病原体検出マニュアル
インフルエンザ
（第 7.1 版）

（2026 年 10 月）

改訂履歴

版	改訂年月	主な改訂内容
1	2002 年 4 月	新規作成
2	2012 年 3 月	遺伝子解析および薬剤耐性検査を追加
3	2014 年 9 月	B 型系統同定用リアルタイム RT-PCR 追加、シークエンス用プライマー更新
4	2018 年 12 月	Part I・IIを最新知見に合わせて更新、シークエンス用プライマー更新、次世代シークエンスおよび PA 阻害剤耐性変異を追加
5	2023 年 8 月	リアルタイム RT-PCR 法およびシークエンス用プライマーを更新
6	2025 年 9 月	リアルタイム RT-PCR 法およびシークエンス法を更新
7	2026 年 9 月	サンプルライブラリ調製およびシークエンス用プライマーを更新、rhPCR 法による PA 阻害剤耐性変異の検出を追加※
7.1	2026 年 10 月	サンプルライブラリ調製を更新（43 ページ）※

※改訂箇所は黄色で示した。

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 4

1. 病原体 4
2. ヒトにおけるインフルエンザの疫学 4
3. 臨床症状 5
4. 検査の進め方 6

Part II: ウイルスの分離 7

1. インフルエンザウイルス分離のための臨床検体 7
2. ウイルス分離用検体の輸送と保存 8
3. 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離 8
   3.1 MDCK 細胞の培養 8
   3.2 インフルエンザウイルスの分離 10
4. 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離 13
   4.1 羊膜腔内接種 13
   4.2 漿尿膜腔内接種 16

Part III: ウイルスの同定 17

1. 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 17
   1.1 赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験 17
   1.2 血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去 18
   1.3 4 HA/25 μl 抗原液の作製（1 プレート 12 株） 21
   1.4 HI 試験 23
   1.5 判定 23
2. 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 25
   2.1 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出 25
   2.2 リアルタイム RT-PCR（TaqMan Probe 法）による同定 26
   2.3 （参考）Conventional RT-PCR 法による同定 34
   2.4 （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 37
   2.5 （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 .37
3. （参考）迅速抗原検査によるインフルエンザウイルス抗原の検出 38

Part IV: インフルエンザウイルスの遺伝子解析 39

1. RT-PCR 法とシークエンス法 39
1.1 RT-PCR 39
1.2 RT-PCR 産物の確認、精製 40
1.3 シークエンス 41
1.4 プライマーおよび RT-PCR 反応条件 50
2. GISAID（The Global Initiative on Sharing All Influenza Data）の利用 56

Part V: インフルエンザの血清診断 60

1. HI 試験による血清学的診断 60
1.1 HI 試験による血清診断上の注意 60
1.2 血清の前処理 60
1.3 抗原の HA 価測定、4 HA/25 μl 抗原液の作製および HI 試験 61
2. ウイルス中和試験による血清学的診断 62
2.1 ウイルス中和抗体価の測定 62

Part VI: 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出 66

1. 薬剤耐性変異の検出 66
1.1 NA、M および PA 遺伝子のシークエンス法 66
1.2 Allele-specific RT-PCR 法による NA-H275Y 変異の検出 69
1.3 RNase H2-dependent PCR（rhPCR）法による PA-I38T 変異の検出 73
2. 薬剤感受性試験 79
2.1 MUNANA 基質を用いる蛍光法 80
2.2 NA-XTD 基質を用いる化学発光法 86

検査依頼先 91

執筆者リスト 91

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（Nucleoprotein: NP）およびマトリックス蛋白質（Matrix protein: 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 分節（C 型および D 型ウイルスでは 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 型ウイルスの粒子表面には宿主細胞表面のレセプターに結合する赤血球凝集素（ヘマグルチニン、Hemagglutinin: HA）と、子ウイルスが細胞表面から出芽する際に、レセプター上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（Neuraminidase: NA）の 2 種類の糖蛋白質が存在する。一方、C 型および D 型ウイルスの粒子表面には赤血球凝集活性とエステラーゼ活性を併せもつ 1 種類の糖蛋白質（Hemagglutinin-esterase-fusion: HEF）が存在する。

A 型ウイルスはヒト以外の動物にも広く感染する人獣共通感染症ウイルスで、粒子表面の糖蛋白質の抗原性の違いに基づいて、HA は 18 亜型、NA は 11 亜型に分類される。H1～H16 および N1～N9 の亜型はカモなどの水禽類に存在し、H17 と H18、N10 と N11 の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、それまでの流行株とは大きく異なる HA および NA の亜型の組み合わせをもつ新型ウイルスが出現し、ヒトの間で世界的大流行（パンデミック）を引き起こすことがある。このような背景から、A 型ウイルスについては、ヒトと動物の両方を対象とした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。わが国においては、例年 11 月下旬から 12 月上旬にかけて流行が始まり、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が一般的であるが、近年では夏季にもインフルエンザの集団発生や小規模な流行があり、ウイルスも年間を通じて分離されている。なお、流行の程度やピークの時期は年によって異なる。

インフルエンザの大規模な流行がみられる年には、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するだけでなく、循環器疾患や慢性の基礎疾患などによる超過死亡も増加し、結果的に全体の死亡数が大きく上昇することが知られている。特に高齢者はこの影響を受けやすく、こうした傾向は先進国に共通して見られる現象である。全人口に対する高齢者の割合が急増しているわが国においても、インフルエンザ流行時には高齢者を中心に超過死亡が増加し、公衆衛生上の重要な課題となっている。

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、パンデミックを引き起こした。このウイルスの大流行に伴い、それまで流行していた季節性 A(H1N1)ソ連型ウイルスは消滅した。その後、2012 年以降は A(H1N1)pdm09、A(H3N2)香港型、B 型ビクトリア系統および山形系統の 4 種類が季節性インフルエンザとして流行していたが、B 型山形系統は 2020 年以降ヒトからの分離が確認されていない。

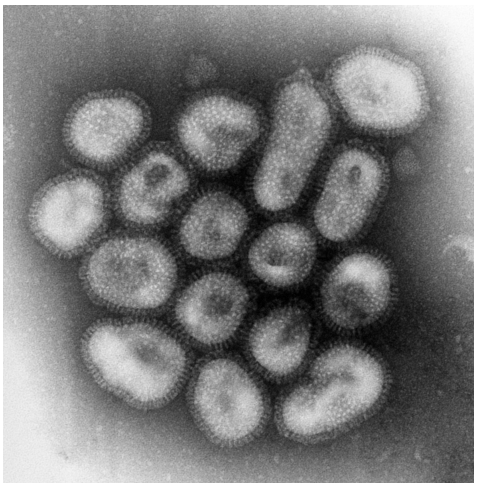


図 1　2009 年にパンデミックを起こしたブタ由来の
A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルス（国内分離株）の電子顕微鏡写真

3.　臨床症状

感染から 1～3 日間ほどの潜伏期間を経て、発熱・頭痛・全身の倦怠感・筋関節痛などの症状が突然出現し、これに続いて咳・鼻汁などの上気道炎症状が現れ、おおむね 1 週間以内に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ことが特徴である。高齢者ではインフルエンザ罹患後に、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発症しやすく、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（例年 11 月～4 月）に以下の 4 つの項目すべ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、非流行期における診断には、他の類似疾患との鑑別が重要であるため、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・同定を目的としたものであり、病因診断として最も信頼性の高い検査である。近年では各種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を短時間で判定することが可能となっているため、これらキットを併用した検査の実施が有効である。一方、血清学的手法は抗体価の上昇をもとに病因を確定する検査で、正確な判定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。これらの検査法の概要を図 2 に示す。

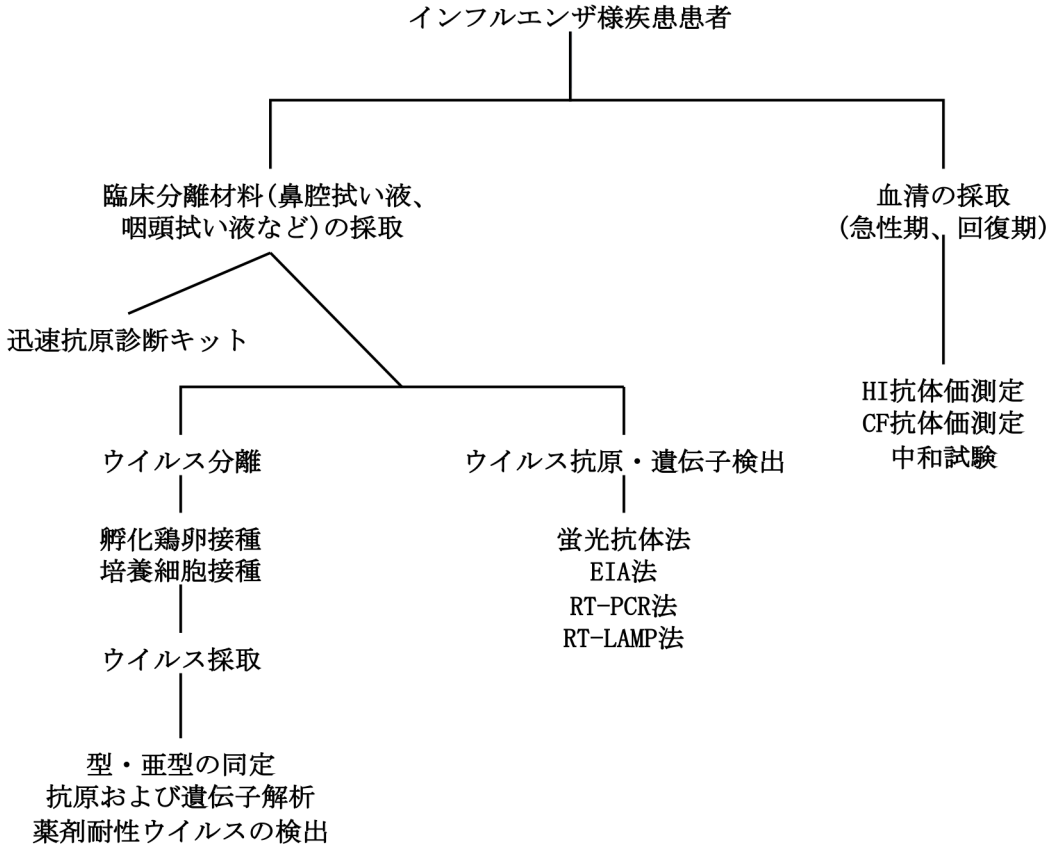


図 2 インフルエンザウイルス検査の概要

日本国内では地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）を中心に、全国的なインフルエンザサーベイランス体制が構築されている。インフルエンザ分離株の抗原解析結果は世界保健機関（World Health Organization: WHO）のワクチン株選定に活用されている。また、薬剤耐性インフルエンザウイルスの監視も継続的に行われており、国内外のインフルエンザ対策に重要な役割を果たしている。

Part II: ウイルスの分離

患者から採取した検体からのウイルス分離は、ウイルス感染症の病因診断法として感度が高く、最も信頼性の高い方法である。また、インフルエンザ予防の要となるワクチンの製造においても、ウイルスの分離は不可欠である。

かつては、インフルエンザウイルスの分離・培養には孵化鶏卵が多く用いられていた。しかし、近年では孵化鶏卵の入手が困難であることに加え、ウイルスを鶏卵内で増殖させる過程で抗原性や感染性が変化する可能性があることから、現在では、培養細胞を用いた分離法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をもとに製造されるため、ワクチン株の確保には孵化鶏卵で分離・継代された種ウイルスが不可欠である。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併用することが望ましい。

1. インフルエンザウイルス分離のための臨床検体

病因診断を目的としたウイルス分離あるいは抗原検出を成功させるためには、適切な臨床検体の採取が重要であり、検査材料として咽頭拭い液（Throat swab）、鼻腔洗浄液（Nasal wash）、鼻咽頭分泌液（Nasopharyngeal secretions: NPS）、鼻腔拭い液（Nasal swab）、鼻汁・鼻かみ液、うがい液などが用いられる。

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（Bovine Serum Albumin: 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）およびファンギゾン（アンフォテリシン B）（2 μg/ml）を添加した細胞培養培地（Minimum Essential Medium: MEM 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（Phosphate Buffered Saline: 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んで採取し、綿棒で拭って上記の培地等に浸す。なお、生理食塩水は pH が不安定になりやすいため原則として使用は推奨されない。

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ことが望ましい。参考として、うがい液を採取する場合の一例を示す：5～10 mlのPBS(-)を口に含み、できるだけ喉の奥で3～5秒間うがいをしてから容器に吐き出す。なお、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

ウイルス分離用検体は、採取後、氷中または 4℃に保管し、できるだけ速やかにウイルス分離を実施する。ウイルス分離までの日数が 5 日～1 週間程度であれば、4℃での保存を継続し、輸送も冷蔵状態で行う。それ以上の日数を要する場合は、検体を-70℃以下で保存し、輸送も凍結状態で行うことが望ましい。また、検体は可能な限り凍結融解を避ける。凍結融解を繰り返し行うと、ウイルスの感染性が低下し、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

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、維持コストの低さといった利点から 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 cm^2, 12.5 cm^2）（Greiner Cat. #658175, BD Falcon Cat. #353018）
Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）（Sigma-Aldrich Cat. #D6429）
ウシ胎仔血清（Fetal Bovine Serum: FBS）
ペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco Cat. #15140-122）
ファンギゾン（アンフォテリシン B）（Gibco Cat. #15290-018）
0.05%トリプシン/0.53 mM EDTA（Gibco Cat. #25300-054）
PBS(-)（Gibco Cat. #14190-144）

※上記試薬類は感染研において培養細胞の状態を検討した上で使用しているものであるが、他のメーカーの同等品に置き換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	5 ml
	100 μg/ml ストレプトマイシン	
ファンギゾン（アンフォテリシン B）	0.5 μg/ml	1 ml

3.1.3 培養細胞継代法（75 cm^2 フラスコ使用の場合）

1) 単層を形成した細胞の培地を吸引除去する。
2) PBS(-) 15 ml をフラスコの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 溶液を細胞表面全体に行き渡る程度の量加え、37℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内に静置する。*
4) 顕微鏡下で細胞が剥がれていることを確認した後、フラスコを軽くたたいて細胞を完全に剥がす。増殖用培地 10 ml を加え、泡立てないようにピペッティングして細胞を分散させる。細胞懸濁液を回収し、800 rpm（125×g）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) 新しい 75 cm^2 フラスコに増殖用培地 10〜20 ml を加えた後、分散させた細胞懸濁液 2 ml（約 1×10^6 cells/ml）を播種し、37℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で培養する。おおむね 3〜4 日で単層の細胞シートが形成される。なお、12.5 cm^2 フラスコに播種する場合は、細胞懸濁液 0.5 ml を、増殖用培地 5 ml とともに新しいフラスコに加えて培養する。この場合は 2〜3 日で単層の細胞シートが形成される。

*細胞のロットや状態によっては、トリプシン添加後、数分で細胞の円形化が観察される場合があるため、過剰なトリプシン処理をしないように注意が必要である。一方で、30 分以上経過しても細胞の形態にほとんど変化が見られない場合には、トリプシン/EDTA 溶液を追加して、再度 37℃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やすく、また作業中の事故等によってコンタミネーションを起こす可能性があるため、継代歴の浅い細胞を用いてストックを作製し、必要に応じて新たに立ち上げ直す体制を整えておくことが重要である。一定の継代歴に達した細胞は廃棄し、あらかじめ保存しておいた細胞ストックから新たな細胞を起こして使用することで、一定の分離効率を維持することが可能となる。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があるため、細胞の管理には十分な注意が必要である。

※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 Cat. #12648-010）に、$>1\times10^6$ cells/ml の濃度で細胞を懸濁する。
2) 2 ml のセーラムチューブに 1 ml ずつ分注し、徐々に凍結させるため、凍結処理容器（BICELL: 日本フリーザー株式会社、または無い場合は厚手のタオル等で包む）に入れ、-80℃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を 50 本、ワーキングストックを 100 本作製している。通常はワーキングストック細胞を用いて実験を行い、継代歴が 25 代に達した時点で当該細胞を廃棄し、保存していたワーキングストックから新たな細胞を起こして使用している。なお、ワーキングストックがすべて使用された場合にはマスターストックから再度ワーキングストックを作製する体制としている。

※ストック細胞の起こし方

1) 液体窒素タンクで保管されている細胞チューブを取り出したら、ただちに 37℃のウォーターバスにチューブを浸し速やかに融解する。凍結用培地に Dimethyl sulfoxide（DMSO）が含まれている場合には、チューブ内の全量をスピッツ管等に移して、800 rpm（125×g）で 5 分間遠心した後、上清を吸引除去し、少量の増殖用培地で泡立てないようにピペッティングして細胞ペレットを懸濁する。
2) 増殖用培地 15 ml を加えた 75 cm^2 フラスコに、細胞懸濁液を加え、37℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で培養を開始する。
3) 24 時間後、上清を吸引除去し、新たに増殖用培地 15 ml を加え、細胞が単層を形成するまで 37℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で培養する。

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 cm^2 プラスチックフラスコ）*

DMEM（Sigma-Aldrich Cat. #D6429）

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

ファンギゾン（アンフォテリシン B）（Gibco Cat. #15290-018）

PBS(-)（Gibco Cat. #14190-144）

アセチル化トリプシン（Sigma-Aldrich Cat. #T6763）

*24 ウェルマルチプレートを使用する場合は、使用する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である。

※上記試薬類は感染研においてウイルス分離効率を検討した上で使用しているものであるが、他のメーカーの同等品に置き換えても差し支えない。

3.2.2 試薬の調製

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	5 ml
	100 μg/ml ストレプトマイシン	
ファンギゾン（アンフォテリシン B）	0.5 μg/ml	1 ml

3.2.3 ウイルス分離法

1) 単層を形成した細胞の培地を吸引除去する。
2) PBS(-) 5 ml をフラスコの器壁に沿って静かに加えて細胞表面を洗浄し、同様の操作を分離用培地でも行う。続いて、接種試料 0.1～0.2 ml を細胞に接種し、細胞が乾燥しないようにすばやく全体に広げる。
3) ウイルスの吸着は 34℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で行い、10 分おきに容器を軽くゆすって、細胞への吸着を促す。
4) 30～60 分後には、吸着に用いた試料を除去することが望ましい。その後、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℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で培養する。使用するトリプシン濃度は細胞種やトリプシンのロットにより異なるため、あらかじめ予備試験を行い、細胞が 1 週間程度単層を維持できる範囲での最大濃度を設定することが必要である。
5) 培養期間中は、細胞変性効果（Cytopathic Effect: CPE）出現の有無を毎日顕微鏡下で観察する。
6) CPE が認められた時点で培養上清を回収するが、CPE が認められない場合でも 6 日目あるいは 7 日目には培地を回収する。

（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 アセチル化トリプシンを添加した DMEM に MDCK 細胞を懸濁して、最終濃度が 1×10^6 cells/ml となるように調整し、細胞懸濁液を 0.5 ml ずつ 24 ウェルマルチプレートに分注し、同時に検体 0.1 ml を各ウェルに接種する。接種後、34℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で培養する。

3.2.4 判定方法

培養上清中の赤血球凝集（HA）活性を測定する。方法については「Part III: 1.1_赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験」の項を参照。

3.2.5 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℃以下に保存する。

3.2.6 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。

（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

2010/11 シーズンには、細胞で継代培養を繰り返しても HA 価が 8 HA/ml に満たない A(H1N1)pdm09 ウイルス株が相次いで検出された。これを受けて、感染研では、インフルエンザウイルスの MDCK 細胞における増殖効率を向上させるため、種々の培地について検討を行った。その結果、DMEM を使用した場合に A(H1N1)pdm09 ウイルスの増殖が顕著に改善されることが明らかとなった（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 細胞および hCK 細胞について

近年 A(H3N2)亜型ウイルスでは、MDCK 細胞を用いた分離・培養において分離効率の低下が懸念されている。一方で、ヒトインフルエンザウイルス受容体である α-2,6 シアル酸を過剰発現させた改変 MDCK 細胞（AX-4 細胞）を用いた場合、MDCK 細胞と比較してウイルスの分離効率や回収ウイルスの力価が改善される例が報告されている（参考文献: https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4139-4146.2005）。

MDCK 細胞での分離成績が思わしくない場合には、細胞樹立機関との試料移動合意書（Material Transfer Agreement: MTA）を締結した上で、感染研から AX-4 細胞の分与・配布を受けることが可能である。AX-4 細胞の分与を希望する場合、または AX-4 細胞の継代維持法や AX-4 細胞を用いたウイルス分離法の詳細については、感染研インフルエンザ研究センター第一室まで照会すること。

また、α-2,6 シアル酸を過剰発現させ、鳥インフルエンザウイルス受容体である α-2,3 シアル酸をノックアウトした MDCK 細胞（hCK 細胞）も報告されている（参考文献: https://doi.org/10.1038/s41564-019-0433-6）。この hCK 細胞に関する要望がある場合も、感染研インフルエンザ研究センター第一室まで相談のこと。

4. 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離

ヒトの咽頭拭い液などの臨床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場合には、羊膜腔内接種法が最も適している。一方で、卵に馴化したウイルスを増殖させる目的には、十分なウイルス液量を確保できることから漿尿膜腔接種法が適している。

4.1 羊膜腔内接種

4.1.1 孵化鶏卵

通常、卵齢 8～9 日の孵化鶏卵を用いる。ただし、A(H3N2)ウイルスの分離に関しては、ボリスブラウン（銘柄）の 14 日卵が適している。

4.1.2 検卵

1) 接種に先立って検卵を行う。暗室等で孵化鶏卵に強い光源を当て、光源の反対側から内部を観察し、胎仔の発育状態を確認する。続いて、胎仔側の気室と卵殻膜との境界部において、血管の分布が比較的少ない部分を選び、その位置に印を付ける（図 1）。

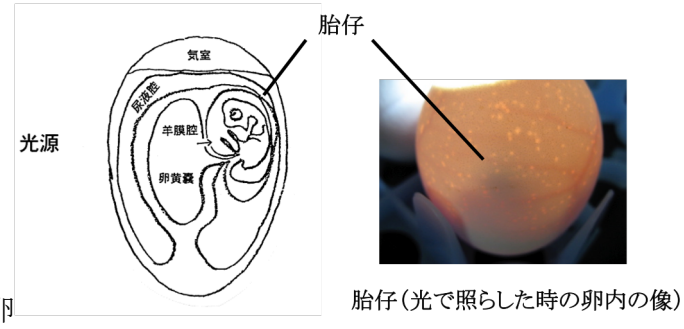


図 1 検卵

2) 検卵後は、卵を卵台に設置し、気室が上にくるように垂直に立てて保持する。

4.1.3 検体接種

1) 卵殻上部の気室部を中心にヨードチンキで清拭し（この操作は省略しても差し支えない）、続いて 70% エタノールで消毒する。
2) 検卵で付した印より約 1 cm 上部を、滅菌したハサミ等で直径約 1 cm 程度に卵殻を除去し、小窓を開ける。
3) 卵殻膜を透明化して胎仔の位置を確認するためには、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小窓より約 0.1 ml 滴下する方法が用いられる。また、卵殻膜を除去することによっても視認性を確保できる。
4) 次に、接種材料を注射器に吸い上げ、小窓から確認した胎仔の側に向けて注射針を刺し入れる。検卵しながら針の位置を確認し、羊膜腔内に針先が到達していることを確かめた上で、0.1 ml を接種する（図 2）。羊膜腔内に注射針が正しく入っているかを確認する方法としては、注射針にあらかじめ少量の空気を入れておき、羊膜腔に針を刺し入れた際に空気を押し出すという手技が有効である。羊膜腔外に針が入っている場合には、空気が泡となって上昇していく様子が卵殻膜越しに確認できる。一方、羊膜腔内に正しく針が挿入されている場合には、泡はその場に留まる。

羊膜腔内に染色液を接種した時の像

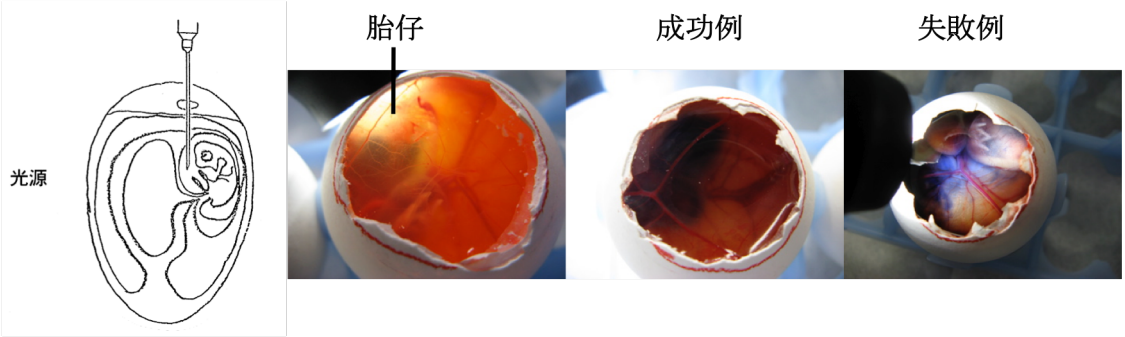


図 2 羊膜腔内接種法

5) 羊膜腔内に接種後は、孵化鶏卵の気室部に開けた小窓をセロハンテープで塞ぐ。セロハンテープは無菌ではないため、卵液が付着しないよう十分に注意する必要がある。

4.1.4 培養

接種した卵は、気室を上にした状態で静置し、加湿した環境下で 34℃にておおよそ 48 時間培養する。接種後 24 時間目に検卵を行い、胎仔が死亡していた場合には羊水を採取して継代を行う。

4.1.5　羊水採液

1) 培養卵は一夜、4℃に静置した後、卵殻上部の気室部を中心にヨードチンキで清拭し（この操作は省略しても差し支えない）、続いて 70%エタノールで消毒する。その後、消毒したハサミ等を用い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で取り除き、採液用注射器の針を用いて漿尿膜を破り、卵を傾けて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よう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くる。この際、風船状に膨らんだ羊膜腔から羊水を採取する（図 3）。採取される羊水の量は通常 1 ml 前後である。

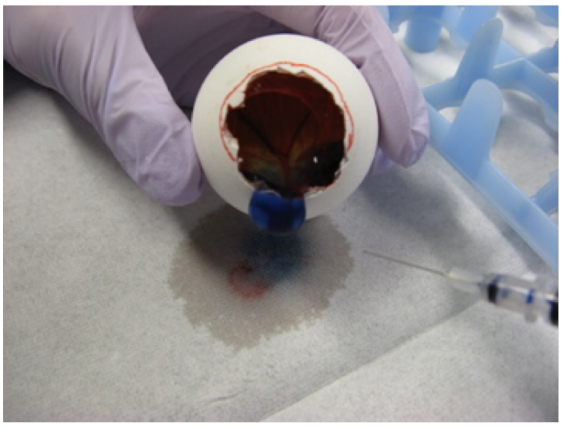


図 3　羊水採液法

4.1.6　判定

採取した羊水について HA 活性を測定する。測定方法は「Part III: 1.1　赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験」の項を参照する。

4.1.7　保存方法

-70℃以下に保存する。

4.1.8　ウイルスの継代培養

羊水中に HA 活性が検出されなかった場合には、回収した羊水を 10 倍に希釈し、再度羊膜腔内に接種する。この操作を数回繰り返すことでウイルスの分離を試みる。また、低い HA 価が検出された場合には、羊水をおおよそ 100 倍に希釈して再度接種を行う。

4.2 漿尿膜腔内接種

4.2.1 孵化鶏卵

卵齢 10～11 日の孵化鶏卵を用いる。検卵については羊膜腔内接種法に準じて行う。

4.2.2 検体接種

1) 検卵が済んだ孵化鶏卵は、卵台に気室を上にして垂直に立てる。次に、卵殻上部の気室部に付けた印（ライン）を中心にヨードチンキで清拭し（この操作は省略しても差し支えない）、続いて 70%エタノールで消毒する。
2) 印（ライン）より約 5 mm 上部において、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直径 1 mm 弱の穴を開ける。
3) 接種材料は 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）で通常 10～1000 倍に希釈し、希釈段階ごとに数個の卵に接種する。
4) 接種量は 1 個あたり 0.1～0.2 ml とし、接種後は穴を木工用ボンドあるいは加熱して融解させた少量のパラフィンなどで塞ぐ。

4.2.3 培養

培養条件は羊膜腔内接種法に準じて行う。

4.2.4 漿尿液採液

1) 培養卵は一夜、4℃に静置した後、卵殻上部の気室部を中心にヨードチンキで清拭し（この操作は省略しても差し支えない）、続いて 70%エタノールで消毒する。その後、消毒したハサミやピンセットを用いて気室部の卵殻を大きく取り除く。
2) 血管、卵嚢を傷つけないよう十分に注意しながら、太めの注射針（18 ゲージ）を装着した注射器で漿尿液を採取する。採取される漿尿液の量は通常 5～10 ml 程度である。

4.2.5 判定

採取した漿尿液について HA 活性を測定する。測定方法は「Part III: 1.1 赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験」の項を参照する。

4.2.6 保存方法

分注して-70℃以下に保存する。

Part Ⅲ: ウイルスの同定

1. 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採取されたスワブ等の検体を、孵化鶏卵や MDCK 細胞などの培養細胞に接種した結果、HA 活性が認められた場合には、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・漿尿液中に存在する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、亜型特異的抗体、あるいは型・亜型特異的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）を用いることができる。これらの方法はインフルエンザウイルスの型別および A 型ウイルスの亜型判別に有効であり、分離ウイルスの同定目的を達成できる。

感染研では、毎年のインフルエンザシーズンに先立ち、当該シーズンのワクチン株や疫学的に重要と考えられる株に対する抗血清を作製し、これを抗原とともに要望のある地衛研へ配布している。HI 試験を実施する際には、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除去する操作が必要であり、試験の信頼性・再現性を確保するためには、これらの処理が適切に行われることが重要である。さらに、試験ごとに参照抗原および被検抗原の抗原量を厳密に調整し、試験結果の判定基準を常に一定に保つことが、試験の信頼度を高める上で不可欠となる。以上の条件が十分に保証される施設においては、HI 試験はインフルエンザウイルスの同定に最も適した方法であり WHO による世界的なインフルエンザ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。

1.1 赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験

1.1.1 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や疫学的に重要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て得られた血清を凍結乾燥させたものである。抗原については、抗血清の作製に用いたものと同一のウイルスを感染させた孵化鶏卵の漿尿液を不活化したものが使用されている。

1.1.2 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

0.01 M PBS（pH 7.2）

生理食塩水（0.85% NaCl）

使用する赤血球を選択する際には、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。近年の A(H3N2)分離株は、モルモット血球に対しては感受性が高い一方で、鶏や七面鳥の血球に対する感受性が極めて低い例が多くみられる。B 型ウイルスでは、モルモット血球よりも鶏および七面鳥血球に良好に反応する株が存在する。また、七面鳥血球とフェレット血清の組合せでは、非特異的凝集や非特異的抑制が観察されることが知られている。

これらの知見を踏まえ、感染研では 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 試験および HI 試験を実施している。なお、モルモット血球にはまれにロット差がみられるため、3 ロットの血球を混合して使用している（表 1）。同一の HA および HI 試験系において複数の型を扱う場合には、モルモット血球を用いることが推奨される。血球選択にあたっては、同一検体でも血球種の違いによって HA 価が異なるため、HA および HI 試験の一連の操作は必ず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、一般的に七面鳥および鶏血球は 0.5%、ヒトおよびモルモット血球は 0.75%が用いられる。反応時間は、鳥類血球では 45 分、哺乳類血球では 60 分である。ただし、感染研ではモルモット血球浮遊液を 1%で使用しており、HA 価はわずかに低く出るものの、HA および HI の像を判定しやすくなる利点がある。

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

すべての血球において U 底マイクロプレートよりも V 底マイクロプレートを用いた方が、血球がきれいに日の丸状に沈降し、判定が容易となる。A(H3N2)の一部の株（例：A/Victoria/210/2009）では NA 活性により室温下で HA 像が消失することがあり、この現象を防ぐため、感染研では HA および HI 反応を 4℃で行っている。ここでは、感染研が実際に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。

1.2　血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去

感染研から分与される同定用抗血清について、非特異的血球凝集阻止因子を除去するためには以下の Receptor Destroying Enzyme（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。溶解後は-20℃以下で保存する。
2) RDE(II)「生研」（デンカ株式会社）を滅菌生理食塩水 20 ml で溶解する。
3) 血清 1 容に対して RDE 3 容を加える（例：血清 0.3 ml に対して RDE 0.9 ml）。

4) 37℃のウォーターバスで 18～20 時間作用させた後、56℃のウォーターバスで 30 分～1 時間加熱して RDE を不活化する。
5) 室温まで冷却した後、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（Guinea pig Red Blood Cell: 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) 室温で 1 時間吸収させる。途中で軽く転倒混和して血球が沈殿しないようにする。
8) 2,500～3,000 rpm（1940×g）で 5～10 分間遠心し、血清と血球を分離する。
9) 得られた吸収済み血清について、非特異的吸収が完全に行われたかどうかを確認する。**
10) 吸収が不完全な場合には、手順 6 から繰り返す。

*血清中に含まれる非特異的血球凝集阻止因子の性状や特異性は血清ごとに異なり、さらに RDE のロットによっても活性に差があることを考慮する必要がある。そのため、抗血清の全量を処理する前に、少量の抗血清を用いて RDE 処理および血球吸収を行い、非特異反応が完全に除去されるかを事前に確認することが望ましい。不完全な RDE 処理や血球吸収は HI 試験の信頼性を著しく低下させる要因となる。

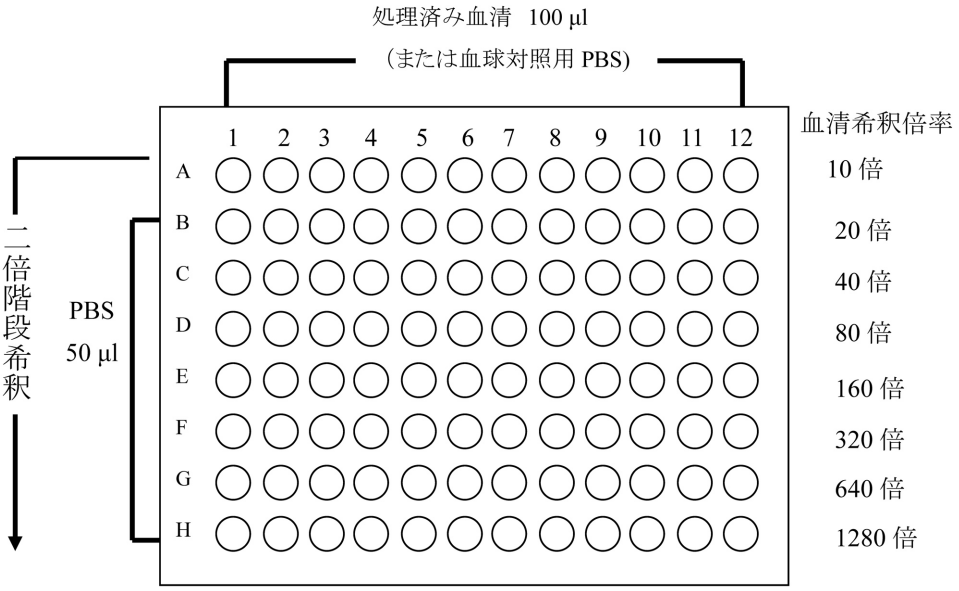
血清診断を実施する場合には、用いる血清や抗原の種類によって、非特異的血球凝集阻止因子の除去方法として RDE 法、トリプシン過ヨウ素酸法など、どの方法が適切であるかを検討する必要がある。

**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～H 列に、PBS（pH 7.2）を 50 µl 加える。
2) A 列の各ウェルに処理済みの血清を 100 µl 加える。1 列は血球対照として、血清の代わりに PBS を 100 µl 加える。
3) A 列から 50 µl を取り、B 列～H 列まで 2 倍階段希釈を行う。
4) すべてのウェルに 1% GRBC を 50 µl 加え、4℃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を観察し、非特異的血球凝集因子が除去されているかを確認する。
6) 交差反応を示さない亜型の抗原を用いた HI 試験を行い、RDE 処理により非特異的因子が完全に除去されたかを確認する。

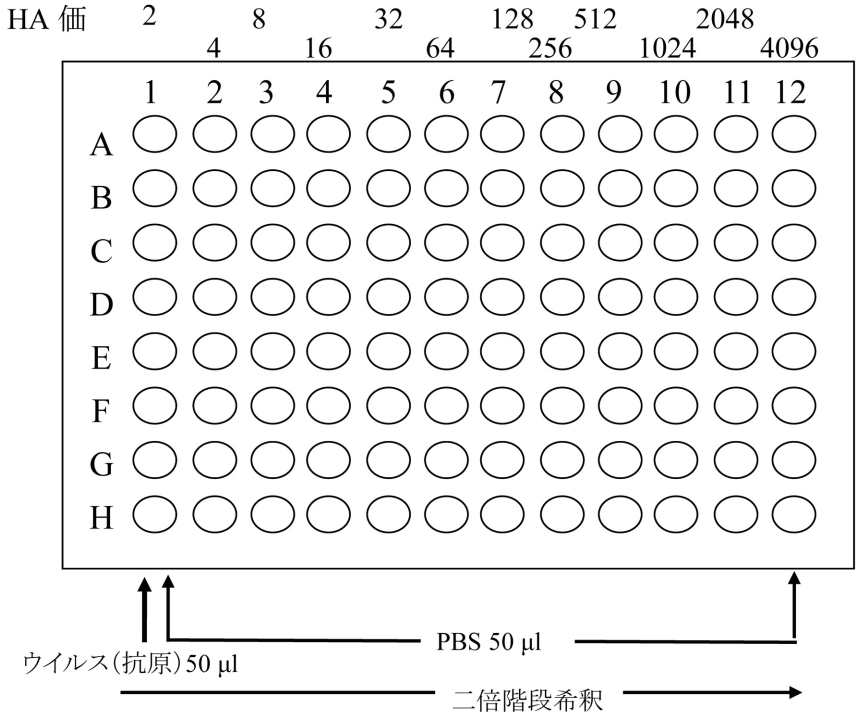
（参考）感染研から配布される分離株亜型同定用キット抗血清の血球吸収処理について

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、モルモット血球を用いて血球吸収処理を行った場合、非特異的な血球凝集抑制が認められ、特に B 型ウイルスの同定に支障をきたすことが判明している。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顕著に観察される。従来、型・亜型不明のインフルエンザウイルスの同定を HI 試験で実施する際には、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、および B 型ウイルスのいずれにも反応するモルモット血球の使用が推奨されてきた。しかし、その際にモルモット血球を用いて抗血清の血球吸収処理を行うことは望ましくない。血球吸収処理を行わない場合には HI 試験における非特異的血球凝集が懸念されるが、事前に非特異的凝集の有無を確認し、その結果を考慮して HI 価を判定することが求められる。



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

1) すべてのウェルに PBS を 50 µl 分注する。
2) ウイルス原液 50 µl を 1 列目の各ウェルに加える。血球対照用の 1 ウェルには、ウイルスの代わりに PBS を 50 µl 加える。
3) 1 列目の各ウェルをよく混和した後、50 µl を取り、順次 2 倍階段希釈を行う。
4) 全ウェルに 1% GRBC を 50 µl 加える。
5) 低速で撹拌後、4℃で 60 分反応させ、判定を行う。完全凝集を示すウイルス希釈の最高値の逆数を HA 価とする。



1.3 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 で割り、4 HA/25 µl 抗原液を作製するための原液希釈倍率を求める。すなわち抗原原液の HA 価が 64 の場合、8 倍希釈で 4 HA/25 µl 抗原液となる。

2) 1 回の試験に必要な抗原液量を見積もり、PBS で原液を希釈して 4 HA/25 µl 抗原液を作製する。

3) すべてのウェルに PBS を 50 µl 分注する。

4) A 列の各ウェルに、希釈した 4 HA/25 µl 抗原液を 50 µl 加える。

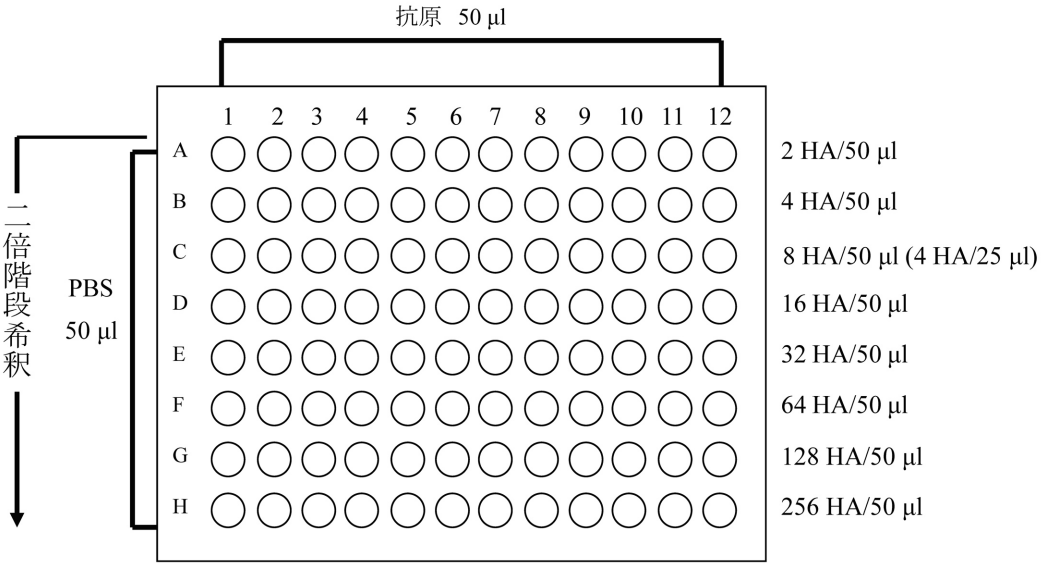
5) A 列の各ウェルをよく混和した後、50 µl を取り、順次 2 倍階段希釈を行う。

6) 各ウェルに 1% GRBC を 50 µl 加える。

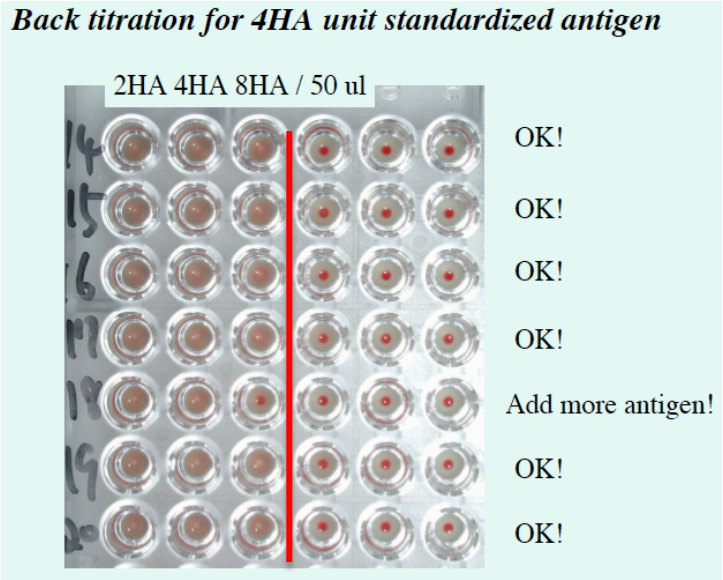
7) 低速で撹拌後、4℃で 60 分反応させ、判定を行う。

8) 3 ウェル目まで完全凝集が認められれば適正とする。完全凝集でない場合は、希釈液を再調整し、HA 価を再測定する。*

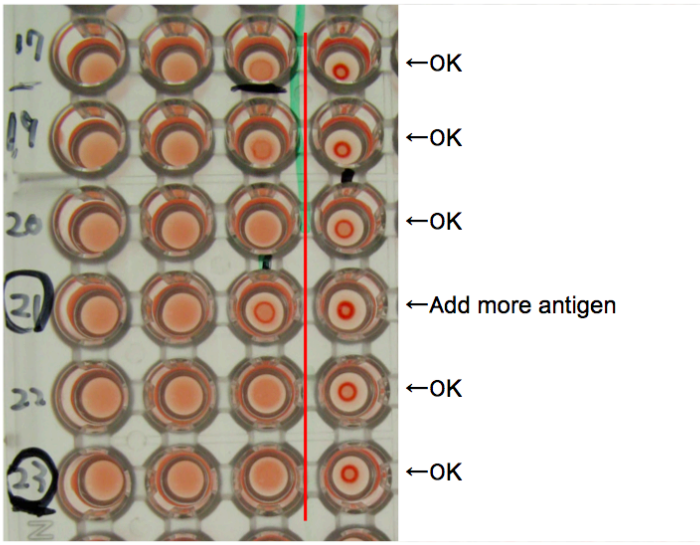
*調整した 4 HA/25 µl 抗原液は、必ず back titration により力価を確認した上で、その日のうちに HI 試験に使用すること。4℃で一晩以上保存した場合は、HI 試験を行う前に HA 価を再確認すること。



七面鳥血球の 8 HA/50 µl (4 HA/25 µl) 例



GRBC の 8 HA/50 µl (4 HA/25 µl) 例



1.4 HI 試験

1) PBS 25 µl をウェル 2～12 に分注する。

2) 1:10 に希釈した抗体をウェル 1 に 50 µl 分注する。

3) ウェル 1 から 25 µl を取り、ウェル 12 まで順次 2 倍階段希釈を行う。

4) 各ウェルに 25 µl ずつ、4 HA/25 µl のウイルス抗原を分注する。

5) 低速で撹拌し、室温で 60 分以上反応させた後、1% GRBC を 50 µl 加える。

6) 低速で撹拌し、4℃で 60 分間反応させた後、プレートを傾けずに判定する。*

*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。抗体の希釈倍率は、2 倍階段希釈終了後の倍率とし、抗原液や血球浮遊液による希釈は考慮しない。

0.5%七面鳥血球を用いた場合は、反応開始から 45 分後に判定を行う。プレートを傾けた際、沈降した血球が対照と同様にウェル内で涙目状に流れるものを陽性と判定する。

1.5 判定

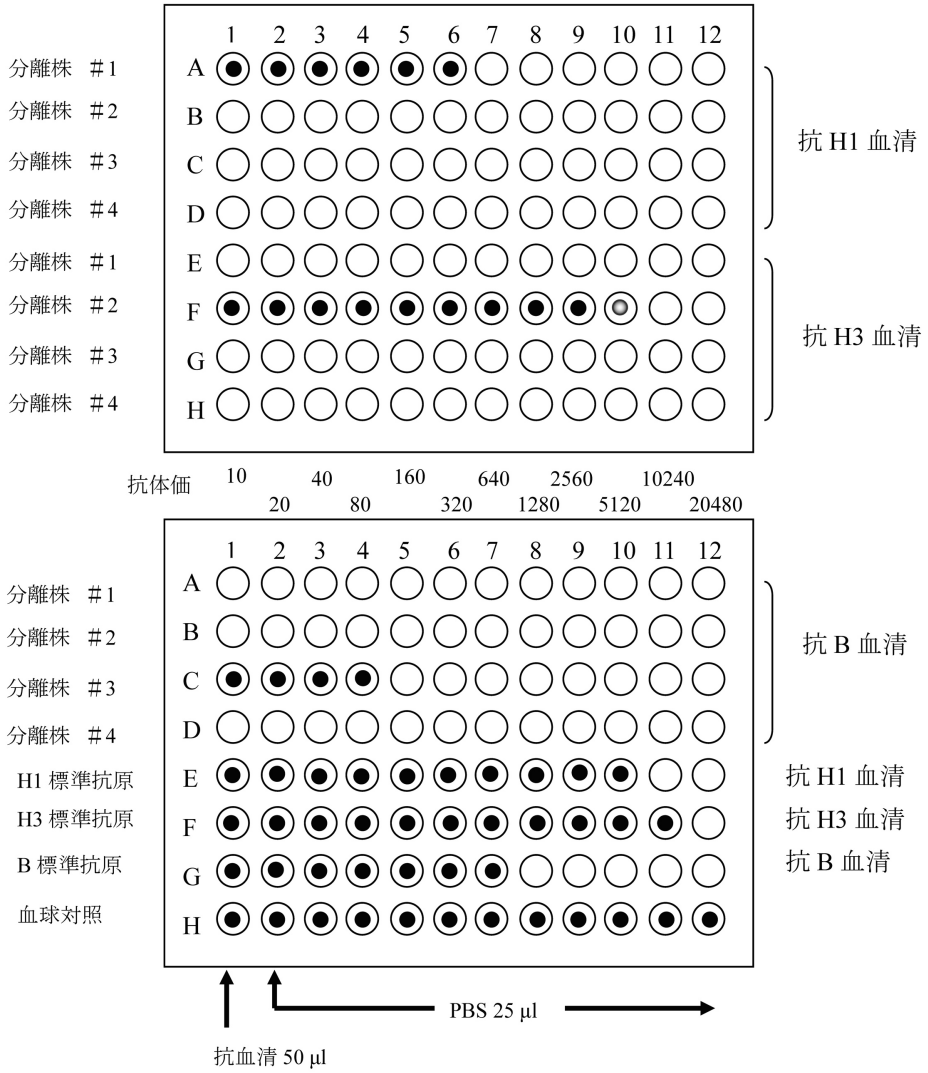
例 （下表・次ページ図参照）

	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には、インフルエンザウイルスでない可能性もあるため、インフルエンザ診断キットや RT-PCR 法等を用いて、A 型または B 型（可能であれば亜型まで）を確認する。



（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

A(H3N2)亜型野外株は、頻度は少ないものの、極めて微弱な赤血球凝集能を示す株もあり、HI 試験の実施が困難となる例が認められている。この場合、分離株の亜型同定は、リアルタイム PCR などの遺伝子解析手法やウイルス中和試験を代替として行う必要がある。感染研インフルエンザ研究センターでは、HI 試験ができない株の抗原性解析において、HI 試験の代替手法としてウイルス中和試験を採用している。これら代替手法の詳細については、インフルエンザ研究センター第一室に照会すること。

2. 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

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 法および Conventional 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、また参考として 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。

2.1 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出

2.1.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット（200, 1000 µl）、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）

2.1.2 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 µl 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 µl 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) スピンダウンした後、100%エタノール 560 µl を添加し、15 秒間ボルテックスする。再びスピンダウンして溶液を回収する。
3) 混合液 630 µl を QIAamp スピンカラムに注入し、キャップを閉めて 6000×g（8000 rpm）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 µl を添加し、キャップを閉めて 6000×g（8000 rpm）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 µl を添加し、キャップを閉めてフルスピード（20000×g、14000 rpm）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×g、14000 rpm）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 µl 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×g（8000 rpm）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℃以下で保存する。

2.2 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の各遺伝子分節は一本鎖の 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、電気泳動などのポスト 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ことができる。

2.2.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット（2, 10, 20, 200, 1000 µl）、RNase-free Water*、滅菌微量遠心チューブ（1.5 ml）、96 well 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、リアルタイム RT-PCR 試薬各種（以下参照）、RNase Inhibitor 20 Units/µl（100 µl）（Applied Biosystems Cat. #N808-0119）

リアルタイム PCR 試薬各種

PCR 試薬名	メーカー	Cat. #
TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Thermo Fisher Scientific	A15299, A15300
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR	Thermo Fisher Scientific	4444432, 4444434, 4444436
THUNDERBIRD Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix	TOYOBO	QRX-101
（参考）AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents	Thermo Fisher Scientific	AM1005, 4387424, 4387391
（参考）QuantiTect Probe RT-PCR Kit	QIAGEN	204443, 204445

*RNase-free Water 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、またはあらかじめ清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注したものを検査ごとに使用する。

2.2.2 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：146 bp

（A(H1N1)pdm09*亜型同定用）

A(H1N1)pdm09　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-pdmH1 Probe1 (2023)	5’-(FAM)CAGCCAGCAATRTTRCATTGACC(MGB)
NIID-pdmH1 Probe2 (2023)	5’-(FAM)CAKCCAGCAATGTTACATTGACC (MGB)

PCR 産物の長さ：187 bp

*A(H1N1)pdm09 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：178 bp

（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：105 bp

（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：98 bp

（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’-GTTGATAACCTKATMTTTTCATATCCTCTG

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

PCR 産物の長さ：98 bp

2.2.3 リアルタイム RT-PCR（TaqMan Probe 法）反応

以下に、感染研で検証した各試薬およびリアルタイム PCR 装置の反応条件を記載した。使用する試薬、リアルタイム PCR 装置によって、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、検出感度などを確認しておく必要がある。

なお、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）の識別については、AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents および QuantiTect Probe RT-PCR Kit でのみ検証済みであるため、その他の試薬を用いる場合は、事前に反応条件の最適化を検討すること。

2.2.3.1 TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG 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）

試薬	容量（µl）	最終濃度
4×TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	5	1×
Forward primer（10 µM）	1.2	0.6 µM
Reverse primer（10 µM）	1.2	0.6 µM
Probe（5 µM）*	0.4	0.1 µM
RNase-free Water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 µl	

*A(H1N1)pdm09 用のプローブについては、10 µM のプローブを以下の割合で混合。

NIID-pdmH1 Probe1 (2023)（10 µM） 0.24 µl

NIID-pdmH1 Probe2 (2023)（10 µM） 0.16 µl

－QuantStudio 5（Applied Biosystems, 以下 QS5）、LightCycler 480 システム II（Roche, 以下 LC480II）又は、LightCycler PRO システム（Roche, 以下 LCPro）を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate (℃/sec) **	Acquisition Mode**
UNG 反応*	1	25	2 分		
逆転写反応	1	50	15 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	2 分	4.4	None
PCR	45	95	3 秒	4.4	None
		60	30 秒	2.2	Single
冷却**	1	40	30 秒	2.2	None

*LC480II および LCPro を使用する場合においては、UNG 反応（25℃）は設定できないが、PCR 反応への影響はない。

**LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.2 TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR 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）

試薬	容量（µl）	最終濃度
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	5	1×
Forward primer（10 µM）	1.2	0.6 µM
Reverse primer（10 µM）	1.2	0.6 µM
Probe（5 µM）*	0.4	0.1 µM
RNase-free Water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 µl	

*A(H1N1)pdm09 用のプローブについては、10 µM のプローブを以下の割合で混合。

NIID-pdmH1 Probe1 (2023)（10 µM） 0.24 µl

NIID-pdmH1 Probe2 (2023)（10 µM） 0.16 µl

－QS5、LC480II 又は LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate (℃/sec)*	Acquisition Mode*
逆転写反応	1	50	5 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	20 秒	4.4	None
PCR	45	95	3 秒	4.4	None
		60	30 秒	2.2	Single
冷却*	1	40	30 秒	2.2	None

*LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.3 THUNDERBIRD Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix 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）

試薬	容量（μl）	最終濃度
THUNDERBIRD Next Probe 4×Mix	5	1×
50×ROX Reference dye	0.04	
Forward primer（10 μM）	1.2	0.6 μM
Reverse primer（10 μM）	1.2	0.6 μM
Probe（5 μM）*	0.4	0.1 μM
RNase-free Water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 μl**	

*A(H1N1)pdm09 用のプローブについては、10 μM のプローブを以下の割合で混合。

NIID-pdmH1 Probe1 (2023)（10 μM） 0.24 μl

NIID-pdmH1 Probe2 (2023)（10 μM） 0.16 μl

**厳密には 20.04 μl となる。

－QS5 を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間
逆転写反応	1	50	10 分
PCR 初期変性	1	95	1 分
PCR	45	95	15 秒
		60	45 秒

－LC480II 又は LCPro を使用する場合（高速サイクル条件が使用可）

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate（℃/sec）	Acquisition Mode
逆転写反応	1	50	10 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	30 秒	4.4	None
PCR	45	95	5 秒	4.4	None
		60	10 秒	2.2	Single
冷却	1	40	30 秒	2.2	None

2.2.3.4 （参考）AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents を用いた反応条件

（本試薬においてのみ PCR 反応が 3-step になっていること、および上記した試薬よりも反応時間が長いことに注意が必要）

試薬	容量（µl）	最終濃度
2×RT-PCR Buffer	12.5	1×
25×RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNase inhibitor（20 Units/µl）	0.1	
Forward primer（10 µM）	1.5	0.6 µM
Reverse primer（10 µM）	1.5	0.6 µM
Probe（5 µM）*	0.5	0.1 µM
RNase-free Water	2.9	
RNA template	5	
Total 容量	25 µl	

*A(H1N1)pdm09 用のプローブについては、10 µM のプローブを以下の割合で混合。

NIID-pdmH1 Probe1 (2023)（10 µM） 0.3 µl

NIID-pdmH1 Probe2 (2023)（10 µM） 0.2 µl

－QS5、LC480II 又は LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate（℃/sec）*	Acquisition Mode*
逆転写反応	1	50	10 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	10 分	4.4	None
PCR	45	95	15 秒	4.4	None
		56	30 秒	2.2	Single
		72	15 秒	4.4	None
冷却*	1	40	30 秒	2.2	None

*LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.5 （参考）QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いた反応条件

（上記した試薬よりも反応時間が長いことに注意が必要）

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

*A(H1N1)pdm09 用のプローブについては、10 µM のプローブを以下の割合で混合。

NIID-pdmH1 Probe1 (2023)（10 µM） 0.3 µl

NIID-pdmH1 Probe2 (2023)（10 µM） 0.2 µl

－QS5、LC480II 又は LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate（℃/sec）*	Acquisition Mode*
逆転写反応	1	50	30 分	4.4	None
PCR 初期変性	1	95	15 分	4.4	None
PCR	45	94	15 秒	1.5	None
		56	75 秒	1	Single
冷却*	1	40	30 秒	4.4	None

*LC480II 又は LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.4 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ことで、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）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が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、使用する試薬やリアルタイム PCR 装置によって、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。

2.3 （参考）Conventional RT-PCR 法による同定

インフルエンザウイルスの各遺伝子分節は一本鎖の 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、特に電気泳動などのポスト 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。

2.3.1 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 Water*、滅菌微量遠心チューブ（1.5 ml）、96 well 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 20 Units/µl（100 µl）（Applied Biosystems Cat. #N8080119）

*RNase-free Water 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、またはあらかじめ清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注したものを検査ごとに使用する。

2.3.2 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：244 bp

（H1pdm09*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

*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：

H3HA1-BIGIN　　5’-AGCAAAAGCAGGGGATAATTC

H3HA1-END　　5’-TGCCTGAAACCGTACCAACC

PCR 産物の長さ：1143 bp

（H1 ソ連型*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：729 bp

*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1119 bp

2.3.3 One-Step RT-PCR 反応

QIAGEN 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、試薬類の分注操作はすべて氷上にて行う。

試薬	容量
RNase-free Water	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（20 U/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などの条件によって、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、検出感度などを確認しておく必要がある。以下は、試薬に QIAGEN OneStep RT-PCR kit、サーマルサイクラーに GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を使用する場合の反応条件を示す。

（Type A、H1pdm09 同定用）

50˚C	30 min.	
↓		
95˚C	15 min.	
↓		
94˚C	30 sec.	×45 サイクル
50˚C	30 sec.	
72˚C	40 sec.	
↓		
72˚C	10 min.	
↓		
4˚C		

（H3、H1 ソ連型、Type B 同定用）

50˚C	30 min.	
↓		
95˚C	15 min.	
↓		
94˚C	30 sec.	×40 サイクル
50˚C*	30 sec.	
72˚C	80 sec.	
↓		
72˚C	10 min.	
↓		
4˚C		

*H3 HA プライマー対のみを使用の際は反応温度を 56℃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℃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。

2.3.4 RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

2.3.4.1 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 Cat. #G2101）、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 Cat. #313-90035 を希釈して使用）、6×Gel loading dye（Promega Cat. #G1881）。

2.3.4.2 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。

2.3.5 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：244 bp、H1pdm09：349 bp、H3：1143 bp、H1 ソ連型：729 bp、Type B：1116 bp もしくは 1119 bp）の確認により判定を行う。

2.4 （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

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： 728 bp

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： 416 bp

反応条件等の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)

2.5 （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

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ことができる。

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）などで精製した RNA を用いることで、RT-LAMP 法により A 型および H1pdm09 亜型の同定を行うことができる。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ことで、煩雑な RNA 精製を行わなくても、RT-LAMP 法により先の型・亜型同定を行うことができる（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ことがあるので、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について十分に検討する必要がある。また、RT-PCR 法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。

3. （参考）迅速抗原検査によるインフルエンザウイルス抗原の検出

わが国では、抗ウイルス薬によるインフルエンザ治療が一般的となっており、臨床現場において迅速診断の重要性は高い。現在、A 型および B 型インフルエンザウイルスの NP 蛋白質を抗原として検出するインフルエンザウイルス抗原検出用キットが各社から販売されている。しかし、抗原検出用キットはウイルス分離や RT-PCR 法などの遺伝子検出法と比べ、一般的に感度・特異性が低い。そのため、発病初期などウイルス量が少ない場合には、抗原が検出されないことがある。抗原検出用キットの陰性結果は、検体中にウイルス抗原が検出されなかったことを示すに過ぎず、インフルエンザウイルスの不在を証明するものではない。したがって、陰性結果のみでインフルエンザ感染を除外することはできない。また、検体採取部位や採取手技によっても結果が左右されるため、特に陰性例では、流行状況、患者の臨床症状、他の検査結果を総合的に考慮して判断する必要がある。さらに、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使用できないものもあるため、各キットの添付文書を確認し、使用方法に従うことが重要である。

Part Ⅳ: インフルエンザウイルスの遺伝子解析

1. RT-PCR 法とシークエンス法

遺伝子配列を用いた解析により、ウイルスの抗原性推定、流行株の変化、薬剤耐性獲得の有無などを把握することができる。このため遺伝子解析は抗原性解析と並んで、ウイルスサーベイランスにおいて極めて重要である。

各施設で遺伝子解析を実施する際の参考として、全ゲノム配列解析の方法および、インフルエンザサーベイランスの中心となる 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反応とPCR反応を同一チューブ内で行うOne Step RT-PCR法を用いた例を示す。RT-PCRに使用する試薬は各社から販売されているが、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase（Invitrogen）を使用した例を記載する。

以下に示す反応系はTotal volume 20 µlであり、メーカー推奨プロトコールの半量未満であるが、通常は後述するシークエンス反応に必要なPCR産物を十分に得ることができる。ただし、使用する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、各設備に応じてVolumeを適宜調整する必要がある。

なお、使用するプライマーおよび反応条件は「1.4 プライマーおよび RT-PCR 反応条件」に記載した。

RT-PCR 組成

・全ゲノム配列（A 型）および HA, NA 遺伝子用

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

・全ゲノム配列（B 型）用

試薬	使用量
2×Reaction Mix	10 μL
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.8 μL
FluB universal Primer cocktail	1.6 μL
Template RNA	5.0 μL
DEPC 処理水	2.6 μL
Total	20 μL

反応液 mixture を軽く遠心後、サーマルサイクラーにセットし、「1.4.2 RT-PCR 反応条件」に従って反応を行う。

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

※シークエンシングにサンガー法を用いる場合は、セグメントごとに RT-PCR を実施する必要がある。一方、次世代シークエンサー（Next Generation Sequencer: NGS）を用いる場合は HA、NA などのプライマーを混合し、1 tube での RT-PCR 反応も可能である。PA など長い PCR 産物は増幅効率が低いものの、概ね解析は可能である。ただし、流行ウイルスにおける遺伝子変化が増幅効率に影響する可能性は否定できない。必要に応じて相談のこと。

1.2 RT-PCR 産物の確認、精製

シークエンス反応に進む前に、RT-PCR により目的の増幅産物が得られていることを確認する。確認にはアガロースゲルを用いた電気泳動が広く利用されている。以下に例を示すが、キャピラリー電気泳動装置など他の方法もあるため、保有機器やコストを勘案して実施すること。

1.2.1 電気泳動（キャピラリー式）

NGS の普及に伴い、Agilent 2100 バイオアナライザ（Agilent、廃盤）、Qsep1（BiOptic）など、キャピラリー式の電気泳動装置も広く利用されるようになっている。各機器の条件に応じて、増幅産物の泳動・確認を適宜実施すること。なお、インフルエンザ全ゲノムの RT-PCR 産物では、セグメントによって増幅量が少ない場合があり、キャピラリー電気泳動でも確認が難しいことがあるため、留意する必要がある。

1.2.2 電気泳動（アガロースゲル）

① RT-PCR 産物 1 μl と Loading Dye をパラフィルム上などで適量混合し、1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行う。泳動 Buffer には 1×TAE を使用する。核酸検出試薬としては、従来のエチジウムブロマイドに代わり、Novel Juice（Bio-Helix）、Midori Green（Fast Gene）などの安全性の高い試薬が主流である。

② 電気泳動は 100V で 15～20 分行い、その後 LED/UV トランスイルミネーターで RT-PCR 産物を確認する。

1.2.3 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）が認められた場合、アガロースゲルから切り出して精製することで解析精度を高めることができる。非特異的産物が微量、または認められない場合は、切り出し精製は不要である（「1.2.4 RT-PCR 産物の精製」へ）。

精製には、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（タカラバイオ）、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）、Freeze N' Squeeze スピンカラム（Bio-Rad）等、市販キットを用いることで簡便に実施可能である（切り出し精製を行った場合は、「1.3 シークエンス」へ）。

1.2.4 RT-PCR 産物の精製

RT-PCR 産物に含まれる未反応塩基やプライマーを除去することで、シークエンス解析の精度を向上させることができる。

古典的な方法としてエタノール沈殿による精製も可能だが、AMPure XP（Beckman Coulter）や QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）などの市販キットを用いると、より簡便に精製できる。

1.3 シークエンス

1.3.1 次世代シークエンサー

COVID-19 パンデミックを契機に、NGS が広く普及した。ここでは Illumina 社の MiSeq、iSeq 100、MiSeq i100 等を用いたインフルエンザウイルスの遺伝子解析法を示す。

1.3.1.1 サンプルライブラリ調製

Illumina 社の NGS に対応したライブラリ調製試薬は、Illumina、QIAGEN、New England Biolabs など各社から市販されている。近年は各社の開発競争により、簡便なキットが増加しているため、実際に NGS を行う際には比較・検討が推奨される。

ここでは一例として、QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN）を用いた手順を示す。

① 断片化、末端修復反応

試薬	使用量
FX buffer（10×）	2 µl
FX Enzyme Mix	4 µl
H_2O	12 µl
RT-PCR 産物	2 µl（>10 ng）
Total	20 µl

※標準プロトコルでは Total volume 50 µl であるが、ここでは 20 µl に改変した系を示す。

よく混合し、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、以下のプログラムで反応を行う。

4℃ （hold）
↓
32℃ 15 min
65℃ 30 min
↓
4℃ ∞

・サーマルサイクラーはあらかじめ4℃の状態にしておくこと。
・heated lid は 70℃に設定する。

② アダプターの付加

試薬	使用量
DNA Ligase Buffer（5×）	8 µl
DNA Ligase	4 µl
Adapter	2 µl
H_2O	6 µl
Sample（断片化・末端修復済み）	20 µl
Total	40 µl

よく混合し、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、以下のプログラムで反応を行う。

20℃ 15 min
↓
4℃ ∞

・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。

※アダプタープレート（96 well）から必要なアダプターを選択して使用する。また使用したアダプター（バーコード）の種類と、対応するサンプルの情報を必ず記録すること。
※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、使用時にアルミシールに穴を開ける必要がある。反応には 2 µl を使用する。使用後、残ったアダプターは別チューブに移し、-20℃以下で保存可能。

③ サンプルの精製

DNA ライブラリの精製を行う。この際、AMPure XP などのマグネットビーズを使用することで、DNA ライブラリの Size selection を同時に行うことができる。

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
↓
1 min 風乾後、magnet plate から外す
↓← 23 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、20 µl を回収し別チューブに移す

2 回
・magnet plate 上で操作する

※サンプルは-20℃で保管可能

※以前は AMPure XP を用いた精製を 2 回実施していたが、1 回で問題ないことを確認した。

※その他のマグネットビーズを使用する場合は、適宜使用量を変更すること。

④ ライブラリ増幅反応

試薬	使用量
HiFi PCR Master Mix（2×）	10 µl
Primer Mix（10 µM each）	0.5 µl
Sample（精製後のライブラリ）	9.5 µl
Total	20 µl

ピペットでよく混合する

↓

98℃　　2 min

↓

98℃　　20 sec ┐
60℃　　30 sec ├ 6 サイクル
72℃　　30 sec ┘

↓

72℃　　1min

4℃　　∞

↓← 20 µl　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 ┐ 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

↓← 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℃で保管可能

⑤ DNA 定量

サンプル（調製済み DNA ライブラリ）の濃度測定には Qubit Fluorometer（Invitrogen）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 倍希釈等適宜希釈して再測定する。

⑥ サンプル調製

MiSeq の場合

各サンプルを 0.4 ng/µl の濃度に調整する

↓

濃度を 0.4 ng/µl 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（用時調製）

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）

iSeq 100 の場合

各サンプルを 0.3 ng/µl の濃度に調整する

↓

濃度を 0.3 ng/µl 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

↓←95 µl Resuspension buffer（Illumina）

または 10 mM Tris-HCl pH 8.5

20 µl を Illumina カートリッジに load、iSeq 100 にセットする

※最終的に、各サンプルから等量のライブラリ DNA を混合できれば良い。そのため、各ライブラリから同じ DNA 量を分取・混合し、最終的な load 濃度（例: 0.4 ng/µl や 0.3 ng/µl）に希釈するなど、必要に応じて工夫しても良い。

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

Illumina のカートリッジには、read 数やサイクル数の異なる製品が販売されている。このため、解析サンプル数や求める read の長さに応じて適切なカートリッジを選択する必要がある。インフルエンザ研究センター第一室では、全セグメント解析を行う場合、MiSeq Reagent Kit v2（300-cycles）では 40 株程度、iSeq 100 i1 Reagent v2（300-cycle）では 24 株程度を目安としている。ただし、必要とするデータの信頼度に応じてサンプル数を加減すること。

※ウイルス量について

NGS 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。そのため、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 数が不足し、目的とする配列を十分に解析できない場合がある。このような場合には、同時解析に用いるサンプル数を減らす、あるいは量の少ないサンプルの DNA 量を増やすなどの調整が必要となる。

1.3.1.2 データ解析

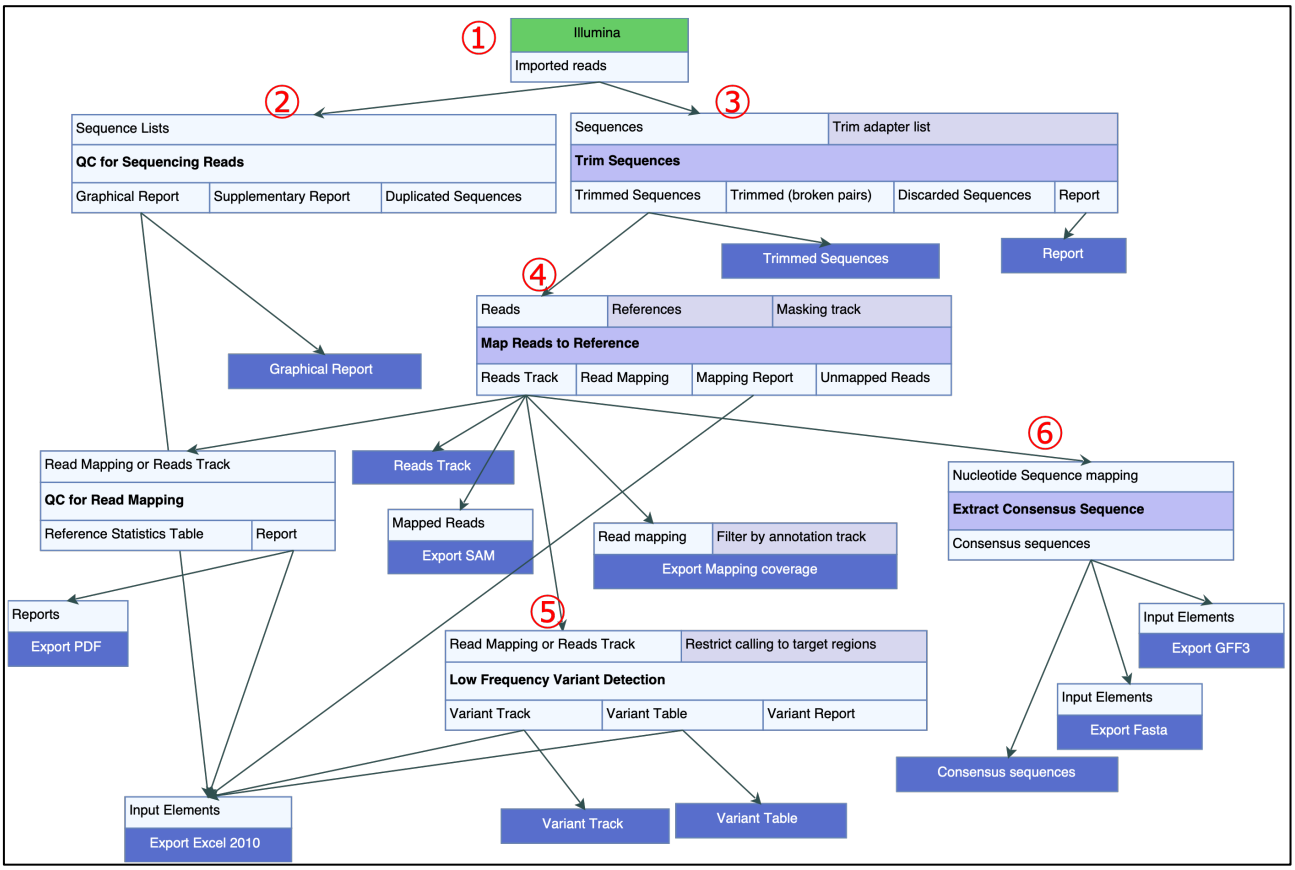
Sanger 法シークエンサーとは異なり、NGS から得られるデータは塩基配列に quality data が付随した多数の短い配列断片である。これらの配列断片を結合させるための解析プログラムは有償・無償を含め多数存在する。以下に、CLC Genomics Workbench（QIAGEN）を用いた解析例を簡潔に示す。なおここでは紹介していないが、多数サンプルの自動処理機能やアミノ酸置換検出機能を追加・カスタマイズすることも可能である。また、ソフトウェアはバージョンアップにより項目名等が変更される場合があるため、使用時には最新の仕様に注意すること。

Resequencing（CLC Genomics Workbench）

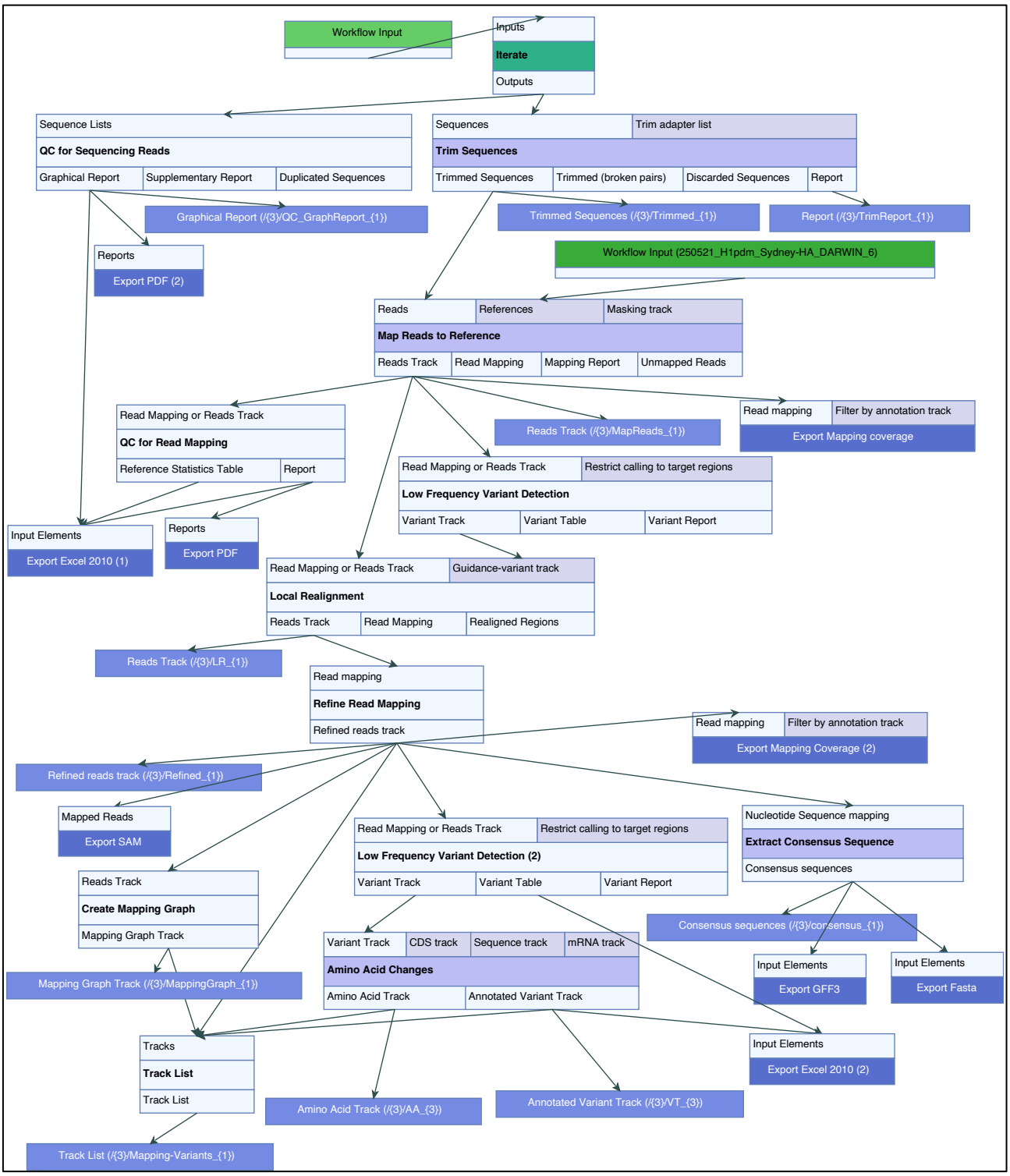
以下に基本的な処理手順を示す。

①MiSeq から出力されたデータ（***.R1_001.fastq.gz 等）を Workbench に import した後、②"Create Sequencing QC Report"を実行しデータの quality 評価、③"Trim Sequences"を用いて配列のトリミングを実施。④"Map Reads to Reference"を実施し、reference 配列を基準にトリミング済みの配列をアセンブルする。アセンブル結果を SAM ファイルとして保存しておくと、他の viewer アプリ（例: Tablet: https://ics.hutton.ac.uk/tablet）で確認する際に便利である。⑤" Low Frequency Variant Detection"を実行し、アセンブルされた配列と reference 配列とで異なる塩基を出力する。この際、Mixture と判定された塩基情報も併せて出力される。⑥"Extract Consensus Sequence"を実行し、アセンブル結果から consensus 配列を FASTA 形式で出力する。

上記手順は CLC Genomics Workbench 内で各コマンドを選択して実施可能であるが、以下のように worksheet として作成・保存しておくと、一連の処理を自動で実行することができる。なお、各コマンドには細かな条件設定があるため、実際の使用に際して不明な点があれば相談のこと。



また、アミノ酸置換の検出や複数サンプルの反復処理などの機能を追加し、以下のような workflow を作成することも可能である。興味がある場合は試してみるとよい。



1.3.2 サンガー法シークエンシング

1.3.2.1 シークエンス反応

Applied Biosystems 社のシークエンサーでは、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）が使用される。以下にその使用例を示す。

① 下記の Mixture を作製する。使用するプライマーは「1.4.1.2 HA セグメント用プライマー」および「1.4.1.3 NA セグメント用プライマー」を用いる。

試薬	使用量
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	1 µl
BigDye sequencing Buffer	2 µl
プライマー（1 µM）	1.6 µl
H_2O	x µl
RT-PCR 産物	y µl（10～20 ng）
Total	10 µl

② 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、下記のプログラムで反応を行う。

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

※シークエンス産物を一時保存する際は 4℃で保存し、数日以上保存する場合は-20℃以下で保存する。

1.3.2.2 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存する未反応の蛍光色素を除去する。エタノール沈殿法による除去も可能であるが、BigDye XTerminator（Applied Biosystems）、MicroSpin G-25 Columns（Cytiva）等を用いることで、反応産物を簡便に精製することができる。

1.3.2.3 シークエンス解析

精製した反応産物をシークエンサーにセットし、得られた波形データをシークエンス解析ソフトで確認し、必要に応じて修正して塩基配列を決定する。ノイズが多く正確に読み取れない領域がある場合は、template DNA 量やアニーリング温度、使用プライマーなどの条件を調整して再解析を行う。

高価ではあるが Sequencher（Hitachi solutions/Gene Codes）、SeqScape（Applied Biosystems）、Geneious（Biomatters）等の塩基配列アセンブリソフトウェアを用いれば、多数の塩基配列を解析しながらアセンブリを行うことができ、効率的な処理が可能となる。

1.4 プライマーおよび RT-PCR 反応条件

以下に、全セグメント、HA セグメント、NA セグメントに対応する RT-PCR 用プライマーを記載する。HA および NA セグメントについては、サンガー法シークエンス用プライマーも併せて記載する。PA セグメントおよび M セグメントに対するプライマーは「Part VI: 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出」を参照すること。

配列は比較的保存性の高い領域を基に設計しているが、インフルエンザ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場合もある。PCR またはシークエンスの結果が良好でない場合は、感染研インフルエンザ研究センターに相談すること。

1.4.1 各プライマー

1.4.1.1 全セグメント用プライマー（NGS 用）

RT-PCR Primer（5' - 3'）

A 型（参考文献: Zhou B. *et al*., *J Virol*. 83: 10309-13. 2009）

MBTuni-12-R: ACGCGTGATCAGCRAAAGCAGG

MBTuni-13: ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

B 型（参考文献: Zhou B. *et al*., *J Clin Microbiol*. 52: 1330-7. 2014）

・FluB universal primer cocktail を作製する。

Primer (each 10 μM)	sequence	
B-PBs-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGAGC	100 μL
B-PBs-UniR	CCGGGTTATTAGTAGAAACACGAGC	100 μL
B-PA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCGGTGC	50 μL
B-PA-UniR	CCGGGTTATTAGTAGAAACACGTGC	50 μL
B-HANA-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGC	100 μL
B-HANA-UniR	CCGGGTTATTAGTAGTAACAAGAGC	100 μL
B-NP-UniF	GGGGGGAGCAGAAGCACAGC	60 μL
B-NP-UniR	CCGGGTTATTAGTAGAAACAACAGC	60 μL
B-M-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCACGCACTT	30 μL
B-Mg-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGGCACTT	30 μL
B-M-Uni3R	CCGGGTTATTAGTAGAAACAACGCACTT	60 μL
B-NS-Uni3F	GGGGGGAGCAGAAGCAGAGGATT	50 μL
B-NS-Uni3R	CCGGGTTATTAGTAGTAACAAGAGGATT	50 μL
FluB universal Primer cocktail	total	840 μL

※Volume は必要量に応じて変更すること。

1.4.1.2 HA セグメント用プライマー

A(H1N1)pdm09

RT-PCR Primer (5' - 3')

H1HA1-BEGINV2	AGCAAAAGCAGGGGAAAACAA
HA2H1-1759-1778R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT

Sequence Primer (5' - 3') (サンガー法用)

Forward:

swine H1-56-76F	CATTATGTATAGGTTATCATG
swine H1-277-296F	TGGTCCTACATTGTGGAAAC
H1pdm-HA-578-596F	TGTGGGGCATTCACCATCC
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') (サンガー法用)

Forward:

H3-7F_v2	ATAATTCTATTAACCATGAAG
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	ATGGTTTGTCATTGGGAATGCT
H3-1342R	GACCAGAGATCTATTTTAGTGTC
HA2H3-1743-1762R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT

B

RT-PCR Primer (5' - 3')

BHA1-N_v2	AATATCCACAAAATGAARGC
HA2B-1867-1887R	AGTAGTAACAAGAGCATTTTT

Sequence Primer (5' - 3') (サンガー法用)

Forward:

BHA1-N_v2	AATATCCACAAAATGAARGC
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

1.4.1.3 NA セグメント用プライマー

A(H1N1)pdm09

RT-PCR primer (5' - 3')

swine N1-F1_v2	AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATGA
swine N1-R1	GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC

Sequence Primer (5' - 3') (サンガー法用)

Forward:	
swine N1-F1_v2	AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATGA
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	GGATCCCAAATCATCTCAAA
swine N1-R1	GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC

A(H3N2)

RT-PCR primer (5' - 3')

H3N2-F1	AGCAAAAGCAGGAGT
H3N2-R1413	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT

Sequence Primer (5' - 3') (サンガー法用)

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_v2	AATAGGAACAAAGGGTTTAGAACARA

Sequence Primer (5' - 3') (サンガー法用)

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_v2	GACAAAAGGTCTTTTKGCTG
BNA-R1102	CATTCTTTGATGAACAAATC
BNA-R1498-1472_v2	AATAGGAACAAAGGGTTTAGAACARA

1.4.2 RT-PCR 反応条件

1.4.2.1 全セグメント用

A 型

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

B 型

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

1.4.2.2 HA, NA, PA, M セグメント用

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

※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。

2. GISAID（The Global Initiative on Sharing All Influenza Data）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 等の国際データベースである GISAID（https://gisaid.org/）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および鳥インフルエンザウイルスに関する情報を収集可能とすることを目的に発足した。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、誰でも最新の情報を閲覧・入手することができる。GISAID は登録制のため、使用に際しては最初に“Register”ページ（https://gisaid.org/register/）からユーザー登録を行う必要がある。

GISAID は時折アップデートが実施されるため、機能の修正・変更により本マニュアルの記載内容と実際の画面表示が異なる場合がある。不明点があれば相談のこと。また、以下に示す遺伝子配列の検索・取得方法以外にも多様な機能が提供されているため、必要に応じて実際に操作し、機能を確認すること。

遺伝子配列の検索は、GISAID の“EpiFlu”ページから“Search”タブを選択することで行うことができる。検索条件を入力する画面（図 1）が表示されるので、必要事項を入力して検索を実行する。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（部分一致も可）により検索する
- Type, H, N 等の項目を指定して亜型を絞りこむ
- “Clade”によりクレード名を指定して絞り込む
- “Collection date”によりウイルス採取時期を指定して絞り込む
- “Originating Laboratory”、“Submitting Laboratory”によりウイルスを分離、登録した機関を絞り込む
- “Required Segments”より目的の遺伝子配列を絞り込む

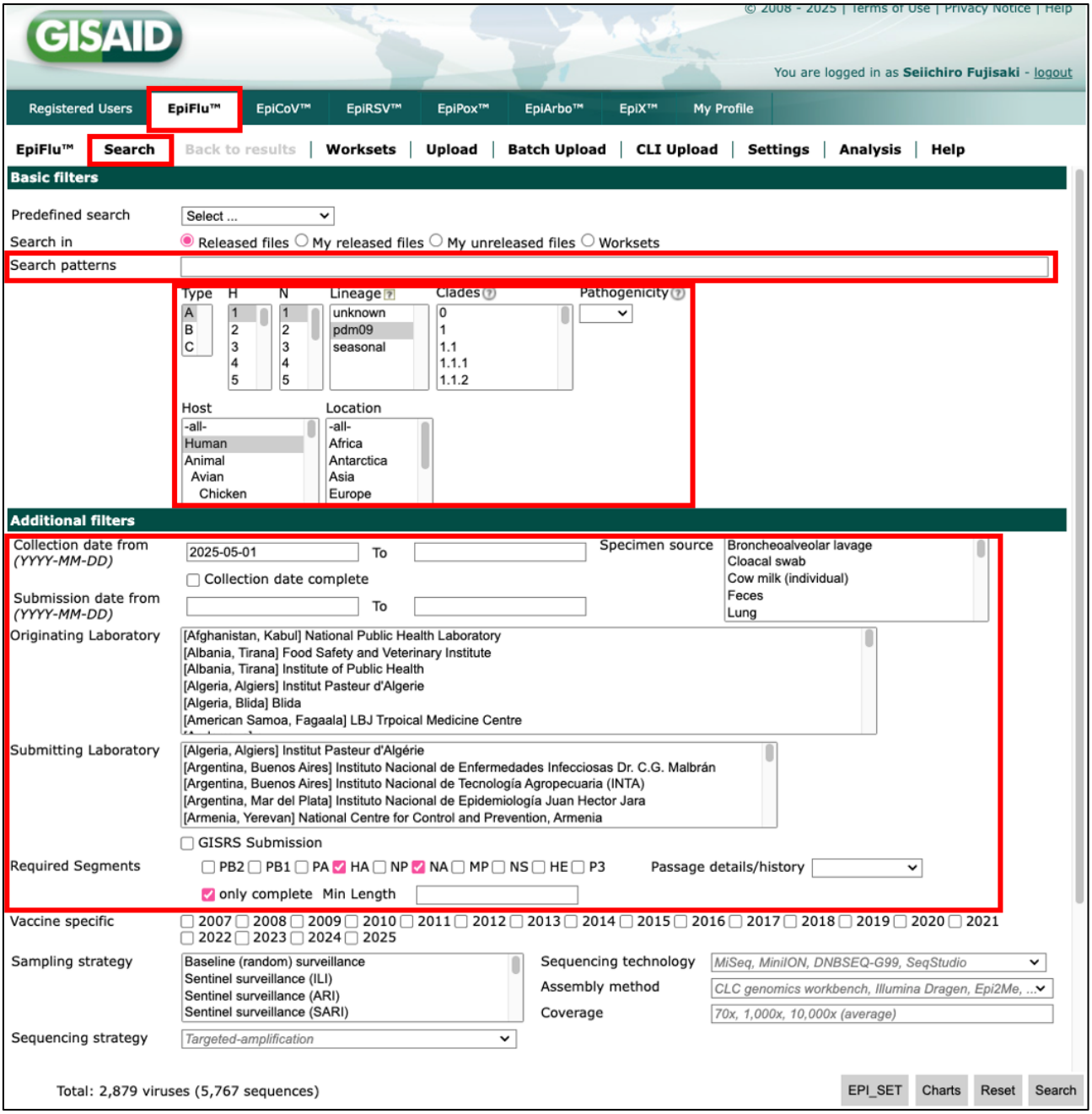
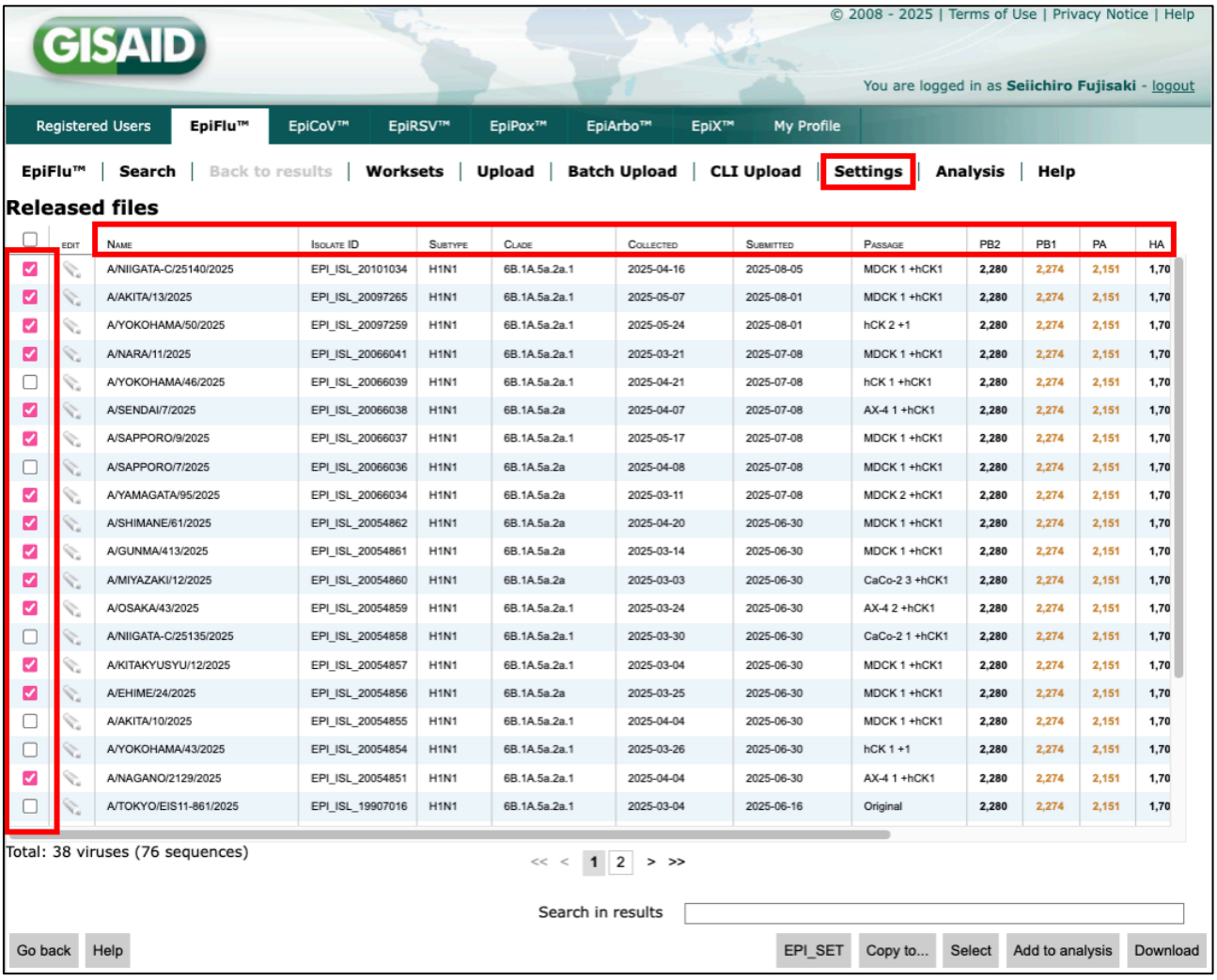


図 1. GISAID EpiFlu 検索画面

検索結果（図 2）では株名一覧とともに、ウイルスの継代履歴、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 で変更することが可能である。Name、Isolate ID、Collection date のいずれかを基準として並べ替えることができる。



Edit	Name	Isolate ID	Subtype	Clade	Collected	Submitted	Passage	PB2	PB1	PA	HA
☑	A/NIIGATA-C/25140/2025	EPI_ISL_20101034	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-04-16	2025-08-05	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/AKITA/13/2025	EPI_ISL_20097265	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-05-07	2025-08-01	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/YOKOHAMA/50/2025	EPI_ISL_20097259	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-05-24	2025-08-01	hCK 2 +1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/NARA/11/2025	EPI_ISL_20066041	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-21	2025-07-08	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/YOKOHAMA/46/2025	EPI_ISL_20066039	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-04-21	2025-07-08	hCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/SENDAI/7/2025	EPI_ISL_20066038	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-04-07	2025-07-08	AX-4 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/SAPPORO/9/2025	EPI_ISL_20066037	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-05-17	2025-07-08	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/SAPPORO/7/2025	EPI_ISL_20066036	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-04-08	2025-07-08	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/YAMAGATA/95/2025	EPI_ISL_20066034	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-03-11	2025-07-08	MDCK 2 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/SHIMANE/61/2025	EPI_ISL_20054862	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-04-20	2025-06-30	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/GUNMA/413/2025	EPI_ISL_20054861	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-03-14	2025-06-30	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/MIYAZAKI/12/2025	EPI_ISL_20054860	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-03-03	2025-06-30	CaCo-2 3 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/OSAKA/43/2025	EPI_ISL_20054859	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-24	2025-06-30	AX-4 2 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/NIIGATA-C/25135/2025	EPI_ISL_20054858	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-30	2025-06-30	CaCo-2 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/KITAKYUSYU/12/2025	EPI_ISL_20054857	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-04	2025-06-30	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/EHIME/24/2025	EPI_ISL_20054856	H1N1	6B.1A.5a.2a	2025-03-25	2025-06-30	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/AKITA/10/2025	EPI_ISL_20054855	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-04-04	2025-06-30	MDCK 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/YOKOHAMA/43/2025	EPI_ISL_20054854	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-26	2025-06-30	hCK 1 +1	2,280	2,274	2,151	1,70
☑	A/NAGANO/2129/2025	EPI_ISL_20054851	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-04-04	2025-06-30	AX-4 1 +hCK1	2,280	2,274	2,151	1,70
☐	A/TOKYO/EIS11-861/2025	EPI_ISL_19907016	H1N1	6B.1A.5a.2a.1	2025-03-04	2025-06-16	Original	2,280	2,274	2,151	1,70

図 2. GISAID EpiFlu 検索結果画面

塩基配列を入手したい株については、株名の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、ダウンロード画面に移行する（図 3）。

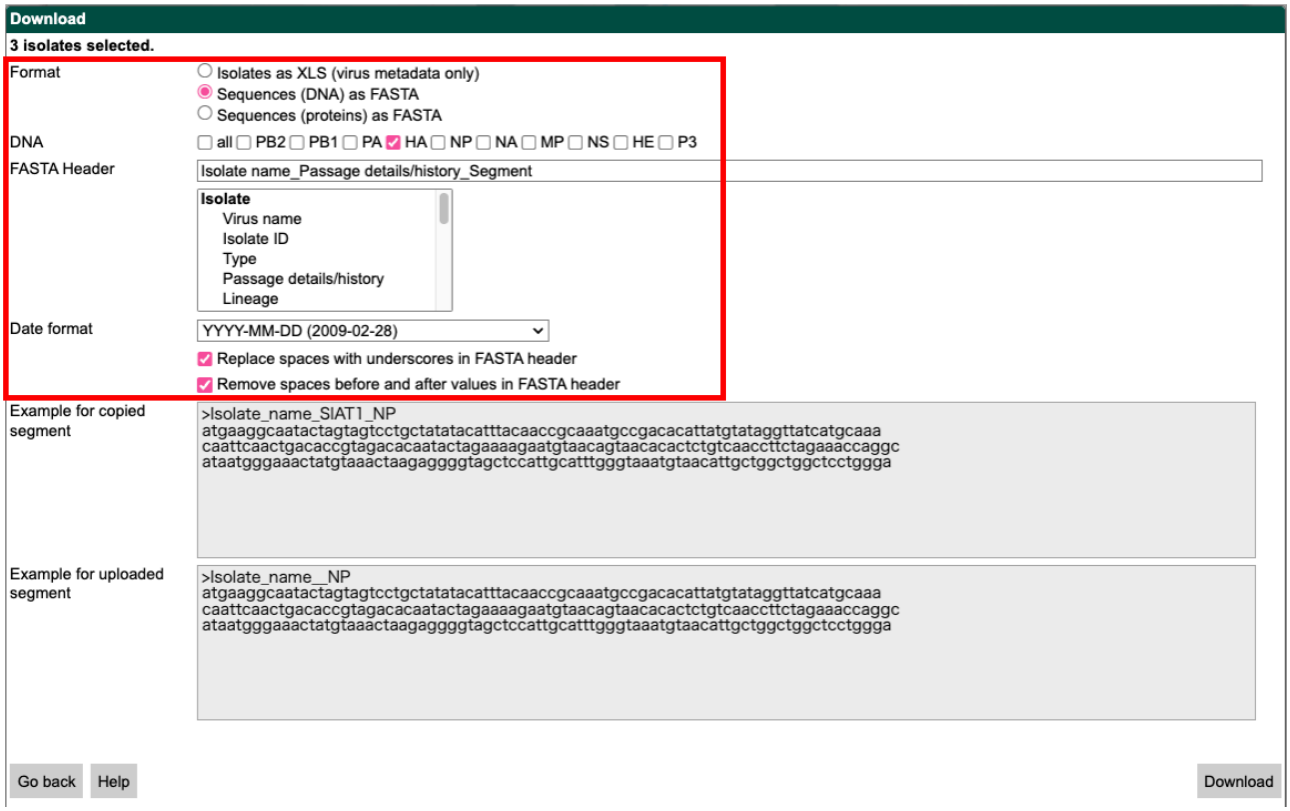


図 3. GISAID EpiFlu シークエンスダウンロード画面

塩基配列は FASTA 形式でダウンロードされる。FASTA Header はウイルス株名や継代履歴などを設定することでカスタマイズが可能である。

Part Ⅴ: 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には、ウイルス株そのものを同定でき、かつ血清診断に比べて迅速に結果が得られるという利点から、ウイルス分離が広く用いられている。一方で、検体の採取が困難である場合や、ウイルス分離を実施する設備が整っていない場合には、血清診断が必要となることがある。また、不顕性感染を含めた個人の感染の有無を確認する目的でも、血清診断は利用される。血清診断を行う際には、急性期血清と回復期血清（発症 2～4 週間後）のペア血清が必要である。急性期血清は、可能な限り発症直後に採取することが望ましい。なお、多くの人は既に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、回復期血清のみでの診断は信頼性が低く、避けるべきである。適切な条件が満たされた場合、急性期と回復期の抗体価が 4 倍以上上昇していれば、ウイルス抗原の検出やウイルス分離が得られなかった場合でも、他の臨床所見と合わせてインフルエンザウイルス感染の診断を行うことができる。

さらに、ウイルス感染の診断以外の目的においても、血清学的手法による抗体の検出は有用である。例えば、国民の抗体保有状況の把握や流行状況・流行予測の基礎資料、ワクチンの免疫原性評価など、疫学的・免疫学的研究において重要な情報を提供する。

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必要である。インフルエンザ分離株の同定試験の項でも述べたように、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 種類の因子が存在する。非特異的血球凝集阻止は、血清成分に含まれる特定の分子がインフルエンザウイルスのレセプターとして働き、赤血球上のウイルスレセプターと競合することによって、ウイルスの赤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、ヒトや動物の血清中には α-、β-、γ-阻害物質の 3 種類が知られている。これらの阻害分子はインフルエンザ株ごとに異なる作用を示すため、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

ヒト血清の前処理については、HA および HI によるインフルエンザ同定試験の項に示したように、RDE(II)「生研」（デンカ株式会社）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を行うことで、多くの場合対応可能である。一方、動物血清などにおいて、これらの処理を施してもなお非特異的反応が除去できない場合には、変法の一つとしてトリプシン–過ヨウ素酸処理法が用いられることがある。

トリプシン−過ヨウ素酸処理法

トリプシン溶液: トリプシン Type II-S（Sigma-Aldrich: T-7409）200 mg を 0.1M リン酸緩衝液（pH 8.2）25 ml に溶解し、濾過滅菌して小分けにし、−20℃以下で保存する。保存した溶液は半年以内に使用する。

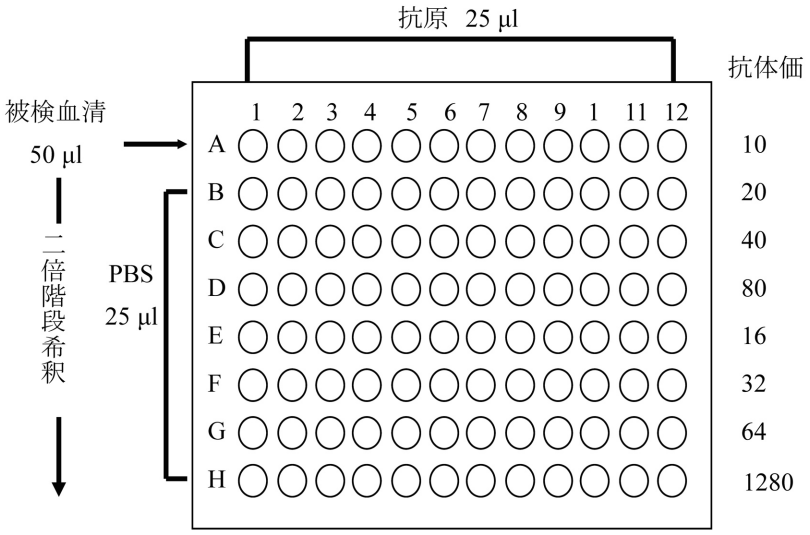
1/90 M 過ヨウ素酸カリウム（KIO_4）溶液: KIO_4 230 mg を PBS（pH 7.2）に溶かして全量 100 mL とし、濾過滅菌して調製する。KIO_4溶液は用時調製とし、調製後 1 週間以内に使い切る必要がある。

1% Glycerol 生理食塩水（KIO_4 の作用を中和する）: glycerol 1 ml を生理食塩水 99 ml に加えて調製し、濾過滅菌する。

1) 血清 1 容に対して 1/2 容のトリプシン溶液を加える。
2) 56℃のウォーターバスで 30 分間処理し、非働化する。
3) 室温に冷却後、3 容の 1/90 M KIO_4溶液を加えて混合し、室温で 60 分間静置する。
4) 3 容の 1% Glycerol 生理食塩水を加えて混合し、室温で 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)処理の場合と同様に、HI 試験に使用する赤血球で吸収処理を行う。
7) 非特異的凝集の有無を確認する。

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

「Part III: 1. 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、血清の階段希釈は、感染血清の抗体価が標準血清に比べて低いことが予想されるため、10 倍から 1280 倍までを用いる。



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、ヒトや動物におけるウイルス特異的抗体の検出において、極めて高い感度と特異性を有する方法である。本試験は、まずウイルスと抗体を混合して中和反応を起こさせ、その後に培養細胞、孵化鶏卵、マウスなどの適切な宿主に接種する二つのステップから構成される。宿主に感染が認められない場合、その検体中にはウイルス感染を中和する抗体が存在していることを示す。培養細胞を用いた場合には、通常ウイルス感染による CPE を指標とするが、近年ではその他の方法も開発されている。

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を測定するうえで最も正確な方法であり、インフルエンザウイルスの場合には HA が主要な標的抗原となる。そのため、中和試験によりウイルス株特異的な抗体を検出することが可能である。ただし、結果を得るまでに時間を要することや、感染性ウイルスを扱うため実施可能な施設が限られるといった制約もある。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

ウイルス中和抗体価の測定は、「2.1.2 ウイルス力価測定」と「2.1.3 ウイルス中和試験」の 2 つの工程に大別される。以下にその概要を示す。ここでは 24 ウェルプレートを例とするが、96 ウェルプレート等にも応用可能である。

2.1.1 材料および試薬

1) ウイルス分離用培地

「Part II: 3.2 インフルエンザウイルスの分離」を参照する。添加するトリプシン濃度はロットごと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。

3) MDCK 細胞

継代数によってウイルス感受性が変化することがあるため、一定の継代数の細胞を用いる。

4) 24 ウェルプレート

5) 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: 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「Part II: 4. 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離」を参照する。

6) 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℃以下で保存する。

7) 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℃以下で保存する。

2.1.2 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。

希釈 (log10)	-1	-2	-3		-n	
ウイルス	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	---------	0.1 ml	この液は棄てる。
希釈液	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml		0.9 ml	

2) MDCK 細胞を播いた 24 ウェルプレートの各ウェルに 1 ml の PBS(-)を加えて洗浄する。

3) 通常-5～-8 の各希釈 0.1 ml を各ウェルに接種する（各希釈 6 ウェル）。

4) 34℃で 1 時間静置する。

5) 分離用培地 0.5 ml を各ウェルに加える。

6) 34℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で約 3 日間培養する。*

7) CPE の有無を判定し、Reed-Muench 法により $TCID_{50}$ を計算する（測定例を参照）。

<測定例>

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（$\log_{10}$）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（$\log_{10}TCID_{50}$/ml） となる。

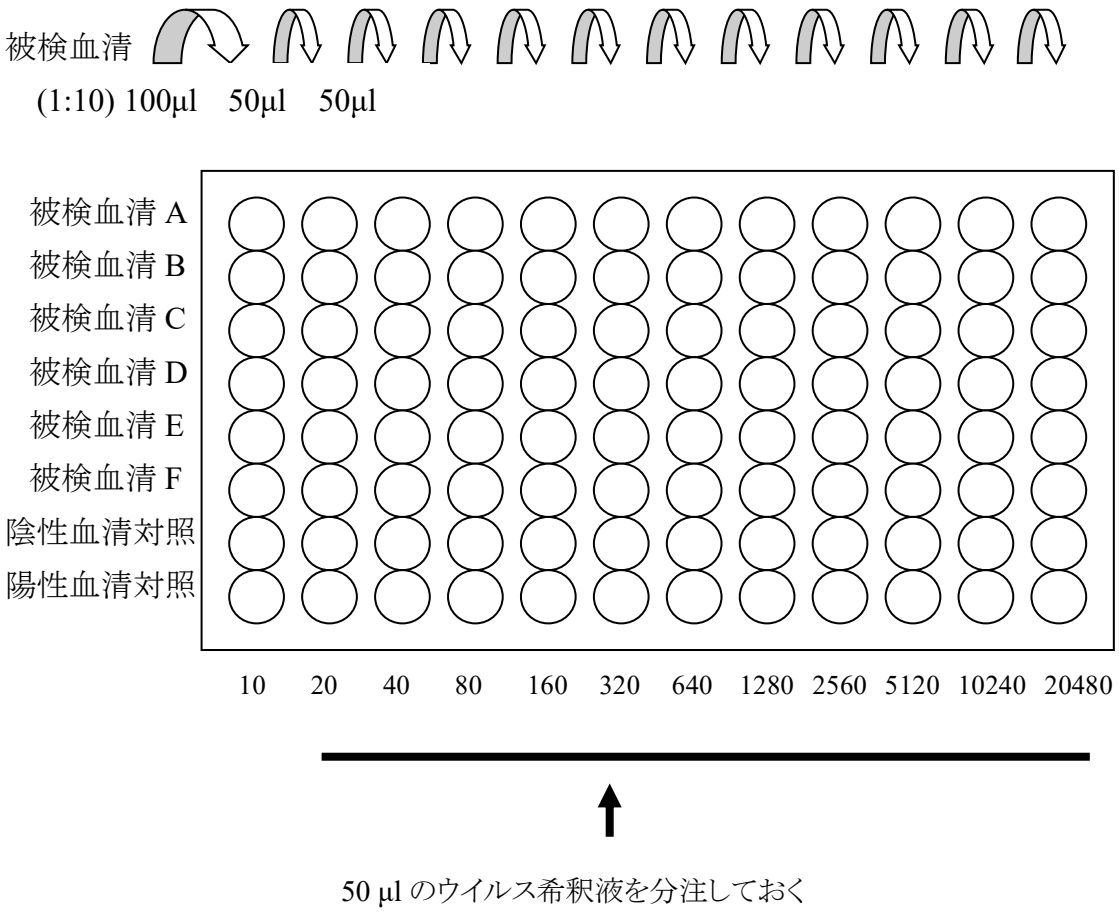
[注意事項]

*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、鳥由来のウイルス等は 37℃の方がよく増殖するため、必要に応じて設定する。

2.1.3 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 ウェルプレートを使用）。

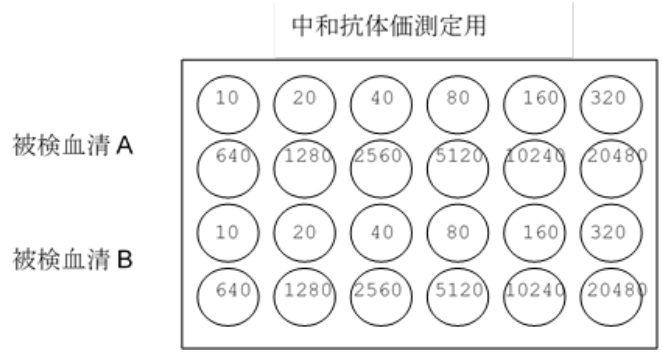


2) 各ウェルに 50 μl のウイルス液を加える（約 100 $TCID_{50}$ の感染価になるように希釈しておく）。

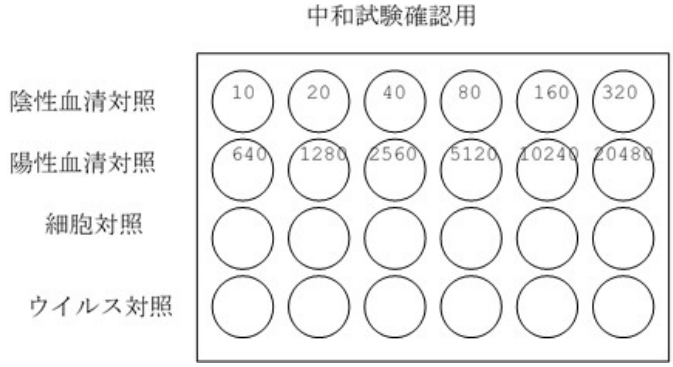
3) 37℃で 30 分間静置し、抗原抗体反応を行う。

4) MDCK 細胞を播いた 24 ウェルプレートの各ウェルに 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 ウェルプレートの各ウェルに、下図のように接種する。



6) 陽性対照血清および陰性対照血清とのウイルス混合液も、それぞれ 0.1 ml を 24 ウェルプレートの各ウェルに、下図のように接種する。



7) 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 $TCID_{50}$/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 を各ウェルに接種する。

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 ずつ各ウェルに接種する（「2.1.2 ウイルス力価測定」を参照）。

9) 34℃で 1 時間静置する。

10) 各ウェルに 0.5 ml のウイルス分離用培地を加える。

11) 34℃の CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で約 2 日間培養する。

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。**

*被検血清はあらかじめ 56℃で 30 分～1 時間処理しておく。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 を加え反応させた後、56℃で 30 分～1 時間処理すると、特異性の高い結果が得られることがある。血清の希釈範囲は、予想される力価や目的に応じて選択する。

**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、使用したウイルスの感染価についても併せて確認しておく。

Part VI: 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、2025 年 8 月の時点で、M2 阻害剤のアマンタジン（商品名シンメトレル）、NA 阻害剤のオセルタミビル（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のバロキサビル（商品名ゾフルーザ）が販売されている。

現在流行している 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の判定基準は 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と判定される。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)ウイルスが世界的に拡大し、日本国内でもほとんどすべての A(H1N1)ウイルスがオセルタミビルに耐性を示した。現在流行している A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ウイルスはオセルタミビルに感受性を示すが、世界各国で散発的に NA-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おり、これらはオセルタミビルと構造の類似するペラミビルに対して交叉耐性を示すことが知られている。

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については、WHO によって暫定的な基準が示されており、3 倍超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。バロキサビルの臨床試験では薬剤投与により PA 蛋白質に I38T 変異が検出され、この変異が薬剤に対する感受性低下に関与することが明らかになっている。

本章で述べる検出法は、全国の地衛研における薬剤耐性ウイルスサーベイランスの一環として実施されており、その結果は国内外の公衆衛生対策に活用されている。

1. 薬剤耐性変異の検出

1.1 NA、M および PA 遺伝子のシークエンス法

シークエンス法の詳細については「Part IV: インフルエンザウイルスの遺伝子解析」を参照すること。代表的な NA および PA の阻害剤耐性変異については、WHO のウェブサイトに一覧としてまとめられている。

NA: https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza/neuraminidase-inhibitor

PA: https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza/polymerase-acidic-protein-inhibitor

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については、「Part IV: インフルエンザウイルスの遺伝子解析」を参照すること。

代表的な 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'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT-3'
RT-PCR primer set（第 2 候補）	Forward	AMA-SZAM1+	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTAGAT-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-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'-TCAGGGAGCAAAAGCAGGTAGATA-3'
	Reverse	AMA-Bm-M-1027R	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT-3'
RT-PCR primer set（第 2 候補）	Forward	AMA-SZAM1+	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTAGAT-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-3'
Sequence Primer	Forward	AMA-348-368F	5'-ACATTCCATGGGGCCAAAGAA-3'
	Forward	AMA-379-400F	5'-GTTATTCTGCTGGTGCACTTGC-3'
	Reverse	AMA-981-1002R	5'-CAGCTCTATGCTGACAAAATGA-3'
	Reverse	AMA-M-1027R	5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-3'

代表的な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'-AGCAAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Reverse	PA-5ePR1_v2	5'-TATGTATTCAGTAGCCCTGCART-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'-GATTTTATTTTGTTGGCT-3'
	Reverse	PA-5eSR4	5'-GCATTTGATTGCATCAT-3'

A(H3N2)

RT-PCR primer	Forward	SZAPA-F	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Reverse	H3PA-pcr1R	5'-CAAATCGCTTATGTCTCTGCAGT-3'
Sequence Primer	Forward	SZAPA-F	5'-CTCGAGCAAAAGCAGGTACTGAT-3'
	Forward	APA-3-F	5'-AAGGAGAACAGATTCATCGA-3'
	Reverse	H3PA-seq2R	5'-CCATTTCTTGTCTTATGGTA-3'
	Reverse	H3PA-seq3R	5'-CTTGGGTCTTCAATGCTCA-3'
	Reverse	PA-1R	5'-CCAGCTCCAGTAGTGTTGCA-3'

B

RT-PCR primer	Forward	B-PA-F2v2	5'-CGGGAGCAGAAGCGRTRCG-3'
	Reverse	B-PA-1237-1218R	5'-ACCCAAGCAGCMACTCTACA-3'
Sequence Primer	Forward	B-PA-F2v2	5'-CGGGAGCAGAAGCGRTRCG-3'
	Forward	B-PA-318-337F	5'-CAAGAGCATGGRATAGAGAC-3'
	Forward	B-PA-636-655F	5'-AARCTTGGACAAACAATATC-3'
	Forward	B-PA-957-976F	5'-CTAGAAAAGTACTCAACACT-3'
	Reverse	B-PA-364-345R	5'-TCAAACAAATCAGCCAGATA-3'
	Reverse	B-PA-682-663R	5'-GCHGGAACAGATATATCCCT-3'
	Reverse	B-PA-990-971R	5'-CAGTYTGRTCCCGTAGTGTT-3'
	Reverse	B-PA-1237-1218R	5'-ACCCAAGCAGCMACTCTACA-3'

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

A(H1N1)pdm09 ウイルスでは、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する耐性を示す。本法では、2 種類の蛍光色素（FAM：耐性株 Y275(T)、VIC または Yakima-Yellow (YAK)：感受性株 H275(C)）でそれぞれ標識された TaqMan Probe を用いて One-step RT-PCR を行い、Allelic Discrimination 解析により、NA-H275Y 変異を検出する。

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 抽出を行う必要がなく、培養上清を RNase-free Water で 10 倍希釈したものを直接 PCR 反応液に加えて検査が可能である。一方、鼻腔拭い液等の臨床検体を用いる場合には RNA 抽出液を使用する必要があるが、検体中に含まれるウイルス量が極めて少ない場合もあるため、十分な検出感度が得られない可能性がある。

機器および試薬

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

RNase-free Water

RNase-free Water は、コンタミネーションを防ぐために市販品を使用することが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、あらかじめ清浄な環境下で RNase-free の滅菌チューブに分注したものを使用すること。

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、MX3005P

  Applied Biosystems 7500、7500 Fast、QuantStudio システム

  Bio-Rad CFX96

  Qiagen Rotor-Gene Q, 3000、6000

- QuantiTect Virus Kit（QIAGEN Cat. #211011, 211013, 211015）を使用する機種

  ABI PRISM 7000、7700、7900HT

  Applied Biosystems 7300、7900HT Fast、StepOne、StepOnePlus

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'-ATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTAC-3'
	Reverse	H1N1NA-R847-872	5'-ACACATGTGATTTCACTAGAATCAGG-3'
耐性株検出用プローブ		FAM-274Ya-swH1N1-F823-835_v2	5'-(FAM)TACTATGAAGAAT(MGB)-3'
感受性株検出用プローブ		VIC-H274a-swH1N1-F823-835_v2 または YAK-H274a-swH1N1-F823-835_v2	5'-(VIC)CACTATGAAGAAT(MGB)-3' 5'-(YAK)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 (YAK)-Probe
QuantiTect Virus RT Mix	0.2 µl	
50×ROX Dye Solution*	0.4 µl	1×
RNase free Water	12.9 µl	
Template**	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 (YAK)-Probe
QuantiTect Virus RT Mix	0.2 µl	
RNase free Water	13.3 µl	
Template**	2.0 µl	
Total 容量	20 µl	

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

**Template には、HA 価が 8 程度以上のウイルス培養上清を遠心して細胞由来成分を除去し、RNase-free Water 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。臨床検体を用いる場合も RNA 抽出液 2 µl を使用するが、検体中のウイルス量が極めて少ない場合があるため、検出感度は保証されない。

H275 および Y275 陽性コントロールは、使用するリアルタイム PCR 装置で結果判定がしやすいように、適宜数点置く。

陰性コントロール（RNase free Water）は、Agilent MX3000P および Agilent MX3005P では 3 点、その他のリアルタイム PCR 装置では 1 点とする。

3) Applied Biosystems の機器を使用する場合の反応条件

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

*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とならず、結果の判定が困難となるため、サイクル数は 40 に設定する。

4) Roche LightCycler 480 を使用する場合の反応条件

ステップ	**Analysis Mode**	サイクル数	温度（℃）	時間	**Ramp Rate**（℃/sec）	**Acquisition Mode**
RT	None	1	50	20 min	4.4	None
Denature	None	1	95	5 min	4.4	None
PCR	Quantification	45*	95	15 sec	1.5	None
			56	45 sec	1	Single

*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とならず、結果の判定が困難となるため、サイクル数は 45 に設定する。

5) Agilent MX3000P、Agilent MX3005P を使用する場合の反応条件

50 C°	20 min	
↓		
95 C°	5 min	
↓		
95 C°	15 sec	×45 サイクル*
56 C°	45 sec（Data Collection）	

*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とならず、結果の判定が困難となるため、サイクル数は 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用いて判定を行う。そのため、Applied Biosystems の機器では Amplification データを使用せず、Post-read データのみを使用する。Roche Diagnostics の機器では、反応終了後に”Analyze”から”Endpoint Genotyping”を選択して解析を行う。

本法では、823 番目の塩基が C である場合は VIC で修飾されたプローブにより検出され、T である場合は FAM で修飾されたプローブにより検出される。したがって、反応終了後の蛍光強度はサンプル中における 823 番目の塩基の C と T の割合を反映している。

なお本法では、従来のように Ct 値を用いた検査精度の確認は行わない。その代わりに、Allelic Discrimination の図において以下の 2 つの条件が満たされた場合に検査結果を有効と判定する。

（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となること。

（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位置すること。

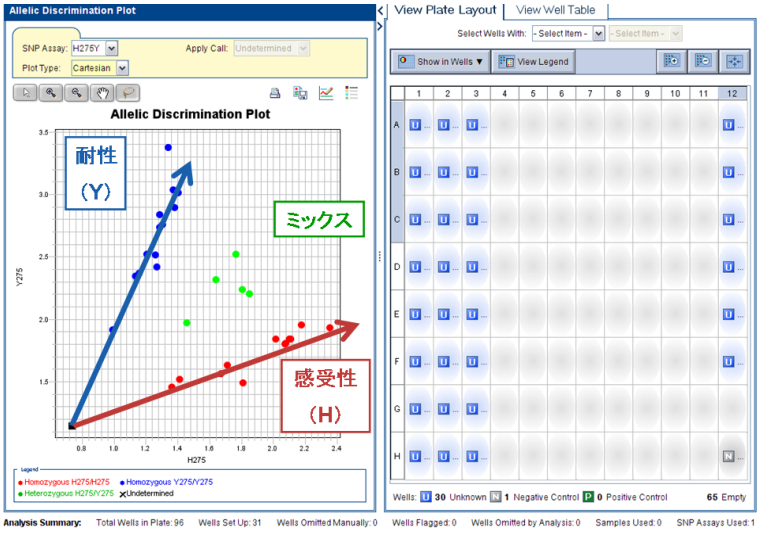


図 1.　Applied Biosystems の機器による解析結果の一例

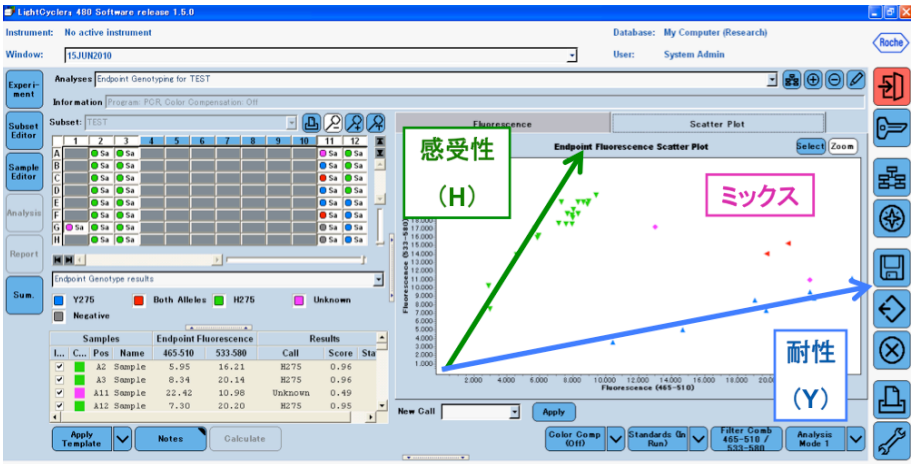


図 2.　Roche LightCycler 480 による解析結果の一例

1.3　RNase H2-dependent PCR（rhPCR）法による PA-I38T 変異の検出

A 型および B 型インフルエンザウイルスでは、PA 蛋白質の 38 番目のアミノ酸がイソロイシン（I）からスレオニン（T）に変異（113 番目の塩基が T から C に置換）するとバロキサビルに対する感受性が低下する。本法では、ウイルス RNA から合成した cDNA を鋳型とし、RNase H2-dependent PCR（rhPCR）により、各型・亜型の PA 遺伝子に特異的なプライマーセット（rhAmp SNP Assay）および 2 種類の蛍光色素（FAM: 耐性株 T38(C)、Yakima Yellow (YAK): 感受性株 I38(T)）でそれぞれ標識された共通プローブ（rhAmp Reporter Mix）を用いて増幅を行い、Allelic Discrimination 解析により、PA-I38T 変異を検出する。

本法は、型・亜型が同定された分離ウイルス株を対象とし、臨床検体は対象外とする。

本法では PA-I38T 以外の耐性変異（PA-I38M 等）は判定できない。これらの変異株は、Allelic Discrimination 解析において I38（感受性株）と同じ位置にプロットされる場合があるため、PA-I38T 以外の耐性変異の有無を確認するには、PA 遺伝子シークエンス法による解析が必要である。

機器および試薬

サーマルサイクラー

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

本法は、Roche LightCycler 480 および Applied Biosystems 7500 Fast を用いて検討した。他の機種については検討していないため、使用する場合は、あらかじめ反応条件および判定条件を検討する必要がある。

YAK の蛍光波長は VIC とほぼ同じであるため、検出フィルターおよび Reporter の設定には VIC を使用して問題ない。

RNase-free Water

RNase-free Water は、コンタミネーションを防ぐために市販品を使用することが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、あらかじめ清浄な環境下で RNase-free の滅菌チューブに分注したものを使用すること。

逆転写反応試薬

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Cat. #RR037A)

または

SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. #18080044)
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Cat. #10777019)
dNTP mix (10mM) (Invitrogen Cat. #18427013)

逆転写反応用プライマー

Uni12 primer 5'-AGCAAAAGCAGG-3'

Uni9 primer 5'-AGCAGAAGC-3'

rhPCR 反応試薬（10μL 反応系の場合 100 反応分、20μL 反応系の場合 50 反応分）

rhAmp Genotyping Master Mix, 0.5 mL (Integrated DNA Technologies Cat. #1076014)

rhPCR 共通プローブ

rhAmp Reporter Mix, 25 μL (Integrated DNA Technologies Cat. #1076025): Roche LightCycler 480 用

rhAmp Reporter Mix w/Reference, 25 μL (Integrated DNA Technologies Cat. #1076020): Applied Biosystems 7500 Fast 用

共通プローブの quencher には、non-fluorescent quencher である Iowa Black FQ が用いられている。Applied Biosystems 7500 Fast など、quencher の設定が必要な機種では、「NFQ-MGB」または「None」などの non-fluorescent quencher を選択する。

rhPCR プライマーセット

rhAmp SNP Assay, XS*

A(H1N1)pdm09 用 Assay ID: CD.GT.BSFN7032.1

A(H3N2)用 Assay ID: CD.GT.BGPR9916.4

B 型用 Assay ID: CD.GT.BGDB2770.1

*まれにロットによっては感受性株 I38(T)を鋳型とした場合でも FAM の蛍光強度が高くなり、判定が困難となることがある。その場合は感染研に相談の上、メーカー（Integrated DNA Technologies）へ問い合わせること。

逆転写反応

使用するサーマルサイクラーの機種によっては適用可能な反応液量（Total容量）に制限があるため、各施設の装置に応じて反応液量を適宜調整すること。

1）PrimeScript RT reagent Kit を用いた反応液

以下のとおり、試薬と RNA を混合する。

試薬	容量	最終濃度
5 × PrimeScript Buffer	2.0 µl	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix	0.5 µl	
Uni12 or Uni9 Primer（2 µM）*	0.5 µl	0.1 µM
RNase-free Water	2.0 µl	
Viral RNA**	5.0 µl	
Total 容量	10 µl	

*A 型インフルエンザウイルスには Uni12、B 型インフルエンザウイルスには Uni9 を用いる。

**分離株から抽出した RNA を用いる。

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。

42℃ 15 min

↓

85℃ 5 sec

↓

4℃

2）SuperScript Ⅲ Reverse Transcriptase を用いた反応液

2.1 プライマーと RNA を混合する。

試薬	容量	最終濃度
Uni12 or Uni9 Primer（10 μM）*	1.0 μl	0.5 μM
Viral RNA**	10.0 μl	
Total 容量	11 μl	

*A 型インフルエンザウイルスには Uni12、B 型インフルエンザウイルスには Uni9 を用いる。

**分離株から抽出した RNA を用いる。

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。

70℃ 10 min

氷上で 2 分間静置する。

2.2 プライマー・RNA 混合液に試薬を加える。

試薬	容量	最終濃度
5×First Strand Buffer	4.0 μl	1×
0.1M DTT	2.0 μl	
dNTP（10 mM）	1.0 μl	0.5 mM
RNase OUT	1.0 μl	
SuperScript III	1.0 μl	
Total 容量	9.0 μl	

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。

42℃ 60 min

↓

72℃ 15 min

↓

4℃

rhPCR 反応

1）Roche LightCycler 480 を使用する場合

以下のとおり、試薬と逆転写反応により得られた cDNA 溶液を混合する。なお、鋳型として cDNA を使用するため、反応チューブを開封する際にはコンタミネーションに十分注意する。

試薬	容量	最終濃度
rhAmp Genotyping Master Mix（2×）	5.0 µl	1×
rhAmp Reporter Mix（40×）	0.25 µl	1×
rhAmp SNP Assay（20×）	0.5 µl	1×
RNase-free Water	2.25 µl	
cDNA	2.0 µl	
Total 容量	10.0 µl	

軽く遠心した後、PCR プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし次のプログラムで反応を行う。

ステップ	Analysis Mode	サイクル数	温度（℃）	時間	Ramp Rate（℃/sec）	Acquisition Mode
Enzyme activation	None	1	95	10 min	4.4	None
PCR	Quantification	35	95	10 sec	4.4	None
			60	30 sec	2.2	None
			68	20 sec	4.4	Single

I38 陽性コントロールおよび T38 陽性コントロールには、各合成 DNA を 2.0 µL ずつ用いる（各 1 点）。これらの陽性コントロールは rhPCR 反応の陽性コントロールであり、逆転写反応の陽性コントロールではないことに注意する。

陰性コントロールは RNase-free Water を 2.0µl 用いる（1 点）。

2）Applied Biosystems 7500 Fast を使用する場合

以下のとおり、試薬と逆転写反応により得られた cDNA 溶液を混合する。なお、鋳型として cDNA を使用するため、反応チューブを開封する際にはコンタミネーションに十分注意する。

試薬	容量	最終濃度
rhAmp Genotyping Master Mix（2×）	10.0 µl	1×
rhAmp Reporter Mix w/Reference（40×）	0.5 µl	1×
rhAmp SNP Assay（20×）	1.0 µl	1×
RNase-free Water	6.5 µl	
cDNA	2.0 µl	
Total 容量	20.0 µl	

軽く遠心した後、PCR プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし通常モードで次のプログラムで反応を行う。（下記の反応条件であれば、「Experimental Properties」において「TaqMan Reagent」を選択しても「Other」を選択しても問題ない）

Pre-read	60℃	1 min	
Amplification	95℃	10 min	
	↓		
	95℃	10 sec	×35 サイクル
	60℃	30 sec	
	68℃	30 sec（Data Collection）	
Post-read	60℃	1 min	

I38 陽性コントロールおよび T38 陽性コントロールには、各合成 DNA を 2.0 µL ずつ用いる（各 1 点）。これらの陽性コントロールは rhPCR 反応の陽性コントロールであり、逆転写反応の陽性コントロールではないことに注意する。

陰性コントロールは RNase-free Water を 2.0µl 用いる（1 点）。

<u>Allelic Discrimination 解析</u>

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用いて判定を行う。そのため、Applied Biosystems の機器では Amplification データを使用せず、Post-read データのみを使用する。Roche Diagnostics の機器では、反応終了後に”Analyze”から”Endpoint Genotyping”を選択して解析を行う。

本法では、113 番目の塩基が T である場合は YAK で修飾されたプローブにより検出され、C である場合は FAM で修飾されたプローブにより検出される。したがって、反応終了後の蛍光強度はサンプル中における 113 番目の塩基の T と C の割合を反映している。

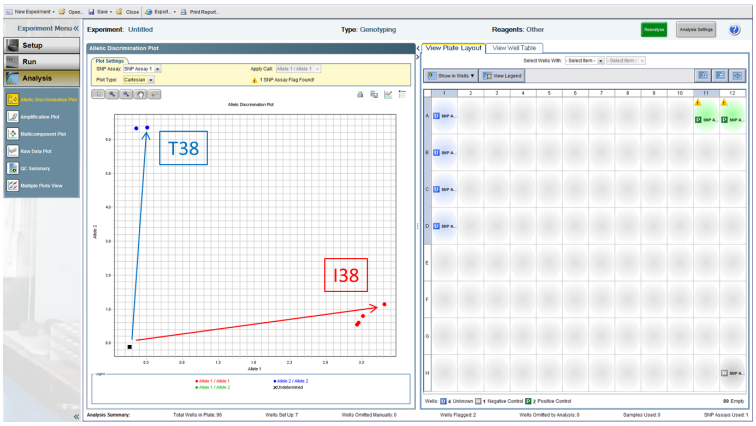


図 1. Applied Biosystems 7500 Fast による解析結果の一例

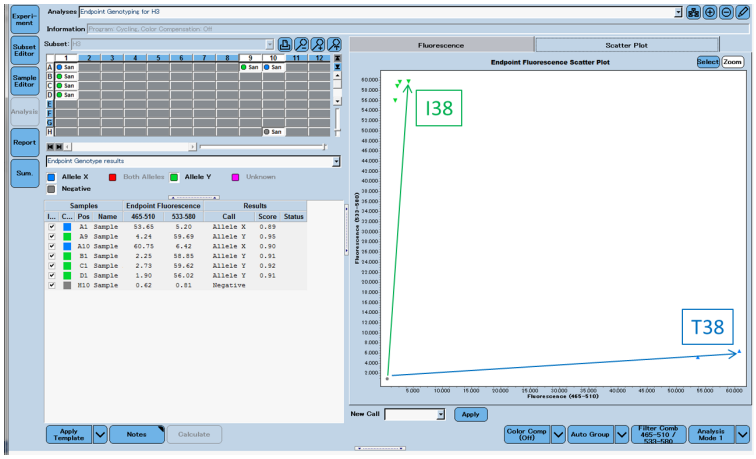


図 2. Roche LightCycler 480 による解析結果の一例

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 IC_{50} 値（NA 活性を 50%阻害する薬剤濃度）で表される。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 IC_{50} 値の判定基準を示しており、日本国内のサーベイランスにおいてもこれに準拠している。日本国内で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}

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。蛍光法では基質として MUNANA (4-(methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid)を使用し、化学発光法では基質として NA-Star または 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ほか、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 のキットにのみ含まれる。

化学発光法は蛍光法よりも感度が高く、少量のウイルスで試験が実施できる利点があるが、コストが高い。一方、蛍光法は安価であり、さらに耐性ウイルスと感受性ウイルスの IC_{50} 値の差が大きく反映されることから、両者が混在する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（NA inhibitor: NI）

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	4-(methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid -20℃ 遮光保存	NA-Fluor Substrate -20℃ 遮光保存
2×Assay Buffer	66.6 mM MES, 8 mM $CaCl_2$, pH 5.5-6.5 2～8℃ 保存	NA-Fluor 2×Assay Buffer 2～8℃ 保存
Stop Solution	0.14 M NaOH in Ethanol 用時調製	NA-Fluor Stop Solution 2～8℃ 保存

参照株（International Reagent Resource から入手可能、https://www.internationalreagentresource.org/）

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

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 $CaCl_2$

992 ml　滅菌蒸留水

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 を滅菌蒸留水で 2 倍希釈する。

2.5 mM MUNANA master stock solution

MUNANA 25 mg を 20 ml の滅菌蒸留水で溶解し、1 アッセイ分ずつ小分けして−20℃ 遮光保存。

200 μM MUNANA working solution（用時調製）

2.5 mM MUNANA stock solution 480 μl に 1× 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 の滅菌蒸留水で溶解し、小分けして−20℃ 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

滅菌蒸留水で溶解し、小分けして−20℃保存。

500 μM NI working stock solution

25 mM NI master stock 50 μl に滅菌蒸留水 2,450 μl を加え、1 アッセイ分ずつ小分けして−20℃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により不活化することができる。

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%エタノールを添加する。

4-MU Standard Curve の作成

4-MU は MUNANA 基質がウイルスの NA 活性によって切断されることで遊離する蛍光物質である。4-MU の Standard Curve を作成することで、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 基質を用いた薬剤感受性試験では、得られた RFU が linear range に収まるよう、あらかじめ最適なウイルス希釈倍率を決定しておく必要がある。

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 µl MS + 1,000 µl SS	100 µM
Dil 2（1:2）	500 µl Dil 1 + 500 µl SS	50 µM
Dil 3（1:2）	500 µl Dil 2 + 500 µl SS	25 µM
Dil 4（1:2）	500 µl Dil 3 + 500 µl SS	12.50 µM
Dil 5（1:2）	500 µl Dil 4 + 500 µl SS	6.25 µM
Dil 6（1:2）	500 µl Dil 5 + 500 µl SS	3.12 µM
Dil 7（1:2）	500 µl Dil 6 + 500 µl SS	1.56 µM
Dil 8（1:2）	500 µl Dil 7 + 500 µl SS	0.78 µM
Dil 9（1:2）	500 µl Dil 8 + 500 µl SS	0.39 µM
Dil 10（1:2）	500 µl Dil 9 + 500 µl SS	0.20 µM
Dil 11（1:2）	500 µl Dil 10+ 500 µl SS	0.10 µM
Dil 12	500 µl SS	0 µM

MS: Master Stock

SS: Stop Solution

2) 上記で調製した 2 倍階段希釈液を、96 ウェルプレートの各 2 ウェルに 200 µl ずつ分注する。

3) プレートを excitation 350 nm～365 nm、emission 440 nm～460 nm で測定する。

4) X 軸に 4-MU 濃度、Y 軸に RFU をとり、グラフにプロットして、4-MU Standard Curve を作成する。

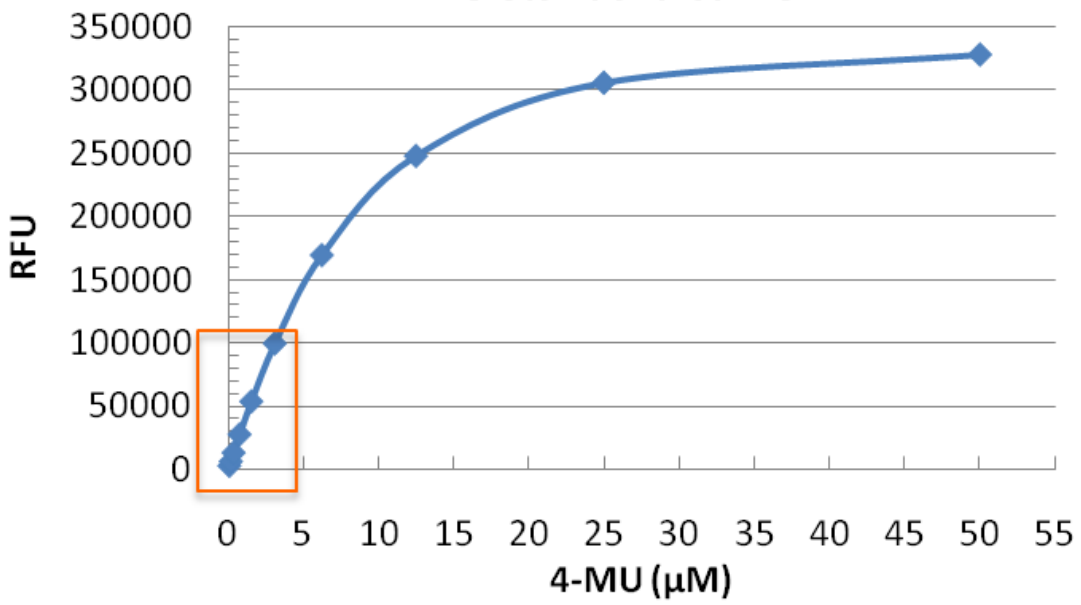


図 3.　4-MU Standard Curve

5) linear range 内の 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。

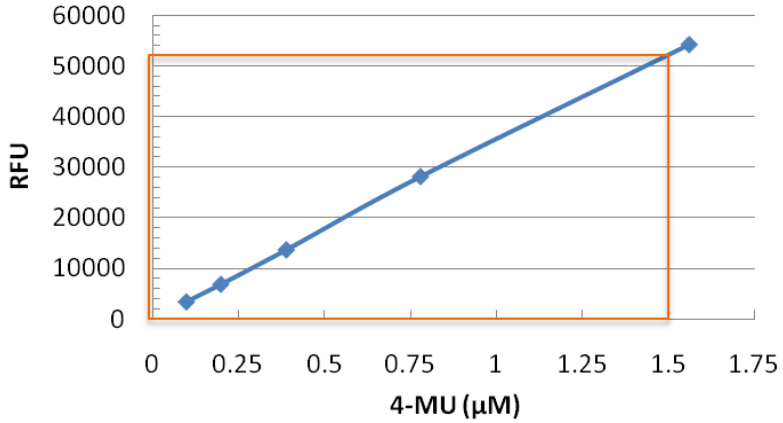


図 4.　図 3 に示した linear range RFU の拡大図

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

<u>ウイルス NA 活性の測定</u>

薬剤感受性試験において信頼性の高い IC_{50} 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。そのため、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 に入る最適なウイルス希釈倍率を決定する。

1) 96 ウェルプレートのすべてのウェルに 1×Assay Buffer を 50 μl ずつ入れる。
A 行の各ウェルにウイルス液 50 μl を加え、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 のみを加える。

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) 各ウェルに 200 µM MUNANA working solution を 50 µl 加える。
3) プレートにふたをして軽く撹拌し、遮光して 37℃で 60 分間インキュベーションする。
4) 各ウェルに Stop Solution を 100 µl 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 で測定する。
6) No Virus Control の RFU 平均値を算出し、バックグラウンド値とする。各ウェルの RFU 値からバックグラウンド値を引いて補正する。
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り、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、最適な希釈倍率を算出する。

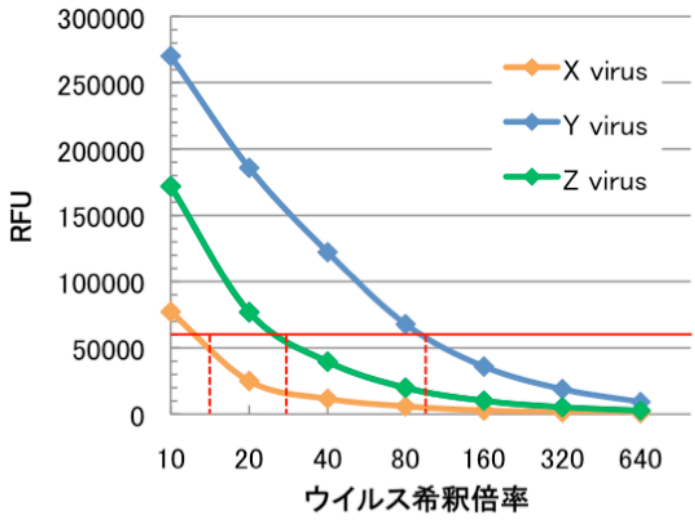


図 6. NA 活性プロットの参考例

NA 阻害剤感受性試験

1) 各ウイルスを、上記で算出した最適希釈倍率に従い 1×Assay Buffer で希釈する（用時調製）。

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

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

WS: Working Stock

AB: Assay Buffer

3) 上記で調製した階段希釈液を以下のプレートレイアウトに従い各ウェルに 25 µl ずつ分注する。

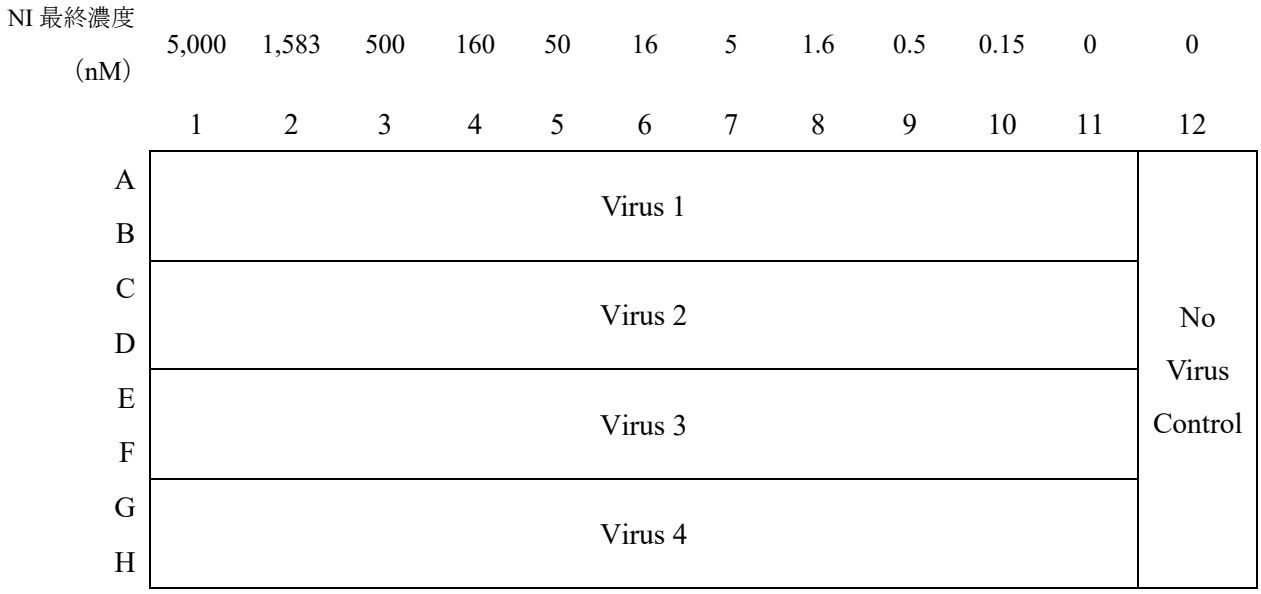


図 7. プレートレイアウト

4) 手順 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 列に向かって各ウェルに 25 µl ずつ分注する。
No Virus Control には、代わりに 1×Assay Buffer を 25 µl ずつ加える。
5) プレートにふたをして軽く撹拌し、37℃で 20 分間インキュベーションする。
6) 各ウェルに 200 µM MUNANA working solution を 50 µl 加える。
7) プレートにふたをして軽く撹拌し、遮光して 37℃で 60 分間インキュベーションする。
8) 各ウェルに Stop Solution を 100 µl 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 で測定する。

<u>IC_{50} 値の算出</u>

1) No Virus Control ウェルの RFU 平均値を算出し、バックグラウンド値とする。各ウェルの RFU 値からバックグラウンド値を引いて補正する。
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、IC_{50} 値を算出する。

2.2 NA-XTD 基質を用いる化学発光法

<u>材料および試薬</u>

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）

NA-XTD Influenza Neuraminidase Assay Kit（Applied Biosystems）
NA-XTD Substrate, 2-8℃ 保存
NA-XTD Assay Buffer, 2-8℃ 保存
NA-XTD Accelerator, 2-8℃ 保存
NA Sample Prep Buffer, 2-8℃ 保存

参照株（International Reagent Resource から入手可能、https://www.internationalreagentresource.org/）
FR-1755 - CDC Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Reference Virus Panel（version 3.0）

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

滅菌蒸留水で溶解し、小分けして−20℃保存。

500 µM NI working stock solution

25 mM NI master stock 50 µl に滅菌蒸留水 2,450 µl を加え、1 アッセイ分ずつ小分けして−20℃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 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 IC_{50} 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。そのため、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 ウェルプレートのすべてのウェルに NA-XTD Assay Buffer を 50 µl ずつ入れる。

NA-XTD Assay Buffer で 5 倍希釈したウイルス液 50 µl を A 行の各ウェルに加え、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 のみを加える。

<table>
<tr><th>ウイルス最終希釈倍率</th><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr>
<tr><td>10 倍</td><td>A</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 1</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 2</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 3</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 4</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 5</td><td colspan="2" rowspan="7">Virus 6</td></tr>
<tr><td>20 倍</td><td>B</td></tr>
<tr><td>40 倍</td><td>C</td></tr>
<tr><td>80 倍</td><td>D</td></tr>
<tr><td>160 倍</td><td>E</td></tr>
<tr><td>320 倍</td><td>F</td></tr>
<tr><td>640 倍</td><td>G</td></tr>
<tr><td></td><td>H</td><td colspan="12">No Virus Control</td></tr>
</table>

図 11. プレートレイアウト

2) 各ウェルに希釈済みの NA-XTD Substrate を 25 µl 加える。

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

4) 各ウェルに NA-XTD Accelerator を 60 µl 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÷No Virus Control の測定値）をとり、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 となる希釈倍率を最適値とする。
ウイルスの NA 活性が低く、希釈倍率が 5 倍以下となる場合には、培地に含まれるフェノールレッドの干渉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。

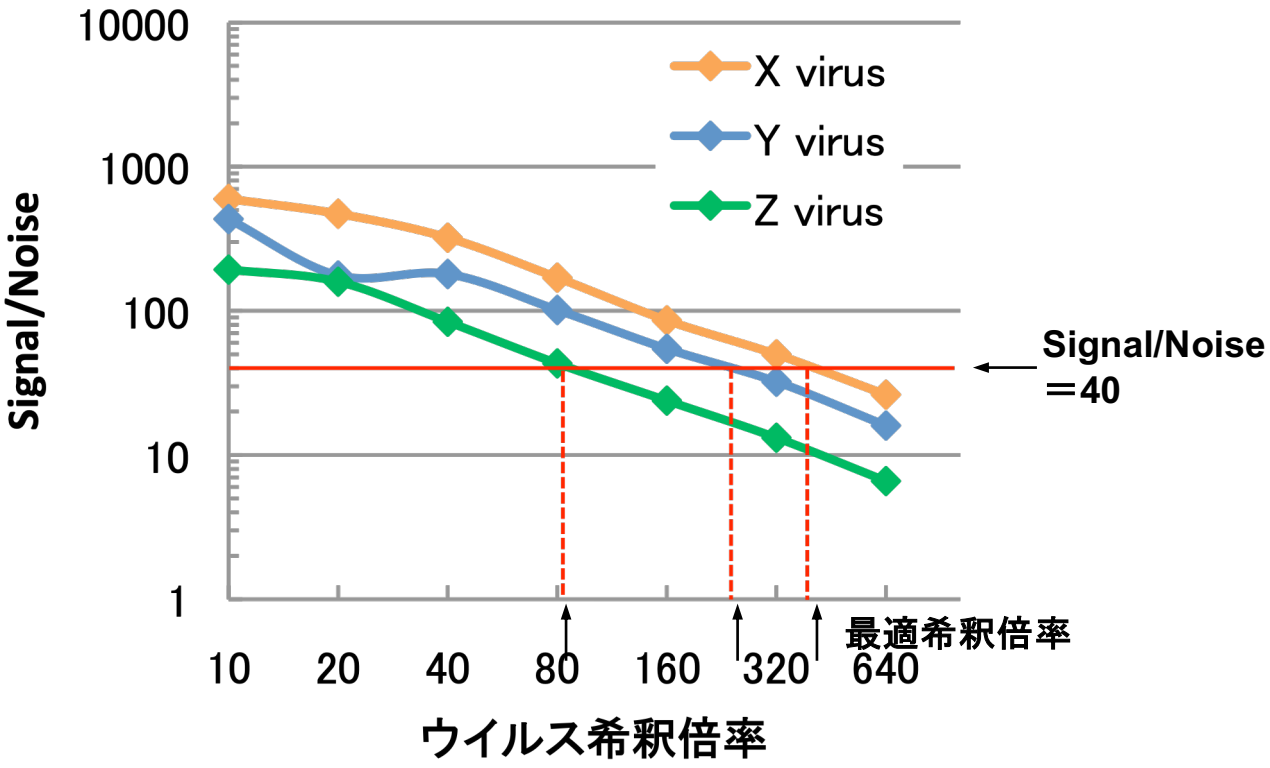


図 12. NA 活性プロットの参考例

NA 阻害剤感受性試験

1) 各ウイルスを、上記で算出した最適希釈倍率に従い NA-XTD Assay Buffer で希釈する（用時調製）。

2) 500 µM 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×）	NI 最終濃度
Dil 1（1:25）	30 µl WS + 720 µl AB	20,000 nM	6,600 nM
Dil 2（1:5）	100 µl Dil 1 + 400 µl AB	4,000 nM	1,320 nM
Dil 3（1:5）	100 µl Dil 2 + 400 µl AB	800 nM	264 nM
Dil 4（1:5）	100 µl Dil 3 + 400 µl AB	160 nM	52.8 nM
Dil 5（1:5）	100 µl Dil 4 + 400 µl AB	32 nM	10.56 nM
Dil 6（1:5）	100 µl Dil 5 + 400 µl AB	6.4 nM	2.11 nM
Dil 7（1:5）	100 µl Dil 6 + 400 µl AB	1.28 nM	0.422 nM
Dil 8（1:5）	100 µl Dil 7 + 400 µl AB	0.256 nM	0.084 nM
Dil 9（1:5）	100 µl Dil 8 + 400 µl AB	0.0512 nM	0.017 nM
Dil 10（1:5）	100 µl Dil 9 + 400 µl AB	0.01 nM	0.003 nM
Dil 11	400 µl AB	0 nM	0 nM

WS: Working Stock

AB: Assay Buffer

3) 上記で調製した階段希釈液を以下のプレートレイアウトに従い各ウェルに 25 µl ずつ分注する。

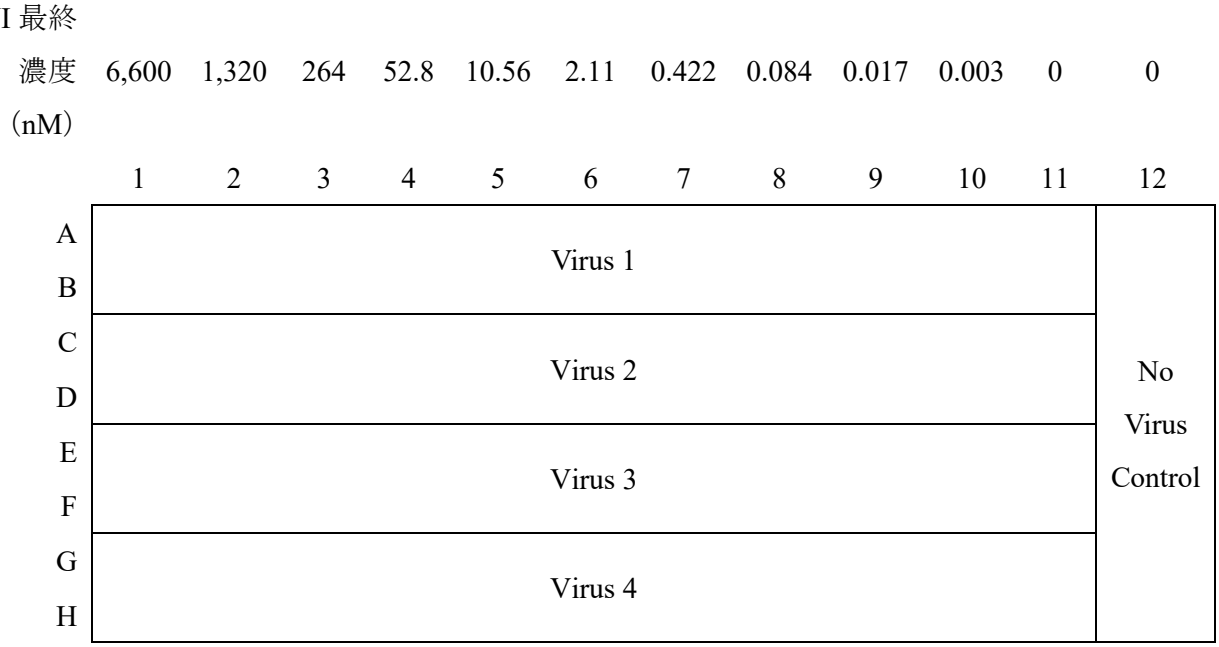


図 13. プレートレイアウト

4) 手順 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 列に向かって各ウ

ェルに 25 µl ずつ分注する。

No Virus Control には、代わりに NA-XTD Assay Buffer を 25 µl ずつ加える。

5) プレートにふたをして軽く撹拌し、37℃で 20 分間インキュベーションする。

6) 各ウェルに希釈済みの NA-XTD Substrate を 25 µl 加える。

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

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

<u>IC_{50} 値の算出</u>

1) NI 存在下における各ウイルスの NA 活性率（%）は、

NI 存在下での測定値÷NI 非存在下（11 列）での測定値×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、IC_{50} 値を算出する。

検査依頼先

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター
〒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

国立健康危機管理研究機構

国立感染症研究所

インフルエンザ研究センター

高下恵美　秋元未来
岸田典子　佐藤　彩
藤崎誠一郎　菅原裕美
中村一哉　永田志保
白倉雅之　三浦秀佳
渡邉真治　森田博子
長谷川秀樹

検査診断技術研究部

上野みなみ
久場由真仁
Doan Hai Yen
百瀬文隆
竹前喜洋
影山努

国立国際医療研究所

川上千春

地方衛生研究所

三津橋和也（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）
三宅啓文（東京都健康安全研究センター）
高橋久美子（東京都健康安全研究センター）
稲葉将平（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）
安井善宏（愛知県衛生研究所）
城座美夏（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）
阿部祐樹（愛媛県立衛生環境研究所）
江藤良樹（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）
多和田早紀（沖縄県衛生環境研究所）
石津桃子（沖縄県衛生環境研究所）