採取した検体が鼻かみ液であったため、ウイルスの採取がうまくできなかつた可能性が考えられる。また、POC 遺伝子診断システムにて 1 例が 1well のみ H7 亜型陽性となったが、リアルタイム RT-PCR 法では H7 亜型は検出されなかつたため、非特異反応による偽陽性と考えられた。今後検討を進めるにあたり、検体を用いた非特異反応の影響をもう少し詳細に調べる必要がある。

また、POC 遺伝子診断システムは、各ウイルスの平均検出時間は 10 分前後であり、迅速性を兼ね備えていることも確認できた。イムノクロマト抗原検査で偽陰性となりやすいウイルス量が少ない病初期であっても POC 遺伝子診断システムでは病原体の検出が可能となり、一次医療機関であっても精度の高い病原体迅速診断が可能となると考えられた。

先天性風疹症候群(CRS)では生後 6 か月～1 歳まで長期にウイルスが検出されることから、病院内での感染制御対策は血清学的診断よりも患児のウイルス排出の有無を調べることの方が重要である。しかし現状では、風疹の遺伝子検査が行えるのは、主に地方衛生研究所であり、行政検査を依頼しても、結果が判明するまでにかかなりの時間を要する。そこで、迅速に結果が

判明する POC 遺伝子診断システムを病院における感染制御対策に導入すれば、病原体の迅速診断が即座に可能となり、不要な感染制御対策を行わずに済むため、現場に従事するスタッフの業務量を適正化でき、臨床現場の業務負担の軽減につながれると考えられた。

現在、国策として新型インフルエンザ等対策行動計画を地方自治体レベルで策定しているが、POC 遺伝子診断システムを導入した場合、新型インフルエンザ等の地域発生早期は、第二種感染症指定医療機関で単独で精度の高い病原体診断が迅速に可能となり、疑い患者を留め置きする時間も最小限にできると考えられる。また、地域感染期においては、一次医療機関に POC 遺伝子診断システムを導入すれば、診断のみならず、行政と病原体検出情報を共有することで細分化された地域でのリアルタイム病原体サーベイランスが可能となり、その結果、細分化された地域で封じ込めを試みたりし、パンデミック時における感染拡大を遅らせる事も可能となり、結果として、国民の健康被害を最小限にとどめることができる可能性がある。

[5. 蛍光 RT-LAMP 法を用いた麻疹ウイルス迅速検出系の開発に関する研究]

麻疹は感染性が強い事から、早期に麻疹患者を診断し、患者や患者周囲の感受性者へ適切に対策をとる事が、ワクチン接種率を高く維持する事とともに重要である。麻疹の標準的検査法として、日本では IgM EIA 法と RT-PCR 法が勧められているが、IgM EIA 法は発症直後の感度にやや問題があり、またしばしば伝染性紅斑(パルボウイルス B19)や突発性発疹(HHV6, HHV7)にも交差反応する事が知られ、一方、RT-PCR 法は検査手技がやや煩雑な上、感度が非常に高いため周囲の環境からのクロスコンタミの可能性もある事、自治体によっては検体の輸送方法が確保されていない等の問題がある。またどちらの検査も、検査結果がでるまでに数日かかるため、

そういった現在の検査診断法の欠点を改善するために、感度がよく、比較的簡便な RT-LAMP 法は一つのブレークスルーになり得ると考える。今回の研究ではより迅速に検出できる蛍光 RT-LAMP 法の確立を目指しており、ベッドサイドでの検査診断も視野に入れている。

現在、麻疹ウイルスはその遺伝子配列によって 24 の遺伝子型に分類され、日本では 2006～2008 年は遺伝子型 D5 が流行の主流であったが、2010 年以降は、遺伝子型 D5 は検出されず、遺伝子型 D4, D8, D9, B3, H1, G3 など新たな遺伝子型のウイルスが検出されるようになった。これらは海外から持ち込まれたと考えられているが、従来の麻疹用 RT-LAMP 法のプライマーを用いて反応性を評価したところ、すべての遺伝子型のウイルスが検出可能ではあったものの、遺伝子型によっては増幅に時間がかかるものがあり、より増幅効率のよいプライマー、反応条件の検討が必要と考えられた。最近の流行株の遺伝子情報の解析も行っており、それらの情報は今後の LAMP 法の改良に有用な情報になると考えられる。

[6. 新規風疹ウイルス遺伝子検出法の開発]

風疹ウイルス遺伝子の 5' 末端は各株間で比較的良く保存されており、様々な遺伝子型を検出可能なプライマー設計に適していることが分かった。遺伝子型 2C ウイルスのみが今回構築した方法では検出できなかったが、近年この遺伝子型のウイルスは世界的にも流行していない。蛍光 RT-LAMP 法を導入すると感度が大幅に改善されることから、さらに検討を行って蛍光 RT-LAMP 法の確立を試みる予定である。また、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、感染症診断に利用可能な診断システムへ応用される事が期待される。

[7. MERS ウイルス検出系の開発に関する研究]

本法は MERS-CoV の遺伝子診断法として有用であると考えられる。一方、2014 年の流行で MERS の株間バリエーションが増え、プライマーミスマッチがいくつか見られるようになった。ほとんどのミスマッチは増幅効率に影響を与えないが、Jeddah-Camel-1 に見られる BIP プライマーにおけるミスマッチはやや感度の低下を招いた。しかしこれらのウイルス株は Riyadh-3 clade に属するが、MERS 全体ではマイノリティであり、検出への影響は低いと考えられる。BIP プライマーの混合塩基化を検討していく必要がある。なお、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、新興感染症対策等の診断システムに応用される事が期待される。

[8. マイクロ流路チップ-LAMP 法を用いた季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検出の検討ならびに小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析]

今回、試作したインフルエンザウイルス検出用のマイクロ流路チップを用いた POC 遺伝子診断システムでは、MDCK 細胞でのインフルエンザウイルスの分離が陽性となった鼻汁希釈液検体のうち A および B 型遺伝子が検出された割合は 95.0 % (19/20)であったことから、本システムのインフルエンザウイルス型別遺伝子の検出感度は、MDCK 細胞を用いた分離・同定試験にほぼ匹敵することが示唆された。また、A 型および A/H3 亜型遺伝子が検出された割合は 89.5 % (17/19)であったが、A/H3 亜型遺伝子の検出が陰性となった 2 検体は、MDCK 細胞での継代 2 代によってウイルス分離陽性となったものであったことから、これら 2 検体中に存在するウイルス数が非常に少なかったために、POC 遺伝子診断システムでは陰性となったと考えられる。今後は A/H1pdm09 亜型および B 型が分離された鼻汁希釈液検体に関しても同様の解析を行い、本システムにおけるこれらの特異的遺伝子検出感度を確認するとともに、季節性インフルエンザウ

ウイルスが分離された検体において、H7 亜型遺伝子の非特異的検出が認められないかどうかを確認する必要がある。

マルチプレックス・リアルタイム(RT-)PCR 法を用いた小児呼吸器病原ウイルスの流行状況に関する解析においては、16 ウイルス(サブタイプ)の遺伝子が検出可能となった。インフルエンザウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルスおよびアデノウイルスなどに対しては、市販のイムノクロマト迅速診断キットが存在するが、今回の解析で検出数の多かったライノウイルスおよびパラインフルエンザウイルス 3 型に対しては、現在のところ市販の迅速診断キットは存在しない。各呼吸器病原ウイルスについて、発病初期の段階での確実な診断を可能にし、さらに的確な治療方針の導入を可能とする手段として、臨床検体からの病原ウイルスを多項目、迅速、簡便および高感度で検出可能とする方法が必要であり、また、この観点において、本 POC 遺伝子診断システムを呼吸器病原ウイルス遺伝子の検出法に応用するのは有用と考えられる。

また、平成 27 年 1 月において、3 例の呼吸器由来臨床検体(診断名は、それぞれ気管支炎、肺炎、発熱)からインフルエンザウイルス A 型遺伝子が検出された。このうちの 1 例は、発熱、けいれんが認められた後に、死に至った。このことから、呼吸器症状が認められない症例においても、呼吸器病原ウイルスの感染がその原因となる可能性のあることが示唆された。典型的な呼吸器症状がない場合においても、その臨床診断時に呼吸器病原ウイルスを多項目、迅速、簡便および高感度で検出可能とする検査方法は、その後の的確な治療実施に有益であることが考えられ、したがって、呼吸器病原ウイルス遺伝子検出検査に本 POC 遺伝子診断システムを応用することは、有用であることが示唆された。

E. 結論

POC 遺伝子診断システムは、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ほぼ同等の簡便な操作性を確保し、閉鎖系のマイクロ流路チップを利用する事により、原理的に遺伝子検査で問題になる検体間あるいは周囲からのコンタミネーションの可能性が排除できるため、これまでよりも正確な遺伝子検査が臨床現場など、実験設備が整っていない場所でも行うことが可能となる。また同時に複数項目の遺伝子検査を行う事が可能であるため、例えば季節性インフルエンザウイルスの型・亜型同定と H5 亜型や H7 亜型の鳥インフルエンザウイルスの同定を同時に行う事も可能である。さらに、本システムを用いて、既存の呼吸器感染症ウイルス群が検出できるようになれば、新興ウイルス等が出現した際に、除外診断する事が可能となる。もちろんこれら新興ウイルス等の診断法がすぐに構築できれば、本システムは新興感染症等対策にも大いに役立つ診断のための有用なツールとなりうると考えられる。

今回、従来の反応試薬から反応組成を変更して反応性を向上させ、Q-primer を利用した蛍光 RT-LAMP 法を導入した事により、試作のインフルエンザウイルス(A 型、B 型、A/H1pdm 亜型、A/H3 亜型、A/H7 亜型)および RS ウイルス(A 型、B 型)検出系を搭載したマイクロ流路チップのプロトタイプを用いた検討では、リアルタイム RT-PCR 法並に非常に高感度に、これらウイルス遺伝子を検出でき、インフルエンザウイルスの型・亜型、RS ウイルスの型を迅速に同定する事が可能であった。また、臨床検体を用いた臨床的評価でも、高感度かつ特異的にこれらのウイルス遺伝子を同定する事が可能であった。なお、POC 遺伝子検査システムのベースとなっている蛍光 RT-LAMP 法は、マイクロ流路チップの代わりに例えば 8 連の PCR チューブを用いれば、検疫所や地方衛生研究所が所持している汎用のリアルタイム PCR 機器を利用しての検査も可能であり、今後、他の地方衛生研究所や検疫所での活用も期待できる。また、試薬類をマイクロ