

流路チップと同様に乾燥品にすれば、常温での保存や輸送も可能となり、特に鳥インフルエンザや MERS-CoV のヒト感染事例が多発している、中東、アジア地区などの海外研究機関でも、簡便、高感度かつ迅速な遺伝子検査を行う事が可能であり、特に東南アジアや中東においてはコードチェーンが発達していない国々もあり、そこで遺伝子検査ができるようになるメリットは大きい。

もし、本 POC 遺伝子診断システムを一次医療機関に導入できれば、これまで高度な手技と経験が必要であったリアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の高感度な遺伝子検査を迅速かつ簡便に行う事ができるようになり、ベッドサイドにおける精度の高い迅速病原体診断が可能となる。これにより、医師等の感染症に対する診断能力の向上が期待でき、また患者に対してはよりの確な診断が行えて、適切な医療および予後を予測した治療を早期に受けられるようになり、医療技術の向上も期待できる。さらに、臨床現場では検査や問診にかかる時間や人員を大幅に少なくする事ができるため、特に医療崩壊につながる医師等の疲弊の軽減にもつながり、特に医師不足が深刻な小児科などではその分人的資産の活用ができるようになる。また、臨床現場等での迅速な感染制御対策も可能となり、同時に院内感染やコミュニティ内での感染拡大の防止にも役立つと考えられる。特に現場に従事するスタッフの業務量の適正化もできて、臨床現場等では非常に有用な検査法になり得る事が示された。

また、これまでの病原体サーベイランスは検体を地方衛生研究所等に送付し、ウイルス同定やウイルス分離、引き続き詳細解析を行うため、病原体の情報共有までに 1 週間単位の時間がかかっていた。迅速、簡便かつ高感度な本遺伝子検査システムが全国の医療機関等で利用可能になれば、臨床現場でリアルタイムに感染症の診断を行うことが可能になり、同時にリアルタイムな感染症サーベイランスや薬剤耐性株などの診

断やサーベイランスを行う事も可能となる。また、実験室診断が省力化できれば、その分病原体を分離して病原性などのより詳細な解析を行う時間が確保できるなど、地方衛生研究所などでも時間および人的活用が可能となる技術であり、わが国の感染症対策にも大きく貢献する事ができるようになる。

さらに医療機関等で病原体のリアルタイム診断が行えるようになると、地域におけるより細かなリアルタイム病原体サーベイランス網を構築する事が可能となる。特に、パンデミック発生時には、リアルタイムに地域の流行情報を共有する事で感染拡大を遅らせたり、一時的かもしれないが、検疫所における機内検疫による病原体の封じ込めも可能となると考えられる。なる。人獣共通感染症等の動物由来の病原体診断やサーベイランスにも活用でき、輸入感染症対策として国内への感染症流入の予防対策に役立てる事も可能で、結果として、国民の健康被害を最小限にとどめ、感染症の治療および予防の観点からも、わが国の新興感染症対策に大きく寄与する事ができる技術と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(業務主任者分のみ、担当責任者分については各項参照)

1. 論文発表

- 1) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiko Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. *J Virol Methods*. 205:110-115, 2014
- 2) Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Kazuo Ohnishi, Kengo Nishimura, Kazutaka Terahara, Manabu Ato, Sigeyuki Itamura,

- Tsutomu Kageyama, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies Against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. *Plos One*. 9(6):e99201, 2014
- 3) Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Marilda M. Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong, Wenqing Zhang, Rod S. Daniels, Aeron C. Hurt. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Research*. 110:31-41, 2014
- 4) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis*. 3;14(1):362-, 2014
- 5) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Seiji P. Yamamoto, Atsushi Hase, Koh-Ichi Takakura, Tsutomu Kageyama. Frequent respiratory viral infections in a young child in a 27-month follow-up study. *JMM Case Reports*. in press. 2014
- 6) Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis*. in press. 2014
- 7) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Seiji P Yamamoto, Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Minoru Ohyama, Kaoru Goto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyama, Nobuhiro Iritani. Associations between co-infecting respiratory viruses in children with acute respiratory infections. *Jpn J Infect Dis*. 67(6):469-475, 2014
- 8) 大場邦弘, 加藤昭生, 古谷智子, 小花奈都子, 林健太, 村田岳哉, 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. インフルエンザ A/H1 pdm09 亜型及び A/H3 亜型感染症による小児の入院診断名の比較. *小児科臨床* 68(1):47-51, 2014
2. 学会発表
国内会議
- 1) 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 平井有紀, 廣川秀徹, 影山 努, 久保英幸. 麻しん診断例から検出された麻しんウイルス株の分子疫学解析(大阪市 2007~2014年). 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会. 東京. 2014年10月
- 2) 高山郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切孝人, 田代真人, 影山 努. 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月
- 3) A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Nastri, Edith F Puruhito, 横田(恒次)恭子, 西村研吾, 影山 努, 高原悠佑, 堀田 博, 清水一史. Comparative analysis for the detection of avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer (POCube) and real-time RT-PCR. 第62回日

本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月

- 4) 中内美名, 高山郁代, 大場邦弘, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. RT-LAMP 法を用いた A/H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月

- 5) 大場邦弘, 高橋仁, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. ARDS から多臓器不全に至ったインフルエンザ A/H1pdm 重症肺炎成人例におけるウイルス学的検討. 第 28 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 鳥取. 2014 年 7 月

国外会議

- 1) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Seiji P. Yamamoto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyema. Frequent respiratory

viral infections in a young child in a 27-month follow-up study. International Congress on Medical Virology (ICMV 2014), Bangkok, November 2014

H. 知的所有権の取得状況

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

II. 委託業務成果報告（業務項目）

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

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

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 インフルエンザウイルスの型、亜型別診断や他呼吸器ウイルス感染症の診断を臨床現場等で実施することを目指し、蛍光 RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせた POC 遺伝子検査システムの開発を進めている。

本研究では、反応の迅速化および高感度化を目的として反応試薬や検出系の改良を行った蛍光 RT-LAMP 検出系について検出感度を評価するとともに、それらの検出系を元に作製されたマイクロ流路チップの検出感度と比較を行った。結果、概ね全ての検出系で高い検出感度が示され、蛍光 RT-LAMP 検出系および POC 遺伝子検査システムの有用性が改めて示された。

A. 研究目的

現在、臨床現場でのインフルエンザの診断には、イムノクロマト法を利用した迅速診断キットが広く使用されている。しかし、A 型、B 型の型別診断しかできないうえ、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。近年、近隣諸国では A(H5N1)や A(H7N9)亜型等の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が報告されており、病初期に亜型診断まで実施できることは非常に有用であると言える。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た Point of care (POC)遺伝子検査システムの開発を進めている。このシステムでは、インフルエンザウイルスの型、亜型別診断の他にも

病初期の臨床症状からインフルエンザと区別が難しい他呼吸器ウイルス感染症の診断も行うことができる。

今年度は、反応の迅速化および高感度化を目指し、反応試薬の改良を行うとともに、蛍光 primer を使用した蛍光 RT-LAMP 法にインフルエンザウイルスおよび RS ウイルスの各検出系を最適化させた。改良した検出系については、PCR 用 8 連チューブに乾燥させ、汎用のリアルタイム PCR 機での検出を試みるとともに、マイクロ流路チップのプロトタイプに搭載し、臨床現場や地衛研での検討を行った。

本研究では、改良した試薬と各検出系を組み合わせた蛍光 RT-LAMP 反応系での検出感度を評価するとともに、それらを乾燥させてマイクロ流路チップに組み込んだ場合の検出感度との比較検討を行った。また、蛍光 RT-LAMP 検出

系の1つの検出系の容量を5 wellに分けてチップ化することで、どの程度検出感度に影響が見られるか検証した。

B. 研究方法

インフルエンザ検出系の検出感度の検討は、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を用いて行った。またRSウイルス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を用いて行った。

1. 蛍光 RT-LAMP 反応系での各検出系の検出感度の検討

蛍光 RT-LAMP 反応は、テンプレート量を $5\mu\text{L}$ とする全量 $25\mu\text{L}$ で、LightCycler 480 (Roche) を使用し、 63°C の等温にて30分間行った。検討は、各検出系でテンプレート濃度を 1×10^3 、 4×10^2 、 1×10^2 、40、20、10 copies/ μL (5×10^3 、 2×10^3 、 5×10^2 、 2×10^2 、 1×10^2 、50 copies/反応、蒸留水で希釈)とし、各濃度3連で実施し、30分以内に消光が見られたものを陽性と判定した。

2. マイクロ流路チップでの各検出系の検出感度の検討

マイクロ流路チップでの検討は、A型、B型、A/H1pdm亜型、A/H3亜型の4検出系が5 wellずつ、RSウイルスA型が2 well、RSウイルスB型が3 well搭載されたインフル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ずつ搭載されたインフル3チップを使用して実施した。マイクロ流路チップは、試薬や primer 類は乾燥化されていて、各 well の総量が $5\mu\text{L}$ である。検討は、各検出系でテンプレート濃度を40、20、10 copies/ μL (2×10^2 、 1×10^2 、50 copies/反応、LAMP 核酸抽出試薬で

希釈)として各濃度3枚ずつで行い、インフル1チップに対しては、A型、A/H3亜型、RSウイルスA型、RSウイルスB型検出系に対するテンプレートを混合して実施し、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行った。判定は、各検出系において1 well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°C の等温で30分とした。

3. チップ化に当たっての検出感度への影響

蛍光 RT-LAMP 反応系での検出感度の検討で用いた最も濃度の低い検出限界付近のテンプレート濃度10 copies/ μL (50 copies/反応)について、5 wellに分けてチップに搭載した場合に検出感度に影響が見られるか比較するため、インフル1チップでテンプレート濃度を2 copies/ μL (50 copies/5well)として各濃度3枚ずつで検討を行った。判定基準は、チップでの検出感度の検討時と同様とした。

(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

1. 蛍光 RT-LAMP 反応系での各検出系の検出感度の検討

蛍光 RT-LAMP 反応では、陽性の場合に消光していく蛍光波形が得られ、目視で判定を行った。参考までに、A/H7亜型での検討で得られた蛍光波形を図に示した。検討結果については、表1にまとめた。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が、A/H1pdm亜型、A/H3亜型、RSウイルスB型検出系では、他の検出系より検出感度が低い傾向が見られた。また、RSウイルスA型検出系では、陰性コントロールに対する非特異反応

が見られた。

2. マイクロ流路チップでの各検出系の検出感度の検討

検討結果については、チップの種類ごとに表 2-1 および 2-2 にまとめた。チップにおいては、テンプレート濃度 10 copies/ μ L (50 copies/反応) でも全ての検出系において 3 枚全てで陽性となり、高い検出感度が示された。

3. チップ化に当たっての検出感度への影響

検討結果については、表 3 にまとめた。蛍光 RT-LAMP 反応系で検出限界付近のテンプレート濃度 10 copies/ μ L (50 copies/反応) であった反応系を 5 well に分けてチップ化した場合、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。なお、RS ウイルス A 型および RS ウイルス B 型検出系については、それぞれチップで 2 well、3 well しか搭載されていないため、今回の検討結果は参考データとして記載したが、RS ウイルス B 型検出系においては、検出系全体でのテンプレート量が 3/5 になるにも関わらず、チップ化することで検出感度の上昇が示された。

D. 考察

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。

これらの検出系を乾燥化しチップに搭載することで、同濃度のテンプレート量が含まれたサンプルを使用しても、1 反応系に占めるサンプル量が 5 倍となることから、全体的に検出感度の上昇が見られた。また、反応系全体の容量やテンプレート量を同じにしても、チップでは 5 well に分けて検出し、1 well でも陽性となればその検出系は陽性と判定できるため、理論的には検出感

度は上昇するはずである。今回の検討では、理論通りの結果が得られた。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ことで、より高感度な診断が可能となることが示された。

E. 結論

本年度作製したインフルエンザウイルスおよび RS ウイルスの各検出系を搭載したマイクロ流路チップのプロトタイプについては、迅速診断キット並みの時間で高い検出感度で診断が可能であることが明らかとなり、POC 遺伝子検査システムが臨床現場等で非常に有用な検査法であることが改めて示された。

また、蛍光 RT-LAMP インフルエンザウイルス検出系については、PCR 用 8 連チューブに乾燥させることに成功し、海外の研究施設で臨床検体を使用して、汎用のリアルタイム PCR 機での検出を試みた。結果、現在行っているリアルタイム RT-PCR 法による検査と比べ、簡便かつ非常に短時間に亜型同定結果が得られ、また常温での輸送や実験操作が可能なることから、研究施設では本方法も非常に有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis.* (in press)
- 2) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a

sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis. 14:362, 2014.

- 3) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiro Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. J Virol Methods. 205C:110-115, 2014.
- 4) 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. 204:101-104, 2014.

2. 学会発表

国内会議

- 1) 高山郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内美名,

高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切孝人, 田代真人, 影山 努. 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月

- 2) 中内美名, 高山郁代, 大場邦弘, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. RT-LAMP法を用いたA/H7N9亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月

G. 知的所有権の取得状況

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 蛍光 RT-LAMP 検出系の蛍光波形(A/H7 亜型検出系)

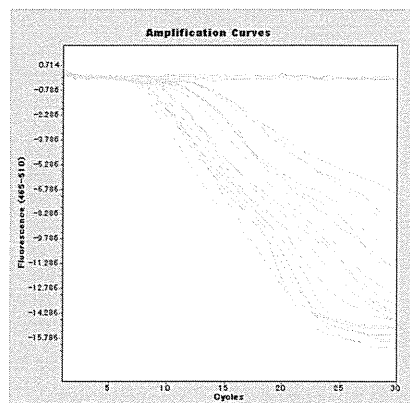


表1 各RNA濃度における陽性反応数

濃度(copies/反応)							
検出系	5×10^3	2×10^3	5×10^2	2×10^2	1×10^2	50	N.C.
Type A	3	3	3	3	3	3	0
Type B	3	3	3	3	3	3	0
A/H1pdm	3	3	3	3	3	2	0
A/H3	3	3	3	3	2	0	0
A/H7	3	3	3	3	3	3	0
RSV A	3	3	3	3	1	3	1
RSV B	3	3	3	1	1	0	0

表2-1 各RNA濃度における陽性チップ数(インフルチップ1)

濃度(copies/反応)			
検出系	2×10^2	1×10^2	50
Type A	3	3	3
Type B	3	3	3
A/H1pdm	3	3	3
A/H7	3	3	3

表2-2 各RNA濃度における陽性チップ数(インフルチップ3)

濃度(copies/反応)			
検出系	2×10^2	1×10^2	50
Type A	3	3	3
A/H3	3	3	3
RSV A	3	3	3
RSV B	3	3	3

表3 2 copies/ μ L (10 copies/反応)における陽性チップ数

検出系		
Type A	3	3
Type B	3	
A/H1pdm	2	
A/H3		2
RSV A		(2)
RSV B		(1)

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

担当責任者 中内 美名 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官

研究協力者 久保 英幸、改田 厚(大阪市立環境科学研究所)

高山 郁代、影山 努

(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター)

研究要旨 高感度なインフルエンザウイルスの型、亜型別診断をベッドサイドで行うことを目指し、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせた簡便なインフルエンザの POC 遺伝子検査システムの開発を進めている。本年度は分離株のシーケンス配列および既存の遺伝子データベース登録配列を用いて、相同性領域の探索や変異予測を行い、これまで構築した Direct RT-LAMP 法に用いるプライマー等配列の更新の必要性の検討を行った。また、これまで 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整備されていなかったため、primer の設計を行いシーケンス方法の構築を行った。

A. 研究目的

現在、臨床現場でのインフルエンザの診断には、イムノクロマト法を利用した迅速診断キットが広く使用されている。しかし、そのほとんどは A 型、B 型の型別診断しかできず、A 型インフルエンザウイルスの亜型同定はできないものが主流なうえ、検出感度がそれ程高くないために、病初期などは偽陰性となる場合がある。そこで我々は病院や診療所等の臨床現場でのインフルエンザ遺伝子検査を可能とするため、従来の RT-LAMP 法を一部改良し、検体からの核酸精製を必要としない Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、インフルエンザウイルスを型、亜型別に検出できる Point of care (POC) 遺伝子検査システムの開発を進めてきた。昨年度までに A 型インフルエンザウイルス、

A/H1pdm09 亜型、A/H3 亜型、A/H7 亜型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、および C 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法の構築および改良を行ってきた。

本年度は分離株のシーケンス配列および既存の遺伝子データベース登録配列を用いて、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等配列の更新の必要性の検討を行った。また、これまで 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整備されていなかったため、プライマーの設計を行いシーケンス方法の構築を行った。C 型インフルエンザウイルスの遺伝子情報の蓄積により、構築した Direct RT-LAMP 法や real-time PCR 法等の遺伝子検

出法のプライマー等配列の更新に必要な情報の基盤が整備されることが期待される。

B. 研究方法

1. ターゲット遺伝子の相同性および変異の確認

A/H1pdm09 亜型検出系のターゲットである HA 遺伝子のアライメントを、2013/2014、2014/2015 シーズンのアジアおよび日本分離株 1423 株の情報をもとに作成し、検出系のプライマー配列との比較を行った。

2. C 型インフルエンザウイルスの各遺伝子シーケンス方法の構築

これまでデータベースに登録された C 型インフルエンザウイルスの各遺伝子セグメントの配列情報を基にプライマーを設計した。大阪市で分離されたウイルス株 2 株を用いて、設計したプライマーについて検討した。

C. 研究結果

1. A/H1pdm09 亜型検出系に用いるプライマー等配列の更新の必要性の検討

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た。

2. C 型インフルエンザウイルスの遺伝子シーケンス法の構築

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プライマーセットを構築した。それらを用いて 2 株の各セグメントの遺伝子配列の決定を行った。

D. 考察

A/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。一方 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。A/H1pdm09 亜型検出系に用いるプライマー配列と、近年のウイルス株の HA 遺伝子配列との比較を行ったところ、10% 以上の分離株で変異が入っている個所が、検出系 1、2 の両方において 5 塩基ある事が明らかとなった。今後プライマーの更新を行い、近年の分離株を用いて特異性および感度についての検討を行う予定である。

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であった。今回構築したシーケンス法を用い、近年の分離株の全遺伝子配列を決定する事が出来た。その結果を用い解析したところ、構築した Direct RT-LAMP 法に用いているプライマー領域にも変異が無い事が確認された。

E. 結論

Direct RT-LAMP 法による A/H1pdm09 亜型検出系については、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。C 型インフルエンザの各遺伝子のシーケンス法の確立により、遺伝子配列情報の蓄積に資する事が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 204:101-104, 2014.
- 2) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiro Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. *J Virol Methods*. 205C:110-115, 2014.
 - 3) Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Mina Nakauchi, Yoshimasa Takahashi, Taishi Onodera, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Takayuki Matsumura, Manabu Ato, Kazuo Kobayashi, Yoshitaka Shimotai, Katsumi Mizuta, Seiji Hongo, Masato Tashiro, Eri Nobusawa. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. *Journal of Virology*. 88(21):12364-12373, 2014.
 - 4) Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza

A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis*. (in press)

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中内美名, 高山郁代, 大場邦弘, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. RT-LAMP 法を用いた A/H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 2) 高山郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切孝人, 田代真人, 影山 努. 2014 年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

呼吸器感染症ウイルスの核酸検出系の構築

担当責任者 高橋 仁 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官

研究協力者 高山 郁代、中内 美名、影山 努

(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター)

改田 厚、久保 英幸(大阪市立環境科学研究所)

研究要旨 本研究では核酸増幅法として知られている Lamp(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を用いて、インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系を構築し、感染症診断に応用することを目的とする。本年度は検出候補としてヒトパラインフルエンザウイルスを選択し、Lamp 法による検出系の構築を行った。その結果、今回構築を行った Lamp 法を用いたヒトパラインフルエンザウイルス検出系は、高感度にウイルス遺伝子を検出できることが確認された。このことから、今回設計したプライマーセットは呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系として有用であることが示唆された。この検出系をマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと組み合わせることで、感染症診断に使用可能なシステムの構築が期待される。

A. 研究目的

呼吸器感染症の原因となるウイルスとしては、インフルエンザウイルス以外にも多くのウイルスが関与していることが知られている。現在、臨床現場での呼吸器感染症の診断には、迅速診断キットを用いたインフルエンザ診断が行われているが、それ以外のウイルス感染による呼吸器感染症の診断法の開発については発展途上である。様々なウイルス感染による呼吸器感染症の診断が可能となれば、臨床現場において患者への対処方法や薬剤選択の判断に有益な情報となる。そこで、本研究では核酸増幅法として知られている Lamp 法を用いて、インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系を構築し、感染症診断に応用することを目

的とする。

B. 研究方法

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)の各血清型について核酸増幅の標的となる遺伝子を決定した。また、これらの標的遺伝子を Lamp 法により増幅させるプライマーセットの設計を行った。

検出候補としたウイルスの標的遺伝子を陽性コントロールとして作製した。大阪市立環境科学研究所より、候補ウイルス感染患者の検体中のウ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。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、検出感度および特異性の確認を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

各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。

陽性コントロールの作製にあたり、ヒトパラインフルエンザウイルスは RNA ウイルスであるので T7 プロモーター配列を付加した標的遺伝子の RT-PCR を行った。この 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、hPIV1; 2×10^2 、hPIV2; 2×10^2 、hPIV4a; 1×10^2 、hPIV4b; 1×10^2 であった。また、特異性の検討を行ったところ、hPIV1 および hPIV4a のプライマーセットは高濃度の hPIV4b 陽性コントロール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 陽性コントロールに対しても反応性を示した。

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が重要である。このような指標をもとに、今年度は検出候補として、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を選択した。

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高感度に 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。しかしながら、今回設計したプライマーセットは他の血清型の高濃度陽性コントロールに対しても反応性を示しており、特異性を向上させるための更なる改良が必要であると考えられた。

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高感度な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、ヒトパラインフルエンザウイルスの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高感度に 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

- 1) Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Masato Tashiro,

- Tsutomu Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis.* (in press)
- 2) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis.* 14:362, 2014.
- 3) Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Kazuo Ohnishi, Kengo Nishimura, Kazutaka Terahara, Manabu Ato, Sigeyuki Itamura, Tsutomu Kageyama, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin. *PLoS One.* 9(6):e99201, 2014.
- 4) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiro Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. *J Virol Methods.* 205C:110-115, 2014.
- 5) 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.* 204:101-104, 2014.

2. 学会発表

国内会議

- 1) 高山郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切孝人, 田代真人, 影山 努. 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月
- 2) 中内美名, 高山郁代, 大場邦弘, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. RT-LAMP法を用いたA/H7N9亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月

G. 知的所有権の取得状況

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

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

担当責任者 大場 邦弘 公立昭和病院 小児科医長

研究協力者

永井 剛(小平市健康課)

松岡 緑郎(松岡内科クリニック)

小田 智三(公立昭和病院感染症科)

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 (公立昭和病院小児科)

高橋 仁、高山 郁代、中内 美名、影山 努(国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)

研究要旨 インフルエンザウイルスの型・亜型の検出と RS ウイルスの型の検出を同時に行う事ができるマイクロ流路チップおよび POC 遺伝子診断システムの臨床的評価を 2014/2015 シーズンに同意が得られた呼吸器感染症 31 検体を対象に、診療現場である外来の一区画で行った。また、POC 遺伝子診断システムの具体的な有効利用についての検討も行った。POC 遺伝子診断システムを臨床現場に導入することで、一次医療機関であっても精度の高い迅速病原体診断が可能となる。病院においては精度の高い感染制御対策が可能となり、現場に従事するスタッフの業務量を適正化できる。そして、POC 遺伝子診断システムを用いてリアルタイム病原体サーベイランス網を構築することで、新型インフルエンザ等の地域発生早期において、疑い患者を留め置きする時間を最小限にできる。そして細分化された小さい地域で封じ込めを行うことが可能となり、パンデミック時における感染拡大を従来よりも遅らせる、もしくは阻止することができ、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と考えられる。

A. 研究目的

H7N9 や H5N1 亜型等の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が世界で頻発しており、これらのウイルスを起源とする新型インフルエンザの発生が危惧されている。また、中東では中東呼吸器感染症(MERS)が発生し、世界的大流行

(パンデミック)が危惧されている。これらの新興ウイルス性呼吸器感染症の初期症状はインフルエンザ様疾患と類似であり、また、国内での再流行が懸念されている麻疹・風疹を含む多くのウイルス性呼吸器感染症の初期症状とも似ていることから、臨床診断だけで新型インフルエンザ、MERS

等の新興感染症を的確に診断する事はできない。

そこで本年度は、国立感染症研究所で開発されたインフルエンザウイルス、MERS、麻疹、風疹など、新興・再興感染症を含むウイルス性呼吸器感染症を、迅速・簡便で一度に多くの病原体検査を並行してできるマイクロ流路チップを用いた Point of care(POC)遺伝子診断システムの臨床的評価を実施する。

また、POC 遺伝子診断システムを細分化された小さい地域の複数の医療現場で用いる事により、行政による迅速かつ正確な発生動向把握の実現を目的としたリアルタイム病原体サーベイランスシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. POC 遺伝子診断システムによる検査の評価

インフルエンザウイルスの型・亜型の検出と RS ウイルスの型の検出を同時に行う事ができるマイクロ流路チップおよび POC 遺伝子診断システムとリアルタイム 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)により、インフルエンザ A 型、インフルエンザ A/H3 亜型、インフルエンザ A/H1 pdm 2009 亜型、インフルエンザ A/H7 亜型、インフルエンザ B 型、RS ウイルス A 型、RS ウイルス B 型の検出系(イムノクロマト抗原検査では亜型判定なし)についての評価を 2014 年 11 月から 2015 年 2 月までの間、診療現場である外来の一区画で行った。POC 遺伝子診断システムの反応時間は 20 分として検査を実施した。

2. リアルタイム病原体サーベイランスシステムの構築に向けた検討

①当院で先天性風疹症候群が疑われる新生児例が発生したため、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を検討した。

②当院所在市である東京都小平市、小平市医師会、当院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を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は、国立感染症研究所および公立昭和病院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。

C. 研究結果

1. POC 遺伝子診断システムによる検査の評価

2014/2015 シーズンに同意が得られた呼吸器感染症 31 検体(鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、鼻かみ液)を対象とした。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を実施した。その結果、11 例で POC 遺伝子診断システム・リアルタイム RT-PCR 法で共にインフルエンザウイルス A 型が検出されたが、1 例は共に検出できなかった。遺伝子検査でインフルエンザウイルス A 型が検出された 11 例については、H3 亜型が全例で検出された。しかし、その内の 1 例が POC 遺伝子診断システムで H7 亜型も同時に検出されたが、リアルタイム RT-PCR 法では H7 亜型は検出されなかった。イムノクロマト抗原検査で RS ウイルスが検出された 5 例につき、POC 遺伝子診断システムを実施した。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。入院 1 日目にイムノクロマト抗原検査で RS

ウイルスが検出された別の1例の入院2日目の検体を用いてイムノクロマト抗原検査を実施し検出されなかったが、POC 遺伝子診断システムではRSウイルスA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。

2. リアルタイム病原体サーベイランスシステムの構築に向けた検討

①2014年12月に当院で妊娠初期の風疹IgM抗体陽性、HI抗体価高値の母体から産まれた新生児に先天性心疾患を認め、先天性風疹症候群(CRS)が疑われ当院NICU病棟に精査目的で入院した。日本周産期・新生児医学会が2014年1月に作成した先天性風疹症候群診療マニュアルに沿って、患児の風疹IgM抗体検査を外注検査に提出した。その結果が判明するまで児の隔離が必要になるが、NICU病棟の性格上、個室管理が困難なため、ゾーニングを行った。そのことで、元々重症患者に対応するためにスタッフ一人あたりの業務量が多い中、更に標準予防策に加え接触予防策を行うことで業務量が増えたこと、また、スタッフの風疹抗体価を見ながら、その日の担当スタッフを決めることで、スタッフ間の業務に偏りが生じたことから、最終的に現場への負担がかなり増える結果となった。CRSでは生後6か月～1歳までの長期にウイルスが検出されることから、病院内においては血清学的診断よりも患児のウイルス排出の有無の方が重要であることが分かった。しかし現状では、風疹の遺伝子検査ができるのは主に地方衛生研究所であるが、地方衛生研究所が行政検査として行う場合、CRSの診断が確定後のことであり、ウイルス排出の有無が判明するまでに更に日数がかかることとなる。本事例においては、入院か

ら外注検査であるIgM抗体の結果が判明するまでに6日間を要したが、研究の同意を得て国立感染症研究所で行ったリアルタイムRT-PCR法の結果は入院して4日後に陰性と判明し、その時点から、NICU病棟を通常の診療体制に戻すことが出来た。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ることで、病原体の迅速診断が可能となり、不要な感染制御対策を行わずに済むようになる。その結果、臨床現場の業務負担の軽減につながるものと考えられた。

②当院所在市である東京都小平市、小平市医師会、当院が参加して小平市の新型インフルエンザ等対策行動計画を策定するための会議を4回開催した。当院は第二種感染症指定医療機関であるため、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措置を行うこととなっている。また、当院は東京都北多摩北部医療圏唯一の三次救急医療を提供する救急指定病院のため、地域感染期においては、中等症から重症患者については当院が対応し、軽症については各クリニックが個別に対応するのではなく、小平市医師会応急診療所が中心となって日中から準夜帯まで平日・休日問わずに対応する方針となった。その中で、地域発生早期において、行政検査として遺伝子検査を実施すると結果判明までに時間がかかるため、迅速に結果が判明するPOC遺伝子診断システムを第二種感染症指定医療機関である当院に導入することで、結果として、患者の留め置きを必要最小限にできることが分かった。また、地域感染期において、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して得られるリアルタイムサーベイランス結果を所管の東京都多摩小平保健所と共有することで、細分化された地域の流行状況

を把握することができることが分かった。

D. 考察

本年度は、インフルエンザウイルスA型・B型・A/H3 亜型・A/H1pdm2009 亜型・A/H7 亜型、RSウイルス A 型・B 型の呼吸器感染ウイルスを、迅速・簡便で一度に多くの病原体検査を並行してできるマイクロ流路チップを用いた POC 遺伝子診断システムの臨床的評価を行った。検出できたインフルエンザ A 型・H3 亜型に関しては、POC 遺伝子診断システムとリアルタイム RT-PCR 法とで結果が全て一致した。二種類の遺伝子検査で検出できず、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 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り、検体採取自体がうまく出来ていない可能性が考えられた。イムノクロマト抗原検査で RS ウイルスが検出された 5 例に関しても、POC 遺伝子診断システムで全例検出することができ、RS ウイルスの型を判別することも可能であった。入院 1 日目にイムノクロマト抗原検査で RS ウイルスが検出された 1 例の入院 2 日目の検体を用いてイムノクロマト抗原検査、POC 遺伝子診断システムを実施したが、POC 遺伝子診断システムのみで RS ウイルス A 型が検出されたため、イムノクロマト抗原検査の偽陰性が考えられた。POC 遺伝子診断システムの陰性確認のために反応時間が 20 分間必要になるが、各ウイルスの平均検出時間は、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 分であり、POC 遺伝子診断システムは迅速性も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。引き続き、POC 遺伝子診断システムの感度・特異性について検討中である。

また、本年度は、POC 遺伝子診断システムの具体的な有効利用についての検討を行った。病院内の感染制御対策においては、患者からのウイルス排出の有無が重要であり、POC 遺伝子診断システムを臨床現場に導入することで、現場に従事するスタッフの業務量を適正化できると考えられた。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、新型インフルエンザ等の地域発生早期において、POC 遺伝子診断システムを導入した第二種感染症指定医療機関では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し、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行うことが可能となり、パンデミック時における感染拡大を従来よりも遅らせる、もしくは阻止できる可能性があり、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。

E. 結論

国立感染症研究所で新たに開発した POC 遺伝子診断システムを臨床現場に導入することで、一次医療機関であっても精度の高い迅速病原体診断が可能となる。病院においては精度の高い感染制御対策が可能となり、現場に従事するスタッフの業務量を適正化できる。また、POC 遺伝子診断システムを用いてリアルタイム病原体サーベイランス網を構築することで、新型インフルエンザ等の地域発生早期において、第二種

感染症指定医療機関において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を最小限にできる。そして細分化された地域で封じ込めを行うことが可能となり、パンデミック時における感染拡大を従来よりも遅らせる、もしくは阻止することができ、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大場邦弘, 加藤昭生, 古谷智子, 小花奈都子, 林 健太, 村田岳哉, 野田雅裕, 石川涼子, 吉田知広, 野田絵理, 小鍛治雅之, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. インフルエンザ A/H1 pdm09 亜型及び A/H3 亜型感染症による小児の入院診断名の比較. 小児科臨床 68(1):47-51, 2014
- 2) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiro Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. J Virol Methods. 205:110-115, 2014

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中内美名, 高山郁代, 大場邦弘, 高橋 仁, 田代真人, 影山 努. RT-LAMP 法を用いた A/H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 2) 大場邦弘, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 影山努. ARDS から多臓器不全に至ったインフルエンザ A/H1pdm 重症肺炎成人例におけるウイルス学的検討. 第 28 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 鳥取. 2014 年 7 月

G. 知的所有権の取得状況

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