

Multiplex Real-Time RT-PCR を用いたインフルエンザウイルスの迅速診断法の開発

日大生産工(PD) ○根本 浩史

日大生産工 神野 英毅

緒言

近年、我々の安全・安心を脅かしているインフルエンザウイルスは、*Orthomyxoviridae* 科に属するマイナス鎖 RNA を遺伝子にもつウイルスであり、核タンパク (NP)とマトリックスタンパク (M)の抗原性の違いから A、B、C 型に分別される。さらに A 型はウイルス表面タンパクの HA と NA の組み合わせにより複数の亜型が存在する。これまでヒト間で流行しているのは A 型の H1N1 と H3N2、および B 型であるが、H5N1 鳥インフルエンザの変異によるパンデミックが危惧されている。

我々が報告したラテックス免疫比濁法 (LTIA 法)を用いたインフルエンザの迅速診断法は、インフルエンザウイルスのハイスループットな定量が行える¹⁾。しかし、その感度、特異性を補うためにも、別途にウイルス確定検査が必要である。これにはより高感度なウイルス分離培養法や RT-PCR 法が選択として挙げられるが、操作が複雑であり、インフルエンザ流行時に要求される短時間、多検体の測定には不向きである。

一方、リアルタイム PCR 法は遺伝子増幅過程を光学的に測定することで、増幅に必要な温度サイクルの回数から遺伝子定量が可能である。また、アガロース電気泳動などの PCR 後の操作が不要なため、より迅速かつ簡便な遺伝子測定法である。本法は複数種類のプライマーを同一反応系で用いる Multiplex PCR 法を適応することでウイルス型を同時に判別することができ、測定操作の高効率化が期待できる。

そこで本研究では、より迅速なインフルエンザの確定検査を目的として、A 型 B 型とも同一反応液で測定でき、1 段階で行える Multiplex real-time RT-PCR (Multiplex RRT-PCR 法)に着目し、遺伝子学的なインフルエンザウイルスの定量とウイルス型判別の同時測定を検討した。

材料、実験方法

1、使用サンプルおよびプライマー、プローブ

検討した標準ウイルスサンプルとして Influenza A 型 (Singapore/63/04 H1N1) および Influenza B 型 (B Yamanashi/166/98) 不活化ウイルス粒子 (Zepto Matrix,

USA)を使用した。プライマーは Suwannakam らの報告²⁾を参照にして、A 型、B 型ともそれぞれウイルス M 部位を標的遺伝子とした Table 1 に示すプライマー、および蛍光プローブとして TaqMan プローブを作製した。各プライマーおよびプローブは BLAST を使用して相同性を確認した。

Table 1 Primers for use in influenza virus multiplex real-time RT-PCR

Type, gene	Name	Sequence (5'-3')	Position
A, M	FLA-M-F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC	151-171
	FLA-M-P218	HEX-ACGCTCACCGTGCCCACT-BHQ1	218-235
	FLA-M-R276	AGGGCATTGTGGACAAKCGTCTA	276-252
B, M	FLB-M-F439	CTCTGTGCTTTRTGCGARAAAC	439-460
	FluB-P135	FAM-TCAGCAATGAACACAGCAA-BHQ1	541-559
	FLB-MR	CCTTCYCCATTCTTTTGACTTGC	671-649

2、ウイルス RNA の抽出

インフルエンザウイルスの RNA は、QIAamp Viral RNA Mini キット (Qiagen, USA)を使用して付属の説明書に従い抽出操作を行った。抽出 RNA サンプルは使用直前まで氷温で保存し、一部は-30℃にて冷凍保存した。

3、蛍光プローブを用いた Multiplex RRT-PCR 測定

抽出 RNA サンプルからの 1 段階 Multiplex RRT-PCR 法は RNA-direct realtime PCR (TOYOBO)を用いて行った。上記のプライマーおよびプローブの 2 セット、そして RNase フリー水にて段階希釈した抽出 RNA サンプルを直接使用して反応液を調製した。PCR 反応は、LightCycler II リアルタイム PCR 測定装置 (Roche Diagnostics, USA)を用いた。調製した各反応液を専用ガラスキャピラリーにそれぞれ分注し、遠心分離して装置にセット後、逆転写反応を行った。続けて 45 サイクルの PCR 反応を行い、各増幅サイクル中のアニーリング時に 530 nm および 560 nm の両測定チャンネルにて同時に蛍光反応を測定して PCR 反応の解析を行った。

結果

各インフルエンザウイルスより抽出した RNA を 10 倍ずつ段階希釈し、測定した結果を Fig. 1 に示す。蛍光反応の立ち上がりに必要な PCR 増幅サイクル回数は、560 nm (a)および 530 nm (b)の両測定チャンネルともに

サンプル濃度に反比例した。インフルエンザA型の蛍光プローブは蛍光色素 HEX (蛍光波長 : 553 nm)を使用し 560 nm に、B 型では FAM (蛍光波長 : 518 nm)を使用し 530 nm にそれぞれ特異的な蛍光反応が観察できた。このとき、A 型は 10^5 希釈まで、およそ等サイクル間隔にて ノイズがない明確なシグナルが得られた。しかしながら、B 型では 10^4 希釈まで蛍光反応が観察できたが、A 型と比べるとノイズが多く不安定であった。次に、この蛍光反応の立ち上がる増幅サイクル回数 (CP)を Y 軸に、サンプル希釈率の対数を X 軸にとり、作製した検量線を Fig. 2 に示す。 10^4 希釈までの範囲でそれぞれ直線的な検量線を作製することができ、A 型では $R^2=0.9975$ 、B 型では $R^2=0.9839$ の良好な相関が得られた。それぞれの検量線の傾きから求めた反応効率、A 型では約 102%、B 型では 93%となった。

考察

本研究で検討した Multiplex RRT-PCR 法は、インフルエンザ A 型、B 型それぞれに特異的な蛍光プローブを使用し、蛍光反応と波長の違いからウイルス遺伝子の定量とウイルス型を同時に測定できる。しかも、抽出した RNA を直接使用でき、別途に逆転写反応を必要としない 1 段階測定法である。そのため、試薬分注などの操作が省かれ、測定開始から約 1 時間で結果が判明することから、より迅速かつ高効率な測定が可能である。また、検討した TaqMan プローブは消光剤に BHQ を用いており、プローブ自体の特異性に加えバックグラウンド蛍光の低下が期待できるため、複数の蛍光プローブが共存する Multiplex 測定系では特に有効と考えられる。

本法では CP よりインフルエンザウイルス遺伝子の高感度定量が可能であり、良好な相関が確認できた。その遺伝子増幅効率、インフルエンザ A 型の測定ではおよそ 100%と理想的であったが、B 型では約 90%と若干低かった。また、B 型の測定では蛍光反応もノイズが多く不安定であったが、蛍光反応に必要な CP は A 型と同様に初期サンプル濃度に応じておよそ一定であった。そのため、PCR の伸長反応時における TaqMan プローブの分解効率に原因があると考えられ、より詳細な PCR 反応条件の検討が必要である。

結論

迅速なインフルエンザの確定検査を行うために、

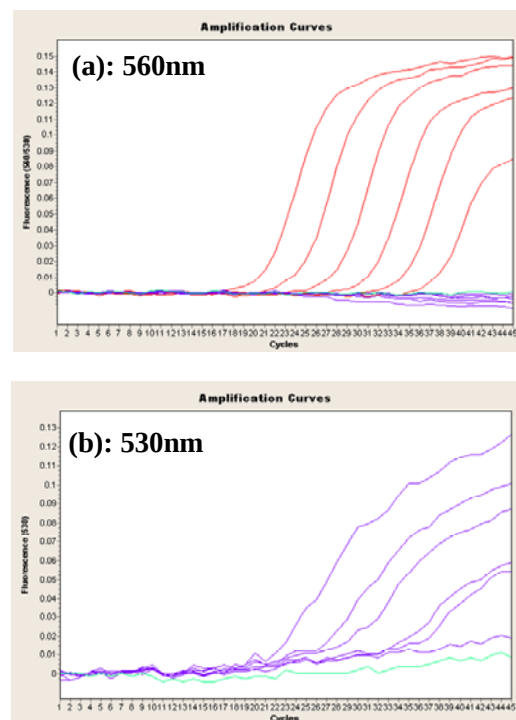


Fig. 1 Amplification curve of influenza virus type A and B detection by multiplex real-time RT-PCR with fluorescent probe. (a):560nm (b):530nm RED : Influenza A Blue : Influenza B Green : Blank

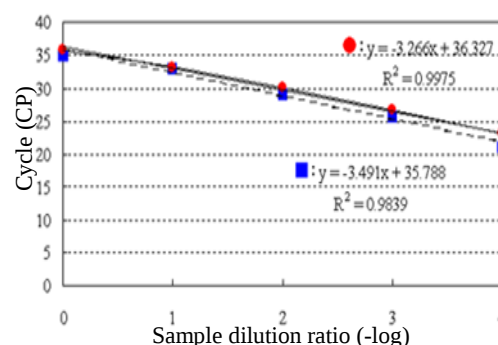


Fig. 2 Standard curves between CP and sample dilution ratio. ● : Influenza A ■ : Influenza B

Multiplex real-time RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの遺伝子定量とウイルス型の同時判別を検討した。本法は改善の余地があるものの迅速、高効率な測定が可能であり、ウイルス確定検査として LTIA 法と組み合わせることで、インフルエンザ流行時における多角的な対策の一つになると期待できる。

参考文献

- 1) H. Nemoto, T. Komoriya, H. Kohno, "Development of Latex Turbidimetric Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of Influenza Virus", JARMAM, 18, (2007), p117-126
- 2) K. Suwannakam et al, "Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays", J Virol Methods, 152, (2008), p25-31