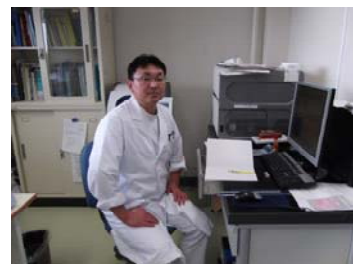


## Real-time PCR 法を用いたインフルエンザウイルス網羅的検出法の確立

### -A 型インフルエンザ遺伝子変異とその対応-

独立行政法人国立病院機構新潟病院 臨床検査科 柳田光利



#### 【研究の背景】

臨床の現場で用いられるインフルエンザウイルス検査法としては、イムノクロマト法を用いた迅速抗原検査キットが POCT(point of care testing)として普及している。キットは年々改良され、A 型と B 型の他にインフルエンザ(H1N1)2009 の亜型測定も可能なキットも開発されている。しかし、その感度および特異度は、必ずしも十分とはいえないのが現状である。

当院では、筋ジストロフィーや神経難病により呼吸機能が低下した患者（人工呼吸器使用者 100 名以上）や重症心身障害児患者などインフルエンザに罹患した場合に重症化や合併症のリスクが高い患者が多数入院しているため、従来から流行期には厳重な感染予防対策を要してきた。2009 年に起きた新型インフルエンザ〔新型豚インフルエンザ A (H1N1)〕のパンデミックの際には、いち早く real-time PCR 検査法を導入し早期診断と感染拡大防止対策を講じた。その時に導入した検査試薬は、当時 Roche 社より発売された新型インフルエンザとその他の A 型季節性インフルエンザの鑑別が可能な遺伝子検査用キットであり高感度測定が可能であった。

その後、2010/11 シーズンにおいては新型インフルエンザの季節外れの大規模流行はみられず、厚生労働省はその取り扱いを季節性インフルエンザに移行した〔現、インフルエンザ (H1N1) 2009〕。

このような状況下で我々は臨床的にインフルエンザ脳症が疑われた 1 小児例を経験した。この症例では、迅速抗原法検査は、A 型 B 型ともに陰性であり遺伝子検査用キットによる検査も陰性であったが、後日、外部機関による遺伝子解析において B 型インフルエンザ感染と判明した。インフルエンザ脳症は重篤な脳障害や死亡の原因となるため、その早期診断は特に小児科領域において重要である。

この経験を踏まえ、我々はインフルエンザウイルスの高感度測定法開発とその院内検査の必要性を再認識し、インフルエンザ A 型の亜型 3 種類〔H1N1、H3N2、(H1N1)2009〕と B

型の計4種類を real-time PCR 法で検出できる検査（この時点で樹立した PCR 検査法を以下従来法と呼ぶ）体制を整備した。

ところが翌 2012/13 シーズンでは、インフルエンザ迅速抗原検査法で A 型陽性検体のほとんどが従来法では陰性を示すという検査結果の乖離現象を経験した。インフルエンザ遺伝子の塩基配列解析を行った結果、H3N2 流行株の Neuraminidase (NA) 遺伝子に生じた変異（塩基置換）が原因で PCR 法が機能しなかったことが判明した。我々は H3N2 ウイルス検出用の primer、probe 等を変更するとともに、今後も生じうるインフルエンザウイルス遺伝子変異（連続変異）に対応するために、A 型ウイルスの各亜型に共通し変異が少ない Matrix 遺伝子（以下 M gene）の測定系を新たに加えた改良法を構築した。しかし、このような体制で迎えた 2013/14 シーズンでは、H3N2 株の測定は正常に機能したものの、(H1N1)2009 流行株において抗原法陽性にも拘らず PCR 法で陰性を示す検体や、陽性であっても M gene の検出核酸量に比べ (H1N1)2009 の検出核酸量が非常に低値を示す検体が多数認められた。塩基配列解析により、この現象の原因は Hemagglutinin (HA) 遺伝子の変異であることが判明し、再度の対応が必要となった。

今回、我々がこれらの連続変異に対応するために行った測定法改良の経緯を報告するとともに、2012/13 シーズン以降に追加した M gene の測定の有用性について述べる。

#### 【対象・方法】

対象は、2009 年 8 月～2014 年 5 月にインフルエンザ様症状を呈し当院を受診した外来患者および同疾患の疑いで発熱した入院患者のうち、インフルエンザの遺伝子検査に同意が得られた患者 1721 例とした。なお、本研究は国立病院機構新潟病院倫理委員会で承認済である（2012 年 11 月 30 日，新潟病院承認番号 No. 110）。

方法は、該当患者から採取した鼻腔あるいは咽頭ぬぐい液等の検体（外来患者は外来受診時、入院患者は発熱時）に対して、抗原法、PCR 法を実施した。抗原法は「クイックナビ™ - Flu」（デンカ生研）を使用した。PCR 法の核酸抽出は MagNa Pure Compact (Roche) と専用試薬の MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) を使用した。PCR 法の装置は LightCycler®480 System II (Roche) を使用し、試薬は Real Time ready RNA Virus Master (Roche) を使用した。PCR 法において 2009/10 から 2011/12 シーズンまでの検体 (599 例) は、新型インフルエンザと他の A 型季節性ウイルスの鑑別用キットを使用していたため、従来法構築後に後方視的に各亜型の同定を行った。2012/13 シーズン (219 例) の H3N2 流行株 (59 例) と 2013/14 シーズン (903 例) の (H1N1) 2009 流行株 (173 例) においてはそれぞれの変異に対応した改良 primer、probe を用いた PCR 法で測定した。また、2012/13 シーズン以降は M gene の測定も行い、各亜型の検出率と比較した。検査結果が乖離した原因を特定するため、2012/13 の H3N2 流行株と 2013/14 シーズンの (H1N1) 2009 流行株においては、両シーズンとも各 3 検体のインフルエンザ遺伝子塩基配列を解析した。

#### 【結果】

2009 年～2014 年 (5 シーズン) の抗原法の結果は、1721 例中 A(+)B(-):568 例 (33.0%)、

A(-)B(+):154例(9.0%)、A(-)B(-):999例(58.0%)であった。PCR法陽性は(H1N1)2009:505例(29.3%)、H3N2:132例(7.7%)、H1N1:0例(0%)、B:190例(11.0%)、混合感染は19例[1.1%(B型と(H1N1)2009:18例、(H1N1)2009とH3N2:1例)]であった。2012/13シーズンにおけるH3N2流行株の陽性は、従来法で1例(0.5%)のみであったが、改良法では59例(26.9%)であった。塩基配列解析によりprobe領域に1ないし2塩基の相違を確認した。2013/14シーズンにおける(H1N1)2009流行株の陽性は、従来法で107例(11.8%)であったが、改良法では173例(19.2%)であった。この173例において、従来法で陰性を示した群(66例)と両方法とも陽性を示した群(106例)について検出核酸量を比較した結果、両方法とも陽性を示した群が有意に高値を示した( $p=0.003$ )。塩基配列解析でFW primerとprobe領域に各々1塩基の変異を確認した。両シーズンの検体において、A型の亜型陽性例は全てM gene陽性であった。

#### 【考察】

毎年のように繰返されるA型インフルエンザの流行は、HA遺伝子、NA遺伝子の点変異(連続変異)により生じる。すなわち、連続変異によりウイルス表面タンパクであるHAやNAのアミノ酸置換が生じて抗原構造を変化(抗原変異)し、ヒトの免疫機構をすりぬけるのである。実際、我々は2012/13シーズンにはH3N2流行株のNA遺伝子に、2013/14シーズンには(H1N1)2009流行株のHA遺伝子にそれぞれ点変異を確認した。

今回我々が経験したように、これらの変異がreal-time PCR法におけるprimerやprobeの位置に生じた場合、検査の感度を著しく低下させて偽陰性を招く可能性がある。

我々はこのような事態に対応するため、A型インフルエンザウイルスの全ての亜型に共通し、変異が少なく塩基配列が高度に保存されているM geneを測定対象に追加した。我々の検討では、M geneは、2012/2013および2013/2014シーズンの変異を伴った流行株においても全て陽性を示した。

インフルエンザウイルス連続変異は今後も毎シーズン起こることが予想されるが、M geneはそれらの流行株においても陽性となることが期待されるため、少なくともA型インフルエンザ感染か否かの判断が可能であり臨床診断上有用と考えた。

#### 【参考文献】

1. 柳田光利, 小澤哲夫, 富沢修一, その他. 新潟病院におけるインフルエンザウイルス検出状況とインフルエンザ(H1N1)2009(H275Y)による医療関連感染について. 新潟県臨床検査技師会誌 2011; 284: 192-96.
2. 柳田光利, 富沢修一, 小澤哲夫, その他. 2012/2013シーズンにおけるインフルエンザウイルスA型流行株に認められたneuraminidase遺伝子変異とインフルエンザウイルスPCR検査法の改良. 臨床病理 2014;62:937-941

## 【感想】

この度は、平成 24・25 年度学術推進プロジェクト研究課題に採択いただき、誠にありがとうございました。審査にあたり、ご尽力いただきました学術推進進化委員会の諸先生ならびに関係各位の皆様へ深く感謝申し上げます。また、第 61 回日本臨床検査医学会学術集会における学術推進プロジェクト研究最終報告会では、「いずれの課題も応分の成果を得た」とのご評価をいただき心よりお礼申し上げます。

最終報告会の冒頭に、座長の出原先生から「今後の本プロジェクト研究は、幅広い分野からの公募を募りたい」とのお話がありました。そして、急に私の名前が挙げられ「現に今回発表の中の最後の演題は、一般病院に勤務する検査技師さんから日常検査業務における研究も含まれています」とご紹介いただきました。私は突然のことで驚いたこともありましたが、それ以上に採択された研究の代表者の中で、私だけが検査技師であったことを知らなかったため、大変恐縮した次第でした。

私達の研究は、2009 年の新型インフルエンザパンデミックに端を発しています。【研究の背景】でも触れましたが、当院にはインフルエンザを発症した場合に重症化や合併症のリスクが高い患者さんが多数入院しているため、当時は富沢修一院長（小児科）の「筋ジストロフィー、神経難病、重度心身障害児（者）病棟や小児慢性、Post-NICU 病棟のハイリスク患者から一人の死亡者も出さない」という号令のもと、職員は一丸となって感染防止対策に取り組み、実際にその目標を達成しました。

パンデミック以降のインフルエンザウイルスは、常に連続変異を繰り返しています。これは、本研究を進める過程で偶然遭遇し、解析の結果明らかとなったものです。私達はインフルエンザウイルス感染症からの感染防止対策の一環とともに、疫学的な流行状況の調査も含めこれからも本研究を継続していく予定です。

最後に、研究課題の一部でありました「ハイリスク患者および脳症患者を主な対象とした臨床的有用性の検討」につきましては、研究期間中に研究の契機となった脳症患者以外のインフルエンザ脳症患者が経験できなかったことも含め、臨床的有用性までの検討に至らなかった点につきましては深くお詫び申し上げますとともに、今後の研究課題としたいと思います。