

H5 型鳥インフルエンザ感染が疑われる症例に対する PCR 診断法の確立

浅岡 直子, 田中 康子, 藤井 豊, 大内 正信

H5 型鳥インフルエンザウイルスの感染が疑われる患者が川崎医科大学附属病院に来院した場合には緊急に鑑別診断する必要があるが、現行の迅速診断キットでは A 型インフルエンザとは判定できても H5 亜型かどうかは鑑別できない。本研究では、本院でも通常の PCR (polymerase chain reaction) 法で簡便に H5 亜型を鑑別できる体制を整えるために、H5 亜型 HA (hemagglutinin) 遺伝子すべてに共通し、なおかつ現在のヒトの A 型インフルエンザ (H1, H3 亜型) ウイルスには存在しない塩基配列部分をターゲットにしたプライマー 8 種を作成して PCR を行なった。その結果、2 ペアのプライマーが H5 HA 遺伝子を特異的に検出できること、その検出感度は検査材料中に 3 PFU (plaque forming units) 相当のウイルスがあれば同定できることが分かった。検体採取から同定までに要する時間は約 5 時間で、通常の PCR サーマルサイクラーがあれば誰でもどこでもできる方法であるため、当院での緊急診断用として充分実用的であると考えられる。

(平成18年1月31日受理)

Rapid PCR Diagnosis for Cases Suspected of H5 Avian Influenza Virus Infection

Naoko ASAOKA, Yasuko TANAKA, Yutaka FUJII, Masanobu OHUCHI

It would be urgently necessary to diagnose H5 avian influenza infection if a patient would come to the Kawasaki Medical School Hospital and be suspected of having the virus. Although the currently used rapid diagnosis kits are useful in detecting influenza viruses A and B respectively, they can not identify the subtypes of the A virus. This research is aimed at establishing the conditions to identify H5 avian influenza virus using a conventional PCR (polymerase chain reaction) method. Eight specific primers to recognize the sequences common to H5 HA (hemagglutinin) genes were made and examined for their sensitivity and specificity. Two pairs of primers were proven to detect H5 HA gene specifically even with a small amount of virus corresponding to 3 plaque forming units. The identification of the H5 HA gene was accomplished within 5 hours. Since this method is available to every laboratory equipped with a conventional PCR thermal cycler, it is useful for the rapid diagnosis of H5 influenza in our hospital. (Accepted on January 31, 2006) *Kawasaki Igakkaishi* 31(4): 235-241, 2005

Key Words ① H5 ② Influenza ③ Diagnosis ④ Bird ⑤ HA

はじめに

2003年に東アジアを中心に高病原性鳥インフルエンザウイルス A/H5N1 が家禽の間で大流行し、2004年にはわが国でも H5N1 ウイルスによる家禽の大量死が発生した。その後、H5N1 ウイルスの汚染地域は拡大の一途をたどり2006年1月現在では、東南アジアのみならず、カスピ海沿岸地帯を越えてトルコにまで感染が広がっている。この間、斃死または殺処分された家禽は1億羽を越え、それと並行して100名を越すヒトへの感染も確認され、その半数近くが死亡している。東南アジアでは H5N1 ウイルスは家禽のみならず野生の鳥類にまで広がっており、すでに生態学的に野生の鳥類間に定着してしまった様相を呈している。従って今後、東南アジアからの帰国者で鳥インフルエンザに感染した患者が同定されないまま川崎医科大学附属病院を来院することも十分に考えられ、そのような事態に対応できる準備を緊急に進める必要がある。従来のインフルエンザ迅速診断キットでは A 型と B 型の識別はできても、A 型の亜型である H5 かどうかは識別不可能である。また現在、県や国における H5 型の検査ルートもあるが、確定診断までに1~2週間を要する。これでは本院に H5 鳥インフルエンザ感染が疑われる患者が来院した場合に対応ができないため、当面、自前の検査体制が必要とされる。本研究は、通常の PCR サーマルサイクラーさえあれば誰でもどこでも H5 型鳥インフルエンザウイルスが簡単に同定できるような方法を樹立するためになされたものである。

材料と方法

プライマーの設定

Gene Bank に登録されている高病原性鳥インフルエンザウイルス

A/chick/Hong Kong/728/97 (H5N1)¹⁾, A/chick/Macheng/2004 (H5N1)²⁾, A/chick/Pennsylvania/47/83 (H5N2)³⁾ の HA 遺伝子の塩基配列の共通部分 (ただしヒトの H1 あるいは H3 亜型にも共通する部分は除外) に対するプライマー 8 種類を作成した (Fig. 1)。

使用したインフルエンザウイルスおよび cDNA 鳥インフルエンザウイルス A/teal/Tottori/150/03 (H5N3) は鳥取大学農学部伊藤壽啓教授より分与された。A/H3 と B 型ウイルスは本院小児科寺田喜平助教授より提供された患者材料を用いて当教室で分離された A/Okayama/1/04 (H3N2) と B/Okayama/1/05 を用いた。A/USSR/90/77 (H1N1) ウイルスは名古屋私立大学の信澤枝里助教授より分与された。A/chick/Pennsylvania/1/83 (H5N2) の HA 遺伝子は著者らの作成した H5/Penn in pUC9 plasmid⁴⁾ を用いた。

ウイルス RNA の抽出

患者材料からのウイルス RNA 抽出を模するため、上記の希釈ウイルス液それぞれ100 μ l をヒト咽頭拭い液100 μ l に懸濁し、ISOGEN (ニッポンジーン社) を使ってウイルス RNA を抽出した。実験方法は ISOGEN に添付のプロトコールに従った。

プライマー名	位置	塩基配列
#1	164-180	5'-CAA GAC ATA CTG GAA A-3'(+)
#2	548-564	5'-CCA ACA ATA AAG AGG A-3'(+)
#3	614-630	5'-CAT CCT AAT GAT GCG G-3'(+)
#4	1391-1408	5'-TCA AAT GTC AAG AAC CT-3'(+)
#5r	563-547	5'-TCC TCT TTA TTG TTG G-3'(-)
#6r	629-613	5'-CCG CAT CAT TAG GAT G-3'(-)
#7r	1407-1390	5'-AGG TTC TTG ACA TTT GA-3'(-)
#8r	1658-1639	5'-TGA TTG CCA GTG CTA GGG AAC-3'(-)

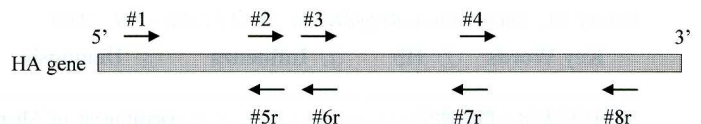


Fig. 1. H5 型鳥インフルエンザウイルス HA 遺伝子検出のためのプライマーの設定。

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) による cDNA の増幅

抽出したウイルス RNA を鋳型として、上記プライマーと Omniscript RT Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を合成した。実験方法は添付のプロトコールに従った。PCR 用の DNA ポリメラーゼとして PyroBest (タカラバイオ社) を使用した。

PCR 検出感度の検証

希釈した A/teal/Tottori/03 (H5N3) ウイルスを咽頭拭い液と懸濁して RNA 抽出を行い、検出可能なプライマーペアを用いて RT-PCR を行なった。

アガロースゲル電気泳動

それぞれの PCR product 8 μ l を Mupid + α 電気泳動槽 (アドバンス社) に置かれた 1% アガロースゲル (SeaKem GTG, Cambrex 社) を用いて 1/2 \times TBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer, ethidium bromide 0.5 μ g/ml 含む) 中で 100 V, 15 分泳動後、落射式蛍光読取装置 Epi-Light UV (アイシン・コスモス社) にて DNA バンドを検出した。DNA 分子量マーカーは λ -Eco T14 I digest (タカラバイオ社) を 500 ng/lane 用いた。

成 績

高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスをバイオセーフティレベル 3 の実験施設を持たない当大学内で使用するのは好ましくないため、類似の塩基配列を持ち、ヒトに病原性を示さないインフルエンザウイルス A/teal/Tottori/03 (H5N3) を検査材料に用いて H5 HA 遺伝子の検出を試みた。準備した 8 種類のプライマーはすべて高病原性 H5 ウイルスの HA 遺伝子に対応したものである。Figure 2

に示したように 7 つの組み合わせで RT-PCR を行い、6 つの組み合わせ (#1-#5r, #2-#7r, #2-#8r, #3-#7r, #3-#8r, #4-#8r) で H5 HA 遺伝子に特異的なバンドが検出された。

続いて RT-PCR の特異性を調べるために H3N2 および H1N1 亜型の A 型ウイルスと B 型ウイルスを用いて同様の実験を行なった。

Figure 3 に示したようにプライマー #1-5r, #2-8r, #3-8r の組み合わせでは H5 ウイルス特異的にバンドが検出された。しかしプライマー #2-7r, #3-7r, #4-8r の組み合わせでは、予測される位置に H1 ウイルスでもバンドが検出されたため不適切とした。なおプライマー #3-8r の組み合わせでは、予測される位置とは異なるものの、H1 でもバンドが形成されるため、今後 H5 の検出用としては #1-#5r と #2-#8r の 2 ペアのプライマーを使うこととした。

高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスは大きく分けて北米型とアジア型の 2 つの系統がある。上記 2 つのプライマーペアはアジア型の HA 遺伝子については特異的に検出できることが分かったが、系統の違う北米型の遺伝子も検出できるかどうかを調べた。北米型の高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスの入手は難しい

Primer pair

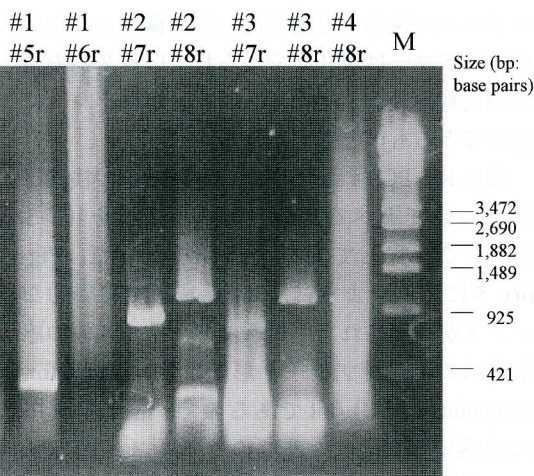


Fig. 2. A/teal/Tottori/150/03 (H5N3) ウイルスを使った H5 HA 遺伝子の検出。M : DNA MW Standard Marker λ -Eco T14 I digest.

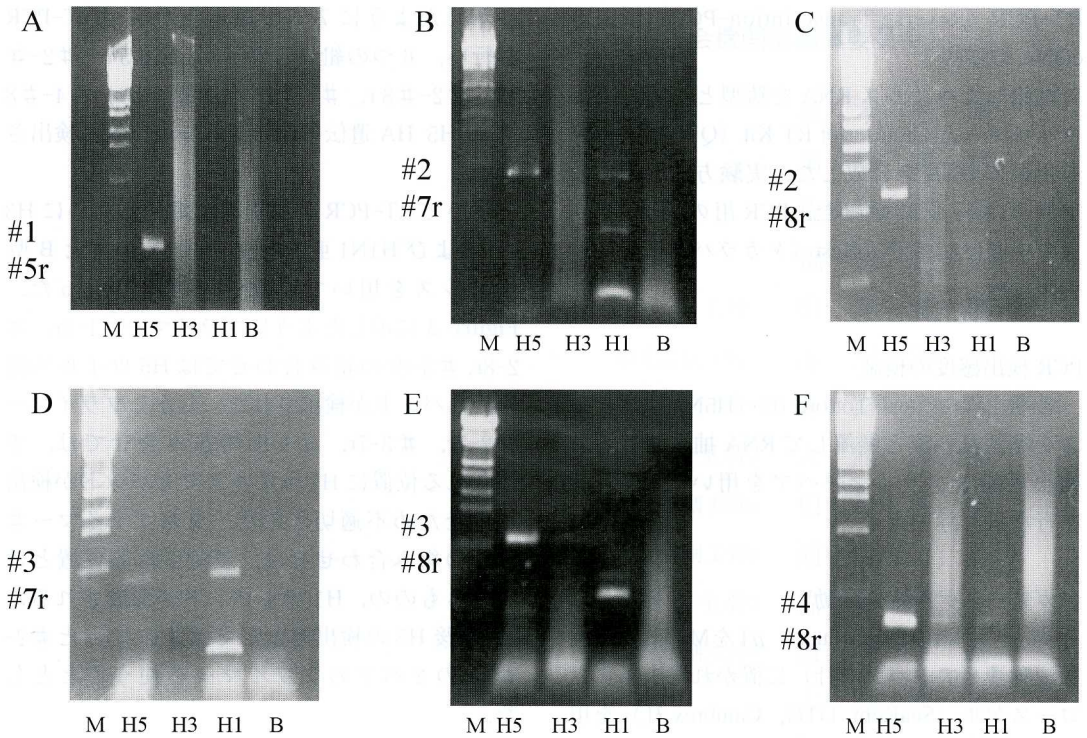


Fig. 3. H5 HA 遺伝子検出 RT-PCR 法の特異性の検証. M : Marker, H5 : A/teal/Tottori/150/03 (H5N3), H3 : A/Okayama/1/04 (H3N2), H1 : A/USSR/90/77 (H1N1), B : B/Okayama/1/05

のみならず、本学内の施設で扱うには不適切であるため、代用手段としてベクターに組み込まれた H5 HA の cDNA を検査材料として実験を行った。Figure 4 に示したように、#1-5r と #2-8r の 2 ペアのプライマーで北米型 H5N2 ウイルスの検出も可能であった。従ってこれらのプライマーは現在まで知られている 2 つの系統の高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスに適用できるものと考えられる。

次に RT-PCR による H5 HA 遺伝子の検出感度について調べるため、ウイルス液を 10^{-1} ~ 10^{-4} まで希釈して同様の操作を行った。Figure 5 に示したように、 10^{-2} 希釈まで特異的なバンドが検出された。希釈前のウイルス液の感染価は 3.0×10^3 プラーク形成単位 (plaque forming units : PFU)/ml であるので、検査材料中には感染価にして 3 PFU のウイルスが存在すれば検出同定が可能であることになる。

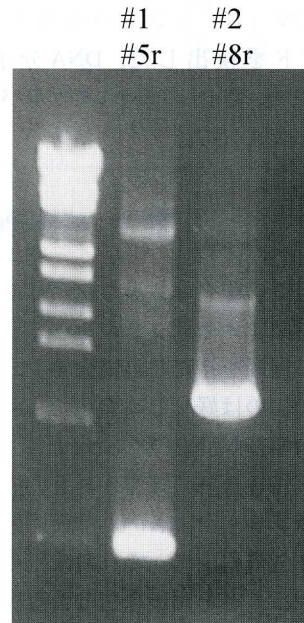


Fig. 4. インフルエンザ A/chick/Pennsylvania/1/83 (H3N2) HA 遺伝子の PCR 法による検出. 検体として HA cDNA in pUC9 を使用.

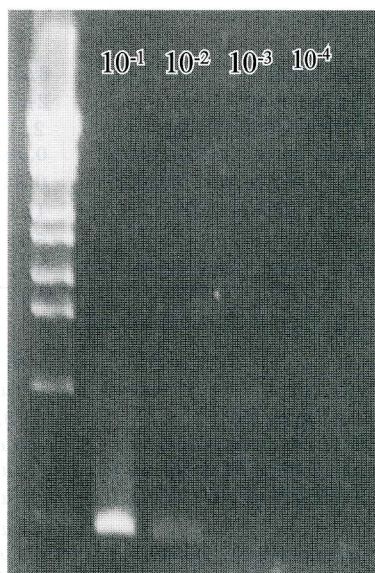


Fig. 5. H5型鳥インフルエンザウイルス検出RT-PCR法の感度の検定. プライマーペアとして#1と#5rを使用した.

考 察

H5鳥インフルエンザの迅速診断は極めて重要かつ緊急の課題であり、近い将来、現行のインフルエンザ迅速診断キット同様、抗原抗体法を用いて30分以内に判定可能なキットが実用化されると考えられる。しかし、東南アジアを中心にヒトへの感染死亡者が続出している現状においては、迅速診断キットが実用化・市販されるまで手をこまねいて静観している事は許されない。Munchら⁵⁾はH5鳥インフルエンザウイルスをRT-PCRで検出するためのプライマーを報告しているが、彼らのプライマーは1996年までの分離株をもとにしたもので、現在ヒトに感染を起しているH5ウイルスの塩基配列とは異なる部分がある⁶⁾。WHO⁷⁾と国立感染症研究所も既にそれぞれH5 HA遺伝子検出用のプライマーを公開しているが、WHOが推奨しているプライマー(H5-1, H5-3)は非特異反応が多く、また茨城県で分離されたH5N2型ウイルスには反応しないなどの問題を抱えている。最近、国立感染症研究所ではこの問題を解決す

べく検出方法の全面的な見直しを行い、新しいプライマーと反応条件を公開している⁸⁾。

著者らは独自に設計したプライマーを用いて、実際の検査を模してH5 HA遺伝子の検出実験を行ない、2つのプライマーペア(#1-#5r, #2-#8r)が検出同定に有効であることを見出した。検出感度も、これまで報告されているA型インフルエンザウイルスのRT-PCRによる検出感度4 CEID₅₀ (50% chick embryo infectious dose) 前後⁹⁾に匹敵するレベルであった。高病原性H5鳥インフルエンザウイルスそのものを扱うことは実験施設の関係上できなかったが、用いたプライマーは高病原性H5ウイルスに共通する部分に対して作られたものであり、また1983年分離のH5N2型ウイルスのHAにも有効であることから、充分実際の使用に堪えるものと考えられる。本方法では2ペアのプライマーを併用することで、特異性を高めることが可能であり、またいずれのプライマーもヒトから分離された最新の鳥型インフルエンザウイルスであるA/Hanoi/30408/2005(H5N1)のHA遺伝子⁶⁾にも、いまだ100%のホモロジーを保持している。

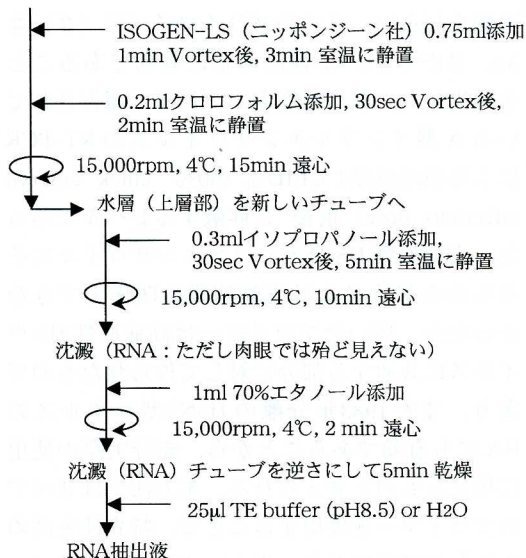
最後にH5 HA遺伝子検出のための推奨プロトコールをFigure 6に記した。RNAを溶解するための水あるいはbufferは予めDEPC(ジエチルピロカーボネート)処理によってRNaseフリーにしたものを使用するとともに実験中はゴム手袋の着用が必要である。鼻腔あるいは咽頭拭い液中のウイルスはISOGEN添加によって直ちに不活化するため以降の操作は通常の実験室で遂行可能である。本研究では酵素としてOmuniscript RTとPyroBestを用いたが、他社のRTや通常のTaqポリメラーゼでも差支えないと思われる。このプロトコールに準じて、実際の患者検体からH3特異的プライマーを用いてH3ウイルスの検出を試みたところ、検体搬入から同定までに要した時間は平均4時間40分であった。

以上の成績から本方法はH5鳥型インフルエンザ迅速診断キットが開発されるまでの応急措

1. RNA抽出

滅菌綿棒を用いて鼻腔又は咽頭拭い液を1-2mlの培地（何でも良い）に採取，必要に応じ冷蔵保存

その0.25mlをマイクロ遠心チューブへ



2. RT-PCR

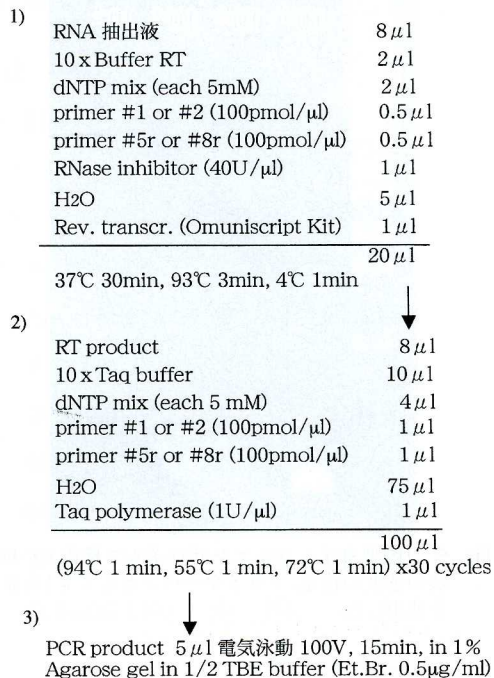


Fig. 6. H5 型鳥インフルエンザウイルス HA 検出推奨プロトコール.

置として充分有用であると考えられる。

遂行可能な RT-PCR 緊急診断法が提案された。

結 語

2 ペアのプライマー (#1-#5r と #2-#8r) が H5 型鳥インフルエンザウイルスの HA 遺伝子検出に有効であることが示され, 川崎医科大学附属病院あるいは市中病院の通常の検査室で

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費 (15590425) および川崎医科大学プロジェクト研究費 (16-402M, 17-405M) の補助を受けてなされた。

文 献

- 1) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed AF046099>
- 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed AY830774>
- 3) Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG: Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology* 139: 303-316, 1984
- 4) Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R, et al. Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/chick/Penn/83 (H5N2). *Virology* 168: 274-280, 1989
- 5) Munch M, Nielsen LP, Handberg KL, et al. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146: 87-97, 2001
- 6) <http://www.flu.lanl.gov/search/index.html> ISDN129400
- 7) http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html

- 8) http://idsc.nih.go.jp/disease/avian_influenza/index.html
- 9) Hindiyeh M, Levy V, Azar R, et al. Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001–2002 influenza season in Israel. *J Clin Microbiol* 43 : 589–595, 2005