

マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの
迅速的なウイルス型判別と遺伝子定量法の検討

根本 浩史 (日大生産工・PD) 神野 英毅 (応用分子化学科) 牛島廣治 (藍野大学)

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。

このような背景のもと、我々が以前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ウイルスレベルな定量が可能である¹⁾。しかし、その感度、特異性を補うためにも、別途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 HI 試験、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。

我々は前回の報告にてリアルタイム RT-PCR 法による RNA ウイルスの遺伝子学的定量法の検討を行い、その例としてカリシウイルスの測定を報告した。リアルタイム RT-PCR 法は RNA を直接サンプルで使用でき、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り、より高感度で迅速かつ簡便な遺伝子測定法である。さらに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 法を適用することができ、ウイルス型を同時に判別することによる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ウイルスの確定検査を目的として、A 型 B 型とも同じ反応液で測定でき、1 段階で行えるマルチプレックスリアルタイム RT-PCR (Multiplex RRT-PCR 法) に着目した。インターカラー法もしくは蛍光プローブ法に

より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ので報告する。

材料、実験方法

1、使用サンプル、検体およびプライマー、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。臨床検体として 08 年 11, 12 月期にインフルエンザが疑われる患者より採取した鼻腔ぬぐい液 6 検体を使用した。プライマーは Suwannakam らの報告¹⁾ 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-ACGCTCACCGTGCCCGT-BHQ1	218-235
	FLA-M-R276	AGGGCATTGGGACAAKCGTCTA	276-252
B, M	FLB-M-F439	CTCTGTGCTTTRTGGCRAAAC	439-460
	FLB-P135	FAM-TCAGCTATGAACACAGCAA-BHQ1	541-559
	FLB-MR	CCTTCYCCATTCTTTTGACTTGC	671-649

2、ウイルス RNA の抽出

各サンプル、検体からのインフルエンザウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini キット (Qiagen, USA) もしくは Magstration System 6GC 全自動遺伝子抽出器 (プレジジョンシステムサイエンス) を使用して付属の説明書に従い抽出した。各抽出 RNA サンプルは使用直前まで氷温で保存し、一部は 80°C にて冷凍保存した。標準ウイルスサンプルより抽出した各インフルエンザ RNA は 4 μg/ml MS2-RNA 溶解液 (Roche Diagnostics, USA) にて段階希釈して、標準 RNA サンプルとした。

3、インターカラー法を用いた Multiplex RRT-PCR 測定

SYBR-Green を用いた抽出 RNA サンプルからの 1 段階 Multiplex RRT-PCR 法は、One Step SYBR Primescript RT-PCR kit II (タカラバイオ) を用いて行った。プライマーとして FLA-M-F151、FLA-M-R276、FLB-M-F439、FLB-MR

の2組4プライマーを用いた。サンプルとして抽出したインフルエンザウイルスRNAもしくはブランクとして水を2 μ l 使用し、Table 2に示す組成の反応液を調製した。PCR反応は、LightCycler IIリアルタイムPCR測定装置 (Roche Diagnostics, USA) を用い、調製した反応液を専用ガラスキャピラリーに分注し遠心分離して装置にセット後、Table 3に示す温度条件により530nmの波長チャンネルにて蛍光強度を測定した。PCR反応後、続けて融解曲線解析を行い、融解温度 (MP) の差異よりウイルス型の半別を行った。

4. 蛍光プローブを用いた Multiplex RRT-PCR 測定

蛍光プローブとして TaqMan プローブを使用した Multiplex RRT-PCR 法は、RNA-direct realtime PCR (TOYOBO)を用いて行った。プライマーおよび TaqMan プローブはTable 1に示す2組4プライマー2プローブを用いた。インフルエンザウイルス RNA または水2 μ l を使用し、Table 4に示す組成の反応液を調製した。調整反応液はインターカレーター法と同じく LightCycler II 測定装置にセットし、Table 5に示す温度条件にて測定を行った。各サイクルのアニーリング反応後に530nmおよび560nmの両波長チャンネルにて蛍光強度を測定してPCR反応の解析を行った。

結果

1. インターカレーターを用いた Multiplex RRT-PCR の反応性

1 \sim 10⁴まで段階希釈した標準RNAサンプルをインターカレーター法によって測定した結果をFig. 1に示す。サンプル希釈率が低いほど少ない増幅回数にてSYBR Greenの蛍光反応の上昇が観察できた。インフルエンザA型、B型とも10⁴希釈程度まで、およそ等サイクル間隔の明確な反応が得られた。しかし、34サイクル以降ではブランクに非特異的な蛍光反応が確認された。次に、この蛍光反応の立ち上がるサイクル回数 (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。測定範囲でそれぞれ直線的な検量線を作製することができ、インフルエンザA型ではR²=0.9918、B型ではR²=0.9881の相関を示した。それぞれの検量線の傾きから求めた反応効率も、インフルエンザA型では108%、B型では124%であった。

Table 2 Composition of reaction reagent with intercalater method

Reagent	Volume (μ l / reaction)
RNase Free H ₂ O	5.6
2X One Step SYBR RT -PCR Buffer4	10
PrimeScript 1Step Enzyme	0.8
Each Primer (10 μ mol/ μ l)	0.5/each
RNA Sample	2.0
Total	20.0

Table 3 PCR Condition of intercalater method

Condition	Acquisition
Stage1 Revers transcription	
42 $^{\circ}$ C 5 min	
95 $^{\circ}$ C 10 sec	
Stage2 PCR / 40 cycles	
95 $^{\circ}$ C 5 sec	None
60 $^{\circ}$ C 20 sec	Single
Stage3 Melting peak analysis	
95 $^{\circ}$ C 0 sec	
65 $^{\circ}$ C 15 sec	Melting
95 $^{\circ}$ C 0 sec	

Table 4 Composition of reaction reagent with fluorescent probe method

Reagent	Volume (μ l / reaction)
RNase Free H ₂ O	4.5
Realtime PCR Master Mix	10
50mM Mn(OAc) ₂	1.0
Each Primer (10 μ mol/ μ l)	0.5/each
EachProbe (10 μ mol/ μ l)	0.25/each
RNA Sample	2.0
Total	20.0

Table 5 PCR Condition of fluorescent probe method

Condition	Acquisition
Stage1 Revers transcription	
90 $^{\circ}$ C 30 sec	
61 $^{\circ}$ C 20 min	
95 $^{\circ}$ C 30 sec	
Stage2 PCR / 60 cycles	
95 $^{\circ}$ C 0 sec	None
60 $^{\circ}$ C 45 sec	Single

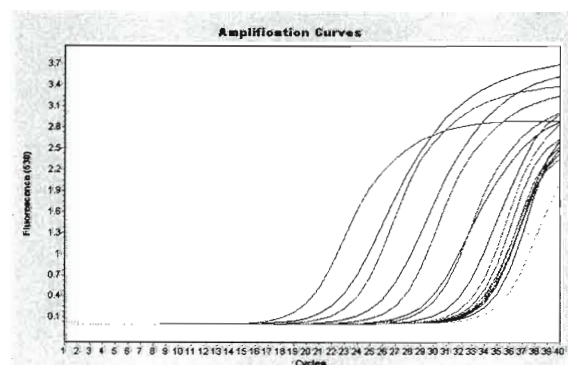


Fig. 1 Amplification curve of influenza virus type A and B detection by multiplex real-time RT-PCR
Red : Influenza A Blue : Influenza B Green : Blank

次にPCR反応後に連続して行った融解曲線解析の結果をFig. 3に示す。インフルエンザA型およびB型の増幅産物による融解曲線は、それぞれ特異的なピークを示した。それぞれのMPはインフルエンザA型が約84°C、B型が約85°Cであり、MPの差異からA型とB型の型判別ができた。75°Cから85°C付近までブランクの幅広いピークが確認されたが、これはプライマーダイマーが形成されているものと判断した。

2、蛍光プローブを用いた Multiplex RRT-PCR の反応性

インターカレーター法と同様に1~10⁴まで段階希釈した標準RNAサンプルを蛍光プローブ法により測定した結果をFig. 4に示す。蛍光反応の立ち上がりに必要なCPは、560nmおよび530nm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:553nm)を使用しており560nmに、B型ではFAM(蛍光波長:518nm)を使用しているため530nmにそれぞれのウイルス型別に特異的な蛍光反応が観察された。蛍光プローブ法もインターカレーター法と同じく、A型、B型とも10⁴希釈までおよそ等サイクル間隔の明確な反応が得られた。このときのCP対サンプル希釈率の検量線をFig. 5に示す。A型ではR²=0.9989、B型ではR²=0.9925の良好な相関性を示す検量線が得られた。それぞれの検量線の傾きから求めた反応効率率は、A型では96%、B型では117%となった。

3、プローブ法による臨床検体の測定

臨床検体6検体より抽出したRNAおよび相対比較のため10¹~10³まで段階希釈した標準RNAサンプルをプローブ法により測定した結果をFig. 6に示す。6検体中3検体が560nmに蛍光反応が出現し、インフルエンザA型陽性と判断した。またA型の標準RNAサンプルのCPよりR²=1の検量線が作製でき、このときの反応効率率は96%であった。この検量線を用いて各検体に含まれる相対RNA量を求めたところ、それぞれ検体No1:0.668、No2:2.336、No6:0.304であった(Fig. 7)。

考察

検討したMultiplex RRT-PCR法は、抽出したRNAを直接サンプルとして使用でき、同じ試薬、反応条件にてインフルエンザウイルスA型およびB型を同時に検出できる、

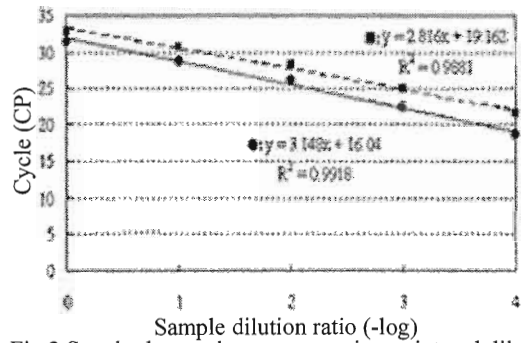


Fig.2 Standard curve between crossing point and dilution ratio of ample RNA with intercalater method

● : Influenza A ■ : Influenza B

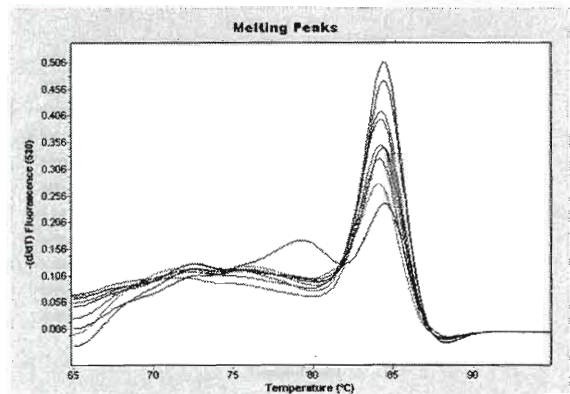


Fig. 3 Typing of influenza virus A and B genes by melting-curve analysis
Red : Influenza A Blue : Influenza B Green : Blank

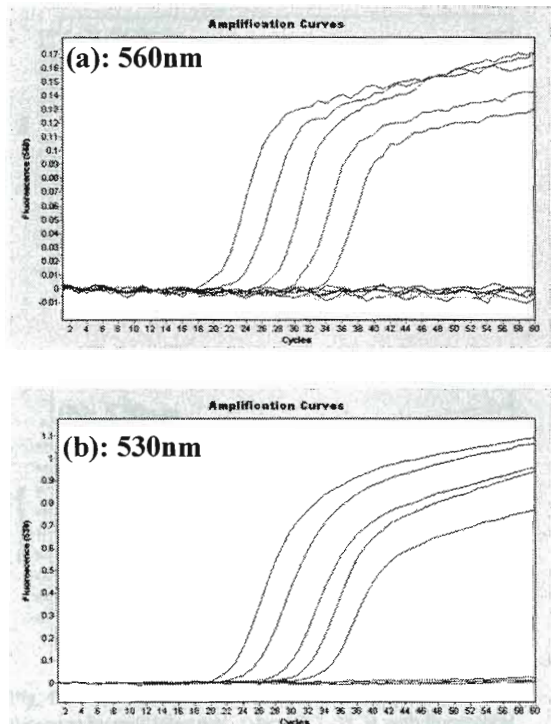


Fig. 4 Amplification curve of influenza virus type A and B detection by multiplex real-time RT-PCR with fluorescent probe. (a) : 560nm (b) : 530nm Red : influenza A Blue : influenza B Green : Blank

ワンステップ測定法である。そのため、試薬分注などの測定操作を最小限に省くことができ、ゲル電気泳動による確認も必要としない。そのため、RNA 抽出操作を入れても3時間以内に結果が半明して、より迅速かつ高効率な測定が可能である。

本研究では SYBR Green を使用するインターカレーター法およびウイルス特異的な TaqMan プローブを使用する蛍光プローブ法の 2 つの方法を同じプライマーを用いて検討した。いずれの方法でもサンプル希釈率対 CP の検量線が作製でき、ウイルス RNA の定量が可能であった。インターカレーター法では MP の差異よりウイルス型の半別が行えた。しかし、その温度差は 1°C 程度であり明確なウイルス型判別とは言い難かった。一方、蛍光プローブ法ではウイルス型別に特異的な波長の蛍光反応が測定できたため、より本測定系に適していると考えられる。また、蛍光プローブ法はインターカレーター法よりも特異的反応を示し、バックグラウンド蛍光が低く、良好な検量線が得られた。コスト面においてインターカレーター法は期待ができるが、本測定系に適するためにはプライマーの変更を含めた反応の改善が必要である。

特異的な測定が行えた蛍光プローブ法により臨床検体の測定を行ったところ、明確な反応が得られ、別途行った RT-PCR よりも迅速かつ高感度にインフルエンザウイルスの確定検査が行えた。そして、各検体が示したインフルエンザウイルス RNA 量が検体中のウイルス量と相関しており、患者症状や治療経過、採取時期によっても変化すると考えられるため、本項目を測定することで新しい臨床的意義が見出せると期待できる。

結論

迅速なインフルエンザの確定検査を行うために、マルチプレックスリアルタイム 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。本法は迅速、高感度な確定検査が可能であり、ウイルス確定検査として LITIA 法と組み合わせて用いることで、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, *JARMAM*, 18, (2007), p117-126
- 2) K. Suwannakam et al., *J Virol Methods*, 152, (2008), p25-31

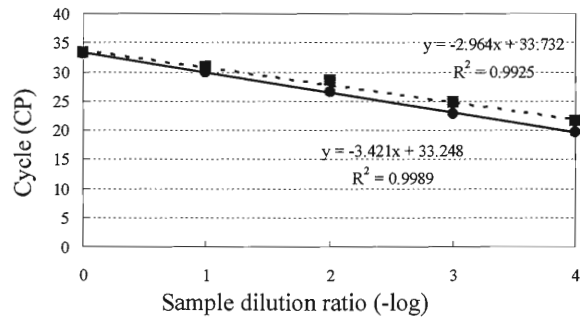


Fig.5 Standard curve between crossing point and dilution ratio of ample RNA with probe method
● : Influenza A ■ : Influenza B

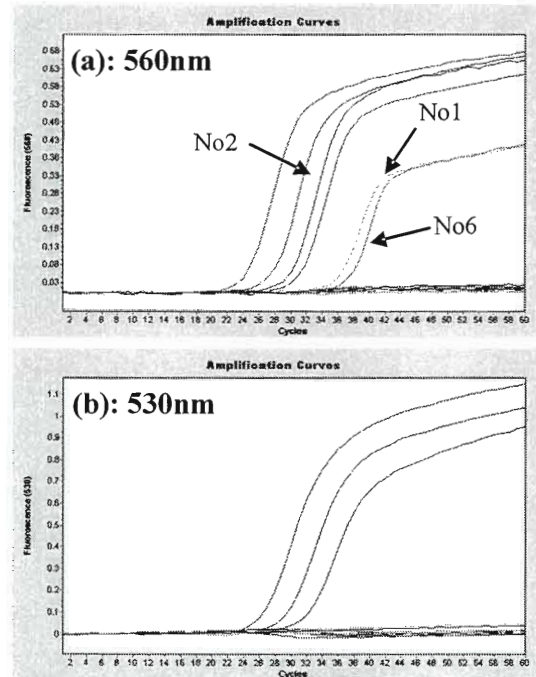


Fig. 6 Amplification curve of influenza virus type A and B by multiplex real-time RT-PCR with TaqMan probe. (a):560nm (b):530nm Red : Standard influenza A 10⁻¹~10⁻³ Blue : Standard influenza B 10⁻¹~10⁻³

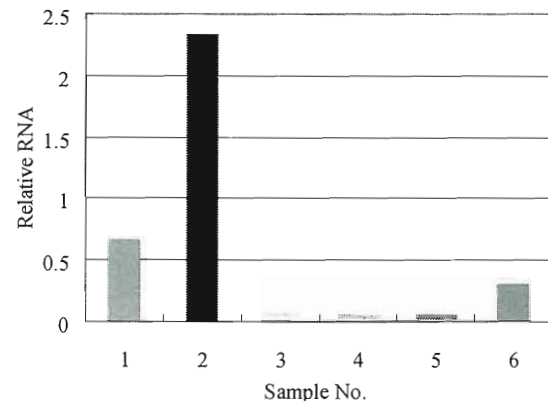


Fig. 7 Comparison of the relative Influenza A virus RNA in clinical samples. The graphs represent the relation of virus RNA amount from calibration curve with standard influenza RNA.