

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659118

研究課題名（和文） 迅速遺伝子診断システムの開発とインフルエンザ亜型診断への応用

研究課題名（英文） The Development of a rapid genetic diagnostic system and the application to the definitive diagnosis of influenza subtypes

研究代表者

内藤 暁宏 (NAITO AKIHIRO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：20332372

研究成果の概要（和文）：通常のリアルタイム PCR を用いたインフルエンザ亜型確定診断には 2 時間以上かかるが、本システムを用いることで、実検体を用いても RNA 抽出から測定終了まで、30 分以内に終了した。通常のリアルタイム PCR と比べ、若干の特異性の低下がみられたが、季節性ソ連型、タミフル耐性、季節性香港型を区別できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Usually, it takes longer than two hours for the definitive diagnosis of the subtypes of influenza viruses by conventional real time PCRs. This newly developed system, however, enables to genotype of influenza viruses in clinical samples in less than 30 min. for whole processes starting from RNA extraction. Although the specificity of the system was slightly lower than that of conventional real time PCRs, it is suggested that the new system is able to identify H1N1 or H3N2 and oseltamivir (Tamiflu) susceptible or resistant in the clinical samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査システム、遺伝子診断、新型インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、飛沫、接触で感染し、その感染力は非常に強い。歴史的にも 1918 年のスペイン風邪 (H1N1)、その後、香港風邪

(H3N2)、ソ連風邪 (H1N1) などのパンデミックを起こしており、2009 年春、メキシコで報告されたブタ由来新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) は数ヶ月間で世界的規模のパンデミックを引き起こしている。高病原性ト

リインフルエンザ H5N1 (High Pathogenic Avian Influenza; HPAI) の場合、現在まで日本での発生は見られていないが、致死率が高く、パンデミックが起これば、国内の死者は17~64万人に上ると推定される。そこで、国、地方自治体、企業などは HPAI 対策マニュアル作成などの対策を講じている。HPAI の国内パンデミックを防ぐには、初期の侵入を防ぐ為の水際対策に始まり、水際対策をすり抜けた初期感染者の早期発見、濃厚接触者の感染確認、封じ込めとその効果や感染の終息を確認する為のサーベランスなどの対策を講じる必要がある。また、ここ数年、季節性のインフルエンザにおいても抗インフルエンザ薬タミフル耐性ウイルスが蔓延して来ているばかりか、A/H1N1pdm や HPAI においても不連続変異によりタミフル耐性を獲得する可能性もある。

インフルエンザ診断の現状は、通常、一般の医療機関において、イムノクロマト法を用いた免疫診断にて確定されるが、その感度は低く、また、A 型、B 型のみ判定しか出来ない。今回の A/H1N1pdm の国内侵入阻止、及びパンデミック阻止対策として、当初、HPAI 対策にのっとった措置が取られた。検疫における停留措置に加え、得られた検体は保健所を通し地方の衛生研究所等に搬送され、遺伝子法診断が進められた。遺伝子診断はリアルタイム PCR によるため、確定までに2~3時間を要したうえ、結果がフィードバックされるのに、さらに時間を要した。最終的には、衛生研究所等でも検査のキャパシティを超え、サーベランスは打ち切られた。A/H1N1pdm による死者は、例年の季節性インフルエンザと同程度であったという面での被害は少なかったが、HPAI に対する予行演習という位置づけで考えるならば、対策の改善が必要である。

2. 研究の目的

現行のイムノクロマトを用いたインフルエンザ診断は、感度が低く、また、A 型、B 型のみ判定しか出来ない。しかし、以下の観点から、医療現場等でも、高感度で迅速なインフルエンザの亜型などの確定診断が要求される。

1. 高病原性トリインフルエンザ対策

高病原性トリインフルエンザでパンデミックが起これば、数十万人の死者が発生するとされている。検疫レベルで診断を可能にしなければ、水際でウイルスの

侵入を食い止めることは出来ない。

2. 検疫における停留措置対策

濃厚接触者の感染の有無の診断をするため、感染初期で検出可能としなければならない。検疫で不必要な停留措置は隔離施設の不足、対処不足を招く一方、感染者の見逃しはパンデミックの原因となる。

3. 治療薬の選択

抗インフルエンザ薬タミフルは発症後、48 時間以内に投与が必要である。しかし、季節性ソ連型 (H1N1) や香港型 (H3N2) インフルエンザは、タミフル耐性変異株が蔓延してきており、適切な治療薬を選択する必要がある。しかし、現実には遺伝子変異を診察中に判定することは不可能である。タミフル耐性変異を迅速に判定できれば、診察時間中に治療薬の選択が可能となる。

感度に関しては、リアルタイム PCR を用いれば、初期感染時でも十分検出可能であると考えられる。しかし、一般的な遺伝子診断で使用される通常のリアルタイム PCR の場合、温度制御の限界、即ち、熱源部の温度上昇・下降が律速となり、2~3時間を要し、緊急性を要する診断には適切ではなく、また、抗インフルエンザ薬の選択も診察中に確定することは現状では不可能である。さらに、特殊な装置、実験機器が必要で、一定レベルの生物学的な知識、実験手技が要求されることから遺伝子診断が、医療現場では対処しきれず、衛生研究所等で行われる理由である。

代表者らが TRUST 社 (兵庫県)、およびシンセラ社 (東京) と共同で開発した超高速リアルタイム PCR 装置 UR-104MK4 はコンパクトディスク (CD) 型のサンプル容器 (薄型にすることで熱伝導を良くする) を 120° 毎に異なった温度の固定された熱円板 (Denature, Annealing, Extension) 上で回転させること (図 1) で、PCR の高速化に成功した。

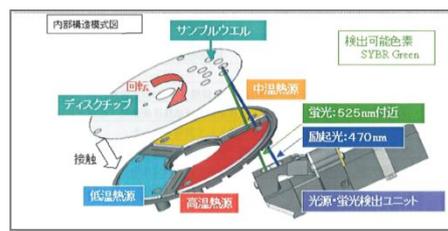


図 1 超高速リアルタイム PCR の原理

本研究は、全行程が 30 分以内に終了するポータブルな高病原性トリインフルエンザ HPAI 迅速遺伝子診断法の開発を目指すとともに、2009 年春よりパンデミックを引き起こしている新型インフルエンザ A/H1N1pdm や、抗インフルエンザ薬・タミフル耐性などの診断への応用を目的とした実用化研究であり、ポータビリティ性を加えることで、空港、ベッドサイドなど場所を選ばずに診断可能なシステムにする点を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の遂行は大きく三つに分けて進めることとし、更に検討項目を記した。

(1) 試薬の至適化

① 試薬、反応条件の至適化

本 PCR 機は、通常の PCR と熱制御方式の違いから、すべての酵素、および、どの PCR 条件にも適用可能なわけではない。特に高速性を謳っている Taq ポリメラーゼでも、この機器では伸長可能な酵素と不可能な酵素がある。

② RNA 抽出法の確定

市販のウイルス RNA 抽出カラム、熱抽出、濾紙抽出、その他で

- 短時間 5 分程度
- 大掛かりな機器を要しない（ポータビリティを持たせる）
- PCR を阻害しない

を満たす抽出法

(2) 実サンプルを用いた検証

モデル系と臨床検体の相違

- PCR の阻害
- バックグラウンド
- 偽陽性、偽陰性

臨床検体（咽頭もしくは鼻腔ぬぐい液）には RNase、細胞、粘液などが含まれている為、RT-PCR の挙動は、モデル系を用いた場合と異なる可能性がある。

(3) 機器のハンディ化

- Well 間の均一性がある
- 再現性がある
- 日間の再現性がある
- その他、診断薬開発・申請に必要な項目

を満たす。

4. 研究成果

(1) 試薬の至適化

① 反応試薬・条件の検討

高速性を謳っている市販の Taq ポリメラーゼ（3 社 9 種類）の検討を行ったところ、2 社 3 種類のポリメラーゼのみ、使用可能であった。このうち、上市、特許などの観点から、1 種類に絞り、至適条件を決定した。

② RNA 抽出法の確定

約 30 分を要する市販のウイルス RNA 抽出キットの各ステップについて、省略可能なステップを検討し、8 分に短縮した。最終的に抽出から検出まで 30 分以内、計 28 分で終了できる系を構築した

Step	Time (min.)
Sample 採取	α
RNA 抽出	8
Sample Apply	5
RT-PCR	15
計	28+α

(2) 病院検体を用いた検討

イムノクロマト法でインフルエンザと判定された臨床検体を用いて検討した。イムノクロマト法に用いた検体の残りから RNA を抽出し、同 PCR にて検討を行った。通常のリアルタイム PCR と比べ、若干の特異性の低下がみられたが、季節性ソ連型、タミフル耐性、季節性香港型を区別できることが示唆された。

A 型患者の亜型・タミフル耐性判定

	M1	H1	Tamiflu
2/12-342	+	-	
2/16-809	ND	+	+
2/19-512	+	+	+
2/23-930	+	+	+
3/8-47	+/-	-	-
3/13-688	+	-	
3/13-786	+	-	
3/21-146	-	+	+

+; >10⁴, +/-; 10⁴~10³, -; 10³> copies/5ul, ND = not determined

通常の遺伝子診断には2時間以上かかるが、本PCRを用いることで、実検体を用いてもRNA抽出から測定終了まで、30分以内に終了したことは、本法の実用化を目指す意義は大きいと考えられた。

また、プライマーの検討を重ね、一桁程度のウイルス粒子数でも検出可能となった。次に、臨床現場において、イムノクロマト法による診断目的で採取され、診断後、保存された26検体を用いて、イムノクロマト法、超高速PCR法、公定法(CDC)にて比較検討を行った。

イムノクロマト法と公定法の一致率は65%であった。イムノクロマト法で陽性と判定された検体16例の内、公定法では9例で陰性と判定された。しかし、公定法で陽性となった検体はイムノクロマト法ではすべて陽性であった。今回、検討に用いたRNAはイムノクロマト法に用いた検体の余剰分から抽出しており、抽出までの過程で細胞残渣、鼻・咽頭粘液中のRNaseから保護されていないため、RNAが分解されている可能性が高く、一致率が低くなったと考えられた。また、イムノクロマト法陽性・公定法陰性の検体の中には、Ct値が完全な陰性コントロールと比して高めの検体もあり、カットオフ値(バックグラウンド値)の設定が一致率を下げる要因の一つであることが考えられた。

一方、イムノクロマト法と超高速PCR法の一致率は73%であった。イムノクロマト法で陽性と判定された検体16例において、超高速PCR法では6例で陰性と判定され、超高速PCR法陽性かつイムノクロマト法陰性となった検体は1例のみであった。

公定法に比して超高速PCR法がイムノクロマト法との一致率が高かった理由は、用いているPCR酵素の違い、および、カットオフ値の設定方法によるものと考えられた。

公定法と超高速PCR法を比較した場合、一致率は85%であった。この結果は、同一RNAを用いているためと考えられた。

最終的な形態が臨床現場などを考えれば、RNAの分解を防ぐことを前提とした検体処理液を用いることが可能となり、検出の精度は上がることが期待できる。その一方、現状ではRNA抽出に遠心機を用いていることから、ベッドサイド、診療現場、検疫などを想定する場合、機器を用いない方法を考案する必要がある。

(3) 機器のハンディ化

サンプルをアプライするWellはCD様のサンプルディスク上に8Wellあり、120°の区画の外周、内周それぞれに4Wellずつ配置されている。リアルタイムPCRによる診断では、検体はDuplicateで行う必要があり、加えて、陽性、陰性コントロールを含めると、8Wellでは測定数が少なく、実用性に乏しい。また、亜型判定、変異、など多項目同時測定は不可能となる。多検体及び多項目同時測定に対応するために120°の区画を3つ配置することで、外周、内周それぞれに4Well \times 3=12Wellずつ全周にわたって配置することが可能となり、理論上、1度に24検体測定できる。しかし、UR-104MK4は各ステップの停留時間を個別に設定できるものの、ディスクの回転は120°ずつ、回転、停止を繰り返す。全周にWellを配置する場合、各ステップの時間を統一しなければならず、また、常時回転する機構が必要となる。

これらの点を考慮し、ハンディ化に移行する前に、24Wellに対応するように機器の改良を進めた。しかし、外周と内周、3つのエリア間で同一標準検体を用いてもWell間の差が大きく、RNA量として4倍以上(Ct値で2以上)の差が生じることから、機器の精度の向上が必須であると判断した。

本法により、臨床検体から、RNA抽出を含め30分以内にインフルエンザ亜型の遺伝子診断が完了可能であることが示され、HPAI対策においても重要な役割を果たし得ることが示唆された。また、インフルエンザ診断以外にも感染症など緊急性を要する遺伝子診断法に応用可能であると考えられる。

一方、RNA抽出は8分以内に完了しているが、遠心機の使用、試薬数、ステップ数が多い点は、臨床現場、検疫等での使用には現状では不向きであり、改良が必要である。また、RNA抽出に特化した検体収集を行い、公定法との比較検討の必要がある。検体も、健常人、retrospective, prospectiveな情報を含めた感染者から採取し、感染状態を加味した偽陰性、偽陽性、カットオフ値の設定を要する。

PCR装置に関してはポータブル化以前に精度のよい多検体に対応できるフォーマットに改良する必要がある。

本研究により得られた成果は、実用化への課題を浮き彫りにした一方、その可能性と意義を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

内藤 暁宏・野村 奈美子・櫻井 陽・南波
玲子・森實 芳仁・芝崎 太 「高速・高感
度インフルエンザ診断法の開発」Cell
Biology Summer Meeting 2010・2010年 7
月 3日・箱根

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 暁宏 (NAITO AKIHIRO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医
科学研究分野・研究員

研究者番号：20332372

(2) 研究分担者

櫻井 陽 (SAKURAI AKIRA)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医
科学研究分野・研究員

研究者番号：40546628

(3) 連携研究者

野村 奈美子 (NOMURA NAMIKO)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医
科学研究分野・研究補助員

研究者番号：50599694