

インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm09）の検出法の開発と流行株における抗原解析

新開 敬行, 長島 真美, 吉田 勲, 原田 幸子, 尾形 和恵, 長谷川 道弥, 林 志直, 甲斐 明美

Development of Detection Methods of Influenza A/H1N1pdm09 Virus and Antigen Analysis of Pandemic Strains

Takayuki SHINKAI, Mami NAGASHIMA, Isao YOSHIDA, Sachiko HARADA, Kazue OGATA,
Michiya HASEGAWA, Yukinao HAYASHI and Akemi KAI

インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) の検出法の開発と流行株における抗原解析

新開 敬行^a, 長島 真美^a, 吉田 勲^a, 原田 幸子^a, 尾形 和恵^a, 長谷川 道弥^a, 林 志直^a, 甲斐 明美^b

2009年にメキシコ, 北米で発生した新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) が世界中で大流行した. 東京都ではWHOにより公開された遺伝子配列を基に, 都内での流行前にA/H1N1pdm09亜型ウイルスを検出するリアルタイムPCR法とRT-nested PCR法を開発し検査体制を構築した. 2009/2010/2011シーズン中に都内で流行したA/H1N1pdm09亜型ウイルスのHA遺伝子配列の解析を行った結果, 4つの大きなグループに分かれたが, その後, 徐々に少数のグループに収束する傾向が明らかになった.

キーワード: インフルエンザウイルス, リアルタイムPCR法, RT-nested PCR法, A/H1N1pdm09亜型株, 遺伝子解析

はじめに

2009年にメキシコ, ニューヨークで発生した, 新型インフルエンザウイルスは, ブタ, トリ, ヒト型由来の遺伝子を持つことが特徴であり, このようなトリプルリアソータント (遺伝子再集合) ウイルス¹⁾が世界的な流行を起こすのは過去に類を見ない極めて稀なケースであった²⁾. 本ウイルスは世界中で大流行を起こし, 2009年に発生したパンデミックウイルスとして, ウイルス株名にpdm09の名が冠されることとなった³⁾. A/H1N1pdm09亜型ウイルスのHA遺伝子配列は, 発生当初の2009年4月にWHOにより公開され⁴⁾, インターネット上にある遺伝子バンクGISAID (ギゼド) から全世界に向けて提供されたものの, ウイルスの検出方法は当初, 明らかにされていなかった. そのため, 遺伝子配列を基にリアルタイムPCR法を用いた検出法の独自開発を行った⁵⁾. また, すべてのA型インフルエンザウイルスを検出するリアルタイムPCR法の開発も併せて行った.

新たに開発した2つのリアルタイムPCR法に加え, これまでに開発したA/H1N1亜型, A/H3N2亜型, B型検査法 (5項目)^{6,7)}ならびに国からの新型インフルエンザウイルス検査法^{8,9)}を含めた8項目を統合した検査システムを用いることで, 東京感染症アラート検査等における新型インフルエンザウイルス検査対応を行った⁵⁾.

さらに, リアルタイムPCR検査での判定保留例の確認検査を目的として, HA遺伝子配列の増幅を行うRT-nested PCR法用のプライマーを設計し, ウイルス遺伝子増幅の確認に使用するとともに, 増幅産物であるHA遺伝子配列の解析を行い, 2009/2010/2011シーズンにおける新型インフルエンザウイルスA/H1N1pdm09亜型の抗原解析を行ったのでその概要を報告する.

実験方法

1. リアルタイムPCR用プライマー/プローブの設計

WHOにより公開された A/H1N1pdm09 亜型ウイルスである A/California/04/2009 株の HA (ヘマグルチニン) 遺伝子配列⁴⁾を基に, ブタインフルエンザウイルス (A/Hsw/NJ/08/1976) 株の HA 遺伝子配列を参考とし, PrimerExpress2.0 および 3.0 (ライフテクノロジー) を用いてプライマーおよびプローブの開発を行った⁵⁾. A 型インフルエンザウイルスを検出するプライマーとプローブの作成は, A 型の H1~H16 亜型までの NP (核タンパク) 遺伝子配列を米国立生物学情報センター (NCBI) 等の遺伝子バンクから収集し, A/California/04/2009 株の NP 遺伝子配列を交えて Genetyx ver.7.0 (ゼネティックス) を用いた多重アライメント解析を行い, コンセンサス配列を作成した. この配列を用いて PrimerExpress 2.0 および 3.0 を用いて A 型共通検出プライマー/プローブを作成した. これらのプライマー/プローブ (Fig.1) は, プライマーのアニーリング温度を 57°C, プローブのアニーリング温度を 70°C で設計し, ライフテクノロジー社に合成委託して作成した.

2. リアルタイム PCR 法の動作確認

A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの HA 遺伝子検出用プライマー/プローブの動作確認は, ブタインフルエンザウイルス (A/Hsw/NJ/08/1976) 株の抗原液からセパジーン RV-R (三光純薬) を用いて抽出したウイルス RNA 液 5 μL を用いて実施した.

また, A型共通配列の検出用プライマー/プローブの動作確認には, 当センターで保有する6種類のA亜型株 (A/Brisbane/59/2007類似株(H1N1), A/Yokohama/22/2002 (H1N2), A/Uruguay/716/2007類似株(H3N2), A/Vietnam/1194/2004(H5N1), A/Mallard/Netherlands/12/2000(H7N3), A/Hong Kong/2108/2003(H9N2)) の抗原液 100 μLから抽出したウイルスRNA液5 μLを用いて実施した. なお, リアルタイムPCR法の試薬はQuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN),

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

Analysis	Target Gene	Subtype	Primer/Probe Name	Primer/Probe Sequence	Origin
real-time PCR	HA	H1	H1-VAF	5'-CTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAAG-3'	ref.6
			H1-VAR	5'-TGATCTCTTACTTTGGGCTTTTGG-3'	
			H1-MGBVA	5'-FAM-TTCACCCCAGAAAATA-MGB-3'	
		H3	RT-H3-F	5'-TCAAGCATCAGGAAGAATCACA-3'	ref.6
			RT-H3-R	5'-CCGATATTCGGGATTACAGTTTG-3'	
			H3-P2	5'-VIC-TCTCTACCAAAAGRAGCCA-MGB-3'	
		B	RT-B-F210	5'-CAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATC-3'	ref.6
			RT-B-R277	5'-GCCGCAATCTGAGAAACA-3'	
			B-239P	5'-VIC-AATGGAGTAACCACACATT-MGB-3'	
	NA	N1	NA1-681H-F	5'-TGCTGTGTGAACGGKTCATG-3'	ref.6
			NA1-743H-R	5'-GAGGCGGCCCCATTACTC-3'	
			N1-708TP-H	5'-FAM-CATAATGACCGATGGCC-MGB-3'	
		N2	NA2-295-F	5'-ACATTACAGGATTTGCACCTTTT-3'	ref.6
			NA2-351-R	5'-CACCARCGGAAAGYCGAA-3'	
	NP	A	RT-ANP-24F	5'-CTCACYGAGTGACATYVAMRYCATG-3'	This study (Revised October 2009)
			RT-ANP-94R	5'-CAYYRGTYTCCATYTGTYTCRTAAG-3'	
			RT-ANP-24F2	5'-CTCACYGAGTGACATYVAMRYCATG-3'	
			RT-ANP-94R2	5'-CAYYRGTYTCCATYTGTYTCRTAWG-3'	
			A-NP-55	5'-FAM-CAAGGCACCAAACGRT-MGB-3'	
	HA	A/H1pdm09	RT-SW-F	5'-TTGAGCTCWGTGTCATCATTTGA-3'	ref.5
RT-SW-R			5'-TWGGGCCATGAAYTTGYCTT-3'		
Flu-Hsw-P			5'-FAM-AGRTTTGAGATATCCC-MGB-3'		
HA	A/H1pdm09	NIID-swH1-F1	5'-AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT-3'	ref.8 ref.9	
		NIID-swH1-R1	5'-TGTTCCACAATGTARGACCAT-3'		
		NIID-swH1-Probe2	5'-FAM-CAGCCAGCAATRTTRCATTTACC-MGB-3'		
RT-PCR/ RT-nested PCR	HA	A/H1pdm09	SW-1-F	5'-GARAGRTTTGAGATATCCCCA-3'	This study
			SW-1-R	5'-GCATATCTYGGTACCCTAGAT-3'	
	HA	A/H1pdm09	SW-2-F	5'-AAGRCAARTTCATGGCCCAA-3'	This study
			SW-2-R	5'-TCCAGTTGCTTCGAATGTTAT-3'	
	HA	A/H1pdm09	NIID-SWHI-Conv-F1	5'-TGCATTTGGGTAATGTAACATTG-3'	ref.8 ref.9
			NIID-SWHI-Conv-R1	5'-AATGTAGGATTTCTGAKCTTTGG-3'	

Fig.1 Primer and probe sequences used to examine the novel influenza virus

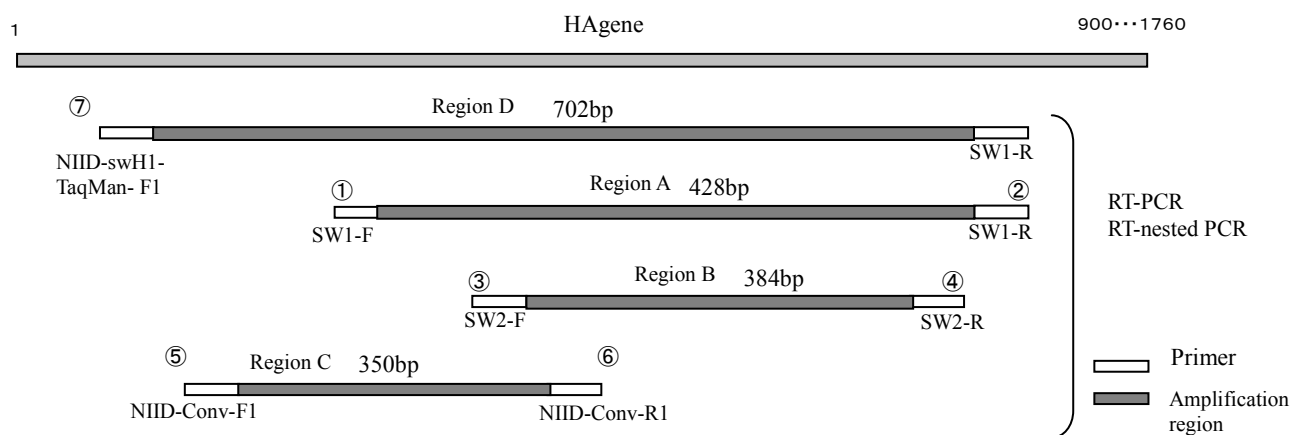


Fig.2 Genetic map of the RT-nested PCR amplification regions and primer positions in the HA gene of A/H1N1pdm09 influenza virus

検査機器は ABI 7900HT (ライフテクノロジー) を用い、50°C40 分、95°C15 分の反応後に 94°C15 秒、57°C75 秒のサイクルを 45 回繰り返す反応条件で実施した。また、国の検査法^{8,9)}と同時に検査を実施する必要が生じたため、反応条件を合わせる目的でアニーリング温度を 54°C に設定した場合についても動作確認を行った。

3. RT-PCR 法による遺伝子検査

1) プライマー設計

A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの RT-nested PCR 法を開発した。新たに設計した RT-PCR 法用プライマー (SW-1-F, R : Fig.2①, ②) は HA 遺伝子上の 385-812 塩基長 (428 塩基) の領域 A を増幅し (Fig.2), nested PCR 法用プライ

マー (SW-2-F, R : Fig.2③, ④) は内側の 406-789 塩基長 (384 塩基) の領域 B を増幅するように設計した。

2) プライマー選択による増幅領域の拡充

より長い遺伝子領域を増幅および解析するために, A/H1N1pdm09 亜型ウイルス検査用プライマーを遺伝子地図上で比較し, 上流側のリアルタイム PCR 法用プライマー (NIID-swH1-TaqMan-F1 : Fig.2⑦) と下流側の RT-PCR 法用プライマー (SW-1-R : Fig.2②) を用いて増幅を試みた。NIID-swH1-TaqMan-F1 プライマーと SW-1-R プライマーとの組み合わせでは, 702 塩基長の領域 D (Fig.2) の増幅が期待でき, One-Step RT-PCR (QIAGEN) 試薬を用いて 56°C30 秒, 50°C40 分, 95°C15 分の加熱の後, 94°C30 秒, 51°C30 秒, 72°C40 秒のサイクルを 45 回繰り返す条件で増幅を行った。

さらに, 国の推奨する RT-PCR 法用プライマー (NIID-Conv-F1, R1 : Fig.2⑤, ⑥) を 2 段階目の増幅用として, 3-1) に示した方法とともに, 2 つ目の nested PCR 法による増幅領域を得られるように考案した (Fig.2)。nested PCR 法による増幅条件は, 耐熱性ポリメラーゼ酵素に TaKaRa Ex Taq を用いて, 94°C3 分の加熱の後, 94°C1 分, 54°C (領域 B) または 50°C (領域 C) で 1 分の加熱, 72°C2 分のサイクルを 35 回繰り返して増幅を行った。

4. 臨床検体からの検出

開発したリアルタイム PCR 法および RT-nested PCR 法を用いて, 2009 年度の東京感染症アラート検査とクラスターサーベイランス検査で搬入された 1,655 件, 感染症発生動向調査では 1,887 件の新型インフルエンザ検査を行った。対象検体は咽頭ぬぐい液であり, QIAampViral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し検査を実施した。

5. HA 遺伝子の抗原解析と検出産物の検証

2009/2010/2011 シーズン中にリアルタイム PCR 法による検査で, A/H1N1pdm09 亜型ウイルスが陽性となった検体および判定保留となった検体のうちの 239 件について, RT-PCR 法または RT-nested PCR 法により得られた HA 遺伝子の一部断片 (領域 B+C, D : 540bp) を ABI 3130 ジェネティックアナライザー (ライフテクノロジー) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。遺伝子解析ソフトである Genetyx ver.7.0 (ゼネティックス) および MEGA4 (メガソフト) を用いてアミノ酸配列に置換して多重アライメント実行後, ワクチン株と検出株および兵庫・大阪地域の流行株の配列データを加え, 近隣結合 (neighbor-joining) 法による系統樹を作成し抗原性の解析を行った。

結果及び考察

1. リアルタイム PCR 用プライマー/プローブの設計および動作確認

A/H1N1pdm09 亜型株の検出法は, 他のインフルエンザウイルス感染症を含めた症例も対象とした 8 項目のスクリ

ーニング検査システムとして構築した。テンプレートモデルとした A/California/04/2009 株と A/Wisconsin/87/2005 (H1N1) 株は, HA, NA, NP, M, NS 遺伝子がブタ由来のインフルエンザウイルス, PB1 遺伝子がヒト由来, PA, PB2 遺伝子がトリ由来で, 3 種類の動物由来インフルエンザウイルス遺伝子が再集合 (リアソータント) したウイルス株である。抗原性を規定する HA 遺伝子がブタ由来であったことから当初はブタインフルエンザウイルスとして扱われた。開発したリアルタイム PCR 法のプライマー/プローブは, A/California/04/2009 株のみならず, A/Hsw/NJ/1976 (H1N1) 株等のブタインフルエンザウイルス HA 遺伝子配列についても確実に検出できるように配列を設計し, 当センターで保有していた A/Hsw/NJ/08/1976 株から抽出した RNA を使用して実際に確認することで (Fig.3), 新型インフルエンザウイルスの遺伝子検出の信頼性を飛躍的に高めることが出来た。

また, 新たに設計した A 型共通配列を検出するプライマー/プローブの動作確認を目的として, 当センターで保有している A 型 6 種類の各亜型 RNA を使用した。その結果, 元の抗原液の濃度調整を行っていなかったため抽出された RNA 量にばらつきがあったものの, リアルタイム PCR 法による検出では, 19 サイクルから 23 サイクルまでの比較的早いサイクルで, 全ての A 亜型の RNA が検出さ

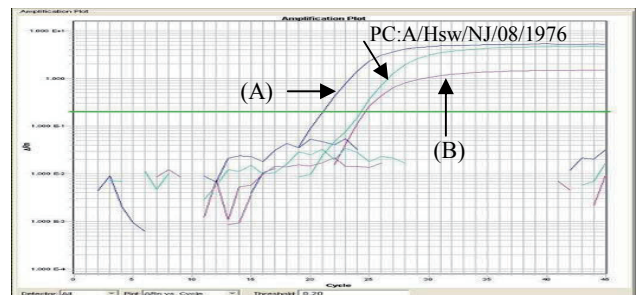


Fig.3 Real-time PCR to detect the HA gene of influenza A/H1N1pdm09 virus

(A): Using the primers and probe indicated by reference 5).

(B): Using the primers and probe indicated by reference 8) and 9)

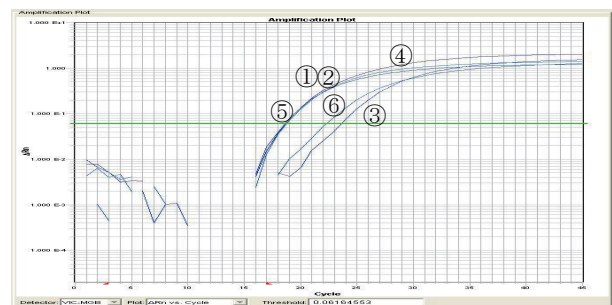


Fig.4 Real-time PCR to detect common sequence of the NP gene of influenza A virus

①:A/Brisbane/59/2007 類似株(H1N1), ②:A/Yokohama/22/2002 (H1N2)

③:A/Uruguay/716/2007 類似株(H3N2), ④:A/Vietnam/1194/2004(H5N1),

⑤:A/Mallard/Netherlands/12/2000(H7N3), ⑥:A/Hongkong/2108/2003(H9N2)

れたことから、A型インフルエンザウイルスすべての検出が確実に進むことが推察された (Fig. 4)。この結果から、新型インフルエンザウイルスの検出においても、結果判定上の重要な検査項目の一つとなった。

しかし、A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの都内での感染が拡大し¹⁰⁾、多くの患者が輩出された 2009 年 9 月以降には、A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの検出に際し、A 型共通配列の検出用リアルタイム PCR 法での検出サイクルが、従来より 6 サイクル程遅れる傾向が認められるようになった (Fig.5A)。このことから NP 遺伝子の変異を原因として疑い、増幅領域の塩基配列の確認を行ったところ、NP 遺伝子の 40 番目の塩基が A (アデニン) または C (シトシン) から G (グワニン) に変異し、72 番目が A から T (チミン) に変異した株が優勢となっていることが判明した。そこで、2009 年 9 月下旬にプライマー (RT-ANP-24F, RT-ANP-94R) の再検討を行い、A/H1N1pdm09 亜型に対する検出性を維持するべく上流側プライマーの 17 番目 (NP 遺伝子の 40 番目に相当) を M→V、下流側プライマーの 23 番目 (NP 遺伝子の 72 番目に相当) を A→W に修正し (RT-ANP-24F2, RT-ANP-94R2)、再度 A/H1N1pdm09 亜型株の検出確認を行った。その結果、検出サイクルの遅れは解消され (Fig.5B)、2009 年 10 月から改訂した検査法で検査を実施した。

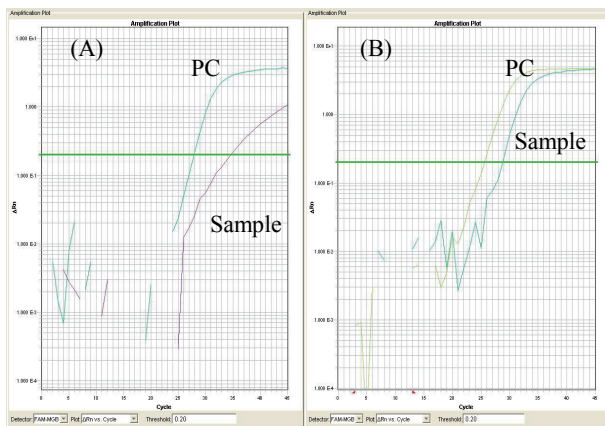


Fig.5 Real-time PCR common sequence of the influenza A virus NP gene was performed before (A) and after (B) the revision of the primer

国の検査法^{8,9)}にも M 遺伝子を対象とした A 型すべてを検出する方法が推奨されているが、M 遺伝子は NP 遺伝子よりも変異を生じやすい上、同じ試料を用いた検出比較では、都の方法の検出感度が高かった。しかしながら、我々の開発した NP 遺伝子検出系もブタ由来、ヒト由来、トリ由来等、標的としている A 亜型が多様であるので、他の遺伝子検出系と同様に定期的な見直しや改良をこまめに行っていく必要がある。

リアルタイム PCR 法での検査を行うに当たって、これまでに開発した季節性インフルエンザ用プライマー/プローブは、57°C/70°C のアニーリング温度で使用していた。

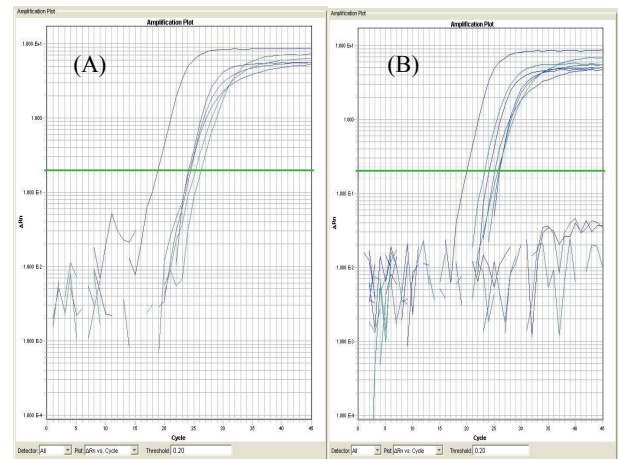


Fig. 6 Influenza virus genes were detected by real-time PCR at the annealing temperature 57°C(A) and 54°C(B)

しかし、国の推奨方法^{9,10)}によるアニーリング至適温度は 54°C であったため、国の方法との同時並行での検出を行う必要性から 54°C での動作確認を行った結果、57°C での検出と遜色なく動作することが判明した (Fig.6)。そのため、東京感染症アラート検査を始めとした A/H1N1pdm09 亜型ウイルスのリアルタイム PCR 法を用いた検査では、すべて 54°C のアニーリング温度を使用して行った。

2. RT-nested PCR 法による遺伝子検査

国のマニュアル⁸⁾に掲載されている RT-PCR 法は、リアルタイム PCR 法と比較して検出感度が低く、低ウイルス量検体からの遺伝子検出での使用には適していない。このため、リアルタイム PCR 法により検出または判定が保留された検体中のウイルス遺伝子の確認や検出には、遺伝子の解析が可能でより高感度な RT-nested PCR 法を用いるのが有効であると考えた。

今回開発したプライマーと国のプライマー (SW1-R : Fig.2②, NIID-swH1- TaqMan-F1 : Fig.2⑦) を用いた RT-PCR 法による HA 遺伝子の増幅領域 D (Fig.2) は 702 塩基長あり、国の RT-PCR 法による増幅領域 C の 2 倍長いのが特徴である。さらに、この領域内に 2 つの異なる nested PCR 増幅領域 B (384bp)、C (350bp) (Fig.2, 7) を確保したことで、検出および確認手段としての遺伝子検出法を整備することが出来た。

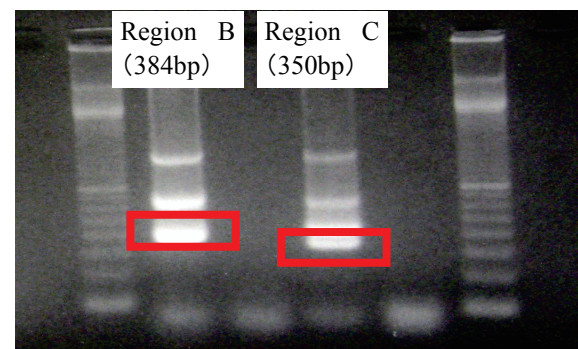


Fig. 7 Electrophoretic profile of the two regions of influenza virus HA gene were amplified by RT-nested PCR method.

2 つの nested PCR 法により増幅される領域 B, C (Fig.2) は一部が重複しているため, 増幅した遺伝子の塩基配列を解析する際には, 重複した部分の配列で接合し, 連続した塩基配列 (590 塩基) を得られる利点がある.

2009 年度の東京感染症アラート検査およびクラスターサーベイランスで 1,665 件の検体が搬入され, その内 1,010 件 (61.0%) の A/H1N1pdm09 亜型陽性をリアルタイム PCR 法等により検出した (Fig.8A). また, 感染症発生动向調査では 1,885 件の検体が搬入され, 1,559 件 (82.6%) の A/H1N1pdm09 亜型陽性を検出した (Fig.8B). これらの中で国のリアルタイム PCR 法では不検出で, 都の方法では陽性であったことから判定保留とされた疑い例 26 件のうち, 16 件が RT-PCR 法または RT-nested PCR 法により陽性と確認された. このことより RT-PCR 法または RT-nested PCR 法による検出と解析は迅速性には欠けるが確実性が高く, 感染初期検体や, 微量ウイルス検体等からの遺伝子検出には有効な検査法であることが明らかとなった.

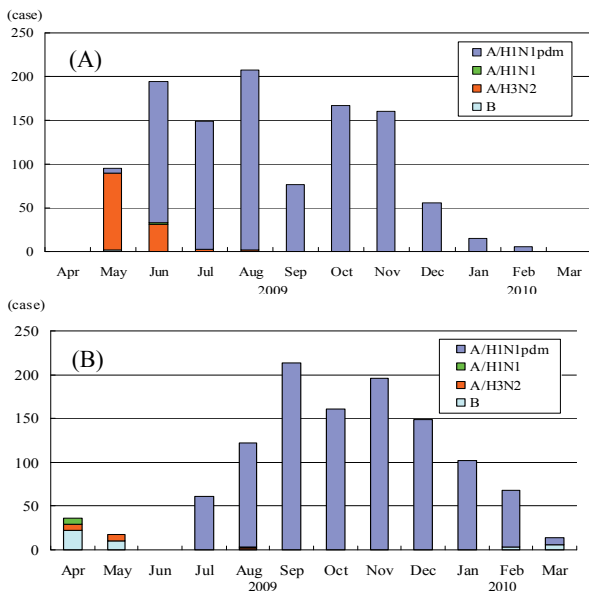


Fig.8 Detection of influenza cases in fiscal year 2009

(A): infection alert and clusters surveillance in Tokyo
(B): Infectious Diseases Surveillance

3. A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの HA 抗原解析

2009 年 5 月から流行が始まった A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの HA 抗原変異について, HA 遺伝子 (540 塩基) のアミノ酸配列 (180 アミノ酸) での分子系統樹解析を行った結果, A/H1N1pdm09 亜型の都内流行株は, A/California/07/2009 株を含むグループ以外にさらに 3 つのグループ (計 4 つ) に分かれている事が判明した (Fig.9).

都内での新型インフルエンザ発生第 1 例 (A/Tokyo/09-2057/2009) の海外帰国者から検出されたウイルスは Group 2 に, 国内最初の流行地となった兵庫・大阪地域への旅行者から検出された都内第 2 例 (A/Tokyo/09-

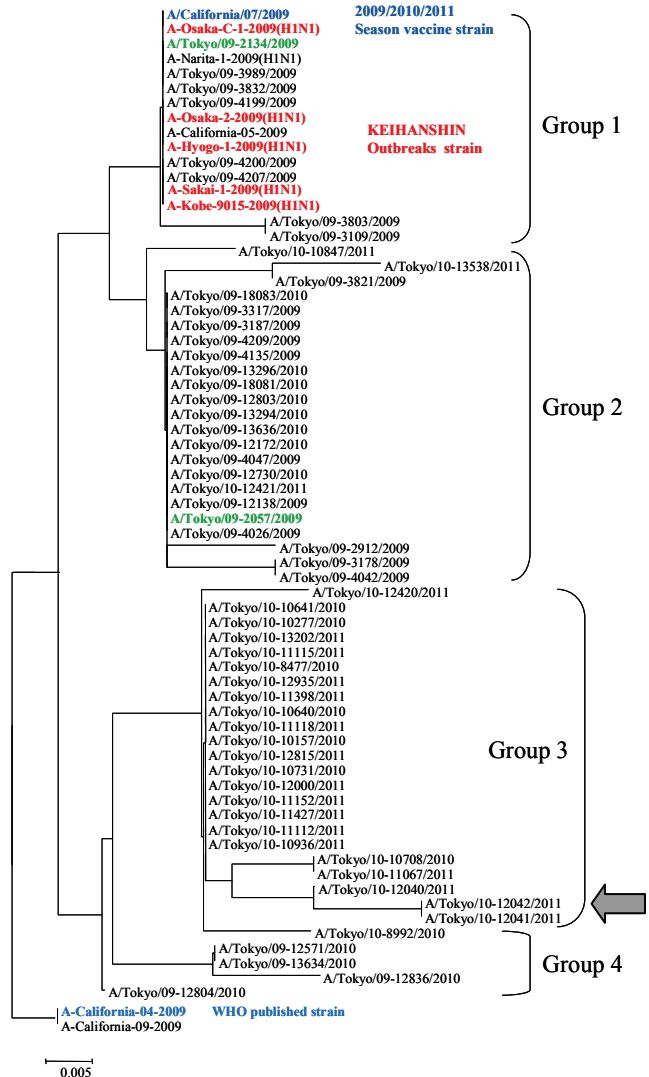


Fig.9 Phylogenetic tree of HA amino acid sequence of influenza A/H1N1pdm09 viruses in 2009/2010/2011 seasons

The tree is constructed by using the neighbor-joining method.
A/Tokyo/09-2057/2009: First pandemic influenza case in TOKYO
A/Tokyo/09-2134/2009: Second pandemic influenza case in TOKYO

2134/2009) のウイルスは Group 1 に属しており (Fig.9), 発生当初はこれら 2 つのグループに属するウイルスが混合流行していたと思われる. しかし, Group 1 は 2009 年の流行途中から消失し, その後, このグループに属するウイルスは一切見つかっていない. また, Group 2 の新しい検出例は数例に留まり, 2010/2011 シーズンは Group 3 に含まれる流行株がほとんどを占めていたことが判明した. 一方, Group 4 は例数が少なく, 限られた株のみが該当し, 新しい検出例も認められなかった.

2011 年現在, 国内で活発な発生が見られるのは, 主として Group 3 に属するウイルスであり, わずかに Group 2 に属するウイルスも見られている. また, いまだ特定のグループに固定化されていないが, Group3 内で細分化していた小グループが収束してきており (Fig.9 矢印), 一部の系

統株に特化する方向で変異が進行していることが推察され、遺伝子学的な変異の方向性が絞られて来たと考えられる。

2009/2010/2011 年シーズンの流行株とワクチン株とのアミノ酸配列 (180 アミノ酸) を比較解析した結果, 1 株あたり 1~12 個のアミノ酸が異なっていた。2009/2010 シーズンの株では平均 2.4 個のアミノ酸が変異していたが, 2010/2011 シーズンの株では平均 4.8 個と 2 倍になっていた。S185T, A197T, S203T 等のアミノ酸変異により赤血球凝集性の低下した株が出現する等¹¹⁾, 血清学的にはウイルスを同定する際の障害となるような抗原性の変異の進行が危惧されている¹¹⁾。一方で, リアルタイム PCR 法等の遺伝子検出を困難にさせる変異の兆候は未だ確認されていない。

2011/2012 年シーズンに WHO が推奨する A/H1 型ワクチン株は, 引き続き A/California/07/2009 株であり³⁾, 今後もワクチン株類似の流行株で様々な抗原変異の発生が予想されることから, 季節性ウイルスの一つとなった今後も A/H1 亜型の抗原変異の動向に十分注意する必要がある。

ま と め

・ 新型インフルエンザ検査に対応したリアルタイムPCR法およびRT-nested PCR法を開発した。

・ A型共通配列を検出するプライマー, プロブは, センターで保有している6種類のA型インフルエンザウイルスから抽出したRNAを全て検出した。

・ RT-nested PCR法による遺伝子検査は, リアルタイムPCR法により判定保留となった検体の確認に使用することができた。また, RT-PCR, RT-nested PCR法による遺伝子増幅産物は, 遺伝子配列を決定し抗原解析や系統樹解析に利用することが出来た。

・ HA 遺伝子の抗原解析によって都内で発生した A/H1N1pdm09 亜型のウイルスは変異を繰り返し, 系統樹上では4つのグループに分かれていたが, 収束しつつあることが判明した。

文 献

- 1) Alexandra P.N., Erik R., Jeanne B., Timothy M. U., et al, *Emerg. Infect. Dis.*, **14**(9), 1470-1472, 2008
- 2) Influenza-like illness in the United States and Mexico, Global Alert and Response (GAR), 24 April 2009, WHO

http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html

(2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

- 3) Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011-2012 northern hemisphere influenza season, http://www.who.int/influenza/vaccines/2011_02_recommendation.pdf (2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 4) Viral gene sequences to assist update diagnostics for swine influenza A(H1N1), 25 April 2009, WHO, http://www.who.int/csr/disease/swineflu/swineflu_sequences_labs_20090425.pdf (2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) 甲斐 明美, 新開 敬行, 長島 真美, 他: 東京健安研セ年報, **61**, 15-38, 2010
- 6) 貞升 健志, 新開 敬行, 長島 真美, 他: 東京健安研セ年報, **57**, 59-64, 2006
- 7) Shimada S, Sadamasu K, Shinkai T, et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*; **59**(1), 67-68, 2006
- 8) 病原体検出マニュアルH1N1新型インフルエンザ (2009年5月 ver.1, 11月 ver.2) .
- 9) WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009virus in humans - revised, http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/HO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf (2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 2009/2010年シーズンの東京都におけるインフルエンザウイルス流行状況, 東京都微生物検査情報, **31**(8), 2010 <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/2010/tbkj3108.html> (2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 11) 小淵正次, 堀元栄詞, 小原真弓, 他: 2010/11 シーズンに急増した赤血球凝集性が低いインフルエンザ A(H1N1)2009 ウイルス分離株—富山県 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/rapid/pr3771.html> (2011年07月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

Development of Detection Methods of Influenza A/H1N1pdm09 Virus and Antigen Analysis of Pandemic Strains

Takayuki SHINKAI^a, Mami NAGASHIMA^a, Isao YOSHIDA^a, Sachiko HARADA^a, Kazue OGATA^a,
Michiya HASEGAWA^a, Yukinao HAYASHI^a and Akemi KAI^a

A novel influenza virus was detected in 2009 in North America and Mexico. This virus spread rapidly and widely throughout the world. Viral gene sequences were published by the World Health Organization (WHO) just after the pandemic virus was detected. However, the gene detection methods were not reported. Consequently, we developed RT-nested PCR and real-time PCR-methods based on the gene sequence. In addition, we analyzed the hemagglutinin (HA) gene sequences of the influenza A/H1N1pdm09 virus. The clusters of influenza viruses in 2009/2010/2011 seasons in Tokyo were classified into 4 groups. We observed a tendency toward convergence between the groups.

Keywords: influenza virus, real-time PCR, RT-nested PCR, A/H1N1pdm09, genetic analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan