

超高速 RT-PCR による迅速亜型診断系の確立

東京都臨床医学総合研究所 分子医療プロジェクト：

○櫻井 陽、南波玲子、野村奈美子、内藤暁宏、森實芳仁、芝崎 太

都立駒込病院・臨床検査科：大林民典、後藤 薫

東京都健康安全研究センター・微生物部：新開敬行、長谷川道弥、保坂三継、甲斐明美

1 はじめに

インフルエンザはインフルエンザウイルスによって引き起こされる呼吸器疾患である。症状としては発熱、頭痛、咳、鼻汁であるが、一般的な風邪様症状と比較すると全身性の症状が強く、高熱を発することが特徴である。

原因となるインフルエンザウイルスはその抗原性から A,B,C 型の三種類に大別されるが、A 型は世界的大流行（パンデミック）を引き起こすため厳密な監視が必要である。

インフルエンザウイルスのパンデミックは不連続変異と呼ばれる現象によって引き起こされる。これは二種類の別個のインフルエンザウイルスが同時に一つの細胞へと感染することで二つのインフルエンザウイルスの遺伝子が「シャッフル」され、抗原的に大きな変異を遂げることである。抗原性が劇的に変異したウイルスに対してその時の人類は抗体を有していないため、変異ウイルスの発生はパンデミックへと移行することになる。

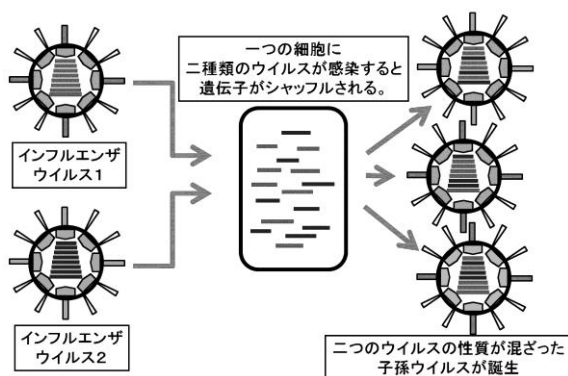


図1 インフルエンザウイルスの遺伝子再集合

人類史上で最も多くの犠牲者を出したインフルエンザウイルスのパンデミックは、1918年のスペイン風邪である。約6億人が感染し（その

時代の総人口は約20億人）、3千万人から6千万人が死亡したとされている。日本でも総人口5500万人中39万から48万人が死亡したと報告されている。スペイン風邪のウイルスの病原性は致死率1から5%程度にすぎないが、このレベルのインフルエンザウイルスがパンデミックを引き起こすと甚大な被害へと発展してしまうことが分かる。

2009年春に北米より発生したブタ由来新型インフルエンザウイルス（Swine-origin influenza virus：S-OIV, A/H1N1pdm）は瞬く間に世界中へと拡散し1968年の香港風邪以来のパンデミックを引き起こした。幸いなことにこのウイルスは比較的病原性が低く、全世界で約1万8千人程度の死者で一旦終息を迎えた。低病原性であるにもかかわらず、決して侮れない数の犠牲者が出てしまったことになる。人類にとってパンデミックは未だ大きな脅威であることが分かる。

最大の問題と考えられているのは高病原性トリインフルエンザウイルス（High-Pathogenic Avian Influenza virus: HPAI）である。1997年香港ではHPAI H5N1亜型に感染した家禽に触れた人間にもそのウイルスが感染し、感染者18人中6人が死亡するという事件が発生した。それまではトリのインフルエンザウイルスはブタなどを介さない限り直接ヒトに感染しないというのが定説であった。従ってトリのインフルエンザウイルスが直接ヒトに感染した初めての報告となる。2003年以降にはこのHPAIはアジア諸国の野鳥に蔓延し、現在では世界中に拡散している。感染した野鳥や家禽に触れて感染した患者も後を絶たず、2011年1月13日現在で517人の感染者が報告され、その6割の約306人が死亡してい

る。幸運なことに、現在この HPAI はトリからヒトへの感染は起こっても、ヒトからヒトへの感染は基本的には起こらない。従って、現状ではこのウイルスがヒトで大流行を巻き起こすことはない。しかし、他のヒトのインフルエンザウイルスとの遺伝子再集合が発生し、この HPAI がヒト-ヒト間での感染性を獲得しパンデミックを引き起こすことには十分警戒する必要がある。最大の被害を巻き起こしたスペイン風邪でさえ数%の致死率にすぎないわけであるから、致死率が 60%にも達する HPAI がパンデミックを引き押しと未曾有の大被害になりうる。これらのことから、パンデミックが起こる前に対策を講じておくことが、世界的に重要なことであると考えられている。

このようなパンデミック対策としては色々な視点があるが、本研究では迅速な診断系の確立による貢献を目的としている。パンデミック発生時に迅速に感染者を識別することによって、国内感染者の拡大を遅らせることができる。このことは政治的・医療的な準備期間の長さに直結するため非常に重要な要素である。2009 年のパンデミックではアメリカの都市部で患者が急増した結果 ICU の数が足りなくなり助かるべき命が多く失われた。日本でもパンデミックの際に同様の事態に陥る可能性は高く、患者の増殖を緩やかにすることは人命救助に即決しうる。また現状の抗インフルエンザウイルス剤は感染早期に投薬することで最大の効果を発揮するものであるから、迅速な診断系の確立はこの観点からも非常に重要な項目といえる。本研究では企業と共同で開発した超高速リアルタイム PCR 装置を用いて 1 反応 15 分以内の診断法を確立した。

2 方法・対象

本研究で用いた超高速リアルタイム PCR 装置は、従来 1 反応に 2 時間は必要なリアルタイム PCR を 10 から 15 分以内に終わるよう改良されたシステムである。このシステムの特徴は CD 型の薄いサンプルケースとこれを上下から押さえる三分割されたヒートブロックにある。CD は 3

つのエリアに分けられ、一つのエリアに 4 つのサンプル注入用の穴が開いている。サンプルは酵素等と混合されたのち、シールによって封入される。サンプルの封入された CD はヒートブロックに挟まれて回転することになる(図)。このシステムが高速に反応を終えることができるのは、二つ理由がある。第一に、サンプルが薄く平たいサンプルケースに封入されているため、迅速にサンプルの温度変化がおこること。第二に、それぞれの熱源が PCR 反応のそれぞれのステップに対応した温度で準備されているため、熱源の温度変化に時間を要しないことである。従って、Denature, Annealing, Extension の各段階が数秒で十分となる。RT-PCR 機には蛍光検出機が装着されており、この速度で PCR 反応を進めながら、蛍光強度を測定可能である。これらの結果、劇的に速い速度での RT-PCR が可能になった。

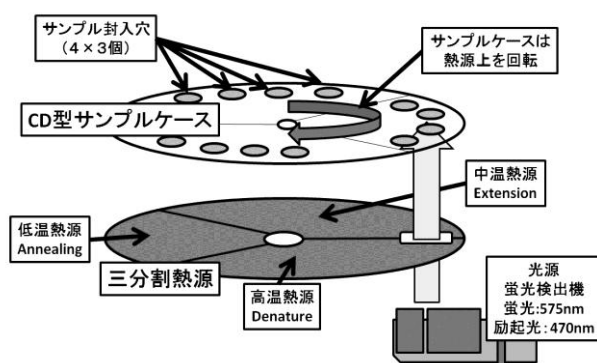


図2 超高速リアルタイム PCR の模式図

標的遺伝子は以下の通り。1) A 型 M1 遺伝子 (A 型特異的) 2) B 型 M1 遺伝子 (B 型特異的) 3) A/H1N1pdm HA 遺伝子 (新型特異的) 4) トリインフルエンザウイルス H5 亜型 HA 遺伝子 (H5 亜型特異的)

これらの遺伝子に対してのプライマーはそれぞれに対してデータベース上の 200 株以上の配列を比較しほとんど変異の入らない領域を選択し、かつこのシステム上で問題なく機能するものを選択した。

スタンダードとしては *in vitro* の合成 RNA と実際のウイルスから抽出した RNA を用いた。合

成 RNA はウイルスの対応遺伝子を T7 プロモーターを有するベクターに組み込み、T7RNA ポリメラーゼを用いて合成を行った。ウイルスは MDCK 細胞で培養し、プラークアッセイ法でウイルス力価を測定した。ウイルス RNA は QIAamp® viral RNA mini kit (QIAGEN) によって抽出した。

臨床検体は、都立駒込病院の感染外来へ来た患者からの咽頭ぬぐい液を分与いただいた。また臨床分離株は、東京都健康安全研究センターのストックから分与いただいた。

3 結果

まず、A 型を特異的に認識するプライマーとして、A 型 M1 遺伝子を標的とするプライマーを設計し検討した。最終決定したプライマーは 15 分という短い反応時間であるにもかかわらず、スタンダード RNA レベルで 10^0 コピーまで、ウイルス力価で 10^{-1} pfu (=1 から 10 コピー) までの分離が可能であった (図 3, 4)

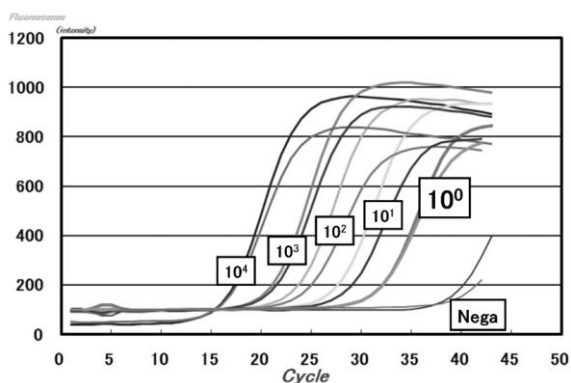


図 3 A 型 MP 認識プライマーによる合成 RNA 認識

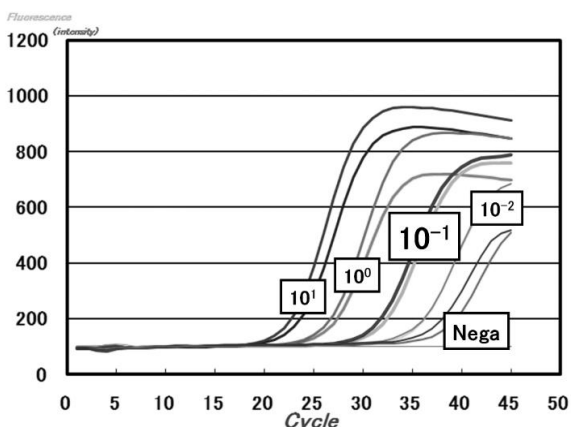


図 4 A 型 MP 認識プライマーによる A/WSN 株認識

同様に 2009 年新型ウイルス特異的なプライマーセットを設計し、最終決定した。こちらも同等の反応時間で、同等の感度である、スタンダード RNA レベルで 10^0 コピーまで、ウイルス力価で 10^{-1} pfu での検出が可能だった (図 5, 6)

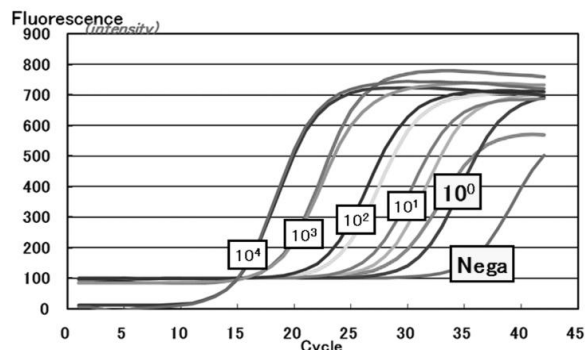


図 5 新型 HA 認識プライマーによる合成 RNA 認識

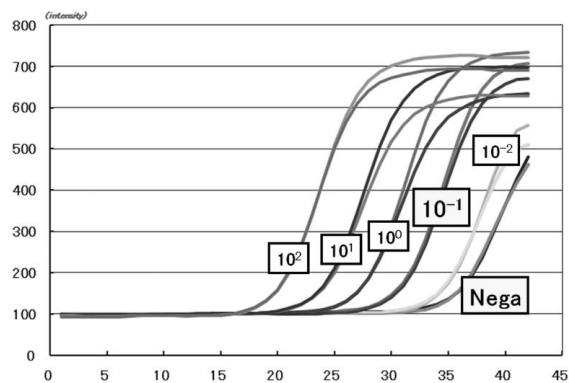


図 6 新型 HA 認識プライマーによる H1N1pdm 株認識

さらに B 型および H5 亜型ウイルス特異的なプライマーセットに関しても同等の結果が得られシステマ的には十分な感度が期待できることが示された。(図 7, 8, 9)

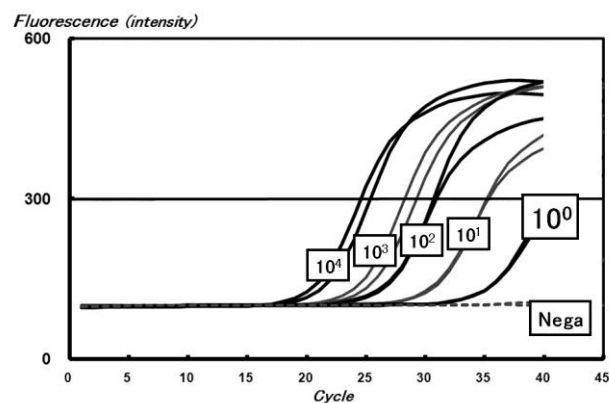


図 7 B 型 MP 認識プライマーによる合成 RNA 認識

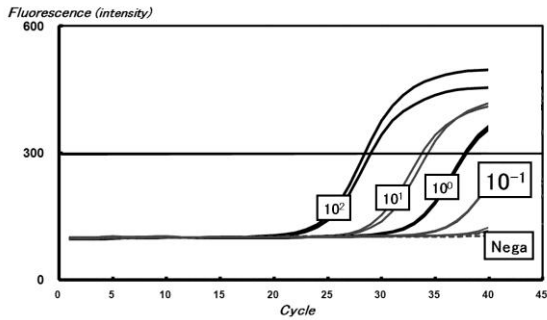


図8 B型MP認識プライマーによる08年B型株認識

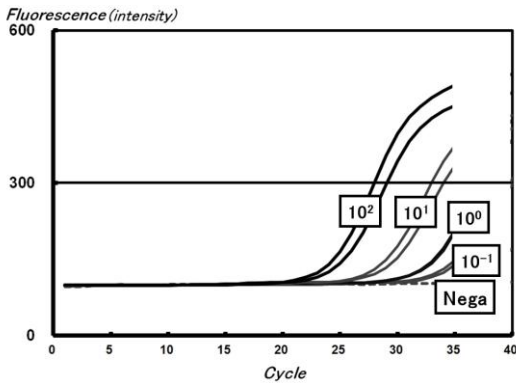


図9 H5亜型HA認識プライマーによるH5亜型株認識

続けて、このシステムが臨床検体レベルでも実用可能かどうかの検討を行った。駒込病院の発熱外来に来院した患者の咽頭ぬぐい液を用い、A型インフルエンザウイルス遺伝子認識の検討を行った。また比較対象として、簡易法として用いられているイムノクロマト法 (Espline®) とWHOの公定法によるリアルタイムPCRを行った。一般的な測定結果を図10に、イムノクロマト法及び公定法と結果を比較したものを図11に示した。カットオフとしては 10^1 コピーに設定しそれを上回るものを陽性と判断した。

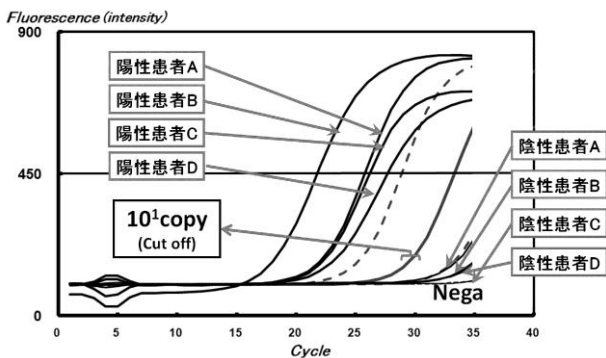


図10 臨床検体からのウイルス検出

10^1 コピーをカットオフにすることにより、陽性患者と陰性患者を明確に分けることが可能であった。(図9) またその結果はイムノクロマト法および公定法とほぼ完全に一致した。図9における29番検体は公定法で5.41コピー、超高速法で二度の検証で 10^1 コピーのカットオフの前後となった。ほぼ同一の結果と判断できる。

	イムノクロマト	超高速1回目	超高速2回目	公定法
1	A	+	+	+
2	A	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	A	+	+	+
8	A	+	+	+
9	A	+	+	+
10	不明	+	+	+
11	A	+	+	+
12	-	-	-	-
13	A	+	+	+
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	不明	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	A	+	+	+
20	A	+	+	+
21	A	+	+	+
22	A	+	+	+
23	A	+	+	+
24	A	+	+	+
25	-	-	-	-
26	A	+	+	+
27	A	+	+	+
28	A	+	+	+
29	A	+	-	- (5.41 Copy)

図11 イムノクロマト、超高速、公定法の比較

更に東京都健康安全研究センターにより2006年から2010年までのインフルエンザウイルス株79種類を分与していただき測定したところ、97.5%の認識率を示した。さらに交叉性は全く見られなかった。このことより幅広いインフルエンザウイルス株にも対応可能であることが示された。

4 考察

本システムは、1反応15分という迅速な診断系であるにもかかわらず、従来の約2時間を必要とするリアルタイムPCR法とほぼ同等の感度でウイルスRNAを検出できることが示された。これはスタンダードのRNAや実験室株のインフルエンザウイルスを用いた検討で、 10^0 コピーや 10^{-1} pfuという感度を得られたことから実証できる。この精度は臨床検体の診断であっても遜色なく、従来

の WHO 公定法のリアルタイム PCR と同様の結果を得ることが可能であった。従って、速度的な優位性のみが生かされると思われる。

速度的に競合になりうるのはイムノクロマト法である。この抗原抗体反応を基本としたシステムは、迅速性が高く 15 分で診断が終了する。しかしながら、この方法は感度が低く 10^4 pfu/ml までの認識能力しかない。本システムの 10^1 pfu という感度を考えると、比較対象にはならない。加えて、イムノクロマト法は抗原抗体反応であり、ウイルスの抗原性の変化に対して迅速に対応できない。これは対応する抗体を手に入れる作業のみで数カ月が必要であるからである。一方、本システムは DNA 合成によりプライマーを設計するだけであるから、数日で合成可能である。従って、想定外の亜型が流行した場合でも迅速に対応可能である。実際、2009 年のパンデミック発生時も、リアルタイム PCR 法はひと月もたずに検出用プライマーの発表が行われていたが、対応したイムノクロマト法は一年以上後であった。

本システムはこの機器の使用が想定される、病院、保健所、空港といった迅速に疑わしい患者を診断したいという状況では十分な機能を備えており、十分な活躍が期待できる。また、インフルエンザ同様に拡散性が強く患者の迅速治療・隔離が要求される病原体には十分応用ができると思われる。

5 まとめ

本研究は今後起こる可能性がある高病原性インフルエンザウイルスによるパンデミック対策として、迅速な診断システムを確立した。15 分以内に亜型診断が可能であるというメリットはパンデミックのような患者の早期発見・隔離・治療といった要素が重要となってくる疾病において圧倒的に有効である。これらの要素は、政治的・医療的な対策を行うための猶予期間に直結するため、パンデミック対策の生命線といっても過言ではない。従って、本研究はパンデミック対策として非常に重要な位置を占める戦略を担うことが期待される。

6 引用・参考文献

- 1) FP.Wright, G.Neumann, Y.Kawaoka: *Field's Virology 5th edition* 1691 (2006)
- 2) RG.Webster: *Arch Virol Suppl.* 13 105 (1997)
- 3) D.Kobasa, A.Takada, K.Shinya, M.Hatta, P.Halfmann, S.Theriault, H.Suzuki, H.Nishimura, K.Mitamura, N.Sugaya, T.Usui, T.Murata, Y.Maeda, S.Watanabe, M.Suresh, T.Suzuki, Y.Suzuki, H.Feldmann, Y.Kawaoka: *Nature.* 7;431(7009) 703 (2004).
- 4) Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team: *N Engl J Med* 18:360(25):2605 (2009)
- 5) WHO: *Pandemic (H1N1) 2009 update 104* 14 May (2010), http://www.who.int/csr/don/2010_06_11/en/index.html [accessed 16 June 2010]
- 6) CDC: *Morb Mortal Wkly Rep.* 19;46 (50): 1204 (1997)
- 7) WHO: *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO:* 6 May (2010) http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_06_08/en/index.html, [accessed 16 June 2010]
- 8) RG.Webster, EA.Govorkova: *N Engl J Med* 355 2174 (2006)