

## 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 5月 15日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591380

研究課題名（和文） C型インフルエンザウイルス感染症の診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of diagnosis of influenza C virus infection

研究代表者

松崎 葉子（MATSUZAKI YOKO）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00292417

研究成果の概要（和文）：C型インフルエンザウイルス感染症の迅速診断に用いる単クローン抗体の作成とリアルタイムPCR法の確立を行った。小児の臨床検体を用いてリアルタイムPCR法とMDCK細胞による分離法とを比較したところ、感度は100%、特異度98.5%、陽性適中率66.7%、陰性適中率100%だった。細胞培養陽性の検体と細胞培養陰性の検体では平均遺伝子コピー数に有意な違いを認め、リアルタイムPCR法がウイルス量の少ない検体でのC型インフルエンザの診断に有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Monoclonal antibodies were produced as the influenza C virus-specific antibodies for rapid diagnosis of influenza C virus infection and the real-time PCR assay for influenza C virus was newly developed. Respiratory specimens from children were examined for the presence of influenza C virus by cell culture and real-time PCR. Taking the cell culture results as the gold standard, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for the real-time PCR were found to be 100%, 98.5%, 66.7% and 100%, respectively. The mean viral load in specimens that were positive by cell culture was significantly high than those in specimens that were negative by cell culture. The real-time PCR assay established here can be used as a sensitive method for diagnosing influenza C virus infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：C型インフルエンザ、迅速診断法

## 1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザは発熱、咳、鼻汁が主

な症状で、38℃以上の熱が2日間続くのが典型的である。A型インフルエンザに比べて有

熱日数は短い、初診時に鑑別することは困難でありウイルス学的診断が望まれる。しかし、現在発売されている迅速診断キットは A 型と B 型の診断しか出来ないため C 型は除外診断にならざるを得ない。細胞培養によるウイルス分離も、A 型や B 型に比べて難しいのが現状である。

## 2. 研究の目的

最終的な目標は、A 型や B 型と同時に C 型インフルエンザウイルスの検出が出来る迅速診断法を確立して臨床現場での診断を助け、抗インフルエンザ薬や抗菌薬の適正な投与を行えるようにすることである。そのために必要な C 型インフルエンザウイルスに対する単クローン抗体を作成すること、もっとも感度が良いとされるリアルタイム PCR を用いた検出法を確立することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

2004 年の山形県での分離株 (C/山形/15/2004) を免疫源としてマウスに免疫し、単クローン抗体の作成を行った。

リアルタイム PCR は TaqMan 法を選択し、C 型インフルエンザウイルスの NP 遺伝子分節にプライマーとプローブを設定して作成した。ウイルスコピー数は、NP 遺伝子全長 (1809 base) を組み込んだプラスミド DNA を *in vitro* transcription して合成した NP 遺伝子の希釈系列より得られた検量線をもとに算出した。

2010 年 1 月から 8 月までの期間に呼吸器感染症の小児から採取した鼻咽頭拭い液 1203 検体について、MDCK 細胞によるウイルス分離とリアルタイム PCR による検出を行い、検出法の評価を行った。さらに、リアルタイム PCR 陽性検体中の感染性粒子数の測定を、発育鶏卵を用いる終末価測定法により行った。

## 4. 研究成果

### (1) 単クローン抗体の作成

C 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する単クローン抗体として、HE 蛋白に対する抗体 7 個と M 蛋白に対する抗体 2 個、NP 蛋白に対する抗体 1 個を得ることができた。

### (2) 臨床検体を用いたリアルタイム PCR 法の評価

小児の臨床検体 1203 検体中、リアルタイム PCR 陽性は 51 検体、ウイルス分離陽性は 34 検体だった。ウイルス分離陽性でリアルタイム PCR 陰性の検体はなかった。したがって、本研究で作成したリアルタイム PCR の分離法と比較した感度は 100%、特異度 98.5%、陽性適中率 66.7%、陰性適中率 100% になった。

### (3) 臨床検体中の C 型インフルエンザウイルスの数と検出成績との関係

リアルタイム PCR 陽性になった 51 検体のうち、細胞培養陽性の検体 (計 34 検体) の平均遺伝子コピー数は  $3.97 \times 10^8$  コピー/ml、細胞培養陰性の検体 (計 17 検体) では  $2.18 \times 10^6$  コピー/ml で、コピー数に有意な違いを認めた ( $P=0.0467$ )。リアルタイム PCR 陽性で細胞培養陰性の 17 検体のうち 15 検体 (88%) が  $10^7$  コピー/ml よりも少ないことから、本研究で確立したリアルタイム PCR 法がウイルス量の少ない検体での C 型インフルエンザの診断に有用であることが示された。

リアルタイム PCR 陽性で細胞培養陰性の検体が本当に陽性であるかどうかを確かめるために、同じ臨床検体を用いて MDCK 細胞よりも感度の良い発育鶏卵羊膜腔での感染性ウイルス粒子数の測定を行った。細胞培養陽性の検体 (計 32 検体) の平均感染性粒子数は  $5.43 \times 10^5$  EID<sub>50</sub>/ml、細胞培養陰性の検体 (計 15 検体) は  $3.67 \times 10^2$  EID<sub>50</sub>/ml だった。 $10^5$  コピー/ml よりも少ない検体では発育鶏卵での増殖も認めなかった。以上の結果から、臨床検体中の C 型インフルエンザの遺伝子コピー数が  $10^7$  コピー/ml 以上有れば細胞培養での分離ができる十分な感染性ウイルスが

あり、 $10^5$ /ml よりも少なければ分離できるだけの感染性ウイルスはなく、 $10^5$  から  $10^7$ /ml の範囲はその中間の感染性ウイルス数になることが判明した。この結果から、コピー数をもとに感染性粒子の数を推測することが可能となり、リアルタイム PCR で C 型インフルエンザの診断を行う際の病原ウイルスかどうかの判定や重症度の推測に貢献できるはずである。

#### 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 9 件)

1. Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S: Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. *J Clin Virol* 54:130-134, 2012. (査読有)
2. Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol* 56(2):139-143, 2012. (査読有)
3. Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y: Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 30(8):680-683, 2011. (査読有)
4. Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Palmitoylation of

CM2 is dispensable to influenza C virus replication. *Virus Res* 157(1):99-105, 2011. (査読有)

5. 板垣勉, 松寄葉子: ヒトメタニューモウイルス感染症の臨床経過とウイルス排出期間の検討. *日本小児科学会雑誌* 115 (4) : 782-787, 2011. (査読有)
6. Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H: Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus. *BMC Infect Dis* 10:170, 2010. (査読有)  
doi:10.1186/1471-2334-10-170
7. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Endemicity of human metapneumovirus subgenogroups A2 and B2 in Yamagata, Japan, between 2004 and 2009. *Microbiol Immunol* 54(10):634-638, 2010. (査読有)
8. Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M: A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virol J* 7(1):53, 2010. (査読有)  
doi:10.1186/1743-422X-7-53
9. 松寄葉子: C 型インフルエンザの臨床的検討. *小児科* 50 (5) : 637-642, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 3 件)

1. Matsuzaki Y, Sugawara K, Shimotai Y, Hongo S, Nobusawa E: Antigenic structure of the hemagglutinin of

pandemic influenza A(H1N1) virus.  
International Union of  
Microbiological Societies 2011  
Congress, Sapporo, Sapporo Convention  
Center; 13 September 2011

2. 松寄葉子, 池田辰也, 青木洋子, 菅原勘  
悦, 下平義隆, 本郷誠治, 安孫子千恵子,  
水田克巳: リアルタイム PCR 法を用いた  
C 型インフルエンザウイルス検出の試み.  
第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山  
形, 山形大学医学部; 2011 年 8 月 18 日
3. 松寄葉子: 地衛研と感染症臨床との連携.  
第 59 回日本感染症学会東日本地方会学  
術集会, 東京, 京王プラザホテル; 2010  
年 10 月 21 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松寄 葉子 (MATSUZAKI YOKO)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00292417