

COVID-19 とインフルエンザの同時流行に備えた検査法整備

研究分担者 高山 郁代

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

本研究では、冬季の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）とインフルエンザウイルスの同時流行に備えて、これら 2 ウイルスを同時に検査できる遺伝子検査法の整備を目的とした。今回は、SARS-CoV-2 遺伝子検査法を改変した結果、インフルエンザ型/亜型同定検査法と同一条件で検査を実施できるようになり、検査効率の向上が見込まれた。

A. 研究目的

本年度は、SARS-CoV-2 発生から初めての冬季を迎えることになり、インフルエンザウイルスとの同時流行が懸念されていた。同時流行した場合、適切な治療や隔離を早期に実施するためには、これら 2 ウイルスを同時に検査できる体制が必須と考えられた。SARS-CoV-2 のリアルタイム PCR 法による遺伝子検査法は、インフルエンザウイルスの型/亜型同定検査法と異なるプロトコルで、同時にこれらウイルスの検査を実施することが出来なかった。そのため、本研究で SARS-CoV-2 遺伝子検査法を改変し、インフルエンザ型/亜型同定検査と同一条件で検査を実施できるよう検討を実施した。

B. 研究方法

SARS-CoV-2 病原体検出マニュアルに記載された N 遺伝子に対するリアルタイム PCR 検査法 N2 セットをインフルエンザ診断マニュアルの反応条件に合わせて改変し、検出感度や特異度に問題が見られないか検討を実施した。

具体的には、SARS-CoV-2 遺伝子検査法の反応試薬の種類の変更、1 反応当たりの試薬量のスケールアップ、温度等の反応条件の変更を試みた。検討に使用した検出系は、マニュアルに記載された TAMRA もしくは BHQ をクエンチャー

に持つ 2 種類のプローブならびにリバースプライマーが ver.1 と ver.2 の 2 種類の配列の場合に対し検討した。検出感度の評価は、SARS-CoV-2 N 遺伝子に対する合成 RNA と臨床検体由来のウイルス RNA の 2 種類のテンプレートを使用して実施した。特異度の評価は、インフルエンザ A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B 型インフルエンザウイルスの分離ウイルス由来の RNA を用いて実施した。また、その他の呼吸器感染症を引き起こす A 型および B 型 RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 1、2、3 および 4 型、ヒトボカウイルス、ヒトコロナウイルス NL63、OC43、HKU1 および 229E、ヒトアデノウイルス、ライノウイルスの臨床検体由来のウイルス核酸も特異度の評価に用いた。

（倫理面への配慮）

本研究でウイルス核酸の抽出に使用した臨床検体については、検査系の構築等を目的とした研究に使用することに対して同意を得られたものであり、倫理面での配慮がなされている。

C. 研究結果

病原体検出マニュアルに記載された SARS-CoV-2 リアルタイム PCR 検査法をインフ

ルエンザ型/亜型同定検査法の反応プロトコルに合わせて改変させたところ、検出感度は変化しなかった。また、PCR 増幅曲線の形状はむしろきれいに検出され、Cq 値も全体的に 2 サイクル程度低めに検出され、結果判定がしやすくなった。

特異度の検討では、検討に使用したプレート全てに対して増幅を示さず、改変した検査法でも SARS-CoV-2 特異的な反応性を示した。

最後に、検出系プライマー配列内に変異を持つ SARS-CoV-2 の臨床検体由来 RNA を用いた検討も実施したが、変異の大きな影響は見られず、正しく結果判定できることが確認された。以上の検討結果から、本研究で改変した SARS-CoV-2 遺伝子検査法を用いるとインフルエンザ型/亜型同定検査法と同一プレートで SARS-CoV-2 遺伝子検査を実施することが可能となり、検査効率の向上が見込まれた。

D. E. 考察ならびに結論

本年度は、インフルエンザの流行がほとんど見られず、当初懸念された COVID-19 との同時流行は起こらなかった。しかし、同時流行の可能性はまだ残されており、本研究で整備した SARS-CoV-2 とインフルエンザ型/亜型同定検査法を同一プレートで実施できる方法は有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, Fujisaki S, Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N.

Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza. mSphere. 2021 1, 6(1), e01043-20.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし