

インフルエンザ診断マニュアル (第5版)

(令和5年8月)

目次

Part I: インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要

1 病原体	3
2 ヒトにおけるインフルエンザの疫学	3
3 臨床症状	4
4 検査の進め方	5

Part II: ウイルス分離と同定

1 インフルエンザウイルス分離のための臨床検体	6
2 ウイルス分離用検体の輸送と保存	7
3 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離	7
4 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離	12
5 赤血球凝集阻止 (HI) 試験によるインフルエンザ分離株の同定	15
6 ウイルス遺伝子検出法によるインフルエンザウイルスの同定	24
7 (参考)迅速診断のためのインフルエンザウイルス抗原の検出	35

Part III: インフルエンザウイルスの遺伝子解析

1 RT-PCR 法とシーケンス	36
2 GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data: www.gisaid.org/)の利用	52

Part IV: インフルエンザの血清診断

1 HI 試験による血清学的診断	56
2 ウイルス中和試験による血清学的診断	58

Part V: 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出

1 薬剤耐性変異の検出	63
2 薬剤感受性試験	71

検査依頼先	83
-------	----

執筆者リスト	83
--------	----

Part I

インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要

1. 病原体

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属し、ウイルス粒子内部に存在する核蛋白質(NP)およびマトリックス蛋白質(M1)の抗原性の違いから A、B、C、D の 4 つの型に分けられる。ウイルス粒子はエンベロープをもち、直径 80~120 nm の球状、または 1-2 μm の紐状の形態をしており、内部には 8(C 型および D 型ウイルスは 7)分節からなるマイナス鎖 RNA が遺伝子として含まれている。A 型および B 型ウイルスでは粒子表面には、宿主細胞表面に存在するレセプターに結合する赤血球凝集素(ヘマグルチニン、HA)と、子ウイルスが細胞表面から出芽する際に、レセプターのシアル酸を切断してウイルス粒子を細胞外へ遊離させる働きをするノイラミニダーゼ(NA)の 2 種類の糖蛋白質が存在する。一方、C 型および D 型ウイルスでは赤血球凝集活性とエステラーゼ活性を併せもつ 1 種類の HEF 糖蛋白質のみが粒子表面に存在する。

A型ウイルスはヒト以外の動物にも広く分布している人獣共通ウイルスで、粒子表面の糖蛋白質の抗原性の違いから、HA は 18 亜型、NA は 11 亜型に分けられる。H1 から H16 までの HA 亜型、N1 から N9 までの NA 亜型は全てカモなどの水禽の世界に存在し、H17 と H18 の HA 亜型、N10 と N11 の NA 亜型はコウモリから見つかっている。A型ウイルスでは十~数十年に一度の頻度でこれら亜型の組み合わせがこれまでの流行株とは大きく異なる新型ウイルスが出現し、ヒトの間でインフルエンザの世界的な大流行(パンデミック)を引き起こす。このことから、A型ウイルスについては、ヒトと動物にわたる広範なサーベイランスが重要である。

2. ヒトにおけるインフルエンザの疫学

毎年冬季になると世界各地でインフルエンザの流行がみられ、北半球にある温帯地域以北の国々ではおおむね 1-2 月頃が流行のピークとなる。わが国のインフルエンザは、毎年 11 月下旬から 12 月上旬頃に流行が始まり、翌年の 1-3 月頃にピークとなり、4-5 月にかけて終息していくというパターンであるが、最近では夏季にインフルエンザの集団発生や小流行があり、ウイルスも通年で分離されている。流行の程度とピークの時期はその年によって異なる。

インフルエンザ流行の大きい年には、インフルエンザおよびそれに関連した死亡数が顕著に増加し、さらには循環器疾患、慢性基礎疾患などによる超過死亡が増加し、結果的に全体の死亡数が増加することが知られている。ことに高齢者がこの影響を受けやすく、先進国などで共通に見られる現象となっている。全人口に対する高齢者の割合が急増している我が国においても、超過死亡は 1998/99 シーズンには 3 万人以上も観測され、超過死亡の 8 割以上は 65 歳以上の高齢者によってもたらされており、社会的な問題となった。

2009年にブタインフルエンザウイルス由来の A(H1N1)pdm09 ウイルス(図 1)が出現し、パンデミックを起こした。このウイルスの大流行に伴い、これまでの季節性 A(H1N1)ソ連型ウイルスが消滅し、2012 年以降は A(H1N1)pdm09、A(H3N2)香港型、B 型のビクトリア系統と山形系統の 4 種類が季節性インフルエンザとして流行している。

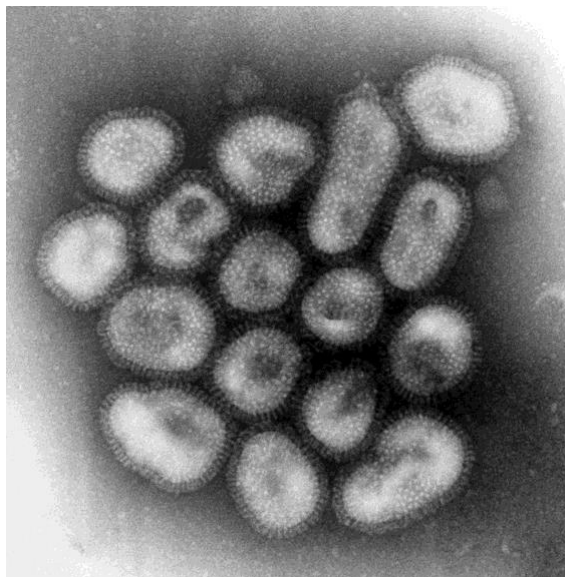


図 1 2009 年にパンデミックを起こしたブタ由来の A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルス(国内分離株)の電子顕微鏡写真

3. 臨床症状

感染から 1-3 日間ほどの潜伏期間の後、発熱・頭痛・全身の倦怠感・筋関節痛などが突然現われ、咳・鼻汁などの上気道炎症状がこれに続き、約 1 週間以内で軽快するのが典型的なインフルエンザで、いわゆる「かぜ」に比べて全身症状が強いのが特徴である。高齢者はインフルエンザに罹患することによって、2 次的な細菌感染による肺炎や気管支炎を起こしやすいことが知られているが、小児ではこれらの合併症に加えて中耳炎を起こしやすく、気管支喘息を誘発することもある。従来の季節性インフルエンザ患者では、ウイルス性肺炎を認めることはごく稀であるが、A(H1N1)pdm09 に感染した若年層では、比較的高い頻度でウイルス性肺炎を誘発することが報告されている。

インフルエンザの診断基準はインフルエンザの流行期間中(例年 11 月～4 月)に以下の 4 つの項目全てを満たすものとされている。

1. 突然の発症
2. 高熱
3. 上気道炎症状
4. 全身倦怠感等の全身症状

なお、非流行期での診断は、類似疾患との鑑別のために、より多くの検査情報が必要である。

4. 検査の進め方

インフルエンザの検査にはウイルス学的、遺伝学的および血清学的手法がある。前者 2 つはウイルスの検出と分離・同定が中心であり、病因の診断としては最も信頼がおける検査である。最近では種々の迅速診断キットが市販されており、臨床分離検体中のウイルス抗原の有無が短時間で判断できるようになっているので、これらキットを併用した検査の進め方が有効である。一方、血清学的手法は抗体価の上昇をもとにした病因の確定診断で、正確な判定を下すためには急性期と回復期のペア血清を採取することが重要である。これら検査法の概要を図 2 に示す。

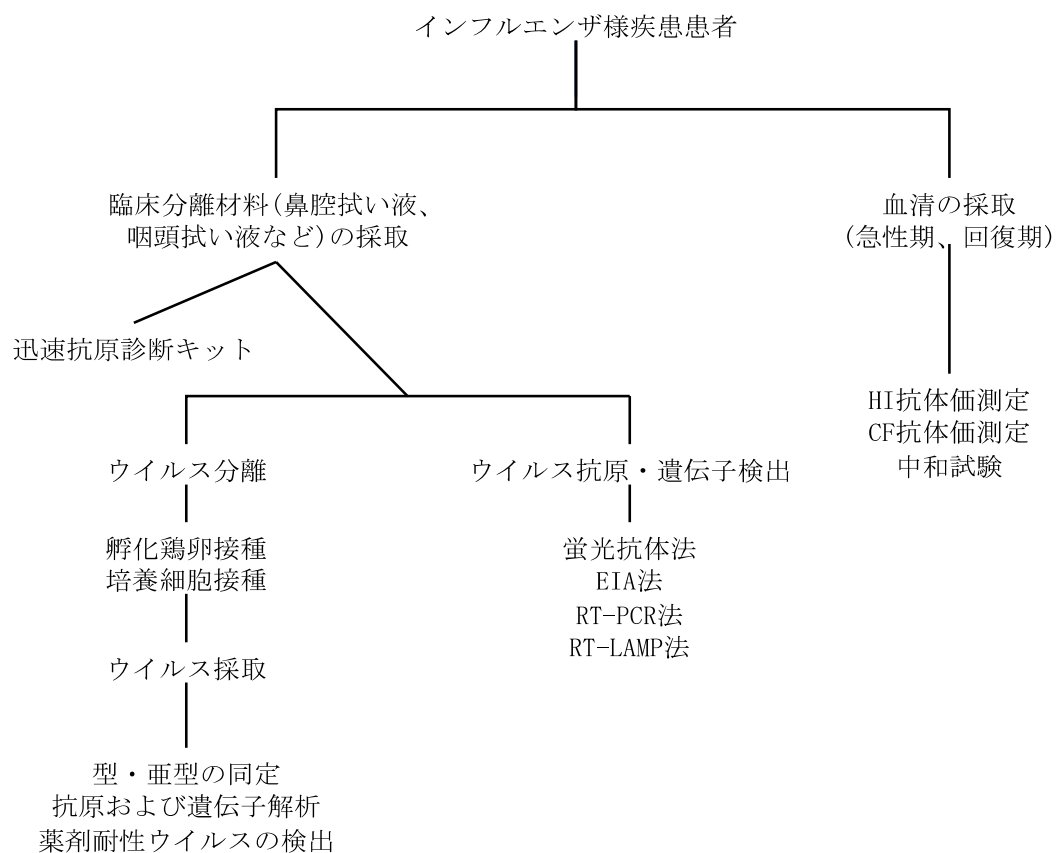


図 2 インフルエンザウイルス検査の概要

Part II

ウイルス分離と同定

患者から採取した検体からのウイルス分離は、ウイルス感染の病原診断として感度が高く、もつとも信頼できる方法である。また、インフルエンザ予防の要であるワクチンを製造するためにも、ウイルスの分離は不可欠である。

過去には、インフルエンザウイルスの分離培養に孵化鶏卵が多く用いられていた。しかし、その入手が困難であることやウイルスを孵化鶏卵で増殖させることによる抗原性、感染性の変化を考慮し、現在では、培養細胞が広く用いられている。一方で現行のインフルエンザワクチンは、孵化鶏卵で増殖させたウイルスから製造されるため、ワクチン株は孵化鶏卵で分離、継代された種ウイルスの確保も必須となっている。そのため、孵化鶏卵によるウイルス検出システムを備えた検査室では、培養細胞によるウイルス分離に加え、孵化鶏卵による分離も心がけたい。

1. インフルエンザウイルス分離のための臨床検体

病原診断のためのウイルス分離あるいは抗原検出の成功には、至適な臨床材料の確保が重要であり、患者の咽頭拭い(Throat swab)液*、鼻腔洗浄液(Nasal wash)、鼻咽頭分泌液(Nasopharyngeal secretions:NPS)、鼻腔拭い(Nasal swab)液*、鼻汁・鼻かみ液*、うがい液**などが検査材料として採取されている。

*咽頭や鼻腔を拭った綿棒を浸す液には、0.5%ウシ血清アルブミンフラクションV (BSA)、ペニシリン(100-500 U/ml)、ストレプトマイシン(100-500 µg/ml)、ゲンタマイシン(100 µg/ml)およびアンフォテリシンB(2 µg/ml)を添加した細胞培養培地(MEM培地または199培地)、市販のウイルス用液体輸送培地またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))を用いる。また、鼻汁・鼻かみ液は、市販の鼻かみ液採取用紙やラップフィルムなどに鼻をかみ、採取した鼻汁・鼻かみ液は綿棒で拭って培地等に浸す。生理食塩水はpHが不安定となるため原則的には使用しない。

**うがい液は、他の検体と比べるとウイルス量が少なく、ウイルス検出率が低い傾向にあるため、うがい液よりも他の検体を優先してウイルス分離や検査を実施する事が望ましい。参考までに、うがい液を採取する場合の一例を示す:5~10 mlのPBS(-)を口に含ませ、できるだけ喉の奥で3~5秒間ガラガラいわせて容器に吐き出したものをうがい液として使用する(採取直前の飲食は避ける)。

2. ウイルス分離用検体の輸送と保存

分離用検体を採取したら氷中または 4°Cに保管し、できるだけ速やかにウイルス分離を試みる。ウイルス分離を行うまでの日数が 5 日～1 週間程度であれば、4°Cの状態を維持し、輸送も冷蔵状態で行う。しかし、それ以上の日数を要する場合は、検体を-70°C以下に保存し、輸送も凍結状態で行う。ウイルス分離用検体は可能な限り凍結融解をさける。この操作を繰り返し行くと、ウイルスの感染性が低下して、ウイルス分離が困難になる。

3. 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離

培養細胞によるインフルエンザウイルスの培養には、分離率の高さ、入手の容易さおよび維持コストの面から Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞が広く用いられている。

3.1 MDCK 細胞の培養

3.1.1 培養器具および試薬

組織培養用プラスチックフラスコ (75 cm², 12.5 cm²) (BD Falcon Cat. #353018)

DMEM 培地 (SIGMA Cat. #D6429)

ウシ胎仔血清 (FBS)

ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO BRL Cat. #15140-122)

ファンギゾン (GIBCO BRL Cat. #15290-018)

0.05%トリプシン/0.53 mM EDTA (GIBCO BRL Cat. #25300-054)

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) (GIBCO BRL Cat. #14190-144)

※上記試薬類は感染研で培養細胞の状態を検討し使用しているものであるが、他のメーカーのものに替えても差し支えない。

3.1.2 試薬の調製

増殖用培地

試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
FBS	10%	50 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 µg/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 µg/ml	1 ml

3.1.3 培養細胞継代法(75 cm²スケールの場合)

- 1) 単層を形成した細胞の培地を吸引する。
- 2) PBS (-) 15 ml を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。
- 3) トリプシン/EDTA を細胞表面全体に行き渡る程度の量加え、37°Cの CO₂ インキュベーター(5% CO₂)内に静置する*。
- 4) 顕微鏡下で細胞が剥がれているのを確認した後、フラスコを軽くたたいて細胞を壁面から完全に剥がす。増殖用培地 5 ml を加え、泡立てないようにピペティングして細胞を分散させる。細胞を回収し、800 rpm (125g) で 5 分間遠心した後、上清を吸引除去し、新たに 10 ml の増殖用培地を加える。
- 5) 増殖用培地 10~20 ml を加えた新しい 75 cm² プラスチックフラスコに細胞分散液 2 ml (おおよそ 1×10⁶ 細胞数/ml に相当) を植え込み、37°Cの CO₂ インキュベーター(5% CO₂)で培養する。3~4 日で単層の細胞シートを形成する。12.5 cm² プラスチックフラスコに播種する場合は、この細胞分散液 0.5 ml を、増殖用培地 2 ml を加えた新しいフラスコに植え込み培養する。2~3 日で単層の細胞シートを形成する。

*細胞ロットによっては数分で円形化が観察される場合もあるため過剰なトリプシン処理をしないように注意する。また、30 分以上経過してもほとんどの細胞の形態に変化のない場合には、トリプシン/EDTA 溶液を追添加して、再び 37°Cに保温する。

3.1.4 細胞ストックの作製

細胞は、継代数を重ねすぎると性質が変化したり、作業途中の事故等でコンタミさせてしまったりすることがあるため、継代歴の新しいもので細胞のストックを作製しておく必要がある。ある一定の継代歴になれば、細胞を廃棄し、細胞ストックからあらたに起こした細胞を使用することで一定の分離効率を維持する事ができる。継代を重ねすぎた細胞ではインフルエンザウイルスの増殖性が低下することもある。

*細胞凍結(細胞ストックの作製)

- 1) 継代時の方法と同様に 4) の遠心まで行い、上清を除去した後、凍結用培地 (Recovery Cell Culture Freezing Medium (GIBCO BRL Cat. #12648-010) に、 $>1 \times 10^6$ cells/ml の濃度で浮遊させる。
- 2) 2 ml のセラムチューブに 1 ml ずつ分注し、徐々に凍結させるため、凍結処理容器 (バイセル(日本フリーザー(株))等、無ければ厚いタオル等で包む) に入れ、-80°Cで 1 晩凍結する。
- 3) 翌日、液体窒素タンクに移動させる。

感染研では、細胞のマスターストックは 50 本、ワーキングストックは 100 本作製している。通常ワーキングストック細胞を使用し、継代歴が 25 代になると廃棄し、あらたにワーキングストックを起こして使用している。ワーキングストックが無くなった場合にはマスターストックからワーキングストックを作製する。

*ストック細胞の起こし方

- 1) 液体窒素タンクに保管している細胞チューブを取り出したら、37°Cのウォーターバスにチューブを浸け、すみやかに融解する。凍結用培地に DMSO が含まれている場合は、チューブ内の全量をスピッツ管等に移して、800 rpm(125g)で 5 分間遠心した後、凍結用培地を吸引除去し、少量の増殖用培地で泡立てないようにピペティングして沈査を崩す。
- 2) 増殖用培地 15 mlを加えた 75 cm² プラスチックフラスコに凍結用培地を取り除いた細胞液を加え、37°C の CO₂ インキュベーター(5% CO₂)で培養する。
- 3) 24 時間後、上清を吸引除去し、新しい増殖用培地 15 ml を加え、細胞が単層を形成するまで 37°C の CO₂ インキュベーター(5% CO₂)で培養する。

3.2 インフルエンザウイルスの分離

3.2.1 器具および試薬

MDCK 細胞の単層培養(組織培養用 12.5 cm² プラスチックフラスコ*)

DMEM 液体培地(SIGMA Cat. #D6429)

ペニシリン/ストレプトマイシン(GIBCO BRL Cat. #15140-122)

ファンギゾン(GIBCO BRL Cat. #15290-018)

リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-)) (GIBCO BRL Cat. #14190-144)

アセチルトリプシン(SIGMA Cat. #T6763)

* 24 ウェルマルチプレートを使用する場合、使用ウェルの間隔を空けることで交叉汚染を避けることが可能。不可能な場合、1 ml/tube(池本理化工業 Cat. #802-135-01)の使用が多検体の処理に適する。

※上記試薬類は感染研でウイルス分離効率を検討し使用しているものであるが、他のメーカーのものに替えても差し支えない。

3.2.2 試薬の調整

分離用培地

試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 µg/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 µg/ml	1 ml

3.2.3 ウイルス分離方法

- 1) 単層を形成した細胞の培地を吸引する。
- 2) PBS (-) 5 ml を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。分離用培地で同様に洗浄した後、接種試料 0.1～0.2 ml を細胞に接種する*。
- 3) 10 分おきに容器をゆすって、ウイルスを吸着させる。ウイルスの吸着は 34°C の CO₂ インキュベーター内で行う。
- 4) 30～60 分後**、トリプシン (0.5～5 µg/ml) ***を含む分離用培地 2.5 ml を加え、34°C の CO₂ インキュベーターで培養する。
- 5) 細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を毎日顕微鏡下で観察する。
- 6) CPE が出現したところで培養上清を回収する。6 日目あるいは 7 日目になったら、CPE 出現の有無にかかわらず培地を採取する。

*細胞が乾燥しないよう接種材料をすばやく細胞全体に広げる。

**試料はウイルス吸着後取り除いた方がよい。

***トリプシン濃度は細胞やトリプシンのロットによって異なるので、予め予備試験を行い、細胞が 1 週間程度単層形成を維持できる濃度の最大量を用いる。

(別法) MDCK 細胞浮遊法でのウイルス分離

0.1% BSA および 2.5 µg/ml アセチルトリプシン加 DMEM で MDCK 細胞数を 1×10^6 /ml に調整し、その 0.5 ml を 24 ウェルマルチプレートに分注し、同時に検体 0.1 ml を接種する。34°C で培養する。

3.2.4 判定方法

培養上清中の HA 活性を測定する。方法については「5.1 赤血球凝集 (HA) 試験および赤血球凝集阻止 (HI) 試験の実際」の項を参照。

3.2.5 ウイルスの継代培養

HA 活性が検出されなかった場合は、回収したウイルス培養液を 10 倍に希釈し、別に用意した培養細胞に接種する。これを数回繰り返す。弱い CPE や低い HA 価が確認されたウイルス培養液は 100 倍程度に希釈して接種する。

3.2.6 保存方法

ウイルス液は 3000 rpm、5 分間遠心し、細胞の破片を除いた後分注し-70°C 以下に保存する。

(参考) A(H1N1)pdm09 ウイルスの培養における分離用培地の比較について

細胞で培養継代を繰り返しても 8 HA/ml に満たない A(H1N1)pdm09 ウイルス株の検出が 2010/11 シーズンに相次いだ。国立感染症研究所では、インフルエンザウイルスの MDCK 細胞における増殖効率を改善するため、種々の培地について検討した。その結果、DMEM 培地を用いた培養で A(H1N1)pdm09 ウイルスの増殖が顕著に改善されることが分かった(表 1)。

表 1 A(H1N1)pdm09 ウイルスの培養における培地の比較

ウイルス	培地	接種後 3 日目		接種後 4 日目		接種後 6 日目		接種後 7 日目	
		CPE	HA 価	CPE	HA 価	CPE	HA 価	CPE	HA 価
A(H1N1)pdm09 ウイルス #1	DMEM	++	8	++	32±	+++	32±	+++	16±
	MEM	-	<2	+	2±	+	2±	+	2±
A(H1N1)pdm09 ウイルス #2	DMEM	++	16±	++	32±	+++	16±	+++	16±
	MEM	-	<2	+	2±	+	2±	+	2±
A(H1N1)pdm09 ウイルス #3	DMEM	+	16±	+	32±	+	16	++	32±
	MEM	-	<2	+	2±	+	2±	+	2±
A(H1N1)pdm09 ウイルス #4	DMEM	++	8	++	32±	+++	32±	+++	32±
	MEM	+	2±	+	2±	+	2±	+	2±
A(H1N1)pdm09 ウイルス #5	DMEM	+++	16	+++	32±	+++	32	+++	64±
	MEM	+	2±	+	2±	+	2±	+	2±

(参考) AX-4 細胞を用いたインフルエンザウイルス分離について

近年 A(H3N2)亜型ウイルスを MDCK 細胞で分離培養した場合の分離効率低下が懸念されている。ヒトインフルエンザウイルス受容体 α -2, 6 シアル酸を過剰発現させた改変 MDCK 細胞である AX-4 細胞(J Clin Microbiol 43: 4139-4146)を用いてウイルス分離を行った場合、分離効率、回収ウイルス力価に改善が認められる例がある。MDCK 細胞でのウイルス分離成績が思わしくなく、AX-4 細胞の使用の検討を行いたい場合、当該細胞は細胞樹立機関との試料移動合意書(Material Transfer Agreement; MTA)締結後に細胞の分与配布が可能である。分与希望や AX-4 細胞の継代維持法および AX-4 細胞でのウイルス分離法の詳細については、国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター第 1 室まで照会のこと。

4. 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離

ヒトの咽頭拭い液等の接種材料からインフルエンザウイルスを孵化鶏卵で分離培養するには、羊膜腔内接種法が最も適している。一方、卵に馴化したウイルスの増殖には、ウイルス液量を確保できることから、尿膜腔接種法が適している。

4.1 羊膜腔内接種法

4.1.1 孵化鶏卵

卵齢： 通常、8～9 日卵を用いる。

A(H3N2)ウイルスの分離には、ボリスブラウン(商品名)の 14 日卵が適している。

4.1.2 検卵

- 1)暗室等にて孵化鶏卵に強い光源を当て、光源の反対側より孵化鶏卵の内部を観察し、発育状態を確かめ、胎仔側の気室と卵殻膜との境目に、なるべく血管の少ない部分に印(ライン)を付ける(図 1)
- 2)検卵した卵を卵台に気室を上になる様に垂直に立てる。

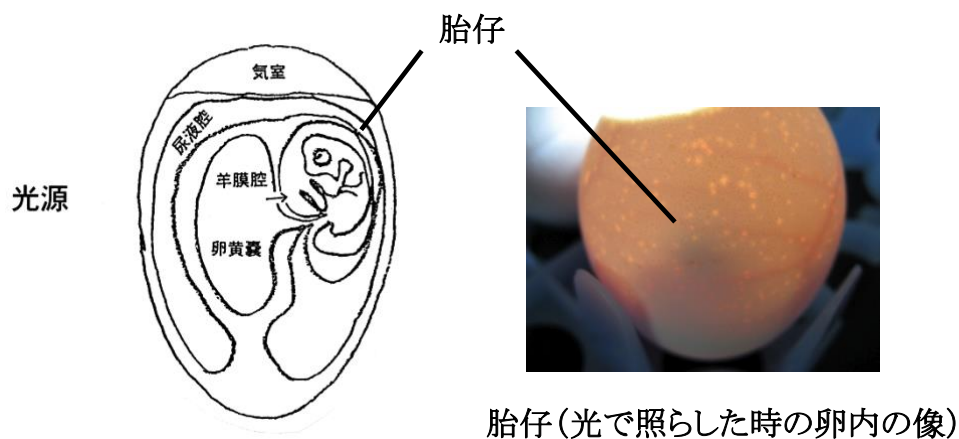


図 1 検卵

4.1.3 検体接種

- 1) 卵殻上部気室部を中心にヨードチンキで清拭*、ついで 70%アルコールで消毒する。
- 2) 印より 約 1 cm 上部に消毒したハサミ等にて、直径約 1 cm になるように卵殻を取り除き 小窓をあける。
- 3) 卵殻膜を透明にし、胎仔の位置を把握する為、高圧滅菌したサラダオイルまたは 50%PBS 加グリセリン 溶液を約 0.1 ml 小窓より滴下する。または卵殻膜を取り除く。
- 4) 接種材料を注射器に吸い入れ、小窓より確認した胎仔の側に、検卵しながら注射針を刺し入れ、注射針の位置を確認後、羊膜腔内に 0.1 ml 接種する(図 2) (羊膜腔内に注射針の先端が入っているのかを確認する方法は、注射針に少量の空気を入れ羊膜腔内に針を刺し入れた際に空気を出す。羊膜腔内に針が入っていない場合には、空気が泡となって上昇して来る事が卵殻膜越しに確認出来る。また羊膜腔内に針が入っている場合には、泡はそこに留まる。)

羊膜腔内に染色液を接種した時の像

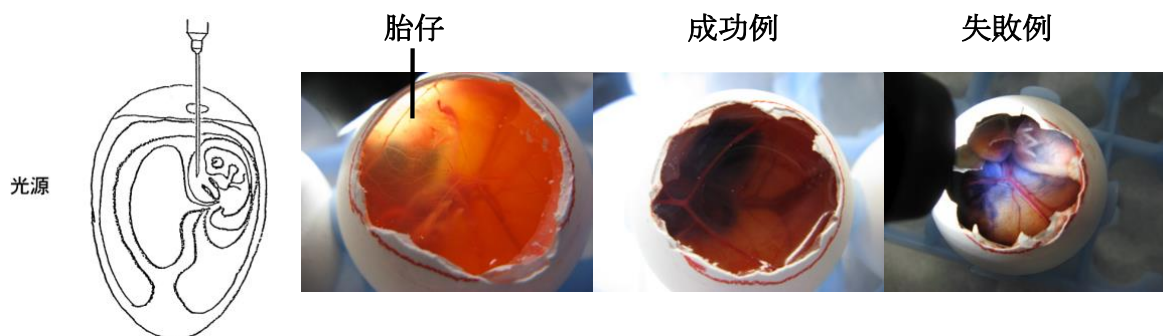


図 2 羊膜腔内接種法

- 5) 羊膜腔内に接種後、卵殻気室部の小窓をセロテープ***にて塞ぐ。

*省略してもよい。

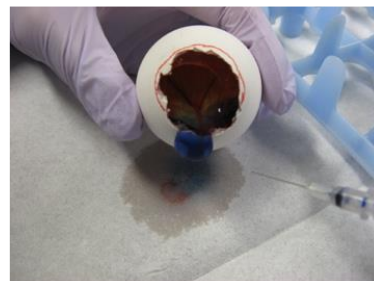
***セロテープは無菌ではないので、卵液が付着しないように注意する。

4.1.4 培養

気室を上にした状態で静置し、加湿して 34℃にて、おおよそ 48 時間培養する。接種後 24 時間目で検卵し、死亡していた場合は、羊水を継代する。

4.1.5 羊水採液

- 1) 一夜、4℃に静置した培養卵の卵殻上部気室部を中心に、ヨードチンキで清拭*、ついで 70%アルコールにて噴霧消毒後、消毒したハサミ等にて気室部全体の卵殻を取り除く。
- 2) 卵殻膜を消毒したピンセットにて取り除いた後、採液用の注射器の針にて、漿尿膜を破り、卵を傾け漿尿液を滅菌シャーレ等に捨てる。
- 3) 胎仔を卵の外に出さない様に注意しながら、さらに卵を傾けると、羊膜に包まれた胎仔が羊水とともに露出して来るので、風船状に膨らんだ羊膜腔から羊水を採液する(右図参照)。なお採液される羊水の量は 1 ml 前後である。



*省略してもよい。

4.1.6 判定

羊水中の HA 活性を測定する。方法については「5.1 赤血球凝集 (HA) 試験および赤血球凝集阻止 (HI) 試験の実際」の項を参照。

4.1.7 ウイルスの継代培養

HA 活性が検出されなかった場合は、回収した羊水を 10 倍に希釈して再び羊膜腔内に接種する。これを数回繰り返す。低い HA 価が検出された場合は、羊水を 100 倍程度に希釈して接種する。

4.2 尿膜腔内接種法

4.2.1 孵化鶏卵

卵齢:10~11 日齢。検卵は羊膜腔内接種法に準じる。

4.2.2 検体接種

- 1) 検卵が済んだ孵化鶏卵を、卵台に気室を上になる様に垂直に立て、卵殻上部気室部の印(ライン)を中心にヨードチンキで清拭*、ついで 70%アルコールで消毒する。
- 2) 印(ライン)より 5 mm 程上部に、消毒した千枚通し等を卵殻に当て、ゆっくり左右に回して径 1 mm 弱の小穴を開ける。
- 3) 接種材料を PBS(ペニシリン 100 単位/ml・ストレプトマイシン 100 µg/ml を含む。)にて通常 10 倍~1000 倍に希釈し、希釈段階毎に数個ずつ接種する。
- 4) 接種量は 0.1~0.2 ml/個。接種後小穴を木工ボンド、加熱融解させた少量のパラフィン等にて塞ぐ。

*省略してもよい。

4.2.3 培養

羊膜腔内接種法に準じる。

4.2.4 尿液採液

- 1) 一夜4℃に静置した培養卵の卵殻上部気室部を中心に、ヨードチンキで清拭*、ついで70%アルコールにて噴霧消毒後、消毒したハサミ、ピンセット等にて気室部の卵殻を大きく取り除く。
- 2) 血管、卵嚢を傷つけない様に注意しながら、太めの注射針(18 ゲージ)を付けた注射器にて尿液を採液する。なお採液される尿液の量は5～10 mlである。

*省略してもよい。

4.2.5 判定

尿液中の HA 活性を測定する。方法については「5.1 赤血球凝集(HA)試験および赤血球凝集阻止(HI)試験の実際」の項を参照。

4.2.6 保存法

分注して-70℃以下に保存する。

5. 赤血球凝集阻止(HI)試験によるインフルエンザ分離株の同定

インフルエンザ様疾患の患者から得られたスワブ等を、孵化鶏卵や MDCK 細胞等の培養細胞に接種することによって得られた検体に赤血球凝集活性が認められた場合、インフルエンザウイルスの存在を確認するために同定試験を行う必要がある。培養上清や鶏卵由来の羊水や漿尿液中のインフルエンザウイルスの同定には、市販のインフルエンザウイルス同定キット(後述)や亜型特異的な抗体、型・亜型特異的 RT-PCR 法(後述)などを利用する。これらの方法は、インフルエンザウイルスの型別(前者)や、A 型ウイルスの亜型の判別などに有効であり、分離されたウイルスの同定という目的を十分達成することが出来る。

国立感染症研究所(感染研)では、毎年インフルエンザシーズンに先駆けて当該シーズンのワクチン株および疫学的に重要であると考えられる株に対する抗血清を作製し、その抗原とともに要望のある地方衛生研究所に配布している。HI 試験の実施にあたり、血清中に存在する非特異的な血球凝集阻害物質および非特異的血球凝集物質を取り除くための操作が必要であり、試験実施機関における試験の信頼性、再現性を確保するためには、これらの操作が適切に行われる必要がある。さらに試験毎に参照抗原および被検抗原の抗原量が厳密に調整されるとともに、試験結果の判定基準が常に一定であることが、試験の信頼度を高めることになる。したがって、これらの条件が十分保証される施設においては HI 試験がインフルエンザウイルスの同定に最も適した試験方法であるため WHO による世界的なインフルエンザのサーベイランス活動においてもこの方法が採用されている。

5.1 赤血球凝集 (HA) 試験および赤血球凝集阻止 (HI) 試験の実際

5.1.1 インフルエンザウイルス同定キット

同定キットに含まれる抗血清は、当該シーズンのワクチン株および疫学的に重要であると考えられるウイルスをウサギまたはフェレットに接種し、その血清を凍結乾燥させたものである。抗原は、抗血清の作製に用いたものと同じウイルスの感染しょう尿液を不活化したものである。

5.1.2 試薬

血球浮遊液 (七面鳥、鶏、ヒト O 型またはモルモット血球)

滅菌蒸留水

0.01M リン酸緩衝液 (PBS) (pH7.2)

生理食塩水、0.85% NaCl

使用する赤血球の選択に際しては、臨床検体から分離されたインフルエンザウイルスの血球凝集性が流行シーズンや継代歴によって変化することを念頭に置く必要がある。細胞で分離された最近の A(H3N2) 分離株はモルモット血球に対しては感受性が高いが、鶏および七面鳥血球に対する感受性は極めて低い株が多く見受けられる。B 型については、モルモット血球よりも鶏および七面鳥血球に対して反応性の良い株が見受けられることと、七面鳥血球とフェレット血清の組み合わせでは非特異凝集と非特異抑制が認められることがわかった。これらの点を考慮して、2011/12 シーズンより感染研では、A(H1N1)ソ連型、A(H1N1)pdm09 には七面鳥血球を、B 型には鶏血球を、A(H3N2)にはモルモット血球を用いて HA と HI 試験を行っている。モルモット血球にはロット差がまれに見られるため、3 ロットの血球を混合し使用している (表 1)。A(H1N1)ソ連型、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B に同一種の血球を使用する場合にはモルモット血球が推奨される。血球選択における注意点としては、同一検体においても異なる血球を用いることによって 4 HA を示す抗原量が異なるため、HA および HI の一連の試験は同一種の血球で行う必要がある。また、血球浮遊液の至適濃度は血球種によって異なり、一般的に、七面鳥、鶏は 0.5%、ヒト、モルモット血球は 0.75% の濃度で使用する。鳥類の血球は 45 分間反応させ、哺乳類の血球は 60 分間反応させる。このように血球種の違いによって、至適濃度および反応時間が異なる。ただし、感染研ではモルモット血球浮遊液を 1% で使用している。血球の濃度が濃くなると HA 価はわずかに低くなるが、HA および HI 像の判定が容易になるためである。全ての血球で U 底マイクロプレートより、V 底マイクロプレートを用いたほうが、血球がきれいに日の丸状になり、判定が容易になる。A(H3N2) のウイルス株 (例: A/Victoria/210/2009 (H3N2)) によっては NA 活性により、室温での HA 像が消失する株があり、感染研ではこの現象を防ぐため 4°C で HA、HI の反応を行っている。ここでは、感染研が行っているモルモット血球を用いた方法について記載する。

表 1 感染研で使用する血球種、濃度、反応条件

型／亜型	血球種	血球濃度(%)	血球との反応条件
A(H1N1)pdm09	七面鳥血球	0.5%	4℃
A(H3N2)	モルモット血球(3 ロット混合)	1.0%	4℃
B	鶏血球	0.5%	室温

5.2 血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去

感染研から分与する同定用抗血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去には以下の方法(RDE法)を用いる*。

- 1)凍結乾燥血清を指定量の滅菌蒸留水で溶解する。溶解した血清は-20℃以下の冷凍庫で保存する。
- 2)RDE(II)「生研」(デンカ生研)に滅菌生理食塩水 20 ml を加えて溶解する。
- 3)一容の血清に三容の RDE を加える(例 0.3 ml 血清+0.9 ml RDE)。
- 4)37℃のウォーターバスで 18 時間から 20 時間作用させた後、56℃のウォーターバスで 30 分から 1 時間加熱し、RDE を不活化する。
- 5)室温に冷却した後、6 容の滅菌生理食塩水を加え、最終希釈を 10 倍とする。
- 6)モルモット血球(GRBC)の packed cells (HA、HI 試験に用いるものと同種の赤血球)を、10 倍希釈した血清 10 容に対して 1 容加え、緩やかに転倒混和する。
- 7)室温 1 時間で、吸収する。途中転倒混和することで血球が沈殿しないようにする。
- 8)2500～3000rpm (1940g) で 5～10 分間遠心し、血清と血球を分離する。
- 9)吸収済血清と血球を反応させて、吸収が完全に行われたことを確認する**。
- 10)吸収が不完全な場合は、6.からの操作を吸収が完全になるまで繰り返す。

*血清中の非特異的血球凝集阻止因子の性状および特異性は、血清ごとに異なり、また RDE のロットごとに RDE 活性が異なることを考慮する必要がある。このため、全量の抗血清を処理するに先立ち、RDE 処理および血球吸収によって、使用する抗血清の非特異反応が完全にのぞけるかどうかを、少量の抗血清を用いて事前に確認するべきである。不完全な RDE 処理や血球吸収による非特異反応は HI 試験の信頼性を著しく低下させる。

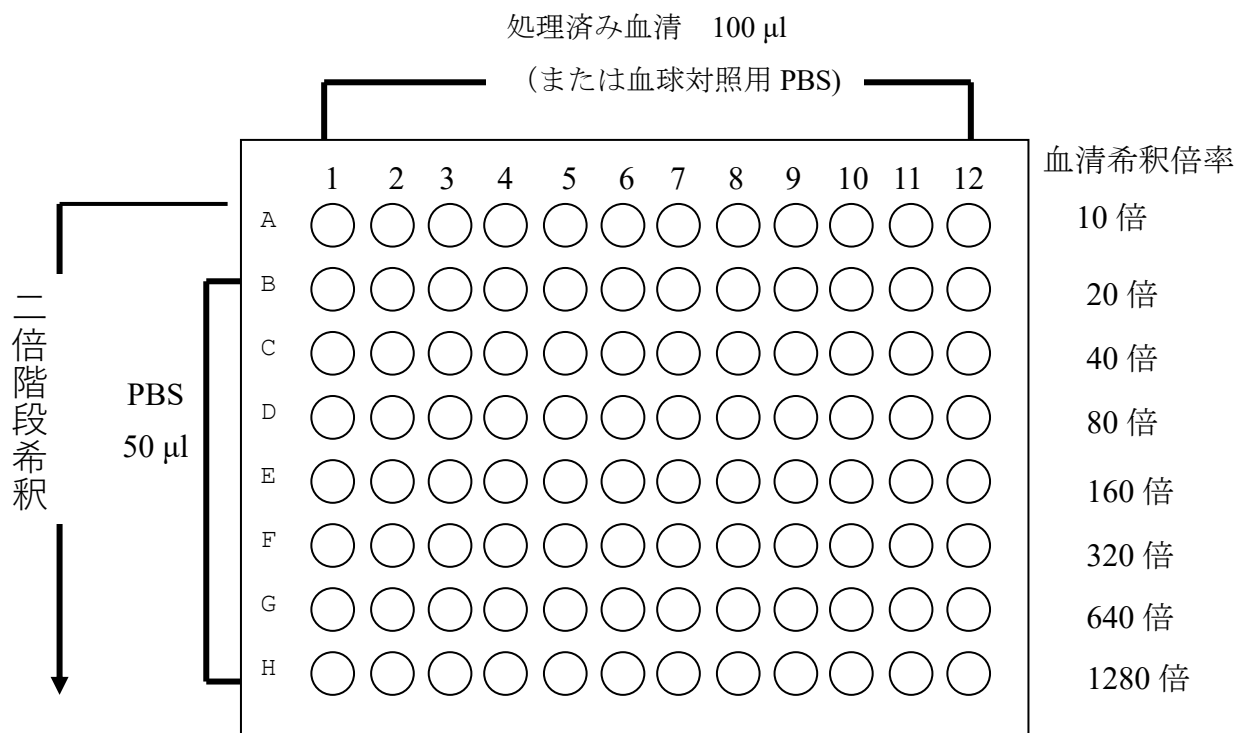
血清診断を行う場合には血清および抗原の種類によって、非特異的血球凝集阻止因子の除去方法としていずれの方法が適しているか(RDE 法、トリプシン過ヨウ素酸法等)を検討する必要がある。

****非特異的血球凝集因子の除去の確認法:**

- 1) マイクロプレートの B 列から H 列まで、PBS (pH7.2) 50 μ l を加える。
- 2) A 列のそれぞれのウェルに 100 μ l の処理済み血清を加える。一列は血球対象として血清の代わりに、100 μ l の PBS を加える。
- 3) A 列から 50 μ l を取り、B 列から H 列まで二倍の階段希釈を行う。
- 4) 全てのウェルに 50 μ l の 1%GRBC を加え、4°C で 60 分間反応させる。
- 5) 血清存在下で血球対照と同様に血球が沈殿するかどうかを判定し、非特異的血球凝集因子が除かれたかどうかを調べる。
- 6) さらに、交差反応を示さない亜型の抗原を用いて HI 試験を行い非特異的な血球凝集阻止因子が RDE 処理によって、完全に除去されたかどうかを調べる。

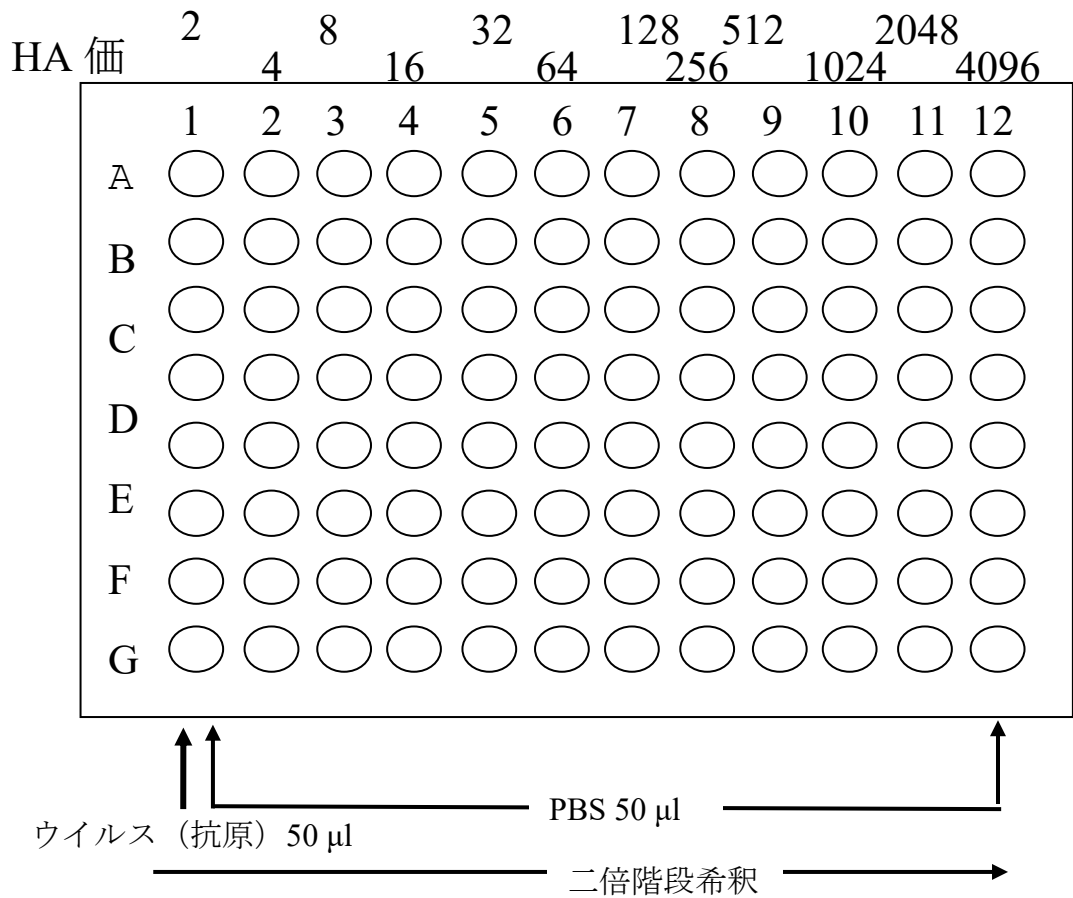
(参考) 感染研から配布される分離株亜型同定用キット抗血清の血球吸収処理について

例年感染研から各地衛研に配布される分離株亜型同定用キットの抗血清(ウサギ免疫血清)について、血球吸収処理をモルモット血球で行った場合、非特異的な血球凝集抑制が認められ、B 型ウイルスの同定に差し障りが生じることが分かった。この現象はモルモット血球で吸収処理した血清と B 型の細胞分離株を反応させた場合に特に顕著に認められる。従来、型・亜型不明のインフルエンザウイルスの同定を HI 試験で行う場合には、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ウイルスのいずれとも反応するモルモット血球の使用を推奨しているが、その際にはモルモット血球による血清の血球吸収処理は行わないことが望ましい。血球吸収処理を行わない場合、HI 試験時の非特異的血球凝集が懸念されるが、事前の試験により非特異的血球凝集の有無を確認し、その結果を考慮しながら HI 価の判定を行う。



HA 価の測定: (1 プレート 8 株 1:2 から 1:4096 まで測定)

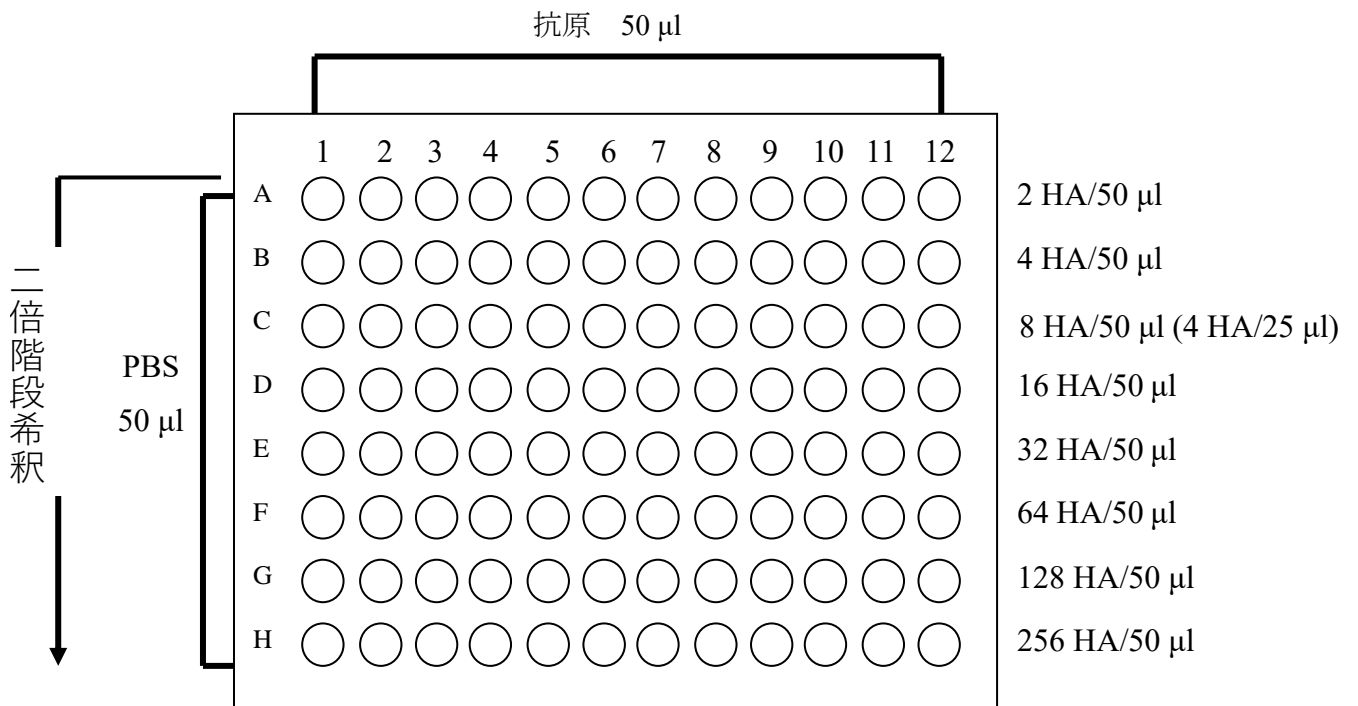
- 1) 50 μ l の PBS を全てのウェルに分注する。
- 2) ウイルス原液 50 μ l を 1 列目の各ウェルにそれぞれ加える。1 ウェルは血球対照としてウイルスの代わりに、PBS を 50 μ l 加える。
- 3) 1 列目の各ウェルをよく混和後、50 μ l をとり、順次 2 倍階段希釈を行う。
- 4) 全ウェルに 50 μ l の 1%GRBC を加える。
- 5) 低速で攪拌後、4°C で 60 分反応後、判定。完全凝集を与えるウイルス希釈の最高値の逆数を HA 価とする。



5.3 4 HA/25 μl 抗原液の作製 (1 プレート 12 株)

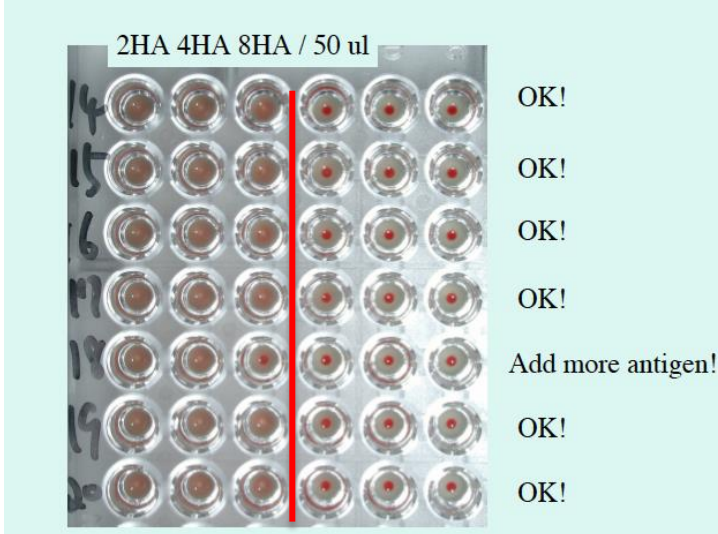
- 1) 上で求めた HA 価を 8 で割って、4 HA/25 μl 抗原液の作製に必要な抗原原液の希釈倍率を求める。すなわち抗原原液の HA 価が 64 の時は、原液を 8 倍希釈したものが計算上、4 HA/25 μl 抗原液となる。
- 2) 一回の試験に必要な抗原液の量をもとに PBS で、抗原原液を希釈して 4 HA/25 μl 抗原液を作製する。
- 3) 50 μl の PBS を全てのウェルに分注。
- 4) A 列にそれぞれ希釈した 4 HA/25 μl 抗原液 50 μl を加える。
- 5) A 列の各ウェルをよく混和後、50 μl をとり順次 2 倍階段希釈を行う。
- 6) 50 μl の 1%GRBC を加える。
- 7) 低速で攪拌後、4°C で 60 分反応後、判定。
- 8) 3 ウェル目まで完全凝集を認めれば O.K. 完全凝集でない場合は希釈液をもとに再調整後、再度 HA 価を測定する。*

*調整した 4 HA/25 μl 抗原液は、必ず back titration で力価を確認した後、その日のうちに HI 試験に供する。4°C で一晩以上保存した場合は、HI 試験実施前に HA 価の再確認をすること。

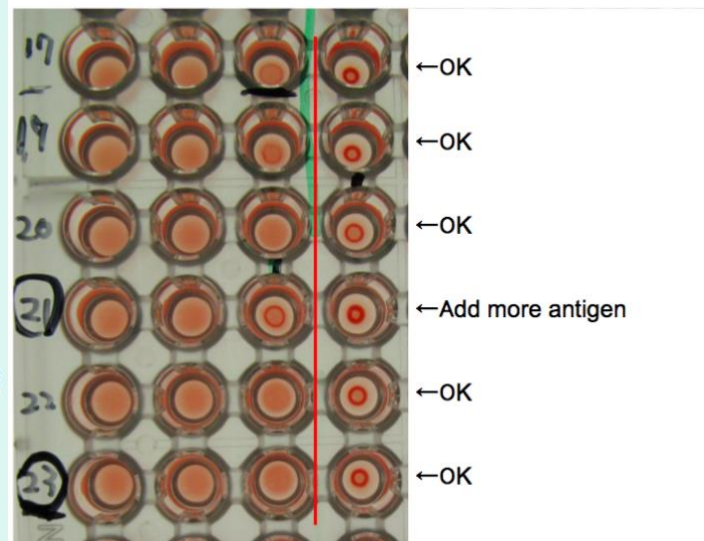


七面鳥血球の 8 HA/50 μ l (4 HA/25 μ l)例

Back titration for 4HA unit standardized antigen



GRBC の 8 HA/50 μ l (4 HA/25 μ l)



5.4 HI 試験

- 1) 25 μ l の PBS をウェル 2 から 12 まで分注する。
- 2) 50 μ l の 1:10 希釈抗体をウェル 1 に分注する。
- 3) ウェル 1 から 25 μ l とり、ウェル 12 まで 2 倍階段希釈する。
- 4) 各ウェル 25 μ l ずつ 4 HA/25 μ l のウイルス抗原を分注する。
- 5 低速で攪拌後、室温で 60 分以上反応後、50 μ l の 1% GRBC を加える。
- 6) 低速で攪拌後、4°C で 60 分反応後、プレートは傾けずに判定。*

*抗体価は、完全に凝集阻止を示す抗体の最高希釈倍率の逆数とする。また、抗体の希釈倍率とは、2 倍階段希釈終了後の抗体の希釈倍率で、抗原液、血球浮遊液による抗体の希釈は考慮に入れないものとする。0.5%七面鳥血球を用いた場合、血球凝集阻止の判定の際には、45 分後にプレートを傾けて、沈降した血球が血球対象と同様にウェル内で涙目状に流れるものを陽性とする。

5.5 判定

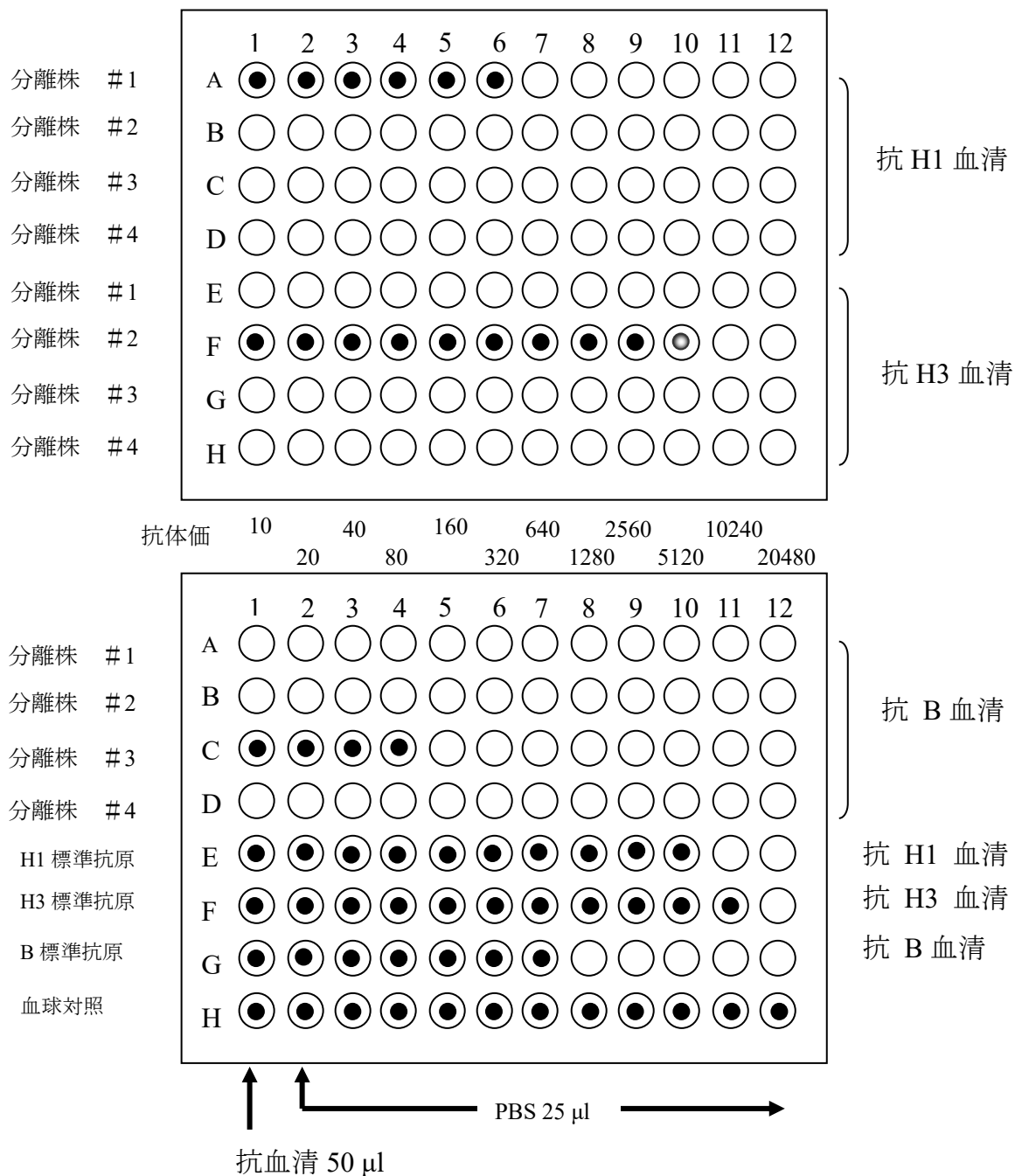
例（下表・次ページ図参照）

	血清 HI 価			判定
	抗 H1 血清	抗 H3 血清	抗 B 血清	
分離株 #1	320	< 10	< 10	H1
分離株 #2	< 10	2560*	< 10	H3
分離株 #3	< 10	< 10	80	B
分離株 #4	< 10	< 10	< 10	判定不能**
H1 標準抗原	5120	< 10	< 10	-
H3 標準抗原	< 10	10240	< 10	-
B 標準抗原	< 10	< 10	640	-

注意:

*:分離株 #2 の抗 H3 血清に対するウェル 10 の反応のように不完全な凝集阻止が認められた場合は、完全阻止を示す最終希釈(2560 倍)を抗体価とする。

** :分離株 #4 の様に標準抗血清のいずれとも反応が認められない場合、インフルエンザウイルスではない可能性も考えられるため、インフルエンザ診断キットや RT-PCR 法などによってインフルエンザ A 型、B 型のいずれで(可能であれば亜型まで)あるかを決定する。



(参考) A(H3N2)亜型分離株の亜型同定および抗原性解析手法について

近年の A(H3N2)亜型野外株は赤血球凝集能が極めて微弱であり、HI 試験を行うことが困難である例が高頻度に認められている。この場合、分離株の亜型同定はリアルタイム PCR といった遺伝子解析手法やウイルス中和試験を代替として実施する必要がある。現在、感染研インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センターでは分離株の抗原性解析にウイルス中和試験を HI 試験の代替手法として採用している。これら代替手法の詳細については、国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター第 1 室まで照会のこと。

6. ウイルス遺伝子検出法によるインフルエンザウイルスの同定

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法などの遺伝子増幅法は、遺伝子検査にとって今日では欠くことのできない重要な分子生物学的手法であり、種々のウイルス遺伝子の検出にも幅広く利用されている。この章では、臨床検体またはウイルス培養液からの RNA 抽出方法、TaqMan Probe を用いたリアルタイム RT-PCR 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型同定法、参考として Conventional RT-PCR 法や Direct RT-LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を用いた A 型および A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルスの同定法について述べる。

6.1 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出

6.1.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(200、1000 μ l)、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ(1.5 ml)、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN Cat#52904、52906)

6.1.2 RNA 抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行う場合のプロトコールを下記に示した。なお、注意事項、詳細についてはキットに付属のマニュアルを参照すること。

- 1) 140 μ l の検体またはウイルス培養液をキャリア RNA 添加済みの Buffer AVL 560 μ l へ添加し、15 秒間ボルテックスし、室温で 10 分間インキュベートする。
- 2) スピンドアウンした後、100%エタノール 560 μ l を添加し、15 秒間ボルテックスする。再びスピンドアウンして溶液を回収する。
- 3) 混合液 630 μ l を QIAamp スピンカラムに注入し、キャップを閉めて 6000 \times g(8000rpm)で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移す。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。この作業をもう一度繰り返す。
- 4) Buffer AW1 500 μ l を添加し、キャップを閉めて 6000 \times g(8000rpm)で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。
- 5) Buffer AW2 500 μ l を添加し、キャップを閉めてフルスピード(20000 \times g、14000rpm)で 3 分間遠心する。
- 6) カラムを新しいコレクションチューブに移し、フルスピード(20000 \times g、14000rpm)で 1 分間遠心する。
- 7) カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、Buffer AVE 60 μ l を添加する。キャップを閉めて室温で 1 分間インキュベートした後、6000 \times g(8000rpm)で 1 分間遠心する。

抽出した RNA は速やかに遺伝子検査に使用し、保存する場合はできるだけ-70 $^{\circ}$ C以下で保存する。

6.2 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定

インフルエンザウイルス遺伝子は一本鎖の RNA であるため、PCR 反応のためにウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を reverse transcriptase (RT) で合成する必要がある。ここでは RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う TaqMan Probe を用いたリアルタイム One-step RT-PCR 法により、季節性インフルエンザウイルスの型(A 型・B 型)・亜型(H1pdm09・H3)を同定する方法ならびに B 型インフルエンザウイルスの系統(ビクトリア系統・山形系統)を識別する方法を示す。一連の反応は 1 チューブ内で連続的に行い、増幅産物をリアルタイムに検出するため電気泳動が不要であり、conventional RT-PCR 法と比べて、判定までにかかる時間を短くすることができる。また通常は、反応後のチューブを開ける必要がないので、電気泳動等のポスト PCR 操作によるコンタミネーションの可能性がなく、コンタミネーションによる偽判定のリスクを減らす事ができる。

6.2.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(2、20、200、1000 µl)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※1}、滅菌微量遠心チューブ(1.5 ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プローブ、RNase Inhibitor 20Units/µl(100 µL) (Thermo Fisher Scientific Cat#N8080119)、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204443, 204445) もしくは AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher Scientific Cat#AM1005, 4387424, 4387391)

※1 RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

6.2.2 リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて

以下に感染研で使用しているプライマーおよびプローブを示す。

(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs	5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ: 146bp

(H1pdm09^{*2} 亜型同定用)

H1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

NIID-swH1 TMPrimer-F1	5'-AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT
NIID-swH1 TMPrimer-R1	5'-TGTTTCCACAATGTARGACCAT
NIID-swH1 Probe2	5'-(FAM)CAGCCAGCAATRTRCATTACC(MGB)

PCR 産物の長さ: 187bp

^{*2} H1pdm09 の HA 遺伝子をターゲットとしており、H1 ソ連型の HA 遺伝子には反応しない。

(H3 亜型同定用)

H3 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

NIID-H3 TMPrimer-F1	5'-CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA
NIID-H3 TMPrimer-R1	5'-GTCATTGGGRATGCTTCCATTTGG
NIID-H3 Probe1	5'-(FAM)AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG(MGB)

PCR 産物の長さ: 178bp

(B 型同定用)

Type B NS 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

NIID-TypeB TMPrimer-F1	5'-GGAGCAACCAATGCCAC
NIID-TypeB TMPrimer-R1	5'-GTKTAGGCGGTCTTGACCAG
NIID-TypeB Probe2	5'-(FAM)ATAAACTTYGAAGCAGGAAT(MGB)

PCR 産物の長さ: 105bp

(B 型ビクトリア系統同定用)

Type B ビクトリア系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

TypeB HA F3vic v2	5'-CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATG
TypeB HA R3vic v2	5'-GTTGATARCCTGATATGTTCGTATCCTCKG
FAM-Type B HA Victoria	5'-(FAM)TTAGACAGCTGCCTAACC(MGB)

PCR 産物の長さ: 98bp

(B 型山形系統同定用)

Type B 山形系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

TypeB HA F3yam v2 5'-CCTGTTACATCCGGGTGCTTYCCTATAATG

TypeB HA R3yam v2 5'-GTTGATAACCTKATMTTTCATATCCTCTG

FAM-Type B HA Yamagata2 5'-(FAM)TCAGRCAACTACCCAATC(MGB)

PCR 産物の長さ: 98bp

6.2.3 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) 反応

6.2.3.1 QIAGEN 社の QuantiTect® Probe RT-PCR kit を用いた反応条件

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量	最終濃度
2×QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5µl	1×
Forward primer (10µM)	1.5µl	0.6µM
Reverse primer (10µM)	1.5µl	0.6µM
Probe (5µM)	0.5µl	0.1µM
QuantiTect RT Mix	0.25µl	
RNase Inhibitor (20U/µl)	0.1µl	
RNase free Water	3.65µl	
RNA template	5µl	
Total 容量	25µl	

<反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下に、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe RT-PCR Kit、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システム、Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 を使用する場合の反応条件を示した。

Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

(Standard モードで使用)

50°C	30min.	
	↓	
95°C	15min.	
	↓	
94°C	15sec.	} ×45 cycles
56°C	75sec. (Data Collection)	

LightCycler 480 を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	30min.	4.4	None
Denature	None	1	95	15min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	94	15sec.	1.5	None
			56	75sec.	1	Single
Cooling	None		40	30sec.	Max*	None

6.2.3.2 Thermo Fisher Scientific 社の AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents を用いた反応条件
 詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量	最終濃度
2×Mix	12.5µl	1×
Forward primer (10µM)	1.5µl	0.6µM
Reverse primer (10µM)	1.5µl	0.6µM
Probe (5µM)	0.5µl	0.1µM
25×Enzyme Mix	1.0µl	
RNase Inhibitor (20U/µl)	0.1µl	
RNase free Water	2.9µl	
RNA template	5µl	
Total 容量	25µl	

<反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下に、試薬に Thermo Fisher Scientific 社 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システム、Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 を使用する場合の反応条件を示した。

Applied Biosystems QuantStudio 5 または 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合 (Standard モードで使用)

50°C 10min.
↓
95°C 10min.
↓
95°C 15sec.
56°C 30sec. (Data Collection)
72°C 15sec.

} ×45 cycles

LightCycler 480 を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	10min.	4.4	None
Denature	None	1	95	10min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15sec.	4.4	None
			56	30sec.	2.2	Single
			72	15sec.	4.4	None
Cooling	None		40	30sec.	2.2	None

6.2.4 リアルタイム RT-PCR の結果解釈と判定

TaqMan Probe 法は PCR の伸長反応中に、PCR 増幅領域に結合した TaqMan Probe が Taq polymerase の有する 5'→3'exonuclease 活性により分解されて発する蛍光シグナルの強度を測定する事で、リアルタイムに PCR の増幅状態をモニターできる方法である。その蛍光シグナルの強度は増幅反応の進行に伴い指数関数的に増えていき、蛍光シグナルを最初に発するタイミングはサンプル中に存在するターゲットとなる核酸量に依存する。リアルタイム RT-PCR では、蛍光シグナルが立ち上がり閾値を超えた時点の PCR 増幅サイクル数である Ct 値 (Cycle threshold) や増幅曲線の 2 次導関数を求めてそれが最大となるサイクル数である Cp 値 (Crossing point) などが算出される。Ct 値 (Cp 値) を利用することで、検査結果の解析および判定を行うことが可能である。ターゲットとなる核酸が多い場合は、増幅サイクルの初期 (Ct 値 (Cp 値) は小さい) に蛍光シグナルが検出されるが、少ない場合は、増幅サイクルの終盤 (Ct 値 (Cp 値) は大きい) で検出される。系によっては増幅サイクルの終盤で、非特異反応による TaqMan Probe の分解が起きることがある。蛍光シグナルの立ち上がりを確認されたといって、必ずしも特異的にターゲット核酸を検出しているわけではない場合もあるので、検出系の特性を事前に必ず確認する必要がある。また、使用するリアルタイム PCR 装置や試薬等によって、蛍光シグナルの増幅傾向に差がある可能性があることから、事前に必ず検出系の特性を十分に考慮した上で、Ct 値 (Cp 値) の解析方法および判定基準の設定を行う必要がある。

6.3 (参考) Conventional RT-PCR 法による同定

インフルエンザウイルス遺伝子は一本鎖の RNA であるため、PCR 反応のためにウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を reverse transcriptase (RT) で合成する必要がある。ここでは、RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う One-Step RT-PCR 法と電気泳動により、季節性インフルエンザウイルスの型 (A 型・B 型)・亜型 (H1pdm09・H3・H1 ソ連型) を同定する方法を示す。

なお PCR 法は、その検出感度の高さから、特に電気泳動等のポスト PCR 操作については、コンタミネーションの大きな元凶となりうるので、動線も考慮した PCR に適切なラボデザインを行い、検査する人は作業フローをしっかりと確認し、コンタミネーションによる偽判定をしないように細心の注意を払う必要がある。

6.3.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(2、20、200、1000 µl)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※3}、滅菌微量遠心チューブ(1.5 ml)、96well PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップもしくはプレートシール、サーマルサイクラー、プライマー、QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN Cat#210210, 210212, 210215)、RNase Inhibitor 20Units/µl (100 µL) (Thermo Fisher Scientific Cat# N8080119)

※3 RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

6.3.2 プライマーについて

以下に感染研で使用しているプライマーを示す。

(A 型同定用)

Type A/M 遺伝子検出用プライマー:

Type A/M30F2/08 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG

Type A/M264R3/08 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG

PCR 産物の長さ: 244bp

(H1pdm09^{※4} 亜型同定用)

H1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマー:

NIID-swH1 ConvPCR Primer-F1 5'-TGCATTTGGGTAAATGTAACATTG

NIID-swH1 ConvPCR Primer-R1 5'-AATGTAGGATTTRCTGAKCTTTGG

PCR 産物の長さ: 349 bp

※4H1pdm09 の HA 遺伝子をターゲットとしており、H1 ソ連型の HA 遺伝子には反応しない。

(H3 亜型同定用)

H3 HA 遺伝子検出用プライマー:

H3HA1-BIGIN 5'-AGCAAAAGCAGGGGATAATTC

H3HA1-END 5'-TGCCTGAAACCGTACCAACC

PCR 産物の長さ: 1143bp

(H1 ソ連型^{※5} 亜型同定用)

H1 former seasonal HA 遺伝子検出用プライマー:

H1 HA1-BEGIN 5'-AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA

H1 R10 5'-GCTATTTCTGGGGTGAATCT

PCR 産物の長さ: 729bp

^{※5} H1pdm09のHA遺伝子にも若干交差反応する場合がある。

(B 型同定用)

B 型 HA 遺伝子検出用プライマー:

BHA1-N 5'-AATATCCACAAAATGAAGGC

BHA1-C 5'-AGCAATAGCTCCGAAGAAAC

PCR 産物の長さ: 1116もしくは1119bp

6.3.3 One-Step RT-PCR 反応

QIAGEN 社の OneStep RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量
RNase-free 滅菌蒸留水	9.5 µl
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 µl
dNTP 混合液 (containing 10 mM of each dNTP)	1.0 µl
sense (+) primer (10 µM)	1.5 µl
antisense (-) primer (10 µM)	1.5 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	1.0 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0.5 µl
RNA template	5.0 µl
Total	25.0 µl/test

<反応条件>

使用するサーマルサイクラー、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下は、試薬に QIAGEN 社 OneStep RT-PCR kit、サーマルサイクラーに Applied Biosystems 社 GeneAmp® PCR System 9700 を使用する場合の反応条件を示す。

(Type A、H1pdm09 同定用)**(H3、H1 ソ連型、Type B 同定用)**

50°C 30min.

↓

95°C 15min.

↓

94°C 30sec.

50°C 30sec.

72°C 40sec.

↓

72°C 10min.

↓

4°C

} ×45 cycles

50°C 30min.

↓

95°C 15min.

↓

94°C 30sec.

*⁶50°C 30sec.

72°C 80sec.

↓

72°C 10min.

↓

4°C

} ×40 cycles

※⁶H3 HA プライマー対のみを使用の際は反応温度を 56°C に設定する。ただし、他のプライマー対と同一サーマルサイクラーで同時に反応する場合は 50°C に設定する。その際、H3 は非特異反応が起きやすくなっているので留意する。

6.3.4 RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認**6.3.4.1 機材および試薬 (感染研での使用例)**

電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、電気泳動用アガロース(1.5~2.0%で使用)、分子量マーカー(100 bp DNA ladder, Promega 社 Cat#2101)、エチジウムブロマイド、1×TAE 電気泳動バッファー(50×TAE ニッポンジーン社 Cat#313-90035 を希釈して使用)、6×Gel loading dye(Promega 社 Cat#G1881)。

6.3.4.2 電気泳動

- 1) One-Step RT-PCR にて増幅後、6×Gel loading dye 2 μl と PCR 増幅液 10 μl をよく混合(ピペッティング)し、1.5%から 2.0%に調製したアガロース(以下、「ゲル」とする。)のウェルに混合液を 10 μl 入れる。他のウェルに分子量マーカーを入れる。
- 2) 電気泳動装置で 100V、30~40 分間、-から+へ電気泳動する。
- 3) 泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15~30 分間染色する。染色後、ゲルを 5~10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、UV を照射して写真撮影する。

6.3.5 RT-PCR の結果解析と判定

各々の RT-PCR 産物の有無とバンドサイズ(Type A:244bp、H1pdm09:349bp、H3:1143bp、H1 ソ連型:729bp、Type B:1116もしくは1119bp)の確認により判定を行う。

6.4 (参考) RT-PCR 法を用いた C 型インフルエンザウイルスの同定法

C型 NS 遺伝子検出用プライマー:

NS+24 5'-AAAATGTCCGACAAAACAGT

NS-751 5'-CTAAGCGAGAGCATATAAGC

PCR 産物の長さ: 728bp

C 型 NS 遺伝子検出 nested PCR 用プライマー:

NS+171 5'-TCTTCCTTTGCACCTAGAAC

NS-586 5'-CCTGTTTCAATTCCGGCCAC

PCR 産物の長さ: 416bp

反応条件等、詳細については下記の文献を参考にすること。

Matsuzaki, Y. *et al.* A nationwide epidemic of influenza C virus infection in Japan in 2004. *Journal of clinical microbiology* **45**, 783-788, (2007).

6.5 (参考) RT-LAMP 法を用いた A 型および A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルスの同定法

RT-LAMP 法は同一反応チューブ内において逆転写反応(Reverse transcription:RT)から Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)を等温反応で行う核酸増幅法であり、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁度測定、もしくは紫外線照射により発生する蛍光の目視観察により、増幅した核酸を検出する事ができる。

現在、A 型インフルエンザウイルスおよび H1pdm09 インフルエンザウイルス同定用の RT-LAMP 試薬が体外診断用医薬品として販売されており、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)等により精製した RNA を用いる事で、RT-LAMP 法により A 型および H1pdm09 亜型の同定を行う事ができる。また、別売りの「インフルエンザウイルス用抽出試薬」を使用すると、咽頭または鼻腔から採取したスワブを抽出試薬に懸濁し、その懸濁液の一部を用いる事で、煩雑な RNA 精製を行わなくても、RT-LAMP 法により先の型・亜型同定を行う事ができる(Direct RT-LAMP 法)。使用方法については、各試薬に添付されている使用説明書に従って行う。

(A 型同定用)

- ・「Loopamp A型インフルエンザウイルス検出試薬キット」(栄研化学株式会社)

(H1pdm09 亜型同定用)

- ・「Loopamp H1pdm2009 インフルエンザウイルス検出試薬キット」(栄研化学株式会社)

なお、RT-LAMP 法では標的遺伝子の 6 つの領域(反応時間を短縮するためのプライマーも含めると 8 つの領域)に対してプライマーを設定するため、特異性の非常に高い核酸増幅法となっているが、反面、この領域に変異が入った遺伝子を検出する場合には、検出感度が大きく低下する、あるいは全く検出できない事があるので、使用の際には対象となる流行株が検出できるかどうかなどの情報収集を行うとともに、各施設では検出感度や特異性等について十分に検討する必要がある。また、RT-PCR 法などと比較すると検出系によってはもともと検出感度が低い場合がある。従って、RT-LAMP 法による陰性結果が出たとしても、検査検体からこの検査方法でウイルス遺伝子が検出できなかったに過ぎず、必ずしも検査検体中のインフルエンザウイルスの存在を否定するものではないことに留意しなければならない。

7. (参考)迅速診断のためのインフルエンザウイルス抗原の検出

わが国では、インフルエンザに対する治療薬として M2 阻害剤であるアマンタジン(商品名シンメトレル; A 型インフルエンザのみに効果がある)および NA 阻害剤であるザナミビル(商品名リレンザ)、オセルタミビル(商品名タミフル)、ラニナミビル(商品名イナビル)、ペラミビル(商品名ラピアクタ)、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビル マルボキシル(商品名ゾフルーザ)が認可されている。これら抗ウイルス剤によるインフルエンザの治療は既に一般的となっており、臨床現場での迅速診断の重要性は高い。わが国では、A 型および B 型インフルエンザウイルスのウイルス核蛋白(NP)をウイルス抗原として検出するインフルエンザ迅速診断のためのインフルエンザウイルス抗原検出用キットが各社より販売されている。一般的に抗原検出用キットは、ウイルス分離や RT-PCR 法などのウイルス遺伝子検出法に比べて検出感度や特異性が低く、特にウイルス量の少ない発病初期などではウイルス抗原を検出できない場合がある。抗原検出用キットでの陰性結果は、検査検体からこの方法でウイルス抗原が検出できなかったに過ぎず、必ずしも検査検体中のインフルエンザウイルスの存在を否定するものではなく、インフルエンザウイルス感染を否定するものでもないことに留意しなければならない。また、検体採取部位の違いや検体採取手技の善し悪しによっても検査結果が異なる場合があることから、特にキットで陰性結果を得た場合であっても、周囲の流行状況、患者の臨床症状や他の検査結果などを考慮して総合的に判断する必要がある。なお、迅速抗原診断キットの中には、鼻汁・鼻かみ液や咽頭ぬぐい液を検体として使用できないものもあるので、注意が必要である。使用方法については、各キットに添付されている使用説明書に従って行う。

Part III

インフルエンザウイルスの遺伝子解析

1. RT-PCR 法とシーケンス

遺伝子配列を用いた解析により、ウイルスの抗原性予測、流行株の変化、薬剤耐性獲得の有無、などの情報を得ることができる。このため遺伝子解析は抗原性解析とともに、ウイルスサーベイランスにとって極めて重要である。

各施設において遺伝子解析を実施する際の参考として、ここではインフルエンザサーベイランスの中心である、HA および NA 遺伝子領域の塩基配列解析方法について説明する。

1.1 RT-PCR

インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖(-)RNAであるため、PCR法による遺伝子増幅の前に逆転写酵素を用いたRT反応が必要である。本項ではRT反応およびPCR反応を同一チューブ内で行うOne Step RT-PCR法を用いた例を紹介する。RT-PCR法に使用する試薬は各試薬メーカーから多数販売されているが、Invitrogen社のSuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymeraseを使用した例を記載する。なお、使用するプライマーは 1.4 に示した。

以下にインフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センターで通常実施している、total volumeが20 μ lの反応系を示す。試薬メーカーの推奨プロトコールに比べるとtotal volumeが半量未満であるが、通常、後述するシーケンス反応に必要なPCR産物は十分に得ることができる。また、サーマルサイクラーの機種によっては反応に適用できるtotal volumeに制限があるため、各設備に合わせて反応系のvolumeを適宜変更する必要がある。

1.1.1 SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)を用いた例

試薬	使用量	最終濃度
2×Reaction Mix	10 μ L	×1
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.8 μ L	-
フォワードプライマー (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
リバースプライマー (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
Template RNA	2.0 μ L	100 ng～1 μ g
DEPC 処理水	6.4 μ L	
Total	20 μ L	

反応液 mixture を軽く遠心後、サーマルサイクラーにセットし、次のサイクルで反応を行う。

55°C	30 min	
94°C	2 min	
	↓	
94°C	15 sec	} 35 サイクル
56°C	30 sec	
68°C	110 sec	
	↓	
68°C	1min	
4°C	∞	

※RT-PCR の反応条件は、使用する試薬やサーマルサイクラーの機種によって異なる。実際に使用する試薬・機器に合った最適な条件を設定する必要がある。

※RT-PCR 反応後のサンプルを一時保存する際は 4°C、数日～長期保存する際は-20°C以下で保存する。

1.2 RT-PCR 産物の確認、精製

シーケンス反応に進む前に、RT-PCR によって目的の増幅産物が得られていることを確認する。アガロースゲルを用いた電気泳動が広く利用されており以下に例を示すが、他にもキャピラリーによる自動電気泳動装置など、所持している機器・コストを勘案して実施されたい。

1.2.1 アガロースゲル電気泳動

- ① RT-PCR 産物 1 µl と Loading Dye を適量混合 (パラフィルム上などで) し、1%アガロースゲルにて電気泳動を行う。泳動 buffer は 1 x TAE を使用する。また以前は核酸検出にエチジウムブロマイドが多用されてきたが、現在は Novel Juice (Bio-Helix 社)、Mirodi Green (Fast Gene 社) など、より安全性が高いとされる試薬が主流となってきている。
- ② 電気泳動を 100V, 15~20 分行った後、LED/UV トランスイルミネーターにて RT-PCR 産物を確認する。

1.2.2 RT-PCR 産物のアガロースゲルからの切り出し精製

電気泳動にて目的以外の増幅産物 (非特異的増幅産物) が確認された場合、アガロースゲルからの切り出し精製を行う事によって解析精度の向上が期待できる。なお、非特異的増幅産物が微量であった場合、および存在しなかった場合は、ゲルからの切り出し精製を実施する必要はない (→項目 1-2-3. へ)。

アガロースゲルからの切り出し精製は、TaKaRa 社 NucleoSpinExtract II、QIAGEN 社 QIAquick Gel Extraction Kit、BIO-RAD 社 Freeze N' Squeeze スピニングカラムなど、市販の試薬を用いて簡便に実施することができる。(切り出し精製を実施したら、項目 1.3 へ。)

1.2.3 RT-PCR 産物の精製

RT-PCR 産物に含まれている多量の未反応塩基、プライマーを除去することで、シーケンス解析の精度を向上させることができる。

古典的にはエタノール沈殿でも精製することが可能であるが、市販の試薬 (BECKMAN COULTER 社 Agencourt AMPure XP、QIAGEN 社 QIAquick PCR Purification Kit など) を用いることで簡便に精製することができる。

1.3 シークエンシング反応

使用するシーケンサー各機種に対応したシーケンス試薬を用いて反応を行う。

1.3.1 サンガー法シーケンシング

1.3.1.1 シークエンス反応

ABI 社のサンガー法シーケンサー機に使用される、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた例を以下に示す。

① 下の Mixture を作製する。使用するプライマーは 1.4.1, 1.4.2 に示した。

試薬	使用量
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	1 μ l
BigDye sequencing Buffer	2 μ l
プライマー (1 μ M)	1.6 μ l
H ₂ O	x μ l
RT-PCR 産物	y μ l (10~20 ng)
Total	10 μ l

② 軽く遠心後、チューブをサーマルサイクラーにセットし次のプログラムで反応を行う。

96°C	1 min	
↓		
96°C	10 sec	} 25 サイクル
50°C	5 sec	
60°C	110 sec	
↓		
4°C	∞	

※シーケンス産物を一時保存する際は 4°C で、数日以上保存する場合は -20°C 以下で保存する。

1.3.1.2 シークエンス反応産物の精製

シークエンス反応液中に残っている未反応の蛍光色素を除去する。エタノール沈殿法での除去も可能だが、BigDye XTerminator (Applied Biosystems)、MicroSpin G-25 Columns (GE ヘルスケア)などを用いることで反応産物を簡便に精製することが可能である。

1.3.1.3 シークエンス解析

精製したシークエンス反応物をシーケンサーにセットし、塩基配列の解析を行う。得られた波形データはシークエンス解析ソフトウェアを用いて必ず確認し、適宜修正して塩基配列を決定する。もしノイズレベルが高く波形を正確に読み取れない領域があれば、シークエンス反応条件(template DNA 量、アニーリング温度、使用プライマーなど)を変更し再度解析を行う。

なお、高価ではあるが Sequencher (Hitachi solutions/GeneCodes)、SeqScape (Applied Biosystems)、Geneious (Biomatters)などの塩基配列アセンブリソフトウェアがあれば、多数の塩基配列を解析しながらアセンブリが可能となるため、効率的に処理を進めることができる。

1.3.2 次世代シーケンサー

次世代シーケンサー(NGS)が普及し、身近な機器になってきている。しかし、消耗品が高価なため継続的な運用が困難な研究所も多い。将来的にコストが下がれば NGS 活用の拡大も十分に考えられる。ここでは NGS 使用方法の参考として、広く普及している MiSeq (Illumina 社)を用いたインフルエンザウイルスの遺伝子解析方法を示す。なお作製したライブラリは iSeq 100 (Illumina 社)でも解析可能である。実験に特別な手技を要する部分はなく、PCR を実施できる者であればさほど困らずにデータを得ることができると思われる。

1.3.2.1 サンプルライブラリ調整

Illumina 社の NGS に対応したライブラリ調整試薬が各社から販売されている (Illumina 社、QIAGEN 社、New England Biolabs 社、など)。各社の試薬開発・競争により簡便なキットが増えているため、実際に NGS を実施する際には各試薬の比較・検討をお勧めする。ここでは QIAGEN 社から販売されている QIAseq FX DNA Library Kit を用いた例を示す。

① 断片化、末端修復反応

試薬	使用量
FX buffer (10x)	2 μ l
FX Enzyme Mix	4 μ l
プライマー(1 μ M)	1.6 μ l
H ₂ O	12 μ l
RT-PCR 産物	2 μ l (>10 ng)
Total	20 μ l

※ 標準プロトコルでは total volume 50 μ l だが、20 μ l に改変した系を示す。

※ 全セグメント増幅用のプライマーおよび反応条件は 1.4.3.に記載した。

良く混合し軽く遠心した後、チューブをサーマルサイクラーにセットし次のプログラムで反応を行う。

4°C	(hold)	
↓		
32°C	15 min	・ サーマルサイクラーは予め 4°C の状態 にしておくこと。
65°C	30 min	・ heated lid は 70°C に設定する。
↓		
4°C	∞	

② アダプターの付加

試薬	使用量
DNA Ligase Buffer (5x)	8 μ l
DNA Ligase	4 μ l
Adapter	2 μ l
H ₂ O	6 μ l
Sample (断片化・末端修復済み)	20 μ l
Total	30 μ l

良く混合し軽く遠心した後、チューブをサーマルサイクラーにセットし次のプログラムで反応を行う。

20°C	15 min	・ heated lid は off にしておくこと。また は、lid を開いた状態にしておくこと。
↓		
4°C	∞	

※アダプタープレート(96well)から使用するアダプターを選び使用する。また使用したアダプター(バーコード)の種類がどのサンプルに対応しているかを必ず控えておく。

※アダプタープレートはアルミシールで密閉されているため、使用する際にアルミシールに穴を開ける必要がある。上記反応に2 µl 使用した後、残ったアダプターは別チューブに移し-20℃以下で保管しておくことが可能である。

③ サンプルの精製

BECKMAN COULTER 社 Agencourt AMPure XP を用いて DNA ライブラリの精製を行う。この際、Agencourt AMPure XP の比率を変えて2回精製を実施することで、DNA ライブラリの size selection も実施している。

試薬	使用量
sample (adapter ligated)	40 µl
AMPure XP	32 µl
Total	72 µl

ピペットでよく混合し、常温で 5 min

↓

magnet plate に設置し、2 min

↓

上清を廃棄する

↓← 200 µl の 70% EtOH を加える

30 sec 静置後、上清を廃棄する

2回
・ magnet plate 上で操作する

↓

1 min 風乾後、magnet plate から外す

↓← 23 µl の H₂O を加える

ピペットで懸濁し、magnet plate に設置する

↓

1 min 静置後、20 µl を回収し別チューブに移す

↓← 20 µl の AMPure XP を加える

ピペットでよく混合し、常温で 5 min

↓

magnet plate に設置し、2 min

↓

上清を廃棄する

↓← 200 μ l の 70% EtOH を加える } 2 回
 30 sec 静置後、上清を廃棄する } • magnet plate 上で操作する

↓

1 min 風乾後、magnet plate から外す

↓← 12 μ l の H₂O を加える

ピペットで懸濁し、magnet plate に設置する

↓

1 min 静置後、11 μ l を回収し別チューブに移す

※サンプルは-20°Cで保管可能

④ ライブラリ増幅反応

試薬	使用量
HiFi PCR Master Mix (2x)	10 μ l
Primer Mix (10uM each)	0.5 μ l
Sample (精製後のライブラリ)	9.5 μ l
Total	20 μ l

ピペットでよく混合する

↓

98°C 2 min

↓

98°C	20 sec	} 6 サイクル
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	

↓

72°C 1min

4°C ∞

↓← 20 μ l AMPure XP

ピペットでよく混合し、常温で 5 min

↓

magnet plate に設置し、2 min

↓

上清を廃棄する

↓← 200 μl の 70% EtOH を加える
 30 sec 静置後、上清を廃棄する

} 2 回
 ・ magnet plate 上で操作する

↓

1 min 風乾後、magnet plate から外す

↓← 18 μl の H_2O を加える

ピペットで懸濁し、magnet plate に設置する

↓

1 min 静置後、17 μl を回収し別チューブに移す

※サンプルは-20°Cで保管可能

⑤ DNA 定量

サンプル(調整済み DNA ライブラリ)の濃度測定には Qubit (Invitrogen 社)が推奨される。メーカー推奨のプロトコルに準じて測定する。通常、サンプルは希釈せず 1 μl を測定に用いれば濃度を算出できる。もし検量線を振り切ってしまう場合は 5 倍希釈など適宜希釈して再測定する。

⑥ サンプル調整

各サンプルを 0.4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ の濃度に調整する

↓

濃度を 0.4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ に調整したサンプルすべてを 1 つのチューブに入れて混合する

↓

5 μl を他のチューブに移し取る

↓←5 μl の 0.2N NaOH(用事調整)

ピペットでよく混合し、常温で 5 min

↓←990 μl HT1 (Illumina カートリッジに付属)

600 μl を Illumina カートリッジに load、MiSeq に取り付ける

(HT1 と混合したサンプルは、カートリッジに入れるまでは氷上で保管)

⑦ MiSeq のマニュアルに従い、run を実行する

※カートリッジについて

MiSeq 用のカートリッジには、MiSeq Reagent Kit v2 および v3、さらにサイクル数の異なる商品が販売されている。出力される read 数は v2 よりも v3 が多く、また、サイクル数が read 長となる(150 cycles = read 長 150 bases)。このため、解析サンプル数や求める read の長さでカートリッジを選ぶことになる。インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター第一室では全セグメント解析の場合、MiSeq Reagent Kit v3 – 150 cycles ではインフルエンザウイルス 24 株程度、MiSeq Reagent Kit v2 – 300 cycles では 40 株程度を目安としているが、各々が必要とするデータの信頼度に合わせてサンプル数を加減されたい。

※ウイルス量について

MiSeq から出力される read 数は投入したライブラリ DNA の量に比例する。このため、ウイルス由来核酸 (RT-PCR 産物) が極端に少ないサンプルでは得られる read 数が結果として少なくなり、解析対象の塩基配列を得るのに十分ではない場合がある。このような場合は、解析に同時に用いるサンプル数を減らす、あるいは量の少ない(と思われる)サンプルの DNA 量を増やすなど、工夫が必要となる。

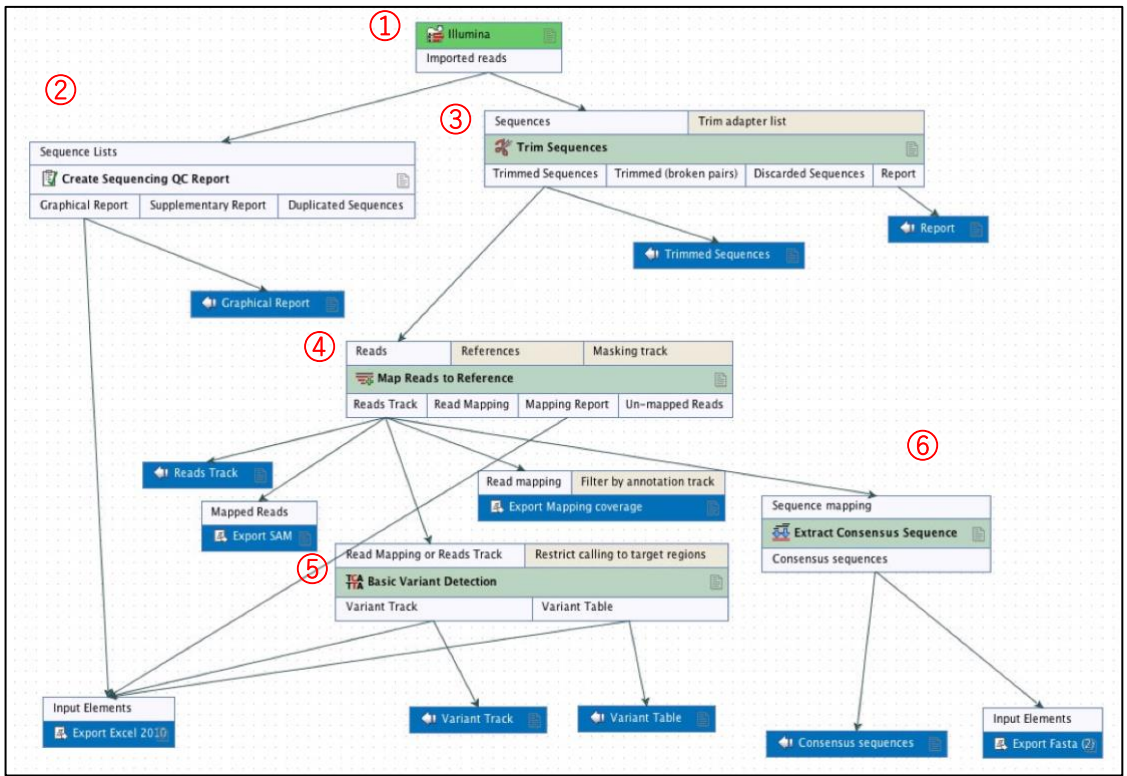
1.3.2.2 データ解析

Sanger 法シーケンサーとは異なり、NGS から出力されるデータは塩基配列に quality data が付随した大量の塩基配列断片である。この大量の配列断片をつなぎ合わせるためのプログラムが有償・無償合わせて多数存在するが、ここでは、CLC Genomic Workbench (Qiagen 社)を用いた解析例を簡潔に示す。

Resequencing (CLC Workbench)

①MiSeq から出力されたデータ (***.R1_001.fastq.gz など) を workbench に import した後、②”Create Sequencing QC Report”にてデータの quality 評価、③”Trim Sequences”にて配列のトリミングを実施。④”Map Reads to Reference”にて、reference 配列を基準としてトリミング済みの配列をアセンブルする。なお、アセンブルした結果を SAM ファイルとして保存しておくと後で他 viewer プログラム (Tablet: <https://ics.hutton.ac.uk/tablet> など) で確認する際に便利である。⑤”Basic Variant Detection”にて、アセンブルされた配列と reference 配列とで異なる塩基を出力させる。Mixture と判定された塩基情報も出力される。⑥”Extract Consensus Sequence”にてアセンブルされた consensus 配列を FASTA 形式で出力させる。

上記内容は Workbench 内でコマンドを選択して実施可能だが、以下の図の様に worksheet として作成・保存しておくで一連の作業を自動で処理することが可能である。なお各コマンドには細かい条件設定がある。実際に使用に際し不明な点があれば相談されたい。



1.4 プライマーリスト

以下に HA, NA 遺伝子の RT-PCR およびシーケンス用プライマーを記す。なお、配列が比較的保存されている領域にプライマーを設計しているが、ウイルスの遺伝子は変異を生じやすいため永続的な使用を保証するものではない。遺伝子系統樹上で分岐するクレードに依存することもある。PCR、シーケンスの結果が思わしくない場合は感染研インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センターに相談されたい。

1.4.1 HA

A(H1N1)pdm09

RT-PCR Primer (5' - 3')

H1HA1-BEGINV2	AGCAAAAGCAGGGGAAAACAA
HA2H1-1759-1778R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

swine H1-56-76F	CATTATGTATAGGTTATCATG
swine H1-277-296F	TGGTCCTACATTGTGGAAAC
H1pdm-HA-578-596F	TGTGGGGCATTACCCATCC
swine H1-768-788F	AATAACATTCGAAGCAACTGG
swine H1-1013-1034F	TCCCGTCTATTCAATCTAGAGG
H1-1224F	TCTGTTATTGAAAAGATGAA

Reverse:

swine H1-385-366R	CAAATGATGACACTGAGCTC
swine H1-596-578R2	GGATGGTGAATGCCCCACA
H1-960R	GAAATGGGAGGCTGGTGTTTA
H1pdm-HA-1122-1103R	CTGCTCATTTTGATGGTGAT
swine H1-1219-1191R	CATCTTTTCAATAACAGAA
swine H1-1662-1642R	CATCCAGAAACTGATTGCCCC

A(H3)

RT-PCR Primer (5' - 3')

H3HA1-BEGIN	AGCAAAAGCAGGGGATAATTC
HA2H3-1743-1762R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

H3-7F	ATAATTCTATTAACCATGAAGA
H3-342-361F	GTTGAACGAAGCAGAGCCAA
H3-598-619F	AATTTGACAAATTGTACATTTG
H3-912F	TCTGAATGCATCACTCCAAA
H3-1281-1300F	GTAGAAGGAAGAGTTCAAGA

Reverse:

H3-334-354R	CTGCGTTCAACAAAAAGGTCC
H3-620R	CCCCCAAATGTACAATTTGT
H3-939-960R	ATGGTTTGTTCATTGGGAATGCT
H3-1342R	GACCAGAGATCTATTTTAGTGTC
HA2H3-1743-1762R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT

B

RT-PCR Primer (5' - 3')

BHA1-N	AATATCCACAAAATGAAGGC
HA2B-1867-1887R	AGTAGTAACAAGAGCATTTTT

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

BHA1-N	AATATCCACAAAATGAAGGC
BHA-459F	AGAAAATGCACCAGGAGGAC
BHA1-703-722F	CCTCAAAAGTTCACCTCATC
HA2B-1040-1061F	GCCCAATATGGGTGAAAACACC
HA2B-1330-1352F	GGATGAACTCCACAACGAAATAC
BHA-1537F	ACCAAACACAAATGCAACCA

Reverse:

BHA1-411R	CTTCTGTATTGATAACGTTG
BHA-466-485R	TAGGGTCCTCCTGGTGC
BHA1-802R	GCACCATGTAATCAACAACA
HA2B-1489-1512R	ACAGCAGAGGGACCCAGCATTTTC
HA2B-1867-1887R	AGTAGTAACAAGAGCATTTTT
BHA1-C	AGCAATAGCTCCGAAGAAAC

1.4.2 NA

A(H1N1)pdm09

RT-PCR primer (5' - 3')

swine N1-F1

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAATGA

swine N1-R1

GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

swine N1-F1

AGCAAAAGCAGGAGTTCAAATGA

swine N1-290-307F

GGGCTATATACAGTAAAG

swine N1-676-694F

ACACAAGAGTCTGAATGTG

swine N1-941-959F

TAGGATACATATGCAGTGG

swine N1-1111-1130F

TTTGAGATGATTTGGGATCC

Reverse:

N1-327R

CTTTACTGTATATAGCCC

swine N1-548-532R

GCACTTGCTGACCAAGC

swine_N1-961-943R

CCCCACTGCATATGTATCC

swine N1-1130-1111R

GGATCCCAAATCATCTCAA

swine N1-R1

GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC

A(H3N2)

RT-PCR primer (5' - 3')

H3N2-F1

AGCAAAAGCAGGAGT

H3N2-R1413

AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

H3N2-F1

AGCAAAAGCAGGAGT

N2-F387

CATGCGATCCTGACAAGTGTTATC

N2-497F

ATGAATGAGTTGGGTGTTCC

N2-F754

TGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAA

N2-1115F

CGTGTGGATGGGGAGAACAA

Reverse:

N2-305R

CCTGTAATGCCACATTGCGG

N2-R579-545

CAACTTGAGCTGGACCATGCTAT

N2-843R

ACATGCTGAGCACTTCCTGA

N2-1076R

TCATTTCCATCATCAAAGGC

N2-1415R

AAAGCTTATATATGCATGAG

B

RT-PCR primer (5' - 3')

BNA-F5v2	TCAAAACTGAAGCAAATAGGCCA
BNA-R1498-1472	AATAGGAACAAAGGGTTTAGAACAGA

Sequence Primer (5' - 3')

Forward:

BNA-F5v2	TCAAAACTGAAGCAAATAGGCCA
BNA-93-73F	AAACGTTAACCCTATTTCTCA
BNA-F355	AAACTCAGCTCCCTTGAT
BNA-F717	TGCCTGCAATTGCATCGG
BNA-F943-956	CAGGTACACAGCAAAAAGAC
BNA-1315F	ATGTCCCCTGTATTGGGATA

Reverse:

BNA-R282	TATGTCCACTCCGGTTCT
BNA-R572-552	TGGAAAATGGAGTTCTCTAC
BNA-R967-943	GACAAAAGGTCTTTTTGCTG
BNA-R1102	CATTCTTTGATGAACAAATC
BNA-R1498-1472	AATAGGAACAAAGGGTTTAGAACAGA

1.4.3 全セグメント

A 型

MBTuni-12-R: ACGCGTGATCAGCRAAAGCAGG

MBTuni-13: ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

※RT-PCR 反応液の組成は 1.1 に記載したものと同様。

42°C	60 min	
94°C	2 min	
	↓	
94°C	30 sec	} 5 サイクル
45°C	30 sec	
68°C	3 min	
	↓	
94°C	30 sec	} 30 サイクル
57°C	30 sec	
68°C	3 min	
	↓	
4°C	∞	

B 型

・FluB universal primer cocktail の作製

Primer (each 10 μ M) sequence

B-PBs-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGAGC	100 μ L
B-PBs-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACACGAGC	100 μ L
B-PA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGTGC	50 μ L
B-PA-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACACGTGC	50 μ L
B-HANA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGC	100 μ L
B-HANA-UniR	CCGGGTATTAGTAGTAACAAGAGC	100 μ L
B-NP-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCACAGC	60 μ L
B-NP-UniR	CCGGGTATTAGTAGAAACAACAGC	60 μ L
B-M-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCACGCACTT	30 μ L
B-Mg-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGGCACTT	30 μ L
B-M-Uni3R	CCGGGTATTAGTAGAAACAACGCACTT	60 μ L
B-NS-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGGATT	50 μ L
B-NS-Uni3R	CCGGGTATTAGTAGTAACAAGAGGATT	50 μ L
FluB universal Primer cocktail		total 840 μ L

※ volume は必要量に合わせて変更すること。

試薬	使用量
2×Reaction Mix	10 μ L
FluB universal Primer cocktail	1.6 μ L
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.8 μ L
Template RNA	5 μ L
DEPC 処理水	2.6 μ L
Total	20 μ L

45°C	60 min	
55°C	30 min	
	↓	
94°C	2 min	
	↓	
94°C	20 sec	} 5 サイクル
40°C	30 sec	
68°C	3 min 30 sec	
	↓	
94°C	20 sec	} 40 サイクル
58°C	30 sec	
68°C	3 min 30 sec	
	↓	
4°C	∞	

2. GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data: www.gisaid.org/)の利用

感染研で解析した塩基配列は、インフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 などの国際データベースである GISAID に登録している。GISAID は 2006 年 8 月に構築・公開されたデータベースであり、各国の研究者が無償でヒト及び鳥インフルエンザウイルスについての情報を収集可能となることを目的として発足した。現在、感染研を含め WHO インフルエンザ協力センターは解析した塩基配列を GISAID に登録しており、だれでも最新の情報を閲覧・入手することが可能である。なお GISAID は登録制であるため、使用に際しては最初に “Register” (<https://gisaid.org/register/>) からユーザー登録を行う必要がある。

※本原稿は 2023 年 5 月時点での GISAID に基づいて執筆しています。GISAID のアップデートに伴い機能の修正、変更が行われた場合は解説と異なる項目があるかもしれません。

※GISAID は度々アップデートにて新規機能を追加している。以下に遺伝子配列の検索・取得について説明するが他の機能についても実際に触れて試していただきたい。

遺伝子配列の検索は “EpiFlu、 “Search” (タブで区切られている)からアクセスすることができる。検索条件を入力する画面(図 1)が表示されるので、必要事項を入力し検索を実行する。以下に使用頻度が高いと思われる項目を簡単に説明する。

- “Search patterns”欄から株名(部分的でも良い)により検索
- Type, H, N などの項目を設定することで亜型を絞りこむ
- “Clade”からクレード名で絞り込む
- “Collection date”によりウイルス採取時期を絞り込む
- “Originating Laboratory”、“Submitting Laboratory”によりウイルス分離、登録した機関を絞り込む
- “Required Segments”から目的の遺伝子配列を絞り込む

© 2008 - 2023 | Terms of Use | Privacy Notice | Contact

You are logged in as **Seiichiro Fujisaki** - [logout](#)

Registered Users **EpiFlu™** EpiCoV™ EpiRSV™ EpiPox™ My Profile

EpiFlu™ **Search** Back to results | Worksets | Upload | Batch Upload | CLI Upload | Settings | Analysis

Basic filters

Predefined search

Search in Released files My released files My unreleased files Worksets

Search patterns

Type	H	N	Lineage	Host	Location	Clades
A				Human	Africa	0
B				Animal	Antarctica	1
C				Avian	Asia	1.1
				Chicken	Europe	1.1.1
				Curlew	North America	1.1.2
				Duck	Oceania	2.1.1
				Eagle	South America	2.1.2
				Falcon		2.1.3
				Goose		2.1.3.1
						2.1.3.2

Additional filters

Collection date (YYYY-MM-DD) From To

Submission date (YYYY-MM-DD) From To

Originating Laboratory

- [Afghanistan, Kabul] National Public Health Laboratory
- [Albania, Tirana] Institute of Public Health
- [Algeria, Algiers] Institut Pasteur d'Algerie
- [American Samoa, Fagaala] LBJ Tropical Medicine Centre
- [Argentina, Buenos Aires] Instituto Nacional Enfermedades Infecciosas C.G.Malbran
- [Argentina, Buenos Aires] Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

Submitting Laboratory

- [Argentina, Buenos Aires] Instituto Nacional Enfermedades Infecciosas C.G.Malbran
- [Argentina, Buenos Aires] Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. C.G. Malbrán
- [Argentina, Buenos Aires] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
- [Argentina, Mar del Plata] Instituto Nacional de Epidemiología Juan Hector Jara
- [Australia, Casuarina] Royal Darwin Hospital

Required Segments PB2 PB1 PA HA NP NA MP NS HE P3
 only complete Min Length

Vaccine specific 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021
 2022 2023

Help Total: 432,721 viruses (2,025,313 sequences) [Charts](#) [Reset](#) [Search](#)

図 1. GISAID EpiFlu 検索画面

検索結果(図 2)では株名一覧と共にウイルス継代履歴、ウイルス採取日、登録されている遺伝子配列の長さが表示される(これらの表示項目は Setting により変更可能)。Name や Isolate ID、Collection date 順で並べ替えることが出来る。

The screenshot shows the GISAID EpiFlu interface. At the top, there's a navigation bar with 'Registered Users', 'EpiFlu™', 'EpiCoV™', 'EpiRSV™', 'EpiPox™', and 'My Profile'. Below that, there are tabs for 'EpiFlu™', 'Search', 'Back to results', 'Worksets', 'Upload', 'Batch Upload', 'CLI Upload', 'Settings', and 'Analysis'. The 'Settings' tab is highlighted with a red box. The main content area is titled 'Released files' and contains a table with the following columns: Name, Isolate ID, Subtype, Collection date, Submission date, Passage, PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, and MP. The table lists various influenza virus isolates, such as A/KANAGAWA/IC2235/2023, A/AOMORI/12/2023, A/GUNMA/3242/2023, etc. Several rows have a red checkmark in the left margin. At the bottom of the table, there is a 'Total: 74 isolates' summary, a pagination control showing '1 2 3', a search bar, and buttons for 'Go back', 'Help', 'Copy to...', 'Add to analysis', and 'Download'. The 'Download' button is highlighted with a red box.

Name	Isolate ID	Subtype	Collection date	Submission date	Passage	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	MP
A/KANAGAWA/IC2235/2023	EPI_ISL_17624324	H3N2	2023-04-06	2023-05-09	hCK 0 +2	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/AOMORI/12/2023	EPI_ISL_17624323	H3N2	2023-03-06	2023-05-09	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/GUNMA/3242/2023	EPI_ISL_17624322	H3N2	2023-02-06	2023-05-09	MDCK 2 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/HOKKAIDO/4/2023	EPI_ISL_17624320	H3N2	2023-02-02	2023-05-09	MDCK 2 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/FUKUI/5/2023	EPI_ISL_17624318	H3N2	2023-02-15	2023-05-09	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/HIROSHIMA-C/3/2023	EPI_ISL_17624317	H3N2	2023-02-08	2023-05-09	MDCK 2 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/AC2213/2023	EPI_ISL_17624315	H3N2	2023-03-23	2023-05-09	hCK 0 +1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/AC2212/2023	EPI_ISL_17624314	H3N2	2023-03-23	2023-05-09	hCK 0 +1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/IC2232/2023	EPI_ISL_17624313	H3N2	2023-03-27	2023-05-09	hCK 0 +1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/HIROSHIMA/29/2023	EPI_ISL_17624312	H3N2	2023-02-13	2023-05-09	MDCK 2 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/AICHI/65/2023	EPI_ISL_17624311	H3N2	2023-03-06	2023-05-09	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/GIFU/1/2023	EPI_ISL_17624310	H3N2	2023-03-01	2023-05-09	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/YOKOHAMA/51/2023	EPI_ISL_17624309	H3N2	2023-02-03	2023-05-09	AX-4 2 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/AICHI/57/2023	EPI_ISL_17624307	H3N2	2023-02-21	2023-05-09	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/OSAKA/27/2023	EPI_ISL_17624306	H3N2	2023-02-13	2023-05-09	AX-4 3 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/CHIBA-C/1/2023	EPI_ISL_17624305	H3N2	2023-02-06	2023-05-09	MDCK 4 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KAGAWA/23072/2023	EPI_ISL_17624304	H3N2	2023-02-15	2023-05-09	AX-4 1 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/SENDAI/8/2023	EPI_ISL_17624301	H3N2	2023-02-27	2023-05-09	AX-4 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/HIROSHIMA/23/2023	EPI_ISL_17527278	H3N2	2023-02-06	2023-04-24	MDCK 3 +hCK1	2,280	2,277	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/IC2228/2023	EPI_ISL_17527274	H3N2	2023-03-20	2023-04-24	hCK 0 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/IC2226/2023	EPI_ISL_17527272	H3N2	2023-03-18	2023-04-24	hCK 0 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982
A/KANAGAWA/IC2224/2023	EPI_ISL_17527271	H3N2	2023-03-17	2023-04-24	hCK 0 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,701	1,497	1,410	982

図 2. GISAID EpiFlu 検索結果画面

塩基配列を入手したい株は、株名左側にチェックを入れる。次に画面右下の Download ボタンを押すことで、ダウンロード画面へ移行する(図 3)。

図 3. GISAID EpiFlu シークエンスダウンロード画面

塩基配列は FASTA 形式でダウンロードされる。FASTA Header はウイルス株名、継代履歴などを設定することでカスタマイズすることができる。

Part IV インフルエンザの血清診断

インフルエンザウイルス感染の診断は、ウイルス株自体が同定できる利点があるうえに、血清診断よりも迅速に結果が得られるという点でウイルス分離が多用されている。一方で、ウイルス分離のための検体の採取が困難である場合や、ウイルス分離をする設備がないなどの理由で血清診断が必要な場合がある。また、不顕性感染を含む個人の感染の有無を調べる目的で血清診断が利用されることもある。このような目的での血清診断の際には急性期の血清と回復期(2~4週間後)のペア血清が必要である。急性期血清は、なるべく発症直後に採取する必要がある。また、たいていの人はインフルエンザウイルスに対する抗体を保有しているために、回復期血清一点での血清診断は、信頼性が低いために避けるべきである。このような条件が保証された上で、急性期血清と回復期血清の抗体価に4倍以上の上昇が認められたとき、ウイルス抗原の検出やウイルス分離が出来なかった場合でも他の臨床所見等と総合してウイルス感染の診断を行うことが出来る。

一方、ウイルス感染診断以外の目的でも、血清学的手法による抗体の検出によって、ウイルスの流行状況、流行予測の基礎資料となる国民の抗体保有状況、ワクチンの免疫原性の評価などの疫学的、免疫学的研究に重要な情報を得ることができる。

1. HI 試験による血清学的診断

1.1 HI 試験による血清診断上の注意

血清診断の手法としてHI試験を用いる際には、血清の前処理に十分な注意が払われるべきである。インフルエンザ分離株の同定試験の稿でふれたように、血清中には非特異的な血球凝集阻止因子と血球凝集因子という相反する2つの因子が存在する。非特異的な血球凝集阻止は、血清中の成分に含まれるある種の分子がインフルエンザウイルスのレセプターとして赤血球上でウイルスレセプターと競合することによってウイルスの血球への結合を阻害する現象として起こる。このような阻害分子として人や動物の血清中の α 、 β 、 γ -阻害物質という三種類の分子種が知られている。これらの阻害分子は、異なるインフルエンザ株に対して異なった作用を示すため、血清種とウイルス株の組み合わせによっては、異なった前処理が必要となる場合がある。

1.2 血清の前処理

人血清の前処理はHA、HIによるインフルエンザの同定試験の稿にあるRDE(II)「生研」(デンカ生研)による非特異的凝集阻止因子の除去と使用する血球による吸収処理で多くの場合対応可能である。動物血清などで、この処理によっても非特異的反応と思われる反応が除けない場合の変法の一つとしてトリプシン-過ヨウ素酸処理法がある。

トリプシン-過ヨウ素酸処理法

試薬:

トリプシン溶液 200 mg のトリプシン(SIGMA type(II), T-7409)を 25 ml の 0.1M リン酸緩衝液(pH 8.2)に溶かし、濾過滅菌する。少量に分注し-20℃以下で保存する。保存したトリプシン溶液は半年間使用可能である。

1/90M 過ヨウ素酸カリウム(KIO₄)溶液 230 mg の KIO₄を PBS pH7.2 に溶かし 100 ml とし、濾過滅菌する。1/90M KIO₄ 溶液は要事調整とし一週間以内で使い切ること。

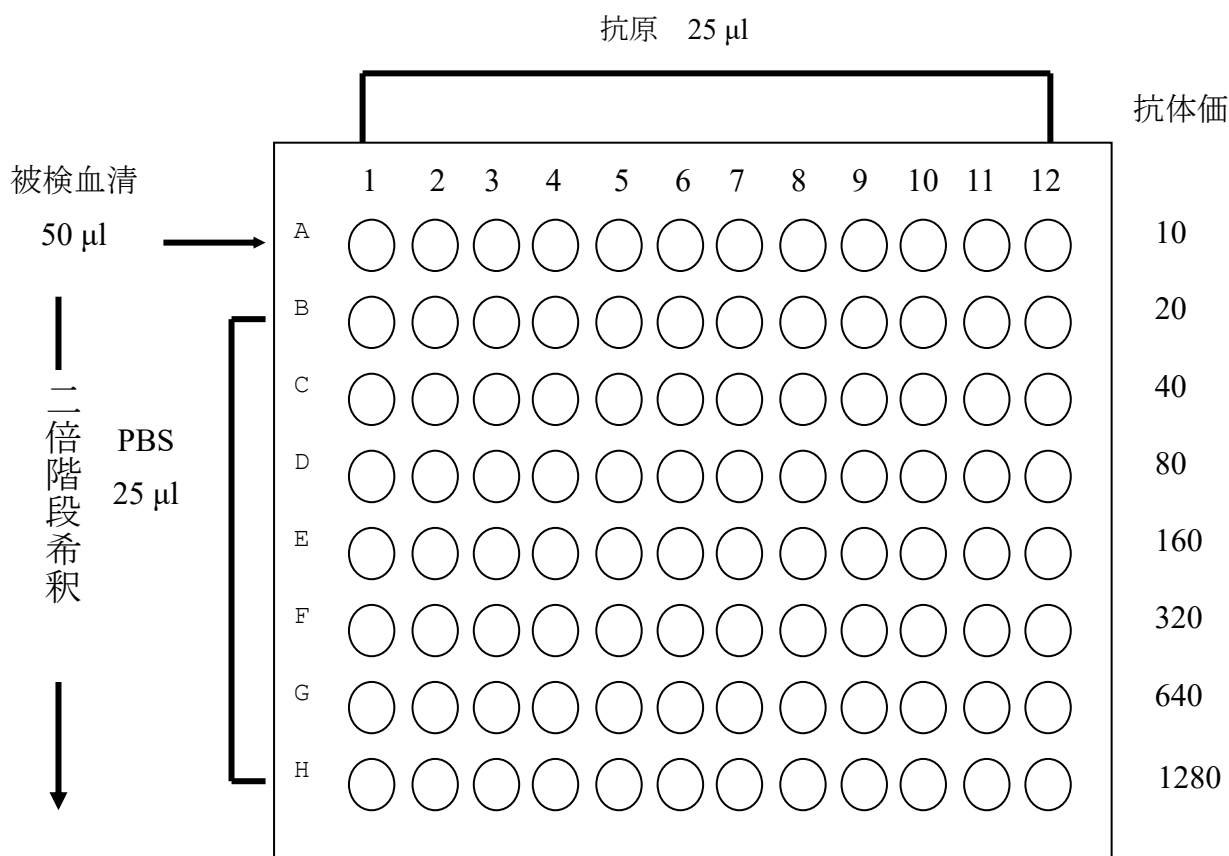
1% Glycerol 生理食塩水 (KIO₄ の作用を中和する) 1 ml glycerol を 99 ml の生理食塩水に加えて、濾過滅菌する。

手順:

- 1) 1/2 容のトリプシン溶液を 1 容の血清に加える。
- 2) 56℃ 30 分ウォーターバス内で非働化する。
- 3) 室温に冷却後、3 容の 1/90M KIO₄ 溶液を加え、混合し室温 60 分間静置する。
- 4) 3 容の 1% Glycerol 生理食塩水を加え、混合し室温 15 分間静置する。
- 5) 2.5 容の 0.85% NaCl を加えて混合する。最終希釈は 1:10 となる。
- 6) RDE(II)処理の場合と同様、HI 試験に使用する血球で吸収処理をする。
- 7) 非特異的凝集の有無を調べる。

1.3 抗原の HA 価測定および 4 HA/25 μl 抗原液の作製および HI 試験法

赤血球凝集阻止 (HI) 試験によるインフルエンザ分離株の同定の稿に準ずる。ただし、血清の階段希釈に関しては感染血清の抗体価は同定用の標準血清に比較して低いと予想されるので、10 倍から 1280 倍まででよい。



2. ウイルス中和試験による血清学的診断

ウイルス中和試験は、ヒトや動物のウイルス特異的な抗体を検出するのに極めて高い感度と特異性を有する。中和試験は、ウイルスと抗体を混合し中和反応するステップとそれを適当な宿主(培養細胞、孵化鶏卵、マウスなどの実験動物)に接種するステップによって構成されている。感染が認められないときには、その検体に中和抗体が存在していることを示している。感染の有無について、培養細胞を宿主として用いた場合、通常ウイルス感染による細胞変性効果(CPE)を指標としているが、それ以外にも様々な方法が開発されている。

中和試験は特定のウイルスに対する感染性を中和する抗体の測定に関して最も正確な方法である。インフルエンザウイルスの場合、中和抗体の主要な標的ウイルス蛋白質はヘマグルチニン(HA)であり、中和試験ではウイルス株特異的に抗体を検出することが可能である。ただ、中和試験は結果を得るのに時間がかかることや、試験に用いる感染性のウイルスを使用できる施設に制限があるなどの制約がある。

ここでは、MDCK 細胞を用いた中和試験の一例について説明する。

2.1 ウイルス中和抗体価の測定方法

ウイルス中和抗体価の測定は大きく「I. ウイルス力価測定」と「II. ウイルス中和試験」の 2 つの部分に分けることができる。以下にその手順を示す。ここでは 24 穴プレートを使用しているが、96 穴プレートなどにも変更可能である。

材料および試薬

1 ウイルス分離用培地

「3.4 インフルエンザウイルスの分離」の項を参照。

添加するトリプシン濃度についてはロット毎に至適濃度を決定しておく。

2 ウイルス希釈液

ウイルス分離用培地を使用する。

4 MDCK 細胞

細胞の継代によりウイルス感染に対する感受性が変化することが考えられるので、一定の継代数のものを使用する。

5 24 穴プレート

6 インフルエンザウイルス

孵化鶏卵または MDCK 細胞等を用いて増殖させる。方法については Part II の「3. 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離」および「4. 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖」の項を参照。

7 抗体陽性血清

入手可能な中和抗体陽性の血清を分注して-20℃以下に保存する。

8 抗体陰性血清

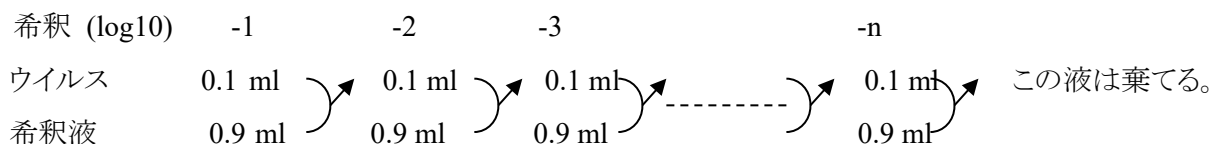
入手可能な中和抗体陰性の血清を分注して-20℃以下に保存する。

2.2 方法

2.2.1 ウイルス力価測定

中和試験に使用するウイルスの感染価を測定する。

1) ウイルスを 10 倍階段希釈する。



2) MDCK 細胞を播いた 24 穴プレートの各穴に 1 ml の PBS(-)を加えて洗浄する。

3) 通常-5~-8 の各希釈 0.1 ml を各穴に接種する(各希釈 6 穴)。

- 4) 34℃で1時間静置。
- 5) 分離用培地 0.5 ml を各穴に加える。
- 6) 34℃の CO₂ インキュベーター (5% CO₂) で3日間程度*培養する。
- 7) CPEの有無を判定し Reed&Muenchの方法で TCID₅₀を計算する(測定例を参照)。

測定例

ウイルス感染価測定記録 実施日:

ウイルス:

ウイルス希釈 (log10)	CPE陽性 ウェル数	CPE陰性 ウェル数	累積陽性 ウェル数	累積陰性 ウェル数	割合	%CPE陽性
0					/	
-1					/	
-2					/	
-3					/	
-4					/	
-5	6	0	12	0	12/12	100
-6	5	1	6	1	6/7	86
-7	1	5	1	6	1/7	14
-8	0	6	0	12	0/12	0

50%の感染を起こす希釈(log₁₀)は-6と-7の間にあり、その希釈は

$$-6 - \frac{86-50}{86-14} = -6.5$$

で求められる。測定は 0.1 ml を接種して実施しているので、このウイルス原液の感染価は

$$6.5+1.0=7.5 (\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml})$$

になる。

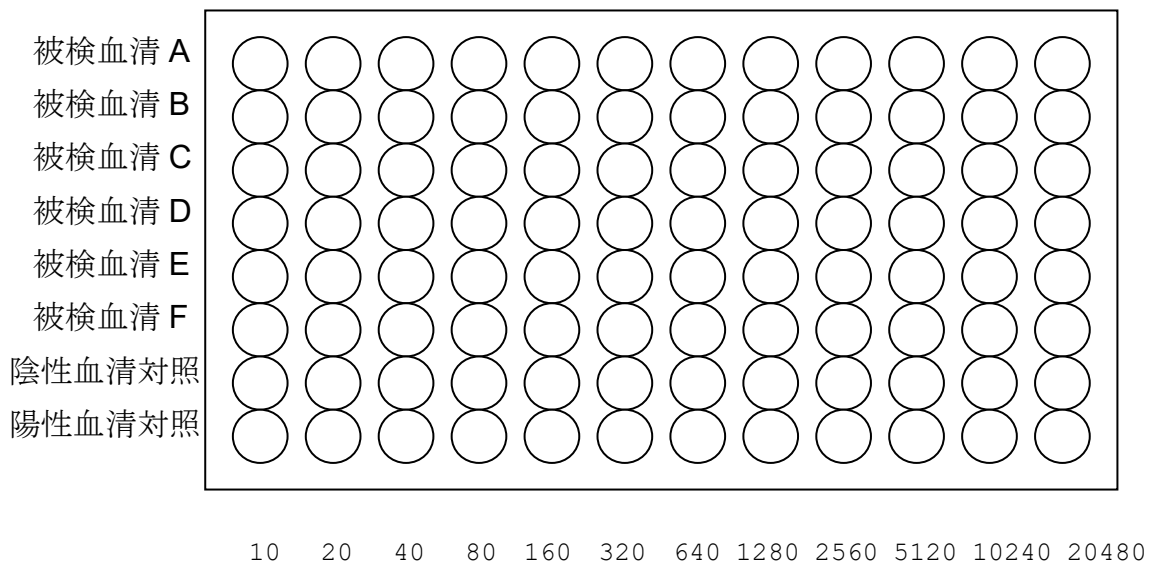
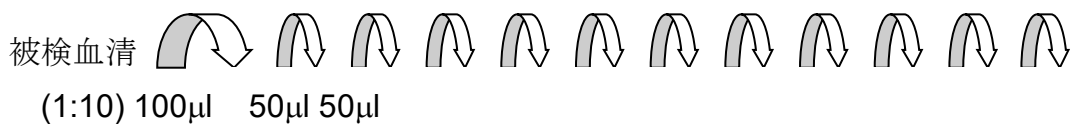
[注意事項]

*通常 34℃で 3 日間程度であるが、使用するウイルス株により異なる。CPE が認められるウイルスの最大希釈のところまで CPE が細胞全体に現れるのに必要な期間を設定する。温度についても、鳥由来のウイルスなどは 37℃の方がよく増殖するので必要に応じて設定する。

2.2.2 ウイルス中和試験

ウイルス力価を測定したウイルスを使用して被検血清の中和抗体価を測定する

1) 被検血清を下図のように 10 倍希釈から 2 倍階段希釈する* (96 穴プレートを使用)



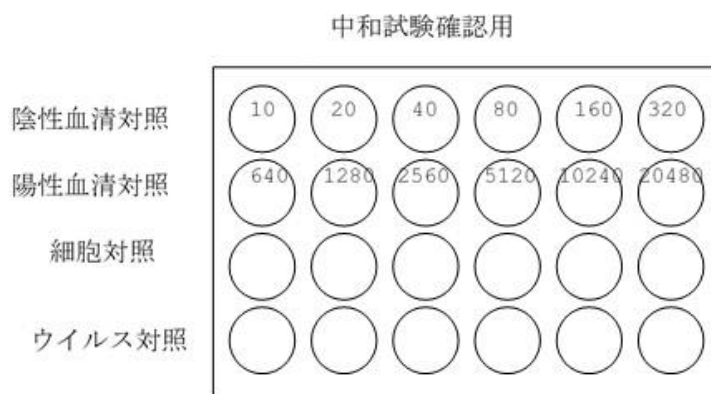
50 μl のウイルス希釈液を分注しておく

- 2) 各穴に 50 μl (約 100 TCID₅₀ の感染価になるように希釈しておく) のウイルスを加える。
- 3) 37℃で 30 分間静置し、抗原抗体反応を行う。
- 4) MDCK 細胞を播いた 24 穴プレートの各穴に 1 ml の PBS(-)を加えて洗浄する。

5) 被検血清とウイルス混合液 0.1 ml を 24 穴プレート各穴に下図のように接種する。



6) 血清の陽性対照および陰性対照とのウイルス混合液も 0.1 ml を 24 穴プレート各穴に下図のように接種する。



7) また細胞対照にはウイルス希釈液を、ウイルス対照には希釈したウイルス液(約 100 TCID₅₀/50 μl)とウイルス希釈液を等量混合したものを、それぞれ 0.1 ml を各穴に接種する。

8) 中和試験に利用したウイルス液について感染価を確認するために、下図のようにウイルス希釈液を 0.1 ml ずつ各穴に接種する(「2.2.1 ウイルス力価測定」の項を参照)。

9) 34℃で 1 時間静置する。

10) 0.5 ml のウイルス分離用培地を加える。

11) 34℃の CO₂ インキュベーター(5% CO₂)で 2 日間程度培養する。

12) ウイルス増殖を完全に抑制する血清の最大希釈倍数の逆数を中和抗体価とする**

* (1)被検血清はあらかじめ 56℃で 30 分から 1 時間処理しておく。

(2)非特異的中和反応を除くためには、血清をあらかじめ 3 容の RDE を加え反応後、56℃で 30 分から 1 時間処理するほうが特異性の高い結果が得られることがある。

(3)血清の希釈の範囲は予想される力価と目的に応じて選ぶ。

**中和抗体価の判定に際しては、陰性対照血清や陽性対照血清の力価が一定の範囲で測定できていることを確認する。また、ウイルスの感染価についても確認しておく。

Part V

薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出

日本国内で使用される抗インフルエンザ薬は、A 型インフルエンザウイルスの M2 蛋白質を標的とする M2 阻害剤、A 型および B 型ウイルスの NA 蛋白質を標的とする NA 阻害剤、PA 蛋白質を標的とするキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤の 3 種類に分類される。日本国内では、2023 年 7 月の時点で、M2 阻害剤としてアマンタジン(商品名シンメトレル)、NA 阻害剤としてオセルタミビル(商品名タミフル)、ザナミビル(商品名リレンザ)、ペラミビル(商品名ラピアクタ)およびラニナミビル(商品名イナビル)、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤としてバロキサビル マルボキシル(商品名ゾフルーザ)が販売されている。現在流行しているほとんどすべての A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)ウイルスは M2 蛋白質に特徴的な S31N 耐性変異をもっており、アマンタジンに対して耐性を示す。

NA 阻害剤に対する耐性ウイルスの判断基準は WHO によって示されており、耐性ウイルスは NA 蛋白質における特徴的な耐性変異および NA 阻害剤に対する感受性の低下により検出される。薬剤耐性株サーベイランスにおいては、A 型ウイルスでは 100 倍以上、B 型ウイルスでは 50 倍以上の感受性低下が確認された場合に耐性ウイルスと判定する。2008/09 シーズン以降、NA 蛋白質に特徴的な H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル耐性 A(H1N1)ソ連型ウイルスが世界中に広がり、日本国内でもほとんどすべての A(H1N1)ソ連型ウイルスはオセルタミビルに対して耐性を示した。現在流行しているほとんどの A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型ウイルスはオセルタミビルに対して感受性を示すが、世界各国で散発的に H275Y 変異をもつオセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスが検出されている。これらの H275Y 耐性変異株は、オセルタミビルと同様の分子構造をもつペラミビルに対して交叉耐性を示すことが報告されている。

新規抗インフルエンザ薬キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスの判断基準は、WHO によって暫定基準が示されており、3 倍以上の感受性低下が確認された場合に感受性低下ウイルスと判定する。バロキサビル マルボキシルの臨床試験では薬剤投与により PA 蛋白質に I38T/F/M 変異が検出され、ウイルスの感受性低下に関与することが明らかになっている。

1. 薬剤耐性変異の検出

1.1 NA、M および PA 遺伝子のシーケンス法による検出

シーケンス法の詳細は、「Part III: インフルエンザウイルスの遺伝子解析」を参照。

代表的な既知の NA および PA の阻害剤耐性変異は WHO 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスウェブサイトにまとめられている。

NA : [https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-neuraminidase-\(na\)-amino-acid-substitutions-associated-with-reduced-inhibition-by-neuraminidase-inhibitors-\(nais\)](https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-neuraminidase-(na)-amino-acid-substitutions-associated-with-reduced-inhibition-by-neuraminidase-inhibitors-(nais))

PA: [https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-polymerase-acidic-\(pa\)-protein-amino-acid-substitutions-analysed-for-their-effects-on-baloxavir-susceptibility](https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-polymerase-acidic-(pa)-protein-amino-acid-substitutions-analysed-for-their-effects-on-baloxavir-susceptibility)

NA 阻害剤耐性変異の検出に用いる、各ウイルス NA 遺伝子に対するプライマーは「Part III: インフルエンザウイルスの遺伝子解析」を参照。

代表的な既知の M2 阻害剤耐性変異は以下のとおりである。

M2 アミノ酸変異	亜型
L26F	A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H5N1)
V27A	A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H5N1)
A30V/T	A(H1N1)pdm09, A(H3N2)
S31N	A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H5N1)
G34E	A(H1N1)

M2 阻害剤耐性変異の検出に用いる、各ウイルス M 遺伝子に対するプライマーは以下のとおりである。

A(H1N1)pdm09

RT-PCR primer set (第1候補)	Forward	AMA-SZAM1+	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTAGAT-3'
	Reverse	AMA-Bm-M-1027R	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGITTTTT-3'
RT-PCR primer set (第2候補)	Forward	AMA-SZAM1+	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTAGAT-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGITTTTTTAC-3'
Sequence Primer	Forward	swMP-382-401F	5'-ATGGGCCTCATATACAACAG-3'
	Forward	swMP-682-703F	5'-GGTCTGAAAGATGACCTTCTTG-3'
	Reverse	swMP-967-947R	5'-GTTGACAAAATGACCATCGTC-3'

A(H3N2)

RT-PCR primer set (第1候補)	Forward	AMA-M1-2v2	5'-TCAGGGAGCAAAGCAGGTAGATA-3'
	Reverse	AMA-Bm-M-1027R	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT-3'
RT-PCR primer set (第2候補)	Forward	AMA-SZAM1+	5'-CTCGAGCAAAGCAGGTAGAT-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-3'
Sequence Primer	Forward	AMA-348-368F	5'-ACATTCCATGGGGCCAAAGAA-3'
	Forward	AMA-379-400F	5'-GTTATTCTGCTGGTGCACCTTGC-3'
	Reverse	AMA-981-1002R	5'-CAGCTCTATGCTGACAAAATGA-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-3'

代表的な既知のキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤耐性変異は以下のとおりである。

PA アミノ酸変異	亜型
I38T	A(H1N1)pdm09, A(H3N2)
I38F	A(H1N1)pdm09
I38M	A(H3N2)

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤耐性変異の検出に用いる、各ウイルス PA 遺伝子に対するプライマーは以下のとおりである。

A(H1N1)pdm09

RT-PCR primer	Forward	PA-5ePF1	5'-AGCAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Reverse	PA-5ePR1	5'-TATGTATTCAGTAGCCCTGCAGT-3'
Sequence Primer	Forward	PA-5eSF1	5'-TTTGTGCGACAATGCT-3'
	Forward	PA-5eSF2	5'-GTGGTGAACAGTATATGTAAC-3'
	Forward	PA-5eSF3	5'-GACAAGAAATGGCCAG-3'
	Reverse	PA-5eSR1	5'-CGTTCGTCGATGAAAT-3'
	Reverse	PA-5eSR2	5'-GATTTTTATTTTGTGGCT-3'
	Reverse	PA-5eSR4	5'-GCATTTGATTGCATCAT-3'

A(H3N2)

RT-PCR primer	Forward	SZAPA-F	5'-CTCGAGCAAAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Reverse	H3PA-pcr1R	5'-CAAATCGCTTATGTCCTGCAGT-3'
Sequence Primer	Forward	SZAPA-F	5'-CTCGAGCAAAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Forward	APA-3-F	5'-AAGGAGAACAGATTCATCGA-3'
	Reverse	H3PA-seq2R	5'-CCATTTCTTGCTTATGGTA-3'
	Reverse	H3PA-seq3R	5'-CTTGGGTCTTCAATGCTCA-3'
	Reverse	PA-1R	5'-CCAGCTCCAGTAGTGTGCA-3'

1.2 Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出

A(H1N1)pdm09 ウイルスは、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸がヒスチジン(H)からチロシン(Y)に変異(823 番目の塩基が C から T に置換)するとオセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性を示す。本法では、2 種類の異なる蛍光色素(FAM; 耐性株 Y275(T)、VIC; 感受性株 H275(C))で標識された TaqMan Probe を用いて One-step RT-PCR を行い、Allelic Discrimination 解析により、A(H1N1)pdm09 ウイルス NA 遺伝子について H275Y 変異の検出を行う。

本法は、HA 価が 8 程度以上のウイルス培養上清については RNA 抽出を行う必要が無く、培養上清を滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを直接 PCR 反応液に加えて検査を行うことができる。鼻腔拭い液などの臨床検体を使用する場合には RNA 抽出液を使用するが、検体中に含まれるウイルス量が非常に少ない場合があるため、検出感度は保証されない。

機器および試薬

RNase-free 滅菌蒸留水

RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

96 ウェルリアルタイム PCR 反応プレート

リアルタイム PCR 装置

リアルタイム RT-PCR 用反応試薬

QuantiTect Virus + ROX Vial Kit (QIAGEN Cat. #211033, 211035) を使用する機種

Roche LightCycler 480

Agilent MX3000P、Agilent MX3005P

ABI 7500、ABI 7500Fast、ABI QuantStudio 12K Flex

BioRad CFX96

QuantiTect Virus Kit (QIAGEN Cat. #211011, 211013, 211015) を使用する機種
 ABI 7900HT、ABI StepOne、ABI StepOnePlus、ABI 7300、ABI 7000

リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブ

RT-PCR primer set	Forward	H1N1NA-F690-719	5'-ATGIGCATGIGTAAATGGITCTTGCTTTAC-3'
	Reverse	H1N1NA-R847-872	5'-ACACATGTGATTTCACTAGAATCAGG-3'
耐性株検出用 Probe		FAM-274Ya-swH1N1-F823-835	5'-(FAM)TACTATGAAGAAT(MGB)-3'
感受性株検出用 Probe		VIC-H274a-swH1N1-F823-835	5'-(VIC)CACTATGAAGAAT(MGB)-3'

リアルタイム RT-PCR 反応

1. QuantiTect Virus + ROX Vial kit を用いた反応液

試薬	容量	最終濃度
5×QuantiTect Virus NR Master Mix	4.0 µl	1×
40×プライマー+プローブ Mix	0.5 µl	0.6 µM Forward primer 0.6 µM Reverse primer 0.1 µM FAM-Probe 0.1 µM VIC-Probe
QuantiTect Virus RT Mix	0.2 µl	
50×ROX Dye Solution ^{*1}	0.4 µl	1×
RNase free Water	12.9 µl	
Template ^{*2}	2.0 µl	
Total 容量	20 µl	

2. QuantiTect Virus kit を用いた反応液

試薬	容量	最終濃度
5×QuantiTect Virus NR Master Mix	4.0 µl	1×
40×プライマー+プローブ Mix	0.5 µl	0.6 µM Forward primer 0.6 µM Reverse primer 0.1 µM FAM-Probe 0.1 µM VIC-Probe
QuantiTect Virus RT Mix	0.2 µl	
RNase free Water	13.3 µl	
Template* ²	2.0 µl	
Total 容量	20 µl	

*1 Roche LightCycler480 では、代わりに RNase free Water を使用する。

*2 Template には HA 価が 8 程度以上のウイルス培養上清を用いる。培養上清を遠心して細胞由来成分を除去し、滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを 2 µl 使用する。HA 価が 8 程度以下のウイルス株の場合は RNA 抽出液 2 µl を使用する。鼻腔拭い液などの臨床検体を使用する場合には RNA 抽出液を 2 µl 使用するが、検体中に含まれるウイルス量が非常に少ない場合があるため、検出感度は保証されない。

ABI 7000、ABI 7300、ABI 7500、ABI 7500 Fast (Standard モード)、ABI 7900HT、ABI StepOne、ABI StepOnePlus、ABI QuantStudio 12K Flex および Roche LightCycler 480 では、H275 陽性コントロールと Y275 陽性コントロールは各数点、陰性コントロールは 1点とする。

Agilent MX3000P および Agilent MX3005P では、H275 陽性コントロールと Y275 陽性コントロールは各数点、陰性コントロールは 3点とする。

陰性コントロールは、RNase free Water を使用する。

3. ABI 7000、ABI 7300、ABI 7500、ABI 7500 Fast(Standard モード)、ABI 7900HT、ABI StepOne、ABI StepOnePlus および ABI QuantStudio 12K Flex での反応条件

Pre-read	60 C°	1 min	
Amplification	50 C°	20 min	
	↓		
	95 C°	5 min	
	↓		
	95 C°	15 sec	×40 cycles* ³
56 C°	45 sec (Data Collection)		
Post-read	60 C°	1 min	

*3 反応がプラトーに達すると各陽性コントロールを結んだ線が直線状にならず、結果判定が行いにくくなるのでサイクル数を 40 に設定する。

4. Roche LightCycler 480 での反応条件

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	20 min	4.4	None
Denature	None	1	95	5 min	4.4	None
PCR	Quantification	45* ⁴	95	15 sec	1.5	None
			56	45 sec	1	Single

5. Agilent MX3000P、Agilent MX3005P での反応条件

50 C°	20 min	
↓		
95 C°	5 min	
↓		
95 C°	15 sec	×45 cycles* ⁴
56 C°	45 sec (Data Collection)	

*4 反応がプラトーに達すると各陽性コントロールを結んだ線が直線状にならず、結果判定が行いにくくなるのでサイクル数を 45 に設定する。

Allelic Discrimination 解析

Allelic Discrimination 解析では、PCR 反応終了後(エンドポイント)の各サンプルの蛍光強度を利用して判定を行う。したがって、Applied Biosystems 社の機器では結果の判定に Amplification データを使用せず、Post-read データのみを使用する。Roche Diagnostics 社の機器では、反応終了後 Analyze で Endpoint genotyping を選択して解析を行う。

本法では、823 番目の塩基が C のものは VIC で修飾されたプローブによって検出され、塩基が T のものは FAM で修飾されたプローブによって検出される。したがって、反応終了後の蛍光強度は、サンプルの 823 番目の塩基の T と C の割合を反映している。

本法では、従来のように Ct 値を利用しての検査の精度確認は行わない。それに代わり、検査結果の判定は、Allelic Discrimination の図で以下の 2 つの条件が満たされた場合に有効とする。

- (1) H275 陽性コントロールおよび Y275 陽性コントロールを結んだ線が直線状になる。
- (2) 陰性コントロールが、両陽性コントロールの直線との交点付近にある。

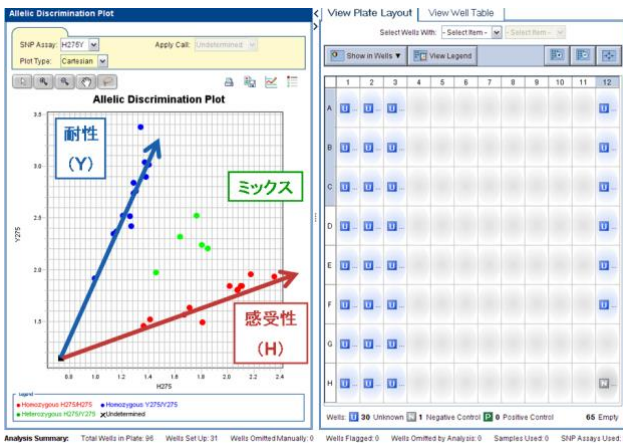


図 1. ABI 7500、ABI 7500 Fast、ABI StepOne および ABI StepOnePlus での解析結果の参考例

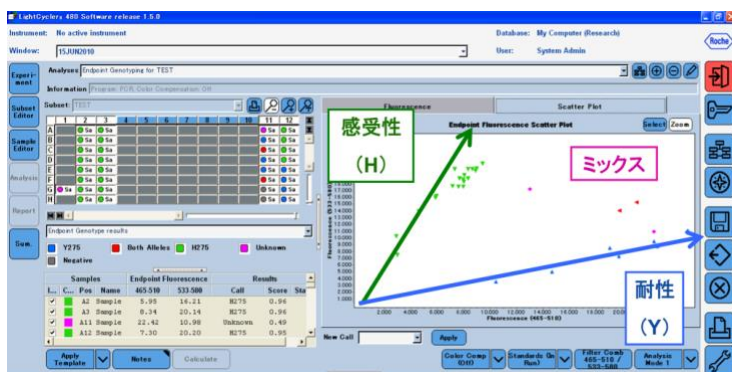


図 2. Roche LightCycler 480 での解析結果の参考例

2. 薬剤感受性試験

NA 阻害剤に対するウイルスの感受性は、薬剤感受性試験により算出される IC₅₀ 値 (NA 活性を 50% 阻害する薬剤濃度) によって表される。WHO は世界規模の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスにおける耐性株の IC₅₀ 値について判定基準を示しており、日本国内のサーベイランスもこの基準に準じている。日本国内のサーベイランスにおける耐性株の判定基準を以下に示す。

分類	A 型ウイルス	B 型ウイルス
	感受性株と比較して	
感受性株	< 10 倍 IC ₅₀	< 5 倍 IC ₅₀
感受性低下株	10-100 倍 IC ₅₀	5-50 倍 IC ₅₀
高度感受性低下株 (耐性株)	>100 倍 IC ₅₀	>50 倍 IC ₅₀

(WHO 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスウェブサイト <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza> を参照)

薬剤感受性試験は蛍光法および化学発光法に大別される。蛍光法は基質として MUNANA (4-(methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid) を使用し、化学発光法は基質として NA-Star あるいは NA-XTD を使用する。MUNANA 基質は Sigma-Aldrich および Biosynth から市販されている他に、Applied Biosystems からキットの一部として提供されている。NA-Star および NA-XTD 基質は Applied Biosystems からキットの一部としてのみ提供されている。

化学発光法は蛍光法より感度が高く、少量のウイルスで試験が実施できるが高価である。一方、蛍光法は安価であり、また耐性ウイルスと感受性ウイルスの IC₅₀ 値の差が大きいため、耐性ウイルスと感受性ウイルスの混合ウイルス株の検出に適している。

2.1 MUNANA 基質を用いる蛍光法

材料および試薬

蛍光測定用 96 ウェルプレート

蛍光測定用プレートリーダー

NA 阻害剤 (NI; NA inhibitor)

Oseltamivir carboxylate (Roche、Biosynth または MedChemExpress)

Peramivir (BioCryst、Biosynth または MedChemExpress)

Zanamivir (GlaxoSmithKline、Biosynth または MedChemExpress)

Laninamivir (Daiichi Sankyo、Biosynth または MedChemExpress)

4-Methylumbelliferone sodium salt (4-MU) (Sigma-Aldrich)

試薬	Kit を使用しない場合	NA-Fluor Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystems)
MUNANA 基質	2'-(4-Methylumbelliferyl)-a-D-N-acetylneuraminic acid, sodium salt hydrate (Sigma-Aldrich, Biosynth) -20°C 遮光保存	NA-Fluor Substrate -20°C 遮光保存
2×Assay Buffer	66.6 mM MES, 8 mM CaCl ₂ , pH 5.5-6.5 2-8°C 保存	NA-Fluor 2×Assay Buffer (66.6 mM MES, 8 mM CaCl ₂ , pH 6.5) 2-8°C 保存
Stop Solution	0.14 M NaOH in Ethanol 用時調製	NA-Fluor Stop Solution (0.2 M Na ₂ CO ₃) 2-8°C 保存

参照株 (International Reagent Resource (IRR) から入手可能)

FR-1755 - CDC Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Reference Virus Panel (version 3.0)

<https://www.internationalreagentresource.org/>

試薬の調製

2×Assay Buffer (Kit を使用しない場合)

以下の試薬を混合し、10 M sodium hydroxide で pH 5.5-6.5 に調整する。

ポアサイズ 0.2 μm のフィルターを通す。

13 g 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)

8 ml 1 M CaCl₂

992 ml 蒸留水

Stop Solution (用時調製) (Kit を使用しない場合)

以下の試薬を混合する (96 ウェルプレート 1 枚分)。

2.225 ml 0.824 M NaOH

11 ml absolute ethanol

1×Assay Buffer

2×Assay Buffer を蒸留水で 2 倍希釈する。

2.5 mM MUNANA master stock solution

MUNANA 25 mg を 20 ml の蒸留水で溶解し、1 アッセイ分ずつ小分けして -20°C 遮光保存。

200 μM MUNANA working solution (用時調製)

2.5 mM MUNANA stock solution 480 μl に 1 \times Assay Buffer 5.52 ml を加える(96 ウェルプレート 1 枚分)。

100 mM 4-MU master stock solution

4-MU 198.1 mg を 10 ml の蒸留水で溶解し、小分けして -20°C 遮光保存。

40% ethanol in NA-Fluor Stop Solution (用時調製) (Kit を使用する場合)

NA-Fluor Stop Solution 7.2 ml に absolute ethanol 4.8 ml を加える(96 ウェルプレート 1 枚分)。

25 mM NI master stock solution

蒸留水で溶解し、小分けして -20°C 保存。

500 μM NI working stock solution

25 mM NI master stock 50 μl に蒸留水 2,450 μl を加え、1 アッセイ分ずつ小分けして -20°C 保存。

ウイルスの不活化

試験に用いるウイルスは以下のいずれかの方法で不活化できる。

ウイルス液またはウイルス希釈液に最終濃度 0.1% NP-40 を添加する。

ウイルス液またはウイルス希釈液に最終濃度 0.2-1% Triton X-100 を添加する。

NA-Fluor Stop Solution に最終濃度 40% ethanol を添加する。

4-MU Standard Curve の作成

4-MU は MUNANA 基質がウイルスの NA 活性による切断を受けた結果として遊離する蛍光物質である。

4-MU の Standard Curve を作成することにより、各測定機器における蛍光値 (relative fluorescence unit; RFU) の linear range を特定することができる。MUNANA 基質を用いる薬剤感受性試験では、得られた RFU が linear range に収まるように、あらかじめ最適なウイルス希釈倍率を決定する必要がある。

1) 100 mM 4-MU master stock solution を Stop Solution で以下のとおり 2 倍階段希釈する。

希釈	必要量	濃度
Dil 1 (1:1000)	1 μ l MS + 1,000 μ l SS	100 μ M
Dil 2 (1:2)	500 μ l Dil 1 + 500 μ l SS	50 μ M
Dil 3 (1:2)	500 μ l Dil 2 + 500 μ l SS	25 μ M
Dil 4 (1:2)	500 μ l Dil 3 + 500 μ l SS	12.50 μ M
Dil 5 (1:2)	500 μ l Dil 4 + 500 μ l SS	6.25 μ M
Dil 6 (1:2)	500 μ l Dil 5 + 500 μ l SS	3.12 μ M
Dil 7 (1:2)	500 μ l Dil 6 + 500 μ l SS	1.56 μ M
Dil 8 (1:2)	500 μ l Dil 7 + 500 μ l SS	0.78 μ M
Dil 9 (1:2)	500 μ l Dil 8 + 500 μ l SS	0.39 μ M
Dil 10 (1:2)	500 μ l Dil 9 + 500 μ l SS	0.20 μ M
Dil 11 (1:2)	500 μ l Dil 10+ 500 μ l SS	0.10 μ M
Dil 12	500 μ l SS	0 μ M

MS: Master Stock

SS: Stop Solution

- 2) 上記の 2 倍階段希釈液をそれぞれ 96 ウェルプレート 2 ウェルに 200 μ l ずつ入れる。
- 3) プレートを excitation 350 nm-365 nm、emission 440 nm-460 nm の波長で測定する。
- 4) X 軸に 4-MU 濃度、Y 軸に RFU をとってグラフにプロットし、4-MU Standard Curve を作成する。

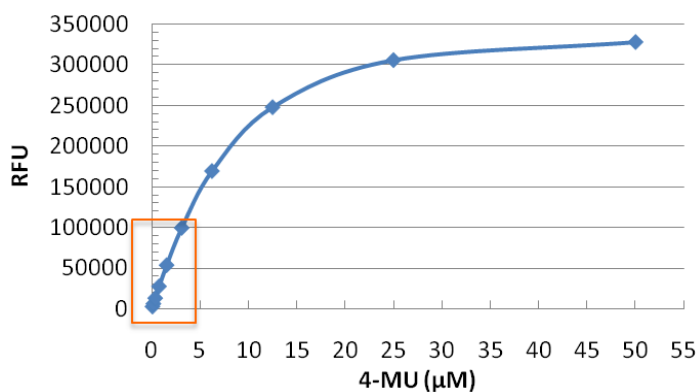


図 3. 4-MU Standard Curve

5) linear range RFU を決定し、薬剤感受性試験で利用するために、NA 活性の基準値を設定する。

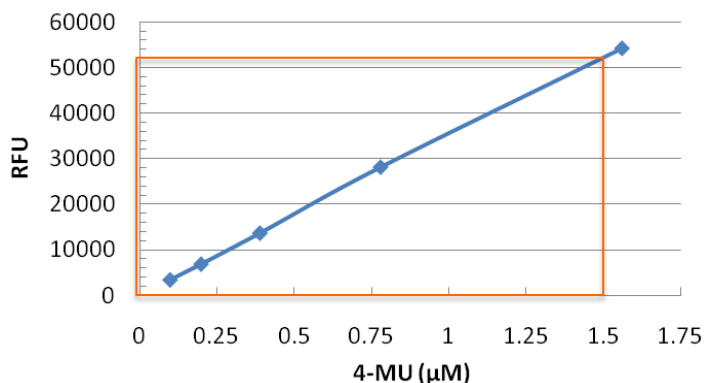


図 4. 図 3 の linear range RFU 拡大図

この例では 4-MU 1.5 μM 相当の RFU~52,000 が NA 活性の基準値として適当である。

ウイルス NA 活性の測定

薬剤感受性試験において信頼性の高い IC₅₀ 値を算出するためには、最適量のウイルスを使用する必要がある。そこで、試験に用いるウイルスの NA 活性を測定し、各測定機器において linear range RFU となる最適なウイルス希釈倍率を決定する。

1) 96 ウェルプレートすべてのウェルに 1×Assay Buffer を 50 μl ずつ入れる。

ウイルス 50 μl を A 行に入れ、以下のプレートレイアウトに従って B から G まで順次 2 倍階段希釈する。

H 行の No Virus Control には、1×Assay Buffer のみが入る。

ウイルス最終希釈

倍率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2 倍 A												
4 倍 B												
8 倍 C												
16 倍 D	Virus 1	Virus 2	Virus 3	Virus 4	Virus 5	Virus 6						
32 倍 E												
64 倍 F												
128 倍 G												
H	No Virus Control											

図 5. プレートレイアウト

- 2) 200 μ M MUNANA working solution 50 μ l を各ウェルに加える。
- 3) プレートにふたをして攪拌し、遮光して 37°C で 60 分間インキュベーションする。
- 4) Stop Solution を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、反応を停止する。
- 5) プレートを excitation 350 nm-365 nm、emission 440 nm-460 nm の波長で測定する。
- 6) No Virus Control の RFU 平均値を求めてバックグラウンド値を算出し、各ウェルの RFU 値からバックグラウンド値を引く。
- 7) X 軸にウイルス希釈倍率、Y 軸に RFU-バックグラウンド値をとってグラフにプロットする。
- 8) 各ウイルスについて、4-MU standard curve から得られた NA 活性の基準値となる RFU 値をもとに最適希釈倍率を算出する。

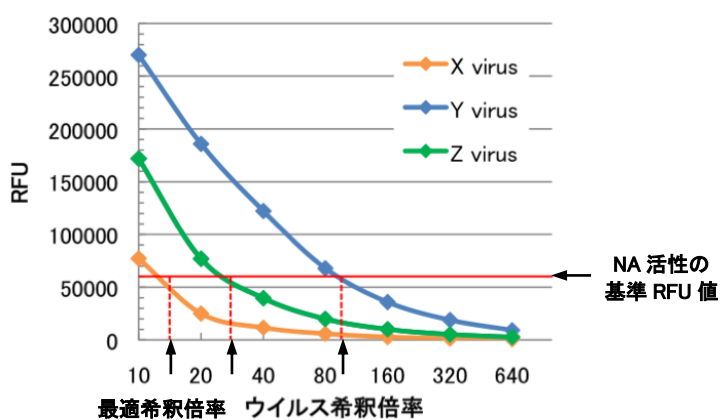


図 6. NA 活性プロットの参考例

NA 阻害剤感受性試験

- 1) 各ウイルスを上記で得られた最適希釈倍率に従って 1×Assay Buffer で希釈する(用事調整)。

2) 500 μ M NI working stock solution を 1 \times Assay Buffer で以下のとおり階段希釈する。

希釈	必要量	NI 濃度 (4 \times)	NI 最終濃度
Dil 1 (1:25)	30 μ l WS + 720 μ l AB	20,000 nM	5,000 nM
Dil 2 (1:3.16)	250 μ l Dil 1 + 540 μ l AB	6,330 nM	1,583 nM
Dil 3 (1:3.16)	250 μ l Dil 2 + 540 μ l AB	2,000 nM	500 nM
Dil 4 (1:3.16)	250 μ l Dil 3 + 540 μ l AB	633 nM	160 nM
Dil 5 (1:3.16)	250 μ l Dil 4 + 540 μ l AB	200 nM	50 nM
Dil 6 (1:3.16)	250 μ l Dil 5 + 540 μ l AB	63.4 nM	16 nM
Dil 7 (1:3.16)	250 μ l Dil 6 + 540 μ l AB	20 nM	5 nM
Dil 8 (1:3.16)	250 μ l Dil 7 + 540 μ l AB	6.3 nM	1.6 nM
Dil 9 (1:3.16)	250 μ l Dil 8 + 540 μ l AB	2 nM	0.5 nM
Dil 10 (1:3.16)	250 μ l Dil 9 + 540 μ l AB	0.64 nM	0.15 nM
Dil 11	540 μ l AB	0 nM	0 nM

WS: Working Stock

AB: Assay Buffer

3) 上記の階段希釈液を以下のプレートレイアウトに従ってそれぞれ 25 μ l ずつ入れる。

NI 最終濃度
(nM)

5,000	1,583	500	160	50	16	5	1.6	0.5	0.15	0	0
-------	-------	-----	-----	----	----	---	-----	-----	------	---	---

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Virus 1											No Virus Control
B												
C	Virus 2											
D												
E	Virus 3											
F												
G	Virus 4											
H												

図 7. プレートレイアウト

4) 1 で希釈したウイルス液をプレートレイアウトに従い、NI 濃度の低い 11 列から 1 列に向かってそれぞれ 25 μ l ずつ入れる。

No Virus Controlには、1 \times Assay Buffer を 25 μ l ずつ入れる。

- 5) プレートにふたをして攪拌し、37°Cで 20 分間インキュベーションする。
- 6) 200 μ M MUNANA working solution 50 μ l を各ウェルに加える。
- 7) プレートにふたをして攪拌し、遮光して 37°Cで 60 分間インキュベーションする。
- 8) Stop Solution を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、反応を停止する。
- 9) プレートを excitation 350 nm-365 nm、emission 440 nm-460 nm の波長で測定する。

IC₅₀ 値の算出

- 1) No Virus Control ウェルの RFU 平均値を求めてバックグラウンド値を算出し、各ウェルの RFU 値からバックグラウンド値を引く。
NI 存在下における各ウイルスの NA 活性率(%)は、
NI 存在下での RFU 値÷NI 非存在下(11 列)での RFU 値×100
として算出される。
- 2) X 軸に対数目盛で NI 濃度、Y 軸に NA 活性率(%)をとってグラフにプロットする。
sigmoidal curve-fitting または point-to-point plotting を用いて、IC₅₀ 値を算出する。

2.2 NA-XTD 基質を用いる化学発光法

材料および試薬

化学発光測定用 96 ウェルプレート

化学発光測定用プレートリーダー

NA 阻害剤 (NI; NA inhibitor)

Oseltamivir carboxylate (Roche、Biosynth または MedChemExpress)

Peramivir (BioCryst、Biosynth または MedChemExpress)

Zanamivir (GlaxoSmithKline、Biosynth または MedChemExpress)

Laninamivir (Daiichi Sankyo、Biosynth または MedChemExpress)

<p>NA-XTD Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystems)</p>
<p>NA-XTD Substrate 2-8°C 保存</p>
<p>NA-XTD Assay Buffer 2-8°C 保存</p>
<p>NA-XTD Accelerator 2-8°C 保存</p>
<p>NA Sample Prep Buffer (10% Triton X-100 in NA-XTD Assay Buffer) 2-8°C 保存</p>

参照株 (CDC-International Reagent Resource (IRR) から入手可能)

FR-1755 - CDC Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Reference Virus Panel (version 3.0)

<https://www.internationalreagentresource.org/>

試薬の調製

NA-XTD Substrate (用時調製)

NA-XTD Substrate を NA-XTD Assay Buffer で 1,000 倍希釈する。

25 mM NI master stock solution

蒸留水で溶解し、小分けして -20°C 保存。

500 μM NI working stock solution

25 mM NI master stock 50 μl に蒸留水 2,450 μl を加え、1 アッセイ分ずつ小分けして -20°C 保存。

ウイルスの不活化

試験に用いるウイルスは以下の方法で不活化できる。

ウイルス液に NA Sample Prep Buffer (10% Triton X-100 in NA-XTD Assay Buffer) を 1/10 量添加する。

ウイルス NA 活性の測定

薬剤感受性試験において信頼性の高い IC₅₀ 値を算出するためには、最適量のウイルスを使用する必要がある。そこで、試験に用いるウイルスの NA 活性を測定し、最適なウイルス希釈倍率を決定する。

1) 96 ウェルプレートすべてのウェルに NA-XTD Assay Buffer を 50 μ l ずつ入れる。

あらかじめ NA-XTD Assay Buffer で 5 倍希釈したウイルス 50 μ l を A 行に入れ、以下のプレートレイアウトに従って B から G まで順次 2 倍階段希釈する。

H 行の No Virus Control には、NA-XTD Assay Buffer のみが入る。

ウイルス最終希釈
倍率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 倍 A												
20 倍 B												
40 倍 C												
80 倍 D	Virus 1		Virus 2		Virus 3		Virus 4		Virus 5		Virus 6	
160 倍 E												
320 倍 F												
640 倍 G												
H	No Virus Control											

図 11. プレートレイアウト

2) 希釈済みの NA-XTD Substrate 25 μ l を各ウェルに加える。

3) プレートにふたをして攪拌し、室温で 30 分間インキュベーションする。

4) NA-XTD Accelerator 60 μ l を各ウェルに加え、2 時間以内にウェル当たり 1 秒間測定する。

5) X 軸にウイルス希釈倍率、Y 軸に Signal/Noise 値 (各希釈ウイルスの測定値 \div No Virus Control の測定値) をとってグラフにプロットする。

6) 各ウイルスについて、Signal/Noise 値が 40 となる希釈倍率が最適値となる。

ウイルスの NA 活性が低くウイルス希釈倍率が 5 倍以下となる場合は、培地に含まれるフェノールレッドの干渉作用により発光強度が低下し、正確な測定値が得られない可能性がある。

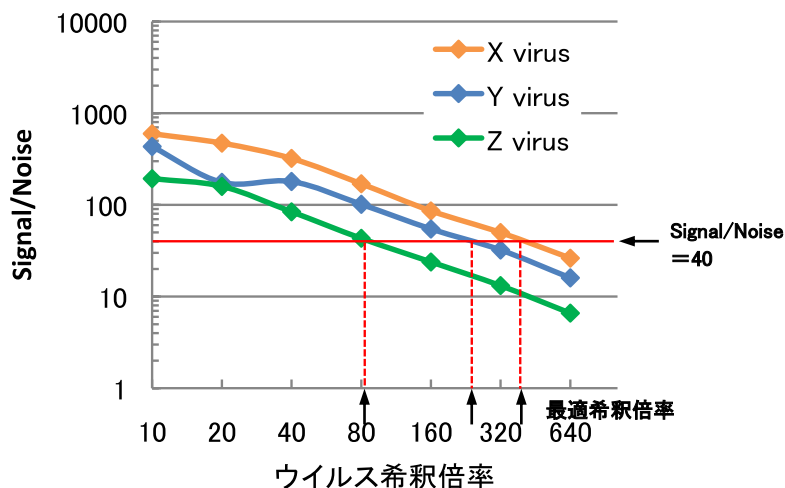


図 12. NA 活性プロットの参考例

NA 阻害剤感受性試験

- 1) 各ウイルスを上記で得られた最適希釈倍率に従って NA-XTD Assay Buffer で希釈する(用時調整)。
- 2) 500 μ M NI working stock solution を NA-XTD Assay Buffer で以下のとおり階段希釈する。

希釈	必要量	NI 濃度 (3 \times)	NI 最終濃度
Dil 1 (1:25)	30 μ l WS + 720 μ l AB	20,000 nM	6,600 nM
Dil 2 (1:5)	100 μ l Dil 1 + 400 μ l AB	4,000 nM	1,320 nM
Dil 3 (1:5)	100 μ l Dil 2 + 400 μ l AB	800 nM	264 nM
Dil 4 (1:5)	100 μ l Dil 3 + 400 μ l AB	160 nM	52.8 nM
Dil 5 (1:5)	100 μ l Dil 4 + 400 μ l AB	32 nM	10.56 nM
Dil 6 (1:5)	100 μ l Dil 5 + 400 μ l AB	6.4 nM	2.11 nM
Dil 7 (1:5)	100 μ l Dil 6 + 400 μ l AB	1.28 nM	0.422 nM
Dil 8 (1:5)	100 μ l Dil 7 + 400 μ l AB	0.256 nM	0.084 nM
Dil 9 (1:5)	100 μ l Dil 8 + 400 μ l AB	0.0512 nM	0.017 nM
Dil 10 (1:5)	100 μ l Dil 9 + 400 μ l AB	0.01 nM	0.003 nM
Dil 11	400 μ l AB	0 nM	0 nM

WS: Working Stock

AB: Assay Buffer

3) 上記の階段希釈液を以下のプレートレイアウトに従ってそれぞれ 25 μ l ずつ入れる。

NI 最終濃

度 6,600 1,320 264 52.8 10.56 2.11 0.422 0.084 0.017 0.003 0 0
(nM)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Virus 1											No Virus Control
B												
C	Virus 2											
D												
E	Virus 3											
F												
G	Virus 4											
H												

図 13. プレートレイアウト

4) 1 で希釈したウイルス液をプレートレイアウトに従い、NI 濃度の低い 11 列から 1 列に向かってそれぞれ 25 μ l ずつ入れる。

No Virus Control には、NA-XTD Assay Buffer を 25 μ l ずつ入れる。

5) プレートにふたをして攪拌し、37°C で 20 分間インキュベーションする。

6) 希釈済みの NA-XTD Substrate 25 μ l を各ウェルに加える。

7) プレートにふたをして攪拌し、室温で 30 分間インキュベーションする。

8) NA-XTD Accelerator 60 μ l を各ウェルに加え、2 時間以内にウェル当たり 1 秒間測定する。

IC₅₀ 値の算出

1) NI 存在下における各ウイルスの NA 活性率(%)を、

$$\text{NI 存在下での測定値} \div \text{NI 非存在下 (11 列) での測定値} \times 100$$

として算出する。

2) X 軸に対数目盛で NI 濃度、Y 軸に NA 活性率(%)をとってグラフにプロットする。

sigmoidal curve-fitting または point-to-point plotting を用いて、IC₅₀ 値を算出する。

検査依頼先

国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
TEL: 042-561-0771、FAX: 042-561-6149

執筆者リスト

国立感染症研究所

インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター

中村一哉
岸田典子
藤崎誠一郎
高下恵美
白倉雅之
渡邊真治
長谷川秀樹

感染症危機管理研究センター

久場由真仁
竹前喜洋
影山努

地方衛生研究所

長野秀樹(北海道立衛生研究所)
高橋知子(岩手県環境保健研究センター)
新開敬行(東京都健康安全研究センター)
清水耕平(横浜市衛生研究所)
小澤広規(横浜市衛生研究所)
安達啓一(愛知県衛生研究所)
小橋奈緒(石川県保健環境センター)
森 愛(神戸市健康科学研究所)
三好龍也(堺市衛生研究所)
河瀬曜(愛媛県立衛生環境研究所)
吉富秀亮(福岡県保健環境研究所)
眞榮城徳之(沖縄県衛生環境研究所)
岡峰友恵(沖縄県衛生環境研究所)