

## 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

担当責任者 駒瀬 勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第三部 第一室室長

**研究要旨** 感染力の強い麻疹を効果的な制御していくには、正確で迅速な検査診断法の確立が求められる。現在の検査診断の標準法は麻疹 IgM EIA 法と RT-PCR 法であるが、結果が得られるまでに数日かかり、またそれぞれに欠点があり必ずしも理想的な検査法とはいえない。RT-LAMP 法は複雑な機器が不要で、目視で遺伝子の増幅を確認できるという利点もあり迅速診断に適している。本年は今後のプライマーの設計に必要な近年分離された麻疹ウイルスの遺伝子を解析し、また、すでに確立されている RT-LAMP 法のプライマーの最近の流行株に対する有効性を確認した。現行の麻疹 RT-LAMP 法のプライマーは遺伝子型 D4, D8, D9, B3, H1, G3 のウイルスにも有効であったが、より迅速性を高めるためにプライマーの改良が必要と思われた。

### A. 研究目的

麻疹は非常に強い感染力をもち、免疫が不十分な人には容易に感染する。また、時として罹患者の 10% 近くが死亡するなど高い病原性を示す事もある。一方、麻疹にはすぐれたワクチンが存在する事から、WHO では天然痘、ポリオについて世界からの根絶/排除を目指している感染症でもある。麻疹の流行を制御するためにはワクチンの接種率を高め、高い抗体保有率を保持するとともに、麻疹を早期に診断し、患者の隔離や患者周囲の感受性者に適切な対策をとる事が求められる。日本における麻疹の検査診断は、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 法による麻疹遺伝子検出検査が併用されている。ともに結果が得られるまで 1 日～3 日程度の時間がかかる。また、IgM 抗体検査は発症初期には抗体が上昇しておらず感度がやや低いという欠

点がある。一方、RT-PCR 法は発症日前後の感度は高いが操作が煩雑であること、また検体の輸送する体制が必ずしも整っていないという問題がある。本研究は蛍光 RT-LAMP 法を用いた麻疹ウイルス遺伝子の迅速診断系を確立し、ベッドサイドで診断できるようにする事を目的としている。さらに発熱、発疹を伴うような呼吸器感染症やインフルエンザ様感染症を包括的に診断できるようなチップへの開発につなげる事も目的としている。

### B. 研究方法

#### 1. 最近の麻疹流行株の遺伝子解析

LAMP 法を開発するには対象とする麻疹ウイルスの遺伝子配列情報を蓄積する必要がある。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、N,P,M,F, H 遺伝子を解析した。

## 2. 最近の流行株を用いた従来法の評価

Fujino らが報告している RT-LAMP 法を用いて、最近の流行株が検出できるかを確認した。ウイルス培養上清から RNA を抽出し、一定の希釈をし、Fujino らの提案したプライマーを用いて RT-LAMP 法を実施した。

### (倫理面への配慮)

臨床材料は疫学研究における倫理指針に基づき個人情報保護等に配慮して行われた。

## C. 研究結果

### 1. 最近の麻疹流行株の遺伝子解析

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。

### 2. 従来の方法の有効性の検証

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  $10^3$  copy/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。

## D. 考察

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。WHO では麻疹の標準的検査法として IgM EIA 法を進めている。日本では平成 25 年に改訂された「麻疹に関する特定感染症予防指針」に麻疹診断には可能な限り IgM EIA 法と RT-PCR 法を併用する事が記載されている。IgM EIA 法と RT-PCR 法は麻疹診断法として実績のあるすぐれた方法であるが、共に検査結果がでるまでに数日かかる事、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)にもクロス反応する事が知られている。また、修飾麻疹では IgM 抗体が十分上昇しない事もある。一方、RT-PCR 法は検査手技がやや煩雑な上、感度がいいので周囲の環境からのクロスコンタミの可能性がある事、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。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ている。日本においては 2006～2008 年の流行では遺伝子型 D5 が主流であったが、2010 年以降、遺伝子型 D5 の検出はなく遺伝子型 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ている。これらは海外から持ち込まれたと考えられるが、これらのウイルスに対する従来の麻疹用 RT-LAMP 法のプライマーについて評価した。すべての遺伝子型のウイルスに有効ではあったが、遺伝子によっては遺伝子の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だと思われた。最近の流行株の遺伝子情報の解析を行ったが、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思われた。

## E. 結論

現在報告されている RT-LAMP 法で現在の流行株のゲノムを増幅し、診断する事が可能であったが遺伝子型によってはやや反応に時間がかかるものがありプライマー、反応条件の改良が必要だと思われた。また、今回使用した麻疹ウイルスの遺伝子解析を行った。これらの情報は今後のプライマーの検討に役に立つと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takuri Takahashi, Yuzo Arima, Hitomi Kinoshita, Kazuhiko Kanou, Takehito Saitoh, Tomimasa Sunagawa, Hiroaki Ito, Atsuhiko Kanayama, Ayako Tabuchi, Kazutoshi Nakashima, Yuichiro Yahata, Takuya Yamagishi, Tamie Sugawara, Yasushi Ohkusa, Tamano Matsui, Satoru Arai, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Kazunori Oishi. Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill Rresponse J.* 16; 5(2):31-3, 2014
- 2) Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *Journal of Virological Methods.* 207:73-77, 2014
- 3) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara,

Toru Kubota, Masaki Anraku, Masako Abe, Noriko Nakajima, Tsuyoshi Sekizuka, Kazuya Shirato, Yuriko Suzaki, Akira Ainai, Yuichiro Nakatsu, Kazuhiko Kanou, Kazuya Nakamura, Tadaki Suzuki, Katsuhiko Komase, Eri Nobusawa, Katsumi Maenaka, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 88:5608-5616, 2014.

- 4) 駒瀬勝啓, 竹田 誠. 海外の麻疹の情報 2013. *病原微生物検出情報* 35(4):97-98, 2014.
- 5) 山岸拓也, 伊東宏明, 八幡裕一郎, 中島一敏, 松井珠乃, 高橋琢理, 木下一美, 砂川富正, 奥野英雄, 多屋馨子, 大石和徳, 駒瀬勝啓, 三崎貴子, 丸山 絢, 大嶋孝弘, 清水英明, 岩瀬耕一, 岡部信彦, 小泉祐子, 平岡麻理子, 瀬戸成子, 杉本徳子, 荷見奈緒美, 熊谷行広, 大塚吾郎, 杉下由行, 甲賀健史, 鈴木理恵子, 阿南弥生子, 舟久保麻理子, 弘光明子, 坂本 洋, 阿部勇治, 氏家無限. 潜在的な疫学リンクが疑われた D8 型ウイルスによる麻疹広域散発事例. *病原微生物検出情報* 35(4):100-102, 2014.
- 6) 古川英臣, 梶山桂子, 宮代 守, 佐藤正雄, 伊藤孝子, 酒井由美子, 井出瑤子, 植山誠, 眞野理恵子, 衣笠有紀, 戸川 温, 高田 徹, 猪狩洋介, 駒瀬勝啓. フィリピン渡航者の D9 型麻疹ウイルスの検出-福岡市. *病原微生物検出情報* 35(5):132, 2014.
- 7) 竹田 誠, 駒瀬勝啓. 輸入麻疹と国内伝播感染症. 44(6):206-217, 2014.

## 2. 学会発表

### 国内会議

- 1) 酒井宏治, 網 康至, 田原舞乃, 久保田耐, 安楽正輝, 中島典子, 関塚剛史, 駒瀬勝啓, 長谷川秀樹, 黒田 誠, 河岡義裕, 田代真人, 竹田 誠. 宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は、インフルエンザウイルスの生体内活性化酵素である. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌. 2014 年 9 月
- 2) 酒井宏治, 關 文緒, 加納和彦, 網 康至, 田原舞乃, 駒瀬勝啓, 前仲勝実, 山口良二, 竹田 誠. 野生型インフルエンザウイルスのヒト SLAM 利用能獲得に必要な変異. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 3) 岡部信彦, 駒瀬勝啓, 砂川富正, 竹田 誠, 多屋馨子, 中野貴司, 蜂谷正彦, 三崎貴子, 吉倉 廣, 渡瀬博敏. 国内の麻疹排除 (measles elimination) 状況に関する考察. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 月
- 4) 多屋馨子, 佐藤 弘, 奥野英雄, 新井 智, 神谷 元, 八幡裕一郎, 伊東宏明, 福住宗久, 砂川富正, 駒瀬勝啓, 竹田 誠, 大石和

徳. 麻疹・風疹に関する最近の国内疫学情報について. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 月

### 国外会議

- 1) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Toru Kubota, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Tsuyoshi Sekizuka, Katsuhiko Komase, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease TMPRSS2 is essential for influenza A virus pathogenicity 13<sup>th</sup> Awaji International forum on infection and immunity, Hyogo, September 2014

## 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

## 新規風疹ウイルス遺伝子検出法の開発

担当責任者 森 嘉生 国立感染症研究所 ウイルス第三部 第二室室長

研究協力者 大槻 紀之 国立感染症研究所 ウイルス第三部 主任研究官

岡本 貴世子 国立感染症研究所 ウイルス第三部 主任研究官

坂田 真史 国立感染症研究所 ウイルス第三部 研究官

**研究要旨** 風疹に関するサーベイランスの質を向上させるためには、迅速且つ簡便な風疹ウイルス検出法の確立が重要であると考えられる。本研究では近年流行している遺伝子型の風疹ウイルスを検出できる RT-LAMP 法を作製した。しかし、やや感度が低いことから、さらに感度を向上させるため、蛍光 RT-LAMP 法の確立を試みている。

### A. 研究目的

風疹は発熱発疹を主徴とする疾患であるが、症状は比較的軽く、他の発熱発疹性疾患と臨床症状のみで鑑別診断することは非常に困難である。世界的に風疹制御ならびに排除の活動が活発化してきており、2012 年世界保健機関総会で採択された世界ワクチン実施計画(Global Vaccine Action Plan)2011-2020 においては、風疹排除を 2020 年までに WHO6 地域のうち 5 地域で達成することが目標に掲げられている。日本においても平成 26 年 4 月より、「風しんに関する特定感染症予防指針」が適用され、早期に先天性風疹症候群の発生をなくすとともに、平成三十二年度までに風疹の排除を達成することが目標として掲げられた。本指針において、風疹サーベイランスの強化が求められており、特に必要性に応じて地方衛生研究所でのウイルス遺伝子検査等の実施を行うことが求められており、このような施設で検査に用いることができる実用性の高い風疹の遺伝子検出法の整備普及が必要とされる。

また、風疹を診断した医師の届出については、可能な限り二十四時間以内に届出を行うことが求められているが、現在風疹の検査診断は、時間のかかる血清中 IgM 抗体検査および遺伝子検出検査が主流であり、一般の医療機関において迅速に検査診断が可能なポイントオブケア検査法が存在しない。このことにより届出が臨床診断のみによって行われる、もしくは検査診断の結果を待って行われることから、届出の質および迅速性に問題が生じる恐れがある。そのため、風疹サーベイランスの質を向上させるためには、医療現場でのポイントオブケア検査の確立が非常に重要である。

RT-LAMP 法は従来の診断法より簡便かつ迅速に操作できる遺伝子検出法であり、地方衛生研究所、保健所等における検査のみならず、病院や診療所等の臨床現場でポイントオブケア検査として導入の可能性が期待される。風疹ウイルス遺伝子検出 RT-LAMP 法としては既に Mori ら(J. Clin. Microbiol., 44:3268-3273, 2006)が発表しているが、現在流行している遺伝子型 2B ウ

ウイルスに対する検出感度が低いことが分かっている。そのため、本研究ではより高感度かつ、世界で流行の認められる遺伝子型のウイルスを検出可能な RT-LAMP 法の確立を試みた。さらにより高感度な検出を行うため、蛍光 RT-LAMP 法についても検討を行った。

## B. 研究方法

現在存在する全ての遺伝子型の風疹ウイルスの検出を行うため、風疹ウイルス内で良く遺伝子配列の保存された領域を探索し、プライマーセットについて PrimerExplorer ソフトウェア (栄研化学) を用いてデザインした。デザインしたプライマーセットを用い、合成 RNA を鋳型にしての検出感度の検討ならびに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。

蛍光 RT-LAMP 法について、栄研化学株式会社との共同研究によってプライマー／蛍光プライマーセットのデザインを行った。デザインしたプライマー／蛍光プライマーセットを用い、合成 RNA を鋳型にしての検出感度の検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

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デザインした。このプライマーセットにより、段階希釈した参照 RNA をどこまで検出できるかを検討したところ、50%検出濃度は 380 コピー／反応であった。

Moriら(2006)の RT-LAMP 法で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ことが明らかになったが、今回開発した方法では、遺伝子型 2C ウイルスを除いて全ての参照株を検出できた(表)。

蛍光 RT-LAMP 法を行うため、新たにプライマー／蛍光プライマーセットを風疹ウイルスゲノムの 5' 末端にデザインを行った。これらのプライマー／蛍光プライマーセットを用いた蛍光 RT-LAMP 法では約 10 コピー／反応まで検出可能であった。

## D. 考察

風疹ウイルス遺伝子の 5' 末端は各株間で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。今回樹立した風疹ウイルス遺伝子検出 RT-LAMP 法では、遺伝子型 2C ウイルスのみ検出できなかったが、本遺伝子型ウイルスは近年世界的に流行が認められず、これが検出できないことは大きな問題にならないと考えられる。しかし、本法は感度がやや低く実用には問題が残る。この結果を踏まえて検討している蛍光 RT-LAMP 法は感度が大幅に改善されていることが示唆されるため、さらに検討を行っていきたい。

## E. 結論

近年流行している遺伝子型の風疹ウイルスを検出できる RT-LAMP 法を作製した。さらに感度を向上させるため、蛍光 RT-LAMP 法の確立を試みている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. Journal of Virological

Methods. 207:73-77, 2014

該当なし

2. 学会発表  
該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

3. その他  
該当なし

表 風疹ウイルス遺伝子検出RT-LAMP法による各遺伝子型ウイルスの検出

株名	遺伝子型	ウイルス濃度 (PFU/反応)		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
RVi/BEL/63[1a]VAC	1a	+	+	-
RVi/Jerusalem.ISR/75[1B]	1B	+	-	-
RVi/Los Angels.USA/91[1C]	1C	+	+	-
RVi/Osaka.JAPN/94	1D	+	-	-
Rvi/Dezhou.CHN/02[1E]	1E	+	+	-
Rvi/Linqing.CHN/00[1F]	1F	+	-	-
Rvi/UGA/20.01[1G]	1G	+	+	-
Rvi/Minsk.BLR/28.05[1H]	1H	+	+	-
Rvi/Milan.ITA/46.92[1I]	1I	+	+	-
Rvi/Miyazaki.JPN/10.01 CRS[1J]	1J	+	-	-
Rvi/Beijing.CHN/80[2A]VAC	2A	+	+	-
Rvi/Telaviv.ISR/68[2B]	2B	+	-	-
Rvi/Moscow.RUS/67[2C]	2C	-	-	-



## MERS ウイルス検出系の開発に関する研究

担当責任者 松山 州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部 第四室室長

**研究要旨** 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る。現在でもアラビア半島全域で月に数十人程度の感染者が見つかり続けており、旅行者を介して日本に侵入しても不思議ではない状況にある。日本国内においてこれまでに数人の旅行者が感染疑い例として検査を受けたが、MERS 陽性になった例は無く、その多くはインフルエンザウイルスに感染していた。このような例を踏まえ、患者検体から呼吸器ウイルスの種類を迅速に判断することは、即座な対応を可能とし、感染拡大を防ぐことに繋がると考えられる。本分担研究では、MERS を含む新興再興呼吸器感染症に対し、臨床の現場(医療機関、保健所、検疫所、地方衛生研究所)において即座に診断ができるような、リアルタイム病原体検出システムの構築を目指す。本年度は MERS コロナウイルスの RT-LAMP 法を開発したので報告する。

### A. 研究目的

中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)はヒトに感染して重症の肺炎を引き起こす。アラビア半島全域で散発的な発生がみられるが、昨年4月には急激に患者数が増加し(1ヶ月に500人以上)、日本国内では2類感染症に指定された。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有ることは、疑いのない事実である。ラクダの出産から哺乳の時期である冬季にラクダの鼻腔や咽頭からウイルスが検出されることが多く、ヒトへはラクダとの接触やラクダミルクを飲むことによって感染する

と考えられている。しかし、ほとんどの感染者はラクダ接触歴が無いこともわかっている。症状の無い感染(不顕性感染)者も多く見つかっており、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が疑われている。

一方、日本においても中東からの帰国者に MERS 疑い例が数人見つかっており、検査の結果その多くはインフルエンザ陽性であった。このようなことから、インフルエンザや他の呼吸器ウイルスと合わせて迅速に病原体を診断できる検査法は有用であると考えられる。

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らによって TaqMan プローブを用いた MERS-CoV 検出法が報告され(Euro Surveill. 7(49), 2012)、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。しかし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。従って、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検出法を開発を行った。

## B. 研究方法

MERS-CoV EMC株(JX869059)の配列を基にPrimer Explorer V4を用いてプライマー設計を行った。RT-LAMP法の6つのプライマーは、ウイルスのNucleocapsid(N) proteinの保存領域に設定された。RT-LAMP反応はLoopamp RNA Amplification Kit および濁度計(LA320-C)を用いて行った。

## C. 研究結果

Primer Explorer V4によりデザインされるRT-LAMP法に適したプライマーセットの候補で試行を行った結果、表1に示すN protein領域のセットが最適であった。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り(図1)、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(表2)。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(表3)。

## D. 考察

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。

## E. 結論

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、upEおよびORF1a領域を標的とするTaqManアッセイに本法を加えることで、MERS-CoVの遺伝子診断の確実化に貢献すると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kazuya Shirato, Takuya Yano, Syouhei Senba, Shigehiro Akachi, Takashi Kobayashi, Takamichi Nishinaka, Tsugunori Notomi, Shutoku Matsuyama. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology* 11:139, 2014.

### 2. 学会発表

#### 国内会議

1) 白戸憲也, 矢野拓弥, 仙波晶平, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道, 納富継宣, 松山州徳. 中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)のRT-LAMP法による検査法の開発. 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

表1 MERS コロナウイルスの RT-LAMP 法のプライマーセット

Primers	Position (EMC, JX869059.2)	Sequence (5' - 3')	Number of matched MERS sequences*
F3	28848-28866	GCTCCCAGGTGGTACTTCT	86/88
B3	29061-29042	cagtccctcaatgtggaag	88/88
FIP (F1c + F2)	28939-28918 + 28872-28890	tcatggacccaacgatgccatACTGGAAGTGGACCCGAAG	77/88 88/88
BIP (B1c + B2)	28956-28977 + 29028-29011	GCTCCTTCAACTTTGGGACGCtagtaccgggcgcgaatt	87/88 83-88
LF	28906-28891	cggaatgggagtgctg	88/88
LB	28978-29000	GGAACCTAACAATGATTCAGCT	85/88

Capital letters indicate the sense strand; lowercase letters indicate the antisense strand.

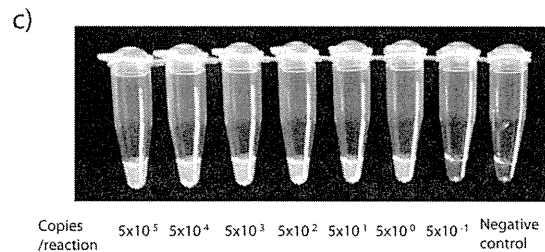
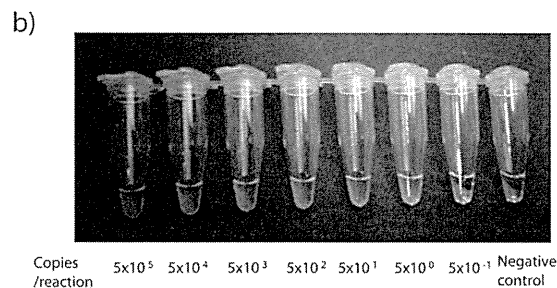
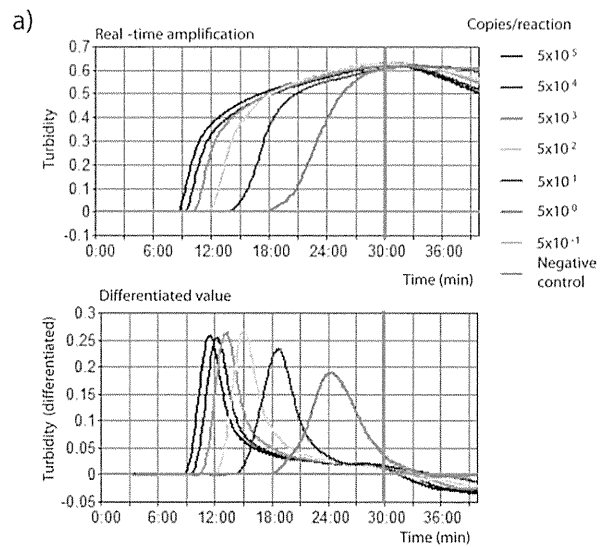


図1. MERS コロナウイルスの RT-LAMP 法の検出感度

表2 MERS コロナウイルスの呼吸器ウイルスに対する交差反応

Virus	Titer/reaction	Results (min)
Coronaviruses		
MERS-CoV (EMC)	$4 \times 10^1$ TCID <sub>50</sub>	14.24
HCoV 229E (VR-740)	$3 \times 10^3$ PFU	> 30
HCoV 229E (Sendai-H/1121/04)	$5 \times 10^3$ PFU	> 30
HCoV NL63	$2.5 \times 10^2$ FFU	> 30
HCoV OC43 (VR-1558)	$1.3 \times 10^3$ TCID <sub>50</sub>	> 30
SARS-CoV (Frankfurt)	$1 \times 10^5$ PFU	> 30
Other Respiratory Viruses		
RSV A (Long)	$1 \times 10^1$ PFU	> 30
RSV A (A2)	$1 \times 10^2$ PFU	> 30
RSV B (18537)	$1 \times 10^2$ PFU	> 30
RSV B (WV/14617/85)	—*	> 30
HMPV (Sendai-H/2404/2003)	—*	> 30
PIV 1 (C-35)	$3 \times 10^4$ PFU	> 30
PIV 3 (C-243)	$5 \times 10^3$ PFU	> 30
ADV 3 (G.B.)	$2.5 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub>	> 30
ADV 4 (RI-67)	$1 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub>	> 30
ADV 7 (Gomen)	$2.5 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub>	> 30
Flu A/California/7/2009 (H1N1pdm)	$8 \times 10^3$ TCID <sub>50</sub>	> 30
Flu A/Victoria/210/2009 (H3N2)	$2.5 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	> 30
Flu B/Brisbane/60/2008	$2.5 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub>	> 30

\*Titer unknown, but was confirmed by PCR.

PFU: plaque forming unit.

FFU: focus forming unit.

TCID50: 50% tissue culture infectious dose.

表3 MERS コロナウイルスの種々ウイルス陽性検体に対する交差反応

Diagnosed pathogen	Results (min)
Positive control	
*MERS-CoV (10 <sup>4</sup> copies)	9.00
Coronaviruses	
HCoV OC43	> 30
HCoV NL63	> 30
HCoV HKU1	> 30
Other Respiratory viruses	
RSV A	> 30
RSV B	> 30
HMPV	> 30
PIV 1	> 30
PIV 2	> 30
PIV 3	> 30
PIV 4	> 30
Rhinovirus	> 30
Bocavirus	> 30
Flu A H1 (Russian)	> 30
Flu A H1 (2009 pdm)	> 30
Flu A H3	> 30
Flu B (Yamagata)	> 30
Flu B (Victoria)	> 30
Flu C	> 30
Measles virus	> 30
Rubella virus	> 30

\*Synthesized RNA obtained from N protein region.

## 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

担当責任者 久保 英幸 大阪市立環境科学研究所 研究主任

研究協力者 改田 厚、入谷 展弘、山元 誠司(大阪市立環境科学研究所)  
高山 郁代、中内 美名、高橋 仁、影山 努  
(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター)

**研究要旨** 呼吸器病原ウイルスの遺伝子を多項目、迅速、簡便および高感度に検出することを可能にするために、現在マイクロ流路チップを組み合わせた LAMP 法装置(LAMP 装置)の開発が進行中である。季節性インフルエンザウイルスが分離された鼻汁希釈液 20 検体について、インフルエンザウイルス遺伝子検出用マイクロ流路チップを用いた LAMP 装置での解析を行った結果、本ウイルスの A および B 型遺伝子の検出陽性率は 95.0 %となり、また、A 型および H3 亜型遺伝子の検出陽性率は 89.5 %となった。大阪市感染症発生動向調査事業に供与された、インフルエンザ様疾患を除く呼吸器由来の臨床検体 220 件について、19 ウイルス(サブタイプ)の呼吸器病原ウイルス遺伝子を検出可能なマルチプレックス・リアルタイム(RT-)PCR 法を用いて解析を行った結果、168 検体から計 228 ウイルス遺伝子が検出された。このうち、検出数の多かった病原ウイルスは、ライノウイルス(75 件)、RS ウイルス(33 件)、パラインフルエンザウイルス 3 型(20 件)、ヒトメタニューモウイルス(17 件)であった。今後、本 LAMP 装置をポイントオブケアとして応用するためには、現行装置の操作性およびインフルエンザウイルス遺伝子の検出感度に関するさらなる検証を行うとともに、ライノウイルスや RS ウイルスなどの呼吸器病原ウイルス遺伝子を検出可能とするマイクロ流路チップを開発する必要があるものと思われた。

### A. 研究目的

呼吸器感染症の病原ウイルスには数多くの種類が存在し、発病初期の臨床症状のみから病原ウイルスを特定することは不可能である。しかし、発病初期の段階で、病原ウイルスに対する適切な処置・治療が可能となれば、完治までの時間短縮が期待できることから、患者の身体的および

経済的負担の軽減をもたらすことが可能となる。現在、数種類の呼吸器病原ウイルスに対するイムノクロマト迅速診断キットが市販されているが、本検査の感度は、PCR 法などの遺伝子検出検査にはおよばない。また、PCR 法は高感度で病原ウイルスの遺伝子が検出可能であるが、結果を得るまでには数時間を要し、さらに高度な検

査技術を要するために、実施可能施設は限定的となっている。現在開発中のマイクロ流路チップを組み合わせた LAMP 法装置(LAMP 装置)は、迅速診断キットと同程度の迅速、簡便性で、かつリアルタイム PCR 法と同程度の感度で、さらに多項目の病原ウイルス遺伝子を検出可能にすることを目的としている。

## B. 研究方法

### 1. LAMP 装置を用いたインフルエンザウイルス遺伝子検出の検討

インフルエンザウイルス A および B 型、さらに A 亜型の H1pdm09、H3 および H7 の各遺伝子を検出可能とするマイクロ流路チップを作製して、LAMP 装置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  $\mu$ l を LAMP 装置専用試薬 120  $\mu$ l と混合した後に、上記マイクロ流路チップに注入して専用ミキサーにて攪拌後、専用 LAMP 機器で 30 分間反応させ、得られた結果を解析して、各遺伝子検出の有無を判定した。

### 2. 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

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、既報に従った(Kaida et al. Jpn J Infect Dis, 67:469-475, 2014)。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた全検体は、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のないことで、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. LAMP 装置を用いたインフルエンザウイルス遺伝子検出の検討

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 AH3 亜型で、1 株のみが B 型(Yamagata 系統)となっている(平成 27 年 2 月 25 日現在)。本検出検査に用いた 20 検体のうち、19 検体は AH3 亜型が分離されたもので、1 検体は B 型が分離されたものであった。AH3 亜型が分離された 19 検体の LAMP 装置での遺伝子検出の結果は、A 型および AH3 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た。以上の結果から、検査した 95.0 % (19/20)の鼻汁希釈液検体において、本 LAMP 装置を用いたインフルエンザウイルスの型別遺伝子検出が可能となった。また、AH3 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(表 1)。

### 2. 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



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(表2)。

ライノウイルスは、検査期間の全月で検出され、特に 4 および 11 月においては、月別検査検体の 50 %以上の検体で検出された(図1)。RSウイルスは、おもに 8 月から 1 月において検出された。パラインフルエンザウイルス 3 型は、5 および 6 月に全検出数の 85.0 % が検出された。ヒトメタニューモウイルスは、4 および 5 月に全検出数の 58.8 % が検出された。また、平成 27 年 1 月においては、診断名がインフルエンザ以外の 3 症例の検体から、インフルエンザウイルス A 型が検出された(表2)。

#### D. 考察

今回、インフルエンザウイルス遺伝子検出用に作製したマイクロ流路チップを組み合わせた LAMP 法装置を用いて、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についての遺伝子検出検査を実施した。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、本装置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 H3 亜型遺伝子が検出された割合は 89.5 % (17/19)であったが、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。このこと

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ことが、LAMP 装置での遺伝子検出陰性結果の理由であることが考えられた。平成 26 年 9 月以降に大阪市で分離陽性となったインフルエンザウイルス AH3 亜型株のうちの 60 株が、鼻汁希釈液検体から分離されている。このうちの 51 株 (85.0 %) は、MDCK 細胞での継代 1 代で分離陽性となったもので、9 株 (15.0 %) は継代 2 代のものであった(平成 27 年 2 月 25 日現在)。今回の LAMP 装置での遺伝子検出検査は、継代 1 代のもの 11 検体、および継代 2 代のもの全 9 検体の、計 20 検体を用いて実施したが、継代 2 代で分離陽性となったうちの 2 検体を除く全検体においては、A 型および H3 亜型遺伝子の検出が可能となった。このことから、本 LAMP 装置を用いた鼻汁希釈液検体での A 型および H3 亜型遺伝子検出に関しては、MDCK 細胞での継代 2 代までにウイルス分離陽性となる検体の場合、すなわち、継代 2 代までに MDCK 細胞に細胞変性効果を示すことが可能なウイルス数が検体中に存在する場合、高確率で検出可能であることが示唆された。今後、AH1pdm09 および B 型が分離された鼻汁希釈液検体についても同様の解析を行い、本 LAMP 装置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ことを確認する必要があるものと思われた。

鼻汁希釈液検体および LAMP 装置専用試薬の混合液をマイクロ流路チップに注入した際、今回の検査に使用した全マイクロ流路チップのほぼすべてのウェルにおいて、気泡の混入が認められた。各検出結果に悪影響をおよぼすほどの気泡の混入は、わずかに認められただけであったが、本装置の改良点として、混合液のチップへの注入操作法を含めて、今後の検討課題であるものと思われた。

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。また、これらの病原ウイルス遺伝子は、検査期間を通して検出されたことから、これらによる感染症発生動向に関しては、常に注意が必要であるものと思われた。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 LAMP 装置を呼吸器病原ウイルス遺伝子の検出法に応用することは、適格であるものと思われた。

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 LAMP 装置を応用することは、有用であることが示唆された。

## E. 結論

MDCK 細胞において、季節性インフルエンザウイルスが分離された鼻汁希釈液 20 検体につ

いて、インフルエンザウイルス遺伝子検出用マイクロ流路チップを用いた LAMP 法装置での解析を行った結果、継代 2 代までに MDCK 細胞に細胞変性効果を示すことが可能なウイルス数が検体中に存在する場合、本 LAMP 装置は、高確率でインフルエンザウイルス遺伝子を検出可能であることが示唆された。また、小児の呼吸器由来臨床検体について、呼吸器病原ウイルス遺伝子に関するマルチプレックス・リアルタイム (RT-) PCR 法での解析を行った結果、おもにライノウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス 3 型、ヒトメタニューモウイルスなどの遺伝子が検出された。今後、本 LAMP 装置をポイントオブケアとして応用するためには、現行装置の操作性およびインフルエンザウイルス遺伝子の検出感度に関するさらなる検証を行うとともに、ライノウイルスや RS ウイルスなどの呼吸器病原ウイルス遺伝子を検出可能とするマイクロ流路チップを開発する必要があるものと思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 改田 厚, 久保英幸, 平井有紀, 山元誠司, 入谷展弘, 長谷 篤, 廣川秀徹. 発疹性感染症のマルチプレックス・リアルタイム PCR. 臨床とウイルス 42(1):56-62, 2014.
- 2) Mina Nakauchi, Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Kunihiro Oba, Hideyuki Kubo, Atsushi Kaida, Masao Tashiro, Tsutomu Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. J Virol Methods 205:110-115, 2014.
- 3) 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 2014 1. Published online October 30, 2014.

4) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Seiji P. Yamamoto, Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Minori Ohyama, Kaoru Goto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyama, Nobuhiro Iritani. Associations between co-detected respiratory viruses in children with acute respiratory infections. Jpn J Infec Dis 67(6):469-475, 2014.

5) 久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 長谷 篤, 西尾孝之. 2013/14 シーズンに大阪市内で分離された季節性インフルエンザウイルス. 大阪市立環科研報告 76:1-6, 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) 久保英幸, 改田 厚, 山元誠司, 入谷展弘. 2013/14 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス AH3 亜型株の性状解析—大阪市. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014年11月

3) 廣川秀徹, 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 坂本徳裕, 松本珠実, 伯井紀隆, 安井典子, 榊田晴美, 藤森良子, 細井舞子, 大平真由, 奥町彰礼, 半羽宏之, 西尾孝之, 吉田英樹, 松本健二, 竹内 敏, 甲田伸一, 吉村高尚. 大阪市の麻しん、および発しん性ウイルス感染症の疫学的検査とその考察. 第38回大阪府医師会医学会総会. 大阪. 2014年11月

### 国外会議

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

## 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

表1. インフルエンザウイルス遺伝子検出用マイクロ流路チップを用いた  
LAMP法装置による遺伝子検出結果

検体番号	MDCK 細胞での分離・同定結果			LAMP 法装置による 遺伝子検出結果
	分離継代数	型・亜型同定結果		
		PCR 法	HI 試験	
OC0953	1	AH3 亜型	ND*	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC0997	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1008	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1130	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1245	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1300	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1362	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1373	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1412	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1413	1	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1355	1	ND	B 型	B 型陽性
OC0897	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1088	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1173	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1174	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1176	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1178	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1189	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性
OC1244	2	AH3 亜型	ND	A 型陽性、H3 亜型陽性
OC1384	2	AH3 亜型	ND	陰性

\*:未実施