

Multiplex Real-Time RT-PCR 法を用いた Influenza virus の 遺伝子型判別と定量法の検討

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。

このような背景のもと、我々は前回の報告にて Multiplex real-time RT-PCR (Multiplex RRT-PCR 法)による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発表した。リアルタイム RT-PCR 法は RNA を直接サンプルに使用でき、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。

今発表では、これまでの課題であった TaqMan プローブを使用時のインフルエンザ B 型測定における蛍光反応の安定性を改善できたので報告する。また実際に臨床検体を測定してその反応性を確認したので併せて報告する。

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-ACGCTCACCGTGCCCACT-BHQ1	218-235
	FLA-M-R276	AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	276-252
B, M	FLB-M-F439	CTCTGTGCTTTTGTGCGARAAAC	439-460
	FLB-P135	FAM-TCAGCTATGAACACAGCAA-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 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。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、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 60 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

10^{-1} ~ 10^{-3} まで段階希釈したインフルエンザ A 型および B 型の標準 RNA と、各検体を測定した結果を 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、530 nm (a) および 560 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) を使用して 530 nm にそれぞれ特異的な蛍光反応が観察でき、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。標準 RNA サンプルの蛍光反応の立ち上がる増幅サイクル回数 (CP) より求めた各検量線の相関は、A 型は $R^2 = 1$ 、B 型は $R^2 = 0.996$ であった。次に各検体より抽出した RNA は 6 検体中 3 検体が 560 nm に蛍光反応が現れ、インフルエンザ A 型陽性と判断した。このとき、前項にて作製した検量線から求めた相対 RNA 量はそれぞれ検体 No1: 0.668、No2: 2.336、No6: 0.304 であった (Fig. 2)。

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。しかし、シングル測定よりも反応系が複雑になるため、至適反応条件を精密に設定する必要があった。

今回の検討ではこの点を解決することができ A 型、B 型とも Fig. 1 に示すような安定的な蛍光反応を得ることに成功した。臨床検体の測定においても低いバックグラウンドの明確な反応が得られ、別途行った RT-PCR とも相関がある結果が得られた。そして、各検体が示したインフルエンザウイルス RNA 量は症状や治療経過、採取時期によっても変化すると考えられ、本項目を測定することで新しい臨床的意義の開発が期待できる。

結論

迅速なインフルエンザの確定検査を行うために、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。本法は迅速、高感度なインフルエンザの診断

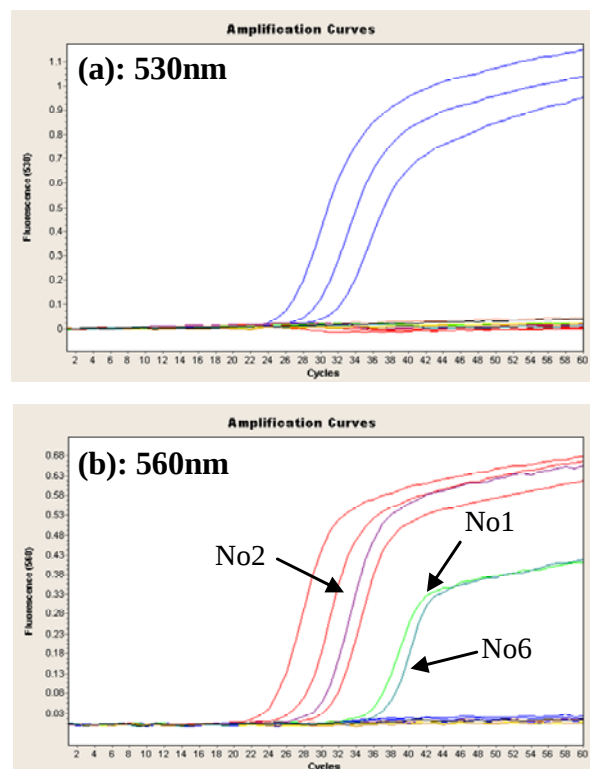


Fig. 1 Amplification curve of influenza virus type A and B detection by multiplex real-time RT-PCR with TaqMan probe. (a):530nm (b):560nm RED : Influenza A 10^{-1} ~ 10^{-3} Blue : Influenza B 10^{-1} ~ 10^{-3}

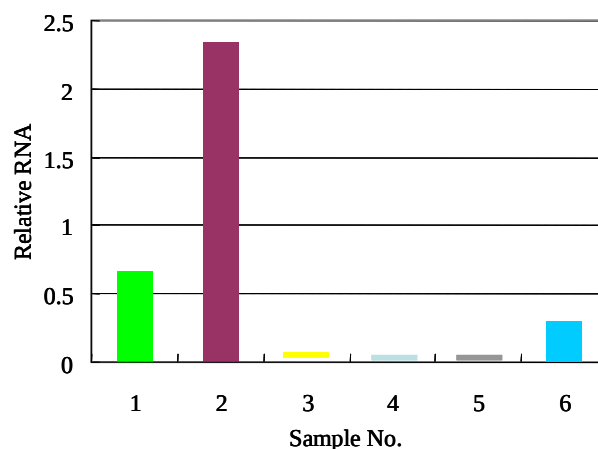


Fig. 2 Comparison of the relative Influenza A virus RNA in clinical samples. The graphs represent the RNA amount relation from calibration curve with influenza standard RNA.

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) 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