

高病原性鳥インフルエンザ診断のための遺伝子検査システムの確立

貞 升 健 志*, 新 開 敬 行*, 長 島 真 美*, 吉 田 靖 子*, 山 田 澄 夫**

Establishment of Genetic Diagnostic system for Highly Pathogenic Avian Influenza

Kenji SADAMASU*, Takayuki SHINKAI*, Mami NAGASHIMA*, Yasuko YOSHIDA* and Sumio YAMADA**

Keywords : 高病原性鳥インフルエンザ highly pathogenic avian influenza, リアルタイム PCR Real-time PCR, ネステッド (二段階) PCR Nested-PCR, 感染症アラート infectious diseases Alert

緒 言

こオルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスはA, B, C型の三種類に分類され, A型インフルエンザウイルスはさらに Hemagglutinin(HA) 型で16種類, Neuraminidase(NA)型で9種類に分類される¹⁾. ヒトに通常感染するA型インフルエンザウイルスはH1N1, H3N2型であるのに対し, カモ等の水禽類にはすべての種類のA型インフルエンザウイルスが感染する. 水禽類由来のインフルエンザウイルスを鳥インフルエンザウイルスと称し, その中でも, ニワトリ等に高致死性があるウイルスを高病原性鳥インフルエンザウイルス, それ以外を低病原性インフルエンザウイルスとし区別している.

高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1型は, 1997年に香港で家禽を中心に発生し, ヒトにおいても18例の感染者(死者6例)が報告された. ヒト感染例で重篤な多臓器不全に至る例が認められたことから, H5N1型インフルエンザは極めて重要な人獣共通感染症として認識された. H5N1型ウイルスは, その後2003年に韓国で, 2004年にはベトナム, タイ, カンボジア, 中国, ラオス, インドネシア, マレーシアで, 2005年にはロシア, カザフスタン, トルコ, ルーマニア, 2006年にはナイジェリア, エジプト, フランス, ドイツ等²⁾の国々で, 鳥類を中心にその発生が報告されている. トルコ, アゼルバイジャン, ベトナム, インドネシア等では, 香港の事例と同様に, 感染した家禽との濃厚接触者におけるH5N1型感染事例および死亡例³⁾が報告されている. H5N1型以外でヒトへの感染を認めたウイルス型としては, H7型 (H7N7: 2003年オランダ⁴⁾, H7N3: 2004年カナダ⁵⁾, 2006年イギリス⁶⁾)やH9型 (H9N2: 1999年⁷⁾, 2003年香港)の存在が知られる.

日本においては, 1925年にH7N7型, 2004年に山口県, 大分県, 京都府でH5N1型による高病原性鳥インフルエンザ事

例の発生があり⁸⁾, 2005年に茨城県でH5N2型による低病原性鳥インフルエンザが家禽で発生している. 京都府や茨城県の事例では, 一部の養鶏場従業員にH5型ウイルスに対する中和抗体が検出された.

現在, H5N1型ウイルスのヒト型への明確な変異は認められていないが, 鳥インフルエンザウイルスがヒトの体内でヒト型ウイルスと遺伝子再集合を起こした場合, さらに強毒で感染性の強い新型インフルエンザウイルスになることが危惧されている.

鳥インフルエンザに罹った鳥類との接触歴を有するインフルエンザ様疾患患者については, ウイルス蔓延防止の目的で, H5N1型を含む鳥インフルエンザ検査を緊急に実施する必要がある^{9,10)}. 東京都においては発熱等のインフルエンザ様症状があり, 高病原性鳥インフルエンザに感染している鳥との接触歴がある場合, または, 高病原性鳥インフルエンザが流行している地域へ旅行し, 鳥との濃厚な接触歴を有する者を, 「高病原性鳥インフルエンザ感染疑い」と定義し, このような事例を高病原性鳥インフルエンザアラート(感染症アラート)として, 緊急検査を行うこととした.

しかしながら, 今まで開発を行ってきたNested-PCR (polymerase chain reaction) 法を中心とした高感度な遺伝子検査法は, 分子系統樹解析により有用なデータが得られるものの, 検査結果が得られるまでに23時間を要するため, この方法のみで緊急検査に対応することは困難であった. そこで, Real-time (リアルタイムPCR)法を中心に, 鳥型およびヒト型インフルエンザウイルスの新たな検出系を開発するとともに, 市販キットであるLoop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を加え, 高病原性鳥インフルエンザ検査システムを構築するとともに, 本システムをアラート事例に実際に適用した. 以下, その概要について報告する.

* 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

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

実験方法

1. 供試ウイルス抗原

各検査法の陽性コントロールとして、国立感染症研究所より分与された鳥インフルエンザウイルスHA抗原:H5N1(A/Vietnam/1194/2004),H7N3(A/Mallard/Nederland/12/2000),H9N2(A/HongKong/2108/03)および都内ヒト由来分離株H3N2(A/Tokyo/05-221/2005), H1N1(A/Tokyo/04-1454/2005), B(B/Tokyo/298/2002)を使用した。

2. インフルエンザウイルス遺伝子検出法

1) LAMP法

Loopamp RNA増幅試薬キット(RT-LAMP), LoopampプライマーセットAvian Flu H5およびLoopamp Avian FluH7(栄研化学)を使用し, 鳥インフルエンザウイルスH5およびH7型の検査を実施した. 本法で特異的な遺伝子が検出された場合, 反応チューブ内の濁度が上昇し, 検出曲線が得られる. なお, 測定機器として, LA-320C(栄研化学)を使用した.

2) 逆転写反応

リアルタイム PCR法およびNested-PCR法に使用するcDNA作成のために, 抽出したRNA溶液5 μ Lと各検査に使用するプライマーペアとOmniscript RT Kit(QIAGEN)を用いて, 37 $^{\circ}$ C, 30分間反応しリアルタイムPCRおよびNested-PCR用のcDNA 10 μ Lを作製した.

3) リアルタイムPCR法

鳥インフルエンザウイルスH5, H7, H9型, ヒトインフルエンザウイルスH1, H3, B型の検出系^{11,12)}およびヒトインフルエンザウイルスN1, N2の検出系を, TaqManプローブまたはTaqMan MGBプローブで設計した. それぞれの検出プライマーおよびプローブを表1に示した.

各プライマーおよびプローブは, 各ウイルス型の遺伝子配列を基に, Primer Express 2.0(Applied Biosystems;ABI)を用いて設計し, ABI社にて委託合成した.

反応条件は, TaqMan Universal Master Mix溶液(ABI)に, cDNA 10 μ Lと蛍光プローブを加えて, 【50 $^{\circ}$ C(2分), 95 $^{\circ}$ C(10分)】の反応後, 【95 $^{\circ}$ C(10秒), 57 $^{\circ}$ C(1分)】の反応工程を45サイクル繰り返した. 本法で特異的な遺伝子配列が形成された場合, 反応チューブ内の蛍光強度が上昇し, 判定ラインを通過した検出曲線が得られる. なお, 測定機器は, ABI PRISM 7900HT(ABI)を用いて行った.

4) Nested-PCR法

一段階の逆転写PCR(RT-PCR)法実施後に, プライマーを換え, PCR法を行う方法である. ヒトインフルエンザウイルスH1, H3, B型検出には, 3型を同時に検出するmultiplex-PCR法^{11,13)}を, H5型検出には国立感染症研究所の推奨するRT-PCR法の内側に新たなプライマーを設計し, 使用した(表2). ヒトインフルエンザウイルス検出系については, H1-FPAN/H1-FPBN, HN153/HN253およびIB-153/253をミッ

クスしたプライマーを用いて【94 $^{\circ}$ C 1分, 53 $^{\circ}$ C 2分, 72 $^{\circ}$ C 2分】の条件で30サイクルの増幅反応を行い, その後, これらのPCR産物を材料として, IU-153/IU-253, IFA-A153/IFA-A453およびIB-353/453を新たなプライマーとして, 同条件で30サイクルの増幅反応を行った. 鳥インフルエンザウイルス検出系については, H5-515f-N/H5-1220R-Nプライマーで【94 $^{\circ}$ C 1分, 53 $^{\circ}$ C 2分, 72 $^{\circ}$ C 3分】の条件で35サイクルの増幅反応を行い, H5-nest-F/H5-nest-Rプライマーを用いて, 51 $^{\circ}$ Cのアニーリング温度で35サイクルの増幅反応を行った. 各PCR反応終了後, 2%アガロースゲル電気泳動にて特異バンドを認めたものを陽性と判定した.

5) RT-PCR法

国立感染症研究所が推奨する高病原性鳥インフルエンザ検査法である, H5-103f/H5-1220rプライマーによる方法¹⁴⁾(2005年7月版)およびH5-248-270F/H5-671-647Rプライマーによる方法¹⁵⁾(2006年6月版)を採用した. 検査は, 各検査マニュアルに準拠した方法で実施し, 2%アガロースゲル電気泳動にてバンドを認めたものを陽性と判定した(図4).

3. 各検査法の検出感度の検討

H5N1型ウイルス(A/Vietnam/1194/2004)抗原液より抽出したRNAを10倍段階希釈した溶液(原液, 10⁻¹~10⁻⁴倍)を作成し, LAMP法, リアルタイム PCR法, Nested-PCR法およびRT-PCR法の各検査法の検出感度を比較した.

4. 塩基配列の決定

Nested-PCR法による高病原性鳥インフルエンザアラート検査において, 陽性のバンドが認められた検体については, 2.5%低融点ゲル(NuSieve GTG Agarose)にて電気泳動後, 特異バンドを切り出し, 精製し, dye terminator cycle sequencing法にて塩基配列を決定し, Mega3¹⁶⁾を用いて分子系統樹解析を行った.

5. 患者検体からの遺伝子抽出法

2005年3, 7, 12月, 2006年1, 4月に, 高病原性鳥インフルエンザアラートの症例定義を満たした5例の患者について, 咽頭拭い液や鼻腔拭い液等から, 鳥インフルエンザウイルス等の遺伝子検査を実施した.

バイオセーフティレベル3(BSL3)実験室に検体を搬入し, 核酸抽出試薬キットQIAamp RNA Viral Mini kit(QIAGEN)を用いて, 咽頭拭い液等の臨床材料から, 添付書の手順に従い核酸(RNA)の抽出を行い, RNA溶液を得た. 陽性コントロールとして用いたウイルス抗原またはウイルス株からのRNA抽出は, セパジーンRVR(三光純薬)を使用し, RNA溶液を得た.

結果

1. H5型検査法の検出感度の比較

表1. リアルタイムPCR用プライマーおよびプローブ

インフルエンザウイルス	遺伝子領域	亜型	プライマー, プローブ名	塩基配列
ヒト型	HA	H1	H1-VAF	F 5' - CTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAG-3'
			H1-VAR	R 5' - TGATCTCTTACTTTGGTCTTTTGG-3'
			H1-MGBVA	P 5' - FAM-TTCACCCAGAAATA-MGB-3'
		H3	H3-F	F 5' - TCAAGCATCAGGAAGAATCACA-3'
			H3-R	R 5' - CCGATATTCGGGATTACAGTTTG-3'
			H3-P	P 5' - VIC-TCTCTACCAAAAAGAAGCCA-MGB-3'
		B	B-F210	F 5' - CAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATC-3'
			B-R277	R 5' - GCCGCCAATCTGAGAAACA-3'
			B-probe239T	P 5' - VIC-AATGGAGTAACCACACATT-MGB-3'
	NA	N1	NA1-681H-F	F 5' - TGCTGTGTGAACGGKTCATG-3'
			NA1-743H-R	R 5' - GAGCGGCCCCATTACTC-3'
			N1-708TP-H	P 5' - FAM-CATAATGACCGATGGCC-MGB-3'
		N2	NA2-295-F	F 5' - ACATTACAGGATTTGCACCTTTT-3'
			NA2-351-R	R 5' - CACCARGGAAAGYCGAA-3'
			N2-319TP	P 5' - VIC-CTAAGGACAATTCG-MGB-3'
トリ型	HA	H5	RT-H5-1607N-F	F 5' - GGMAYYAYCARATAYTGTCAVITYTAYTC-3'
			RT-H5-1688N-R	R 5' - CCAWAARGATAGACCAGCYA-3'
			Flu-H5-1639	P 5' - FAM-AGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAA-TAMRA-3'
			Flu-H5-1639N	P 5' - FAM-AGTAGCGAGCTCCCTAGCACTGGCAAT-TAMRA-3'
		H5	RT-H5-272F	F 5' - AATGTGTGAYGARTTYMTYAATGT-3'
			RT-H5-342R	R 5' - GRYCRTTGRCTGGAYTGRYTTTCT-3'
			Flu-H5-298M	P 5' - FAM-CGGAATGGTCTTACATAGT-MGB-3'
			RT-H7-489F	F 5' - AGAGATGAAATGGCTCCTGTCAA-3'
		H7	RT-H7-568R	R 5' - CTTCCCTGTGTYTTGTATGACTTAGTC-3'
			Flu-H7-513	P 5' - VIC-CACAGACAATGCTGCTTTCCCGCA-TAMRA-3'
			RT-H9-907F	F 5' - GAGGGTTGTTTGGTGCCATAG-3'
		H9	RT-H9-976R	R 5' - CCGTACCAGCCTGGACTAG-3'
	Flu-H9-929		P 5' - TET-TGGATTCATAGAAGGAGGTTGGCCTGG-TAMRA-3'	

F:Forward, R:Reverse, P:Fluorogenic Probe

表2. Nested-PCR用プライマー

インフルエンザウイルス	遺伝子領域	亜型	プライマー名	塩基配列
ヒト型	HA	H1 (173bp)	H1-FPAN	F 5' - AGGGAGCAATTGAGTTCAGTA-3'
			H1-FPBN	R 5' - CCATTGCCTCAAATATTATTG-3'
			IU-153	F 5' - TTACAGAAATTTGCTATGGCTG-3'
			IU-253	R 5' - AACTACAGAGACATAAGCATT-3'
		H3 (366bp)	HN-153	F 5' - TTTGTTGAACGCAGCAAAGCT-3'
			HN-253	R 5' - CTCCCGGTTTTACTATTGTCC-3'
			IFA-A153	F 5' - GATTATGCCTCCCTTAGGTC-3'
			IFA-A453	R 5' - CCCCTACCCAGGGTCTAG-3'
		B (315bp)	IB-153	F 5' - GCAAAAAGCTTCAATACTCCAC-3'
			IB-253	R 5' - TTTGTGGTAGCCCTCCGTC-3'
			IB-353	F 5' - GGAACCTCAGGATCTTGCC-3'
			IB-453	R 5' - GGTAGCCCTCCGTCTTCTG-3'
トリ型	HA	H5 (202bp)	H5-515f-N	F 5' - CATACCAACAATAAAGAGA-3'
			H5-1220R-N	R 5' - GTGTTCAATTTGTCAATRAT-3'
			H5-nest-F	F 5' - GGAATGCCCCAAATATGTGAA-3'
			H5-nest-R	R 5' - GTCTGCAGCGTACCCACTCC-3'

表3. H5亜型検査用プライマー (RT-PCR)

遺伝子領域	亜型	プライマー名	塩基配列
HA	H5 (708bp)	H5-515f-N	F 5' - CATACCAACAATAAAGAGA-3'
		H5-1220R-N	R 5' - GTGTTCAATTTGTCAATRAT-3'
	H5 (424bp)	H5/248-270	F 5' - GTGACGAATTCATCAATGTRCCG-3'
		H5/671-647	R 5' - CTCTGGTTAGTGTGATGTGYCCAA-3'

H5N1型ウイルス(A/Vietnam/1194/2004) 抗原希釈RNA (10⁰ ~10⁻⁴溶液) を用いて, LAMP法, リアルタイムPCR法, Nested-PCR法およびRT-PCR法の各検査法の検出感度を比較した結果, リアルタイムPCR法では, H5型 (FAM-TAMRA) の検出系で10⁻³希釈まで, H5型 (FAM-MGB) の検出系で10⁻⁴希釈まで検出することができた (図1). 一方, LAMP法では10⁻²希釈まで (図2), Nested-PCR法では10⁻¹までしか検出できなかった. RT-PCR法では2006年6月以降に推奨されているH5-248-270F/H5-671-647Rプライマーを使用した方法では10⁻²まで検出されたが (図3), 従来のH5-103f/H5-1220rプライマーを使用した方法では10⁰希釈液の検出ができなかった. 以上の結果から, H5型検査法では, 検査法毎に検出感度が異なり, 最も検出感度が高いのがリアルタイムPCRで, 次いで, LAMP法, Nested-PCR法, RT-PCR法 (H5-248-270F/H5-671-647Rプライマーによる方法を除く) の順に検出感度が低くなることが明らかとなった (表4).

2. 高病原性鳥インフルエンザアラート事例への対応

当センターでは, 以上の結果に基づいて, 図4に示す検査体制を構築した. すなわち, 都内の医療機関で, 高病原性インフルエンザ疑いの症例定義を満たした事例が発生した場合, 医療機関から管轄の保健所に, 保健所より感染症対策

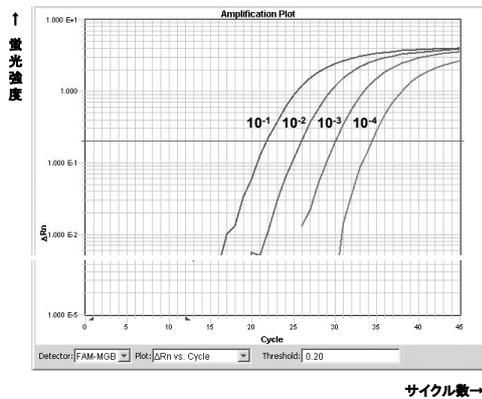


図1. LAMP法によるH5型インフルエンザウイルス遺伝子の検出 (10⁻¹~10⁻⁴希釈抗原)

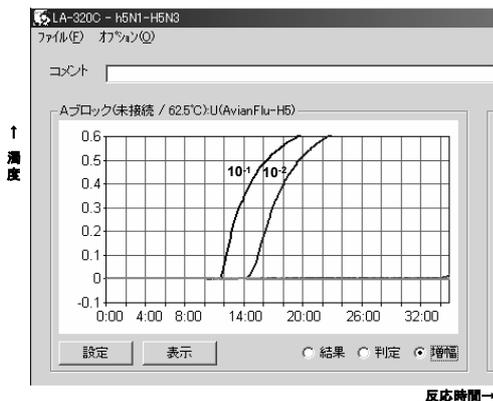


図2. リアルタイムPCR法 (FAM-MGB) によるH5型インフルエンザウイルス遺伝子の検出 (10⁻¹~10⁻⁴希釈抗原)

課に患者情報が送られる. 保健所は検体採取後, 直ちに当センターに検体を搬送する. 当センターでは検体受付後, 直ちに検査を開始し, 検体を受け付けてから, 3時間後にLAMP法, 6時間後にリアルタイムPCR法, 23時間後にNested-PCR法の検査結果を感染症対策課へ連絡する.

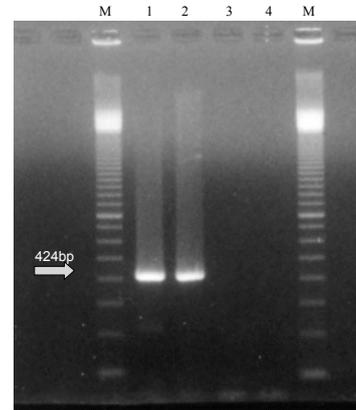


図3. 高病原性鳥インフルエンザアラート時の対応ウイルスの遺伝子検出結果

表4. H5型ウイルスを用いた各検査法の感度比較

	×1	×10 ⁻¹	×10 ⁻²	×10 ⁻³	×10 ⁻⁴
LAMP法	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Real-time PCR法					
FAM-TAMRA (RT-H5-1607N-F/1688N-R)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
FAM-MGB (RT-H5-272F/342R)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Nested-PCR法	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
RT-PCR法 (H5-515f-N/H5-1220r-N)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
RT-PCR法 (H5-248-270/H5-671-647)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

(+) : 検出
(-) : 非検出

表5. 高病原性鳥インフルエンザアラート事例の遺伝子検査結果

事例	日時	年齢	性別	LAMP法		Real-time PCR法								Nested-PCR法			
				H5	H7	H1	H3	H5	H7	H9	B	N1	N2	H1	H3	H5	
1	2005年3月	60代	女	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	(+)	ND
2	7月	50代	男	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	(+)	ND
3	12月	30代	男	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
4	2006年1月	40代	男	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	4月	50代	男	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

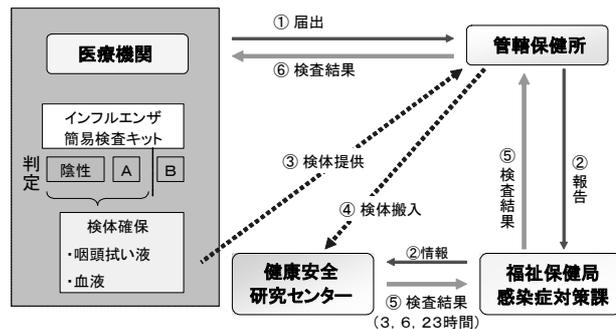


図4. 高病原性鳥インフルエンザアラート時の対応

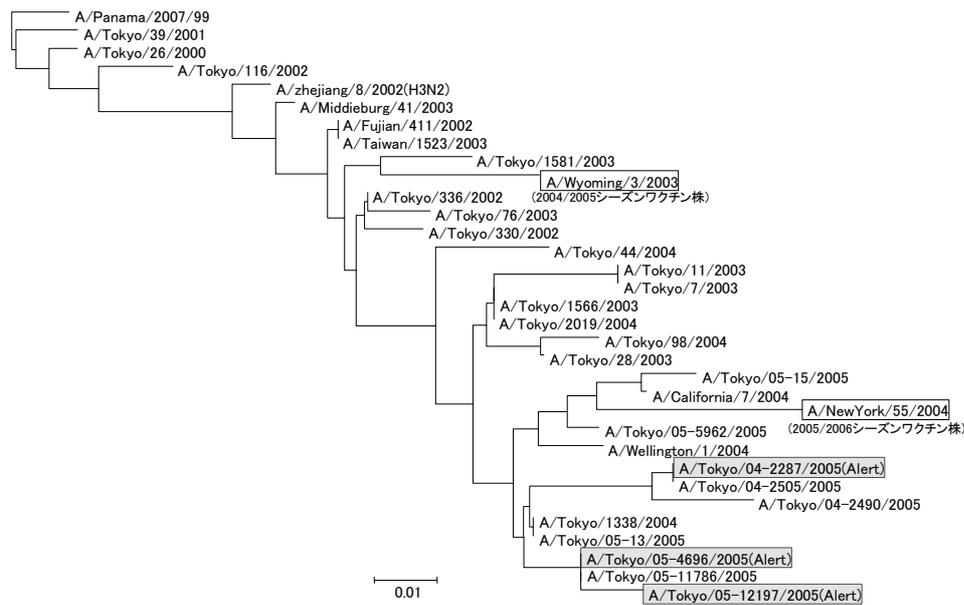


図5. アラート事例より検出されたH3型の分子系統樹解析
(網掛け表示：アラート事例から検出されたH3型遺伝子)

3. アラート事例からの鳥およびヒトインフルエンザ

2005年3, 7, 12月, 2006年1, 4, 6月に, 高病原性鳥インフルエンザアラートの定義を満たした5例について咽頭拭い液等の検体を採取し, 鳥インフルエンザウイルス等の遺伝子検査に供した結果(表5), LAMP法, リアルタイムPCR法およびNested-PCR法では, 鳥インフルエンザウイルス遺伝子は検出されなかったが, 3例よりリアルタイムPCR法およびNested-PCR法でインフルエンザウイルスH3型遺伝子が, 1例からN2遺伝子が検出された(NA領域のリアルタイムPCR法は, 2005年12月以降導入). Nested-PCR法により増幅された遺伝子産物を精製後, 塩基配列を決定し, 分子系統樹解析を実施した結果, 検出されたH3は当時またはその後, 東京都で流行した株と同様の位置にクラスタリングされた(図5).

考 察

1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1型によるヒト感染事例が発生してから, 約10年が経過しようとしている. 世界保健機関(WHO)の報告によると, 2003年以降, H5N1型ウイルスによるヒト感染症例は241例, うち141例の死亡が確認されている(2006年8月24現在).

我が国において, ヒトにおける高病原性鳥インフルエンザは, 感染症法で四類感染症に分類され(2003年11月), 初めて法的に報告が義務付けられた¹⁷⁾. さらに2006年6月には鳥インフルエンザH5N1型が指定感染症に定められ¹⁸⁾, 全国レベルでの防疫対策が進められている.

H5N1型インフルエンザの発生に関しては, 地域的および季節的限局性はあまり認められていない. 一方で, ヒトにお

けるインフルエンザは, H1N1(Aソ連)型, H3N2(A香港)型およびB型ウイルスによる流行が冬季を中心に繰り返されている^{19,20)}. しかし, 2005年4月から7月に発生した沖縄県におけるインフルエンザの発生事例²¹⁾に見られたように, インフルエンザは冬季にのみ限定された疾患ではなくなってきた. したがって, 海外渡航者を中心とした高病原性鳥インフルエンザ疑い事例の場合には, 鳥インフルエンザウイルスのみならず, H1N1およびH3N2型等のヒト型インフルエンザウイルスについても, 類症鑑別診断として検査を同時に実施する必要がある.

各検査法の特徴として, LAMP法はRT-PCR法やリアルタイムPCR法よりも短時間で結果が得られるが, 使用するプライマーが6種類にもおよぶため, 遺伝子の変異しやすいウイルス遺伝子領域の増幅には適さない. H5型ウイルスの検出においても, ベトナム株の検出は可能であるが, 茨城株(H5N2)の検出ができなかったことが報告されている²²⁾.

リアルタイムPCR法は2種類のプライマーに1種類のプローブを用いて, 標的遺伝子の検出を迅速に行う方法である. 標的遺伝子検出系の設計の自由度が大きく, プライマーおよびプローブの設計も比較的容易である.

今回, 我々の開発したリアルタイムPCR法による検出系は, H5型では, 国から示された基準法であるH5型検出用のRT-PCR法(2005年7月; 国立感染症研究所)よりも, 1,000倍(RT-H5-1607N-F/1688N-R)から10,000倍(RT-H5-272F/342R), 新たな基準法(2006年6月)よりも10倍から100倍検出感度が高いことが判明している. さらに, H7およびH9型にも対応している. ヒトインフルエンザウイルスについても, H1,

H3(N1, N2), B型の検出が可能で, 従来のNested-PCR法よりも迅速で, かつ広範な型の検出にも対応できる。

Nested-PCR法はPCR法を2回行う高感度な方法であり, 陽性結果が得られた場合には, 塩基配列を決定し分子系統樹解析に利用することが可能である^{19,20)}。

これらの方法に加え, 市販されているLAMP法(H5, H7型)および疫学的解析に有用なNested-PCR法(H1, H3, B, H5型)の利点を組み合わせた検査システムを活用することにより, 高病原性鳥インフルエンザ疑似事例が, H5N1型等の鳥インフルエンザウイルス感染によるものか, ヒト型インフルエンザウイルスによるものかを迅速かつ高感度に判別, 検査することが可能となった。

しかしながら, H5N1型は海外発生株における遺伝子変異²¹⁾が報告されていることから, 常にGenBank等のデータベースから最新の遺伝子配列情報を得て, リアルタイムPCRやNested-PCR法に使用するプライマー等の更新を図っていく必要がある。H5型以外にも, H7, H9型鳥インフルエンザウイルスやヒトインフルエンザウイルスH1, H3, B型およびN1, N2型についても同様に更新を行っていく必要がある。

Nested-PCR法によるH1, H3, B型の検出は, リアルタイムPCR法と同程度の検出感度が得られているにもかかわらず, H5型の検討では, リアルタイムPCR法よりも感度が低い結果が示された。この理由として, 今回検討した方法は, 国の検査マニュアルに採用されていたH5型検出RT-PCR法(増幅領域708bp)¹⁴⁾をベースに作成したため, 増幅領域が長く, 迅速診断には向かないことが要因として考えられた。2006年6月にはRT-PCR法による新たなH5型検査マニュアルが作成・公表されたため¹⁵⁾, その方法をベースとしたNested-PCR法を現在開発中である。

当センターでは2003年に発生した重症急性呼吸器症候群(SARS)の教訓から¹¹⁾, 先んじてH5N1を含む鳥インフルエンザウイルスならびに類症鑑別診断のための遺伝子検査システムを構築し, 東京感染症アラート検査²⁹⁾の実戦に応用してきた。今後も, 検査法ごと(LAMP法3時間, リアルタイムPCR法6時間, Nested-PCR法23時間)に結果が出次第, 迅速に報告していくとともに, このシステムをさらに改良していくことが, 高病原性鳥インフルエンザを含めた新興感染症の実験室診断法の確立に不可欠であると考えられる。

(本研究の概要は, 東京都技術会議ラボネット2006「行政課題の解決に向けた新技術の取り組み」で発表した。)

文 献

1) Fouchier, RA., Munster, V., Wallensten, A., *et al.*:

J. Virol., **79**, 2814-2822, 2005.

2) 厚生労働省ホームページ, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou02/pdf/03.pdf>

3) WER, **81**, 249-260, 2006.

4) Holle, MDRvB., Meijer, A., Koopmans, M., *et al.*:
Eurosurveillance, **10**, 10-12, 2005.

5) http://www.who.int/csr/don/2004_04_05/en/

6) Low pathogenic avian influenza H7N3 outbreak in Norfolk, England, April-May2006, Final Epidemiology Report, <http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/disease/ai/pdf/epireport100706.pdf>

7) Saito, T., Lim, W., Suzuki, T., *et al.*: *Vaccine*, **20**, 125-133, 2001.

8) 今井邦俊: 食衛誌, **45**, 279-281, 2004.

9) 加瀬哲男, 森川佐依子, 奥野良信, 他: 病原微生物検出情報, **30**, 222, 2005.

10) 水野泰孝, 金川修造, 川名明彦, 他: 病原微生物検出情報, **26**, 43, 2005.

11) 新開敬行, 貞升健志, 長谷川道弥, 他: 東京健安研七周年報, **55**, 25-29, 2004.

12) Shimada S, Sadamasu K, Shinkai T, *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*; **59**(1), 67-8, 2006.

13) 長島真美, 佐々木由紀子, 山崎 清, 他: 東京衛研 年報, **48**, 30-37, 1997.

14) RT-PCR法によるH5鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出(第2版), 地方衛生研究所ネットワーク, 2005年7月, <http://www.chieiken.gr.jp/manual01/avian/RT-PCR200507.pdf>

15) インフルエンザ(H5N1)に関するガイドライン(フェーズ3), 新型インフルエンザ専門家会議, 108-114, 2006.

16) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.: *Briefings In Bioinformatics*, **5**, 150-163, 2004.

17) 感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針の一部改正について, 健発第1219001号, 平成15年12月19日, 厚生労働省.

18) インフルエンザ(H5N1)を指定感染症として定める等の政令等の施行について, 健感発第0602003号, 平成18年6月2日, 厚生労働省

19) 新開敬行, 貞升健志, 長谷川道弥, 他: 病原微生物検出情報, **26**, 96-97, 2005.

20) 新開敬行, 長谷川道弥, 田部井由紀子, 他: 病原微生物検出情報, **25**, 336, 2005.

21) 平良勝也, 仁平 稔, 糸数清正, 他: 病原微生物検出情報, **26**, 243-244, 2005.

22) 衛生微生物技術協議会第26回講演抄録集.

23) WHO Global Influenza Program Surveillance Network, *EID*, **11**, 1515-1521, 2005.

24) 東京感染症アラートの症例定義 東京都福祉保健局健康安全室感染症対策課編, 平成18年6月19日, 東京都感染症対策課