

8. 既存プライマーを用いたリアルタイムPCRによる

A型インフルエンザウイルス遺伝子検出法の検討

家畜保健衛生所 業務第一課 恵美須 裕子

要約

A型インフルエンザウイルス遺伝子検出法において、リアルタイムPCR法と従来のPCR法とで検出感度を比較し、さらにリアルタイムPCR法における反応条件の検討を行った。核内タンパク質(NP)遺伝子に対する既存のプライマー¹⁾を用いて実施した結果、リアルタイムPCR法では従来のPCR法よりも10倍高い検出感度を示した。また、アニーリング温度では48°C、プライマー最終濃度では1.0μMで高い反応効率を示した。

緒言

近年、高病原性鳥インフルエンザは国内外で発生が報告されており、畜産サイドで、また新型インフルエンザ発生という点から公衆衛生サイドにおいても最大の関心事項となっている。家畜保健衛生所としては発生防止に努めるとともに、発生時の迅速な検査・防疫措置の実施が求められる。「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」²⁾が平成20年2月21日に一部改正され、異常家さん等発見時の検査においてA型インフルエンザウイルス遺伝子検出法が新たに加えられた。迅速で高感度の遺伝子検出方法の一つとしてPCR法は様々な検査において汎用化されてきているが、昨今導入が進むリアルタイムPCRを用いることでさらに感度がよく、迅速な検査が可能になると考えられる。

本県ではA型インフルエンザウイルスNP遺伝子に対するプライマーを用いたPCR法による補助的診断は実施しているが、今年度リアルタイムPCR導入に伴いこれを用いたA型インフルエンザウイルス遺伝子検出法の有用性の検討の一つとして従来のPCR法と検出感度を比較、また、リアルタイムPCRでの反応条件についても若干の検討を行った。

材料及び方法

1. リアルタイムPCR法とPCR法との検出感度の比較

1) 被検材料からの核酸抽出と逆転写反応

被検材料であるA型インフルエンザウイルスとしては、本県で分離された馬インフルエンザウイルス(H3亜型)を用いた。フェノール・クロロホルム法によりRNAを抽出・逆転写反応後、反応産物を 10^0 から 10^5 倍まで段階希釈し、PCR反応の鋳型DNAとした。

2) PCR反応

リアルタイムPCR法にはタカラバイオ株式会社のSYBR® Green Iを用いたリアルタイムPCR用試薬、PCR法には同社のPCR用試薬を用いた。使用プライマーと反応条件は表1、2のとおりである。プライマーの最終濃度は0.4μMで使用した。リアルタイム法ではPCR反応後に融解曲線分析を行い非特異反応の有無を確認・判定、PCR法では1.5%アガロースゲルによる電気泳動を実施し、判定した。

これ以降の各PCR反応では鋳型DNAを加えないものを陰性対照とした。

表1 使用プライマー

NP1200f	: CAG RTA CTG GGC HAT AAG RAC (注: R=A or G, H=A or T or C)
NP1529r	: GCA TTG TCT CCG AAG AAA TAA G

表2 反応条件

95 °C	10 sec.	} 40 cycles
95 °C	10 sec.	
55 °C	20 sec.	
72 °C	30 sec.	

2. リアルタイム PCR 法における反応条件の検討

1) アニール温度の検討

上記1で使用した鋳型 DNA の 10 倍希釈したものを使用。表2の条件を元に、プライマー最終濃度は $0.4 \mu\text{M}$ でアニール温度を 48°C 、 50°C 、 53°C 、 55°C 、 57°C で PCR 反応を実施、各反応の Ct 値により反応性を比較した。

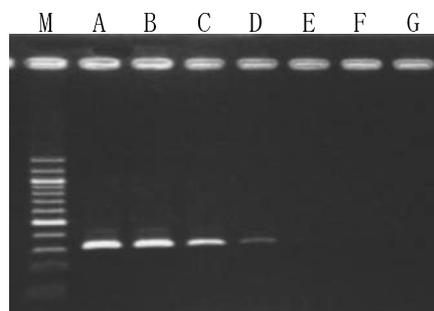
2) プライマー濃度の検討

上記1で使用した鋳型 DNA の 10 倍希釈したものを使用。表2の条件を元に、アニール温度を 48°C 、プライマー最終濃度を $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.8 \mu\text{M}$ 、 $1.0 \mu\text{M}$ として PCR 反応を実施、各反応の Ct 値により反応性を比較した。

結果

1. リアルタイム PCR 法と PCR 法との検出感度の比較

PCR 法とリアルタイム PCR 法の結果を図1、2に示した。PCR 法では 10^3 倍希釈まで検出可能であった。一方、リアルタイム PCR 法では 10^4 倍まで検出可能であった。なお、両方とも非特異反応、プライマーダイマーの生成は見られなかった。



レーン M: 100bp マーカー、A~F: $10^0 \sim 10^5$ 倍、G: 陰性対照

図1 PCR 法

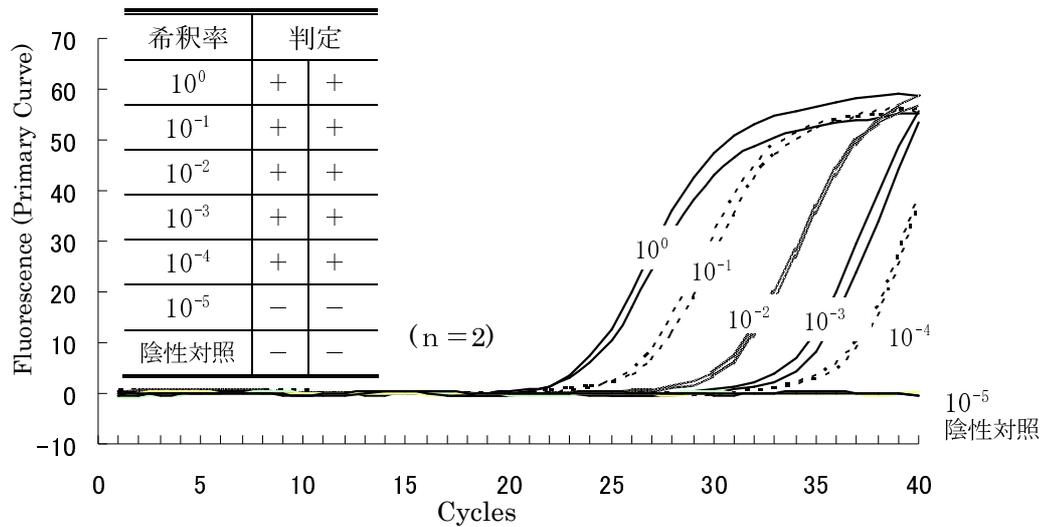


図2 リアルタイムPCR法

2. リアルタイムPCR法における反応条件の検討

1) アニーリング温度の検討

各温度における Ct 値の結果を図3に示した。48℃、50℃、53℃、55℃、57℃でそれぞれ Ct 値は 21.88、22.34、23.15、24.07、25.63 であった。初期鋳型 DNA が一定の場合、Ct 値が小さいほど反応効率がよいと考えられることから、今回実施した温度のなかでは48℃がもっとも反応効率がよかった。なお、どの温度においても非特異反応は見られなかった。

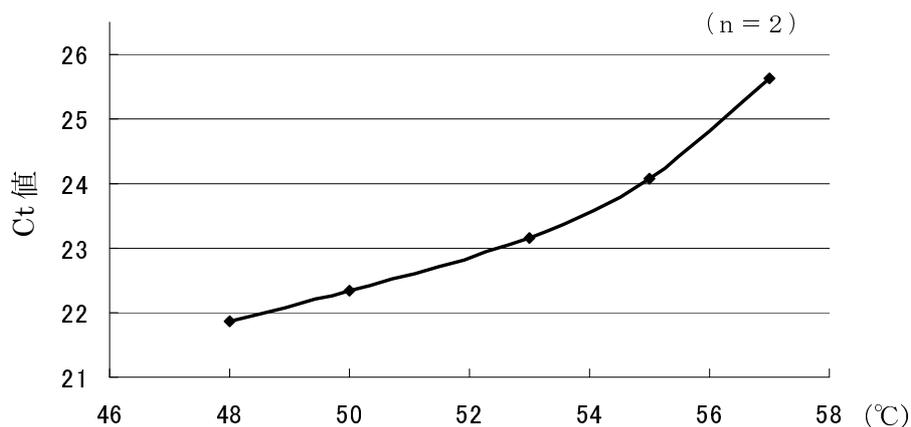


図3 アニーリング温度

2) プライマー濃度の検討

各濃度における Ct 値の結果を図4に示した。0.2 μM、0.4 μM、0.8 μM、1.0 μMで

それぞれ Ct 値は 24.56、22.71、21.04、20.86 であった。今回実施した濃度のなかでは 1.0 μ M がもっとも反応効率がよかった。なお、どの温度においても非特異反応は見られなかった。

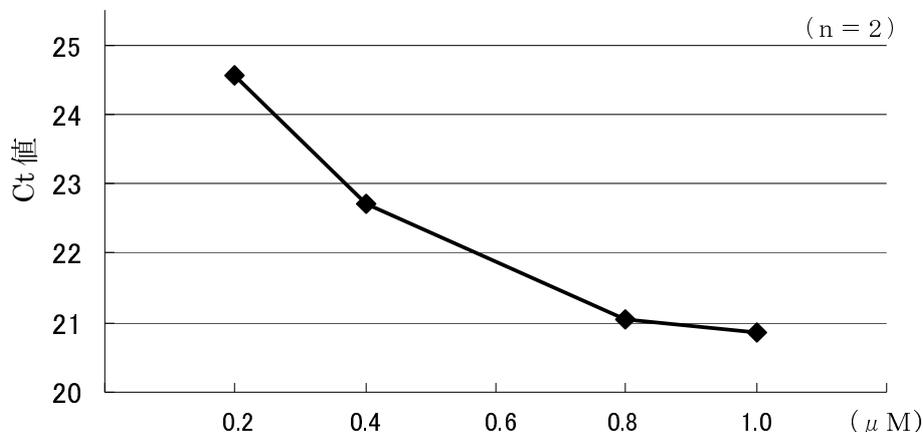


図4 プライマー濃度

考 察

A型インフルエンザウイルス遺伝子検出法としてリアルタイムPCRを用いた検査法が有用であるかを検討する一材料として、従来のPCR法と感度を比較した。この結果、従来よりも10倍高い感度を示した。PCR法では電気泳動像を肉眼により判定することで主観的要素が少なからず関与するが、リアルタイムPCR法では装置により客観的に測定・判定でき、感度が高いことから、より正確な検査が実施可能になると考えられる。また、電気泳動の行程が必要ないため、所要時間、手技ともに短縮され簡便さを増すことで、アーチファクトを最小限に抑えることができる。これらのことから、リアルタイムPCR法は高病原性鳥インフルエンザ等のより迅速で正確な検査を必要とされる際の補助的遺伝子検出法として有用である可能性が示された。

今回実施したSYBR® Green Iによるインターカレーター法は短所として非特異反応があるとされているが、使用したプライマーでは最終濃度1.0 μ Mといった高濃度においても非特異反応、プライマーダイマーの生成は確認されず、新たにプライマーを設計する必要もなく既存のプライマーで充分対応可能であると考えられた。今回試みた反応条件のなかでは、先述したとおりプライマー濃度1.0 μ M、アニーリング温度48°Cでの反応が最適であった。

今回はA型インフルエンザウイルスとして馬インフルエンザウイルスを用いたが、反応性等が鳥インフルエンザウイルスと異なることから、初動時に行う簡易検査やウイルス分離法との検出感度の比較は出来なかった。今後これらの検討やリアルタイムPCR法による検出感度と実際のウイルス排泄量との比較を実施していきたい。

参考文献

- 1) Lee M、 et al. *J Virol Methods* 97、 13-22 (2001)
- 2) 「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」(平成 16 年 11 月 18 日公表、最終変更：平成 20 年 2 月 21 日)