

RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス A (H5) 型遺伝子の検出

山上隆也 原 俊吉

Detection of Avian Influenza Virus Genome by Reverse Transcription-PCR

Takaya YAMAGAMI and Shunkichi HARA

キーワード：鳥インフルエンザ，RT-PCR 法，迅速診断キット，ウイルス分離

「高病原性鳥インフルエンザ」は A 型インフルエンザウイルスのうち家禽類に強い病原性を獲得した H5, H7 亜型による感染症であり，2003 年 11 月の感染症法改正で 4 類感染症に追加された。なかでも H5N1 型のヒトでの感染例は徐々に増え続けており，最近分離されたウイルスの一部にはヒトで増殖しやすい性質に変異した株も確認されている。さらに，感染したヒトの体内でヒトのインフルエンザウイルスと高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子再集合がおこり，新型インフルエンザウイルスとなる可能性が危惧されている¹⁾。このため，高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染防止と感染した場合の迅速診断，早期治療等の対策が非常に重要である。これらのことを背景として H5N1 型による高病原性鳥インフルエンザは 2006 年 6 月に「インフルエンザ (H5N1)」として指定感染症に定められた。

当所では高病原性鳥インフルエンザ，インフルエンザ (H5N1) 対策として RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス A (H5) 型の検査体制を整備しており，検査法を検討した結果 A (H1)，A (H3) 型との型別が可能であった。本稿ではわれわれが実施している RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス A (H5) 型遺伝子検出法の概要とその基礎的検討結果について報告する。

対象と方法

1. 検査対象

1) 亜型特異性の検討

インフルエンザウイルス A 型の各亜型に対して特異的に設計されたプライマーペアが，異なる亜型に対して交差反応を示さないかどうか (亜型特異性) を検討するため，インフルエンザウイルス A (H3) 型分離株，

A (H1) 型分離株，国立感染症研究所分与のインフルエンザウイルス A (H5N1) 型 cDNA (A/Vietnam/JP 1203/2004) を検体として用いて RT-PCR を行った。

2) 他法との比較検討

インフルエンザ様疾患の患者から採取した咽頭ぬぐい液，鼻腔ぬぐい液 18 件について迅速診断キット，ウイルス分離，RT-PCR 法の 3 法を実施して検出結果を比較した。迅速診断キットでは検体採取後直ちに検査を実施したが，ウイルス分離，RT-PCR 法では検体を -70 °C に保存して検査実施時に融解して用いた。

2. インフルエンザウイルス検出法

1) 迅速診断キット

市販のインフルエンザ迅速診断キットを用いて実施した。操作，判定はキットの添付文書に従った。

2) ウイルス分離と亜型の同定

MDCK, Caco-2 細胞に検体 200 μ l を接種して 1 週間培養し，その培養液上清が 0.75% モルモット赤血球に対して凝集を示したものをウイルス分離陽性とした。凝集を示さなかったものはそれぞれの細胞でさらに 1 週間継代培養し，計 3 代継代しても赤血球凝集を示さなかったものはウイルス分離陰性とした。分離ウイルスは国立感染症研究所分与の 2005/2006 シーズン用インフルエンザウイルス同定キットを用いて赤血球凝集抑制試験²⁾で亜型を同定した。詳細については既報³⁾に準じた。

3) RT-PCR 法

「RT-PCR 法による H5 鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出 (第 2 版)」⁴⁾ に準じて実施した。逆転写反応 (cDNA 合成) と PCR には検査の簡便化を目的として簡易試薬キット⁵⁾ を用いたため，反応条件を若干変更した。

すなわち，検体 140 μ l から QIAamp Viral RNA

表1 RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス遺伝子検出用プライマー

プライマー	亜型		塩基配列 *		増幅産物 (bp)
Uni-12	A型共通	cDNA合成用	5' - AGCAAAGCAGG	-3'	
H5 103f H5 1220r	A(H5)型	sense	5' - ARATYTGTCATYGGTTAYCATGCA	-3'	1168
		antisense	5' - GTGTTTCATTTTGTAAATGAT	-3'	
	A(H1)型	sense	5' - GCTATTTCTGGGGTGAATCT	-3'	729
		antisense	5' - AGCAAAGCAGGGGAAAATAA	-3'	
	A(H3)型	sense	5' - TGCCTGAAACCGTACCAACC	-3'	1143
		antisense	5' - AGCAAAGCAGGGGATAATTC	-3'	

* R : A/G Y : C/T

Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA 60 μ l を抽出した。その 10 μ l を用いてインフルエンザウイルス A 型共通プライマー (Uni-12) と cDNA 合成キット「Ready To Go You Prime First Strand Beads」(GEヘルスケア) により cDNA 33 μ l を合成した。このうち 3 μ l を用いて PCR キット「Ready To Go PCR Beads」(GEヘルスケア) と亜型特異的プライマーペア⁶⁾ により、亜型ごとに個別の反応系で PCR を行った。得られた PCR 増幅産物についてサブマリン電気泳動を行い、目的とする大きさのバンドが確認されたものを陽性とした。用いたプライマーは表 1 に、RT-PCR 法の詳細については図 1 に示した。

結 果

1. 亜型特異性

PCR 増幅産物の電気泳動結果を図 2 に示した。A(H1) 型特異的プライマーペアでは A(H1) 型分離株のみが陽性、A(H3) 型特異的プライマーペアでは A(H3) 型分離株のみが陽性、A(H5) 型特異的プライマーペアでは A(H5) 型 cDNA のみが陽性となり、各プライマーペアの亜型特異性は良好であった。

逆転写反応 (cDNA合成)

抽出RNA	10.0 μ l
プライマー (50 μ M)	0.3 μ l
滅菌蒸留水	22.7 μ l
Ready To Go You Prime First Strand Beads	1 tube

37°C 1時間
98°C 5分
水中 5分

PCR

cDNA	3.0 μ l
プライマー (sense) (50 μ M)	0.2 μ l
プライマー (antisense) (50 μ M)	0.2 μ l
滅菌蒸留水	21.6 μ l
Ready To Go PCR Beads	1 tube

94°C 2分
94°C 1分
50°C 1分
72°C 2分
72°C 10分

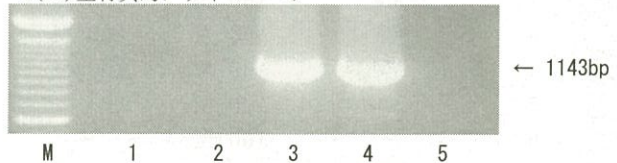
40回 繰り返し

電気泳動にて確認

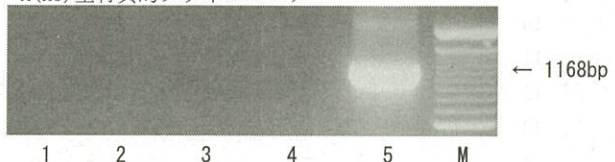
A(H1)型特異的プライマーペア



A(H3)型特異的プライマーペア



A(H5)型特異的プライマーペア



1, 2 : A(H1)型陽性検体 3, 4 : A(H3)型陽性検体
5 : A(H5)型陽性検体 M : 100bpラダー

図1 RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス遺伝子検出法

図2 RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス遺伝子検出結果

2. 他法との比較

各法での検出結果を表2に示した。迅速診断キットでは9件が陽性、ウイルス分離では12件が陽性、RT-PCR法では10件が陽性となった。RT-PCR法による亜型の同定結果はウイルス分離による同定結果とすべて一致した。

検体処理、反応時間などを含めた検査所要時間は迅速診断キットが約20分、ウイルス分離は1～4週間、RT-PCR法は約1～2日であった。

考 察

市販のインフルエンザ迅速診断キットはA型とB型の型別はできるものの、A型の場合にはH3, H1, H5といった亜型を同定することは出来ない。ヒトのインフルエンザウイルスではウイルス分離を行い、抗血清を用いた赤血球凝集抑制試験²⁾で亜型の同定が可能である。しかし、数週間以上の検査期間が必要となることから、高病原性鳥インフルエンザやインフルエンザ(H5N1)を疑う症例での型別法としては迅速性に問題がある。

しかし、RT-PCR法はウイルス遺伝子検出と亜型の同定が同時に可能であり、検査期間も1～2日程度と短い。さらに迅速診断キットよりも感度がよく、亜型の同定結果もウイルス分離と一致した。今回、臨床検体では

表2 インフルエンザウイルス検出法3法の結果の比較

検体番号	検出結果		
	迅速診断キット	ウイルス分離	RT-PCR法
1	A型	A(H1)型	A(H1)型
2	A型	A(H1)型	A(H1)型
3	A型	A(H1)型	A(H1)型
4	A型	A(H1)型	A(H1)型
5	-	A(H1)型	-
6	-	A(H1)型	-
7	A型	A(H3)型	A(H3)型
8	A型	A(H3)型	A(H3)型
9	A型	A(H3)型	A(H3)型
10	A型	A(H3)型	A(H3)型
11	A型	A(H3)型	A(H3)型
12	-	A(H3)型	A(H3)型
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-

- : 陰性

H5型についての検討はできなかったが、H1, H3型と同様の結果が得られるものと思われる。以上のことから、RT-PCR法は鳥インフルエンザウイルスA(H5)型の迅速な検出法、型別同定法として有用性の高い方法であると考えられた。

欠点としては亜型ごとに反応系が個別であるため、1検体につき複数の反応系で実施しなければならないこと、逆転写反応とPCRを分離して行うTwo step RT-PCR法であるためコンタミネーションに特に注意が必要なことである。なお、2006年6月に病原体検査マニュアルが改訂され、Two Step RT-PCR法に変わってOne step RT-PCR法が採用された⁷⁾。One step RT-PCR法はTwo step RT-PCR法よりも感度の低い可能性が考えられる⁵⁾ものの、コンタミネーション防止と検査の簡便化が期待されるため、今後は反応条件等を検討して実施したいと考えている。

文 献

- 1) 小澤 真, 河岡義裕: インフルエンザパンデミック—今そこにある危機—, 感染症誌, 80, 1~7 (2006)
- 2) 根路銘国昭ら: ウイルス学各論改訂2版(国立予防衛生研究所学友会編), 287~328, 丸善(1982)
- 3) 山上隆也ら: 2004/2005シーズンの山梨県におけるインフルエンザの流行, 山梨衛公研年報, 48, 19~22 (2004)
- 4) 国立感染症研究所ウイルス第3部インフルエンザウイルス室: RT-PCR法によるH5鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出(第2版), 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ, http://idsc.nih.go.jp/disease/avian_influenza, (2005)
- 5) 山上隆也, 小澤 茂: ノーウォーク様ウイルス遺伝子の検出を目的とした市販RT-PCRキットの有用性, 医学検査, 49, 1277~1281 (2000)
- 6) 国立感染症研究所ウイルス第3部インフルエンザウイルス室: インフルエンザウイルス, 病原体検査マニュアル(地方衛生研究所全国協議会, 国立感染症研究所編), (2003)
- 7) 国立感染症研究所ウイルス第3部インフルエンザウイルス室: 高病原性鳥インフルエンザ, 病原体検査マニュアル(地方衛生研究所全国協議会, 国立感染症研究所編), (2006)