

## リアルタイム RT-PCR による ヒトメタニューモウイルス遺伝子の検出

水村 綾乃<sup>1</sup>、土井 妙子<sup>1</sup>、田中 俊光<sup>1</sup>、小林 圭子<sup>2</sup>、横井 一<sup>3</sup>

(1 環境保健研究所 健康科学課 2 現 保健所食品安全課 3 現 動物保護指導センター)

**要 旨** 重症呼吸器感染症に関与するウイルスの迅速かつ高感度な検査法を確立することを目的として、ヒトメタニューモウイルス (hMPV) 遺伝子を検出するためのリアルタイム RT-PCR 法について検討した。その結果、hMPV の F 遺伝子を標的としたリアルタイム RT-PCR 法の Nested PCR 法に対する検出感度は 60.7%、特異性は 97.6%であったが、遺伝子型 B1 に対する検出感度が低い傾向が示唆され、更なるプライマーと TaqMan プローブの改良が必要であると考えられた。

**Key Words** : ヒトメタニューモウイルス, リアルタイム RT-PCR, 重症呼吸器感染症

### 1. はじめに

重症呼吸器感染症 (svARI) に関与するウイルスとして、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、パラインフルエンザウイルス、ヒトライノウイルス及びヒトコロナウイルスなどが知られている。

hMPV は 2001 年に発見された呼吸器感染症ウイルスで、パラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科メタニューモウイルス属に分類されるマイナス一本鎖の RNA ウイルスである<sup>1)</sup>。hMPV の遺伝子型は、A と B の 2 つのグループに分けられ、さらにそれぞれ 2 つのサブグループに分類されている。臨床症状としては、上気道炎や下気道炎 (気管支炎及び肺炎) を引き起こし、特に乳幼児や高齢者において重症化する傾向が認められている<sup>2)</sup>。合併症としては、急性中耳炎、熱性けいれん、急性胃腸炎などが報告されている。流行時期は、3~6 月と春期に多いとされているが、通年で検出されるという報告もみられる。また、ある地区における優位な流行株が数年毎により異なるという報告がされている<sup>3)</sup>。

2011 年 1 月から 2013 年 8 月までの期間での千葉市における hMPV の検出状況及び流行状況は、春期に加え、秋期にも検出数が増加する傾向がみられ、また、シーズン毎に流行するサブグループが異なることや、

複数のサブグループが同時期に流行していた<sup>4)</sup>。

近年では、病院や高齢福祉施設において hMPV を原因とする呼吸器感染症の集団発生事例<sup>5)</sup>が報告されており、迅速な検査対応が求められている。

現在、hMPV の検出法としては、RT-PCR 法<sup>6)</sup>によりウイルス遺伝子を検出する検査法が用いられており、ウイルスの流行状況調査や集団感染事例におけるウイルス検出法としての主要な診断技術となっている。

しかしながら、RT-PCR 法による遺伝子検出は、電気泳動により PCR 産物を確認する必要があること、更に PCR 産物のシーケンス解析を必要とすることなどから、迅速性及び簡易性に欠ける一面が存在する。

そこで、本研究では svARI に関与するウイルスの検出法の開発を目的として、迅速性、高感度及び定量性を併せ持ったリアルタイム RT-PCR 法による hMPV 遺伝子検出法の構築について検討した。

### 2. 方法

リアルタイム RT-PCR 用プライマー及び TaqMan MGB プローブは、hMPV の F 遺伝子領域に設計した (表 1)。

リアルタイム RT-PCR 法の検量線作成に使用するコントロールプラスミドは、VeroE6 細胞により分離された hMPV 遺伝子型 A2 の培養上清を用い、F 遺伝子の

PCR産物をTAクローニングすることにより作製した。すなわち、PCR産物を TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen)を用いて pCR4-TOPO vector にサブクローニングし、その塩基配列を Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)を用いたダイレクトシーケンス法により確認した後、Plasmid Mini Kit (Qiagen)により精製した環状プラスミドを制限酵素 Spe I で切断して直鎖状プラスミドとした後、UV260nm の OD 値を測定し、コントロールプラスミドのコピー数を算出した。なお、今回、コントロールプラスミドの作製に用いた PCR 産物の塩基配列を BLAST サーチによって検索した結果、hMPV 遺伝子型 A2 の配列は GQ153651 と最も高い相同性を示した。

また、臨床検体における本法の有用性（検出感度と特異性）を検討するための材料として、2013年1月から2013年12月までの期間に上気道炎または下気道炎（気管支炎及び肺炎）を呈して千葉市内の医療機関を受診した患者から採取された 279 検体（咽頭ぬぐい液 48 検体、鼻汁 226 検体、鼻腔ぬぐい液 1 検体及びうがい液 4 検体）を使用した。これらの検体から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用してウイルス RNA を抽出し、Super Script III (Invitrogen) を用いた逆転写反応により cDNA を作製した。

リアルタイム RT-PCR 法は、1 tube あたり 25  $\mu$  L の反応量で実施した。20  $\mu$  L のリアルタイム PCR 反応液 (QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen)、Forward 及び Reverse プライマー（最終濃度各 0.4  $\mu$  M)、TaqMan MGB プローブ（最終濃度 0.1  $\mu$  M) 及び RNase-free 滅菌蒸留水を混合) に 5  $\mu$  L の cDNA 溶液を加えた後、ABI 7300 Real-time PCR system

(ABI) を使用して増幅反応を行った。反応条件は、95°C15分(DNA polymerase の活性化)を1サイクル、94°C15秒(熱変性)と56°C75秒(アニーリングと伸長反応)を45サイクルとした。また、コントロールプラスミドについては、TE buffer にて  $2.5 \times 10^7$  copies/5  $\mu$  L から  $2.5 \times 10^1$  copies/5  $\mu$  L までの10倍段階希釈系列を作製し、cDNA 溶液と同様に増幅反応を行った。反応終了後に ABI Sequence Detection System Software ver. 1.4 を使用して各希釈系列におけるコントロールプラスミドの増幅反応から得られたデータに基づき検量線を作成し、ウイルス遺伝子(cDNA)の定量解析を実施した。

リアルタイム RT-PCR 法との検出感度を比較するため、病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)に準拠し、hMPV の F 遺伝子(表1)に対する Conventional RT-PCR 法及び Nested PCR 法を実施した。Nested PCR により得られた増幅産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、近隣結合法により系統樹解析を行った。なお、解析領域は 317 bp として、遺伝子型を決定した。

### 3. 結果

hMPV 遺伝子型 A2 のコントロールプラスミドの10倍段階希釈系列について、リアルタイム RT-PCR 法による増幅曲線および検量線の検討を実施した結果、 $2.5 \times 10^1$  copies/tube から  $2.5 \times 10^7$  copies/tube の範囲内で、PCR サイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X 軸にコントロールプラスミドのコピー数(対数表示)、Y 軸に PCR サイクル数(Ct 値)をプロットした場合の検量線は、 $R^2=0.999$ 、Slope: -3.33 で hMPV 遺伝子型 A2 において、良好な直線性を示し

表1 hMPV のリアルタイム RT-PCR, Conventional RT-PCR 及び Nested PCR のプライマーと TaqMan MGB プローブの配列

Assay	Primer or probe	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Polarity <sup>b</sup>	Location <sup>c</sup>
Real-time RT-PCR	hMPV-6S	AGY TTCAGTCARTTCAACAGAAG	+	3625-3647
	hMPV-4As	CCTGCWGATGTYGGCATGT	-	3767-3749
	hMPV-TPf	FAM- AACACCAGCAATATC ·MGB	+	3690-3704
Conventional RT-PCR	hMPV-1f	CTTTGGACTTAATGACAGATG	+	3704-3724
	hMPV-1r	GTCTTCCTGTGCTAACTTTG	-	4153-4134
Nested PCR	hMPV-2f	CATGCCGACCTCTGCAGGAC	+	3750-3769
	hMPV-2r	ATGTTGCAYTCYTTGATTG	-	4106-4087

<sup>a</sup> Mix bases in degenerated primers and probe are as follows: Y, C or T; R, G or A

<sup>b</sup> +, sense; -, antisense

<sup>c</sup> Location is relative to the genome of hMPV genotype A1 strain NL/1/00(accession number AF371337)

た (図 1)。このことから、本法による hMPV の検出と定量が可能であることが明らかとなり、検出感度は  $2.5 \times 10^1$  copies/tube であると推定された。

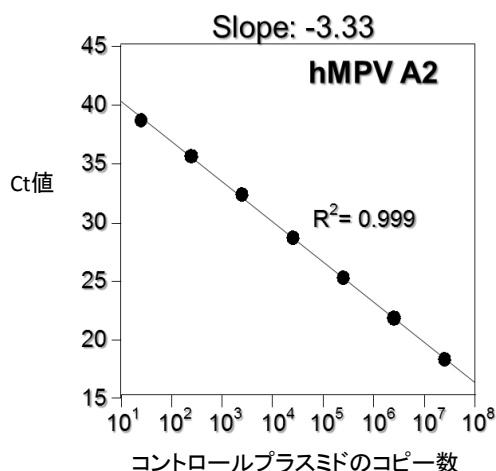


図 1 hMPV 遺伝子型 A2 のコントロールプラスミド 10 倍段階希釈系列のリアルタイム RT-PCR 法による検量線

臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法と Conventional RT-PCR 法、または Nested PCR 法との検出感度と特異性の検討の結果、Conventional RT-PCR 法に対するリアルタイム RT-PCR 法の検出感度は 43.8%、特異性は 94.0%であった (表 2)。Nested PCR 法に対する検出感度は 60.7%、特異性は 97.6%であった (表 2)。また、Nested PCR 法で陽性となり、リアルタイム RT-PCR 法で陰性となった 11 検体の型別は、遺伝子型 B1 が 9 検体、遺伝子型 B2 が 2 検体であった (表 3)。

さらに、他の呼吸器ウイルス (インフルエンザウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、コクサッキー A 群ウイルス、コクサッキー B 群ウイルス、エンテロウイルス 71、エコーウイルス、ライノウイルス) に対する本法の交差反応について確認した結果、遺伝子の増幅は認められなかった。

#### 4. 考察

本研究で検討した hMPV のリアルタイム RT-PCR 法は、F 遺伝子領域を標的配列として選択し、遺伝子型 A1, A2, B1, B2 に共通のプライマー及び TaqMan MGB プローブをそれぞれ設計した。

その結果、 $2.5 \times 10^1$  copies/tube 以上の遺伝子が存在すれば hMPV 遺伝子の検出と定量が可能であり、他の呼吸器ウイルスとの交差反応もなく高い特異性を有することが確認された。しかしながら、hMPV のリアルタイム RT-PCR 法の検出感度は、Nested PCR 法よりも低いものであった。特に遺伝子型 B1 に対する検出感度が低い傾向が今回の結果から示唆されたことから、更なるプライマーと TaqMan プローブの改良が必要であると考えられた。

今回開発した hMPV のリアルタイム RT-PCR 法は、従来の Conventional RT-PCR 法や Nested PCR 法と比較して、PCR 反応後の電気泳動や PCR 産物のシーケンス解析等による確認が不要であることから、簡易かつ迅速に hMPV 遺伝子の検出と定量が可能となった。

表 2 リアルタイム RT-PCR 法と Conventional RT-PCR 法及び Nested PCR 法との検出感度と特異性の比較

		リアルタイム RT-PCR		
		陽性	陰性	計
Conventional RT-PCR	陽性	7	9	16
	陰性	16	247	263
	計	23	256	279
Nested PCR	陽性	17	11	28
	陰性	6	245	251
	計	23	256	279

表 3 リアルタイム RT-PCR 法による結果と検出された hMPV の遺伝子型

		シーケンスによる遺伝子型別				
		A2	B1	B2	型別不明	計
リアルタイム RT-PCR	陽性	5	1	11	6	23
	陰性	0	9	2	0	11
	計	5	10	13	6	34

これにより、svARI 集団発生時における行政検査、院内感染や高齢福祉施設における hMPV の集団発生事例の疫学調査や地域における流行状況調査等に应用できる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J. *et al* : A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 2001 ; 7(6) : pp.719 - 724.
- 2) Honda H, Iwahashi J, Kashiwagi T. *et al.* : Outbreak of human metapneumovirus infection in elderly inpatients in Japan. *J Am Geriatr Soc* 54: pp.177 - 180, 2006.
- 3) 菊田英明 : ヒト・メタニューモウイルス, ウイルス, 第 56 巻 第 2 号, pp.173 - 182, 2006.
- 4) 小林圭子, 水村綾乃, 土井妙子 他 : 千葉市におけるヒトメタニューモウイルスの流行状況と遺伝子解析, 千葉県公衆衛生学会, 2014.
- 5) 横井一, 水村綾乃, 小林圭子 他 : 福祉施設におけるヒトメタニューモウイルス集団感染事例—千葉市, 病原微生物検出情報(IASR), vol 34: pp.234-235, 2013.
- 6) 高尾信一, 下菌広行, 柏弘 他 : 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析, 感染症学雑誌, 78 : pp.129 – 137, 2004.