

Real-time RT-PCR による RS ウイルスおよび ヒトメタニューモウイルス遺伝子の検出

横井 一、小林圭子、水村綾乃、田中俊光

要 旨

重症呼吸器感染症 (svARI) に関与するウイルスの検出法の開発を目的として、Real-time RT-PCR 法による RSV の検出と subgroup 型別、及び HMPV の検出系の構築について検討した。その結果、RSV の N 遺伝子に対する Nested PCR 法を基準とした場合の Real-time RT-PCR 法の検出感度は 100%、特異性も 100% であった。また、Real-time RT-PCR 法と Nested PCR 法による RSV の subgroup 型別の結果の乖離はなく、本法は RSV を対象とした遺伝子診断に有用であることが明らかとなった。

一方、HMPV の F 遺伝子に対する Nested PCR 法を基準とした場合の Real-time RT-PCR 法の検出感度は 55.8%、特異性は 95.5% であり、特に genotype A2 や B1 に対する検出感度が低い傾向が示唆され、プライマーと TaqMan プロープの更なる改良が必要であると考えられた。

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 (InfV)、RS ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、ヒトライノウイルス (HRV) 及びパラインフルエンザウイルス (PIV) などが知られている。中でも RSV と HMPV の臨床症状は類似しており、特に乳幼児において重症化しやすい傾向がある。

近年、RT-PCR 法がウイルス遺伝子の検出法として用いられるようになり、ウイルス量が少ない臨床検体から高感度に RSV または HMPV 遺伝子を検出することが可能となり、これらの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、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、電気泳動による PCR 産物の確認及び得られた PCR 産物の確認 (シーケンス解析等) を必要とするため、迅速性に欠ける一面もある。

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 Real-time RT-PCR 法に着目し、RSV の検出と subgroup 型別及び HMPV の検出が可能な遺伝子診断法の構築について検討した。

2 方法

ウイルス RNA の調製には、VeroE6 細胞により分離された RSV (subgroup A と subgroup B の 2 株) 及び HMPV (genotype A2 と genotype B2 の 2 株) の培養

上清を使用した。また、臨床検体における本法の有用性 (検出感度と特異性) を検討するための臨床検体として、2003 年 12 月から 2011 年 7 月及び 2011 年 10 月から 11 月までの期間に上気道炎または下気道炎 (気管支炎、肺炎) の呼吸器症状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臨床材料 154 検体 (咽頭拭い液 74 検体、鼻汁 76 検体、気管吸引液 2 検体及び喀痰 2 検体) を使用した。これらのウイルス株または検体から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用してウイルス RNA の抽出し、Super Script (Invitrogen) により cDNA を作製した。

Real-time RT-PCR 用プライマーおよび TaqMan MGB プロープは、RSV の F 遺伝子領域 (表 1) と HMPV の F 遺伝子領域 (表 2) に設計した。

Real-time 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、RS ウイルス F 遺伝子とヒトメタニューモウイルス 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* 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、RSV

subgroup Aの配列はAB574192、RSV subgroup Bの配列はHQ317233、HMPV genotype A2の配列はGQ153651及びHMPV genotype B2の配列はHM197719と最も高い相同性を示した。

Real-time RT-PCR法は、1 tubeあたり25 μ Lの反応量で実施した。22.5 μ LのReal-time PCR反応液(Q uantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen) 100 μ Mプライマー、10 μ M TaqMan MGBプローブ、及びRNase-free滅菌蒸留水を混合)に2.5 μ 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 15分(DNA polymeraseの活性化)の後、94 15秒(熱変性)と56 75秒(アニーリングと伸長反応)の反応を45回繰り返した。また、前述のコントロールプラスミドについては、TE bufferにて10倍段階希釈を行い、 2.5×10^7 copies/2.5 μ Lから 2.5×10^1 copies/2.5 μ Lまでの10倍希釈系列を作製し、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の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いて検量線を作成し、ウイルス遺伝子(cDNA)の検出と定量解析を実施した。

Real-time RT-PCR法との検出感度を比較するためのConventional RT-PCR法とNested PCR法は、病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)に準拠し、RSVのN遺伝子(表1)、HMPVのF遺伝子(表2)に対するPCR法を実施した。

3 結果

RSVのsubgroup Aとsubgroup B及びHMPVのgenotype A2とgenotype B2の各コントロールプラスミドの10倍段階希釈系列について、Real-time RT-PCR法による増幅曲線および検量線の検討を実施した。その結果、 2.5×10^1 copies/tubeから 2.5×10^7 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、図1に示すようにRSV subgroup A ($R^2=0.999$, Slope: -3.42)、RSV subgroup B ($R^2=0.999$, Slope: -3.49)、HMPV genotype A2 ($R^2=0.999$, Slope: -3.46)、及びHMPV genotype B2 ($R^2=0.999$, Slope: -3.42)において、それぞれ良好な直線性を示した。以上の結果から、本法によるRSVとHMPVの検出と定量が可能であることが明らかとなり、検出感度は各血清型ともに 2.5×10^1 copies/tubeであると推定された。

RSVとHMPV分離株の培養上清から抽出したRNAから逆転写反応により作製した各cDNA溶液の10倍段階希釈液を用いて、Real-time RT-PCR法の検出限界について確認した。その結果、RSV subgroup Aで

9.9 copies/tube (Ct値: 40.34)、RSV subgroup Bで1.4 copies/tube (Ct値: 40.98)、HMPV genotype A2で17.0 copies/tube (Ct値: 37.01)及びHMPV genotype B2で2.8 copies/tube (Ct値: 38.30)までPCR増幅曲線が得られた。

臨床検体から抽出したRNAから作製したcDNAを用いてReal-time 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を行った。その結果、RSVのN遺伝子に対するConventional RT-PCR法を基準とした場合のReal-time RT-PCR法の検出感度は100%、特異性は92.7%であった(表3)。Nested PCR法を基準とした場合の検出感度は100%、特異性も100%であった(表3)。また、データには示していないがReal-time RT-PCR法とNested PCR法によるRSVのsubgroup型別の結果の乖離はなかった。

一方、HMPVのF遺伝子に対するConventional RT-PCR法を基準とした場合のReal-time RT-PCR法の検出感度は95.2%、特異性は93.2%であった(表4)。Nested PCR法を基準とした場合の検出感度は55.8%、特異性は95.5%であった(表4)。なお、データには示していないがNested PCR法によって陽性となり、Real-time RT-PCR法で陰性となった19検体の遺伝子型は、genotype A2が17検体、genotype B1が2検体であった。

さらに、他の呼吸器ウイルス(インフルエンザウイルス、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、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトボカウイルス)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Real-time RT-PCR法は、RSVのF遺伝子領域とHMPVのF遺伝子領域にプライマーとTaqMan MGBプローブを設計した。

RSVではsubgroup AとBを検出するためのsenseプライマーとantisenseプライマー及びsubgroup AとBに特異的なTaqMan MGBプローブをそれぞれ設計し、1 tubeでRSV遺伝子の検出と同時にsubgroupの型別も可能な系を構築した。その結果、 2.5×10^1 copies/tube以上の遺伝子が存在すれば、RSV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。また、RSVのReal-time RT-PCR法の検出感度は、N遺伝子に対するConventional RT-PCR法よりも高く、Nested PCR法と同等であった。さらに、Real-time RT-PCR法によるsubgroupの型別結果もNested PCR法と一致した。このことから、本法はRSVを対象とした遺伝子診断に十分に

応用可能であることが明らかとなった。

一方、HMPVではgenotype A1とA2を検出するためのsenseプライマーを1種類、genotype B1とB2を検出するためのsenseプライマーを1種類全てのgenotypeに共通のantisenseプライマーを1種類、及びgenotype Aとgenotype Bに特異的なTaqMan MGBプローブをそれぞれ設計し、1 tubeで全ての遺伝子型の検出が可能な系を構築した。その結果、RSVと同様に 2.5×10^1 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Real-time RT-PCR法の検出感度は、F遺伝子に対するConventional RT-PCR法とほぼ同等であり、Nested PCR法よりも低いものであった。特にgenotype A2や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、プライマーとTaqManプローブの更なる改良が必要であると考えられた。

今回開発した RSV 及び HMPV の Real-time RT-PCR 法は、従来の Conventional RT-PCR 法や Nested PCR 法と比較しても、PCR 反応後の電気泳動が不要であり、PCR 産物の確認(シーケンス解析等)も不要であることから、簡便で迅速にかつ高感度に RSV と HMPV 遺伝子の検出と定量が可能である。従って、svARI 集団発生時における行政検査、RSV または HMPV の発生状況等に関する疫学調査等に活用できる可能性が示唆された。また、Real-time RT-PCR 法のアニーリング温度を 56 に統一したことから、1 台の装置で RSV と HMPV を同時に検出可能であり、検査効率の向上にも貢献できるものと思われる。特に RSV の Real-time RT-PCR 法は、1 tube で RSV 遺伝子の検出と同時に subgroup の型別も可能であることから、その効果は大きいものと考えられた。

本研究は平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究(研究代表者:木村博一)の一環として実施した。

表1 RSV の Real-time 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

PCR Assay	Primer or Probe	Sequence (5'→3') ^{*a}	Gene position (Polarity) ^{*b}	Location
Real-time RT-PCR	RSVf-F1	CARCAAAGTTAYTCTATCATGTC	F (+)	6460-6482 ^{*e}
	RSVf-R1	GATCCTGCATTRTCACARTACCA	F (-)	6656-6634 ^{*e}
	RSVfA-TPf2 ^{*c}	VIC- TGTAGTACAATTRCCACT -MGB-NFQ	F (+)	6510-6527 ^{*e}
	RSVfB-TPf ^{*d}	FAM- TGTRCAGCTRCCTATC -MGB-NFQ	F (+)	6563-6578 ^{*f}
Conventional RT-PCR	RSV AB-F	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	N (+)	1628-1647 ^{*e}
	RSV AB-R	GGGCTTTCCTTGGTTACTTC	N (-)	2465-2446 ^{*e}
Nested PCR	RSV A-F	GATGTTACGGTGGGGAGTCT	N (+)	1863-1882 ^{*e}
	RSV A-R	GTACACTGTAGTTAATCACA	N (-)	2197-2178 ^{*e}
	RSV B-F	AATGCTAAGATGGGGAGTTC	N (+)	1905-1924 ^{*f}
	RSV B-R	GAAATTGAGTTAATGACAGC	N (-)	2089-2070 ^{*f}

^{*a} Mix bases in degenerated primers and probe are as follows: Y, C or T; R, G or A.

^{*b} (+), Sense; (-), antisense.

^{*c} The MGB probe is labeled with VIC reporter dye at the 5' end, and with minor groove binder (MGB) and a nonfluorescent quencher (NFQ) at the 3' end of the oligonucleotide.

^{*d} The MGB probe is labeled with FAM reporter dye at the 5' end, and with minor groove binder (MGB) and a nonfluorescent quencher (NFQ) at the 3' end of the oligonucleotide.

^{*e} Location is relative to the genome of RSV subgroup A strain A2 (accession number M11486).

^{*f} Location is relative to the genome of RSV subgroup B strain 9320 (accession number AY353550).

表2 HMPV の Real-time 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

PCR Assay	Primer or Probe	Sequence (5'→3') ^{*a}	Gene position (Polarity) ^{*b}	Location
Real-time RT-PCR	hMPV-3S	ATGGCYGTYAGCTTCAGTCA	F (+)	3616-3635 ^{*d}
	hMPV-4S	GATGGCTGTCAGYTTTCAGTC	F (+)	3615-3635 ^{*d}
	hMPV-3As	TGYCCTGCAGATGTYGGCATGT	F (-)	3770-3749 ^{*d}
	hMPVa-TPr ^{*c}	FAN-ATCCAGCRTTGTCTGA-MGB-NFQ	F (-)	3689-3673 ^{*d}
	hMPVb-TPr ^{*c}	FAM-ATCCCTGCATGTCTGA-MGB-NFQ	F (-)	638-622 ^{*e}
Conventional RT-PCR	hMPV-1f	CTTTGGACTTAATGACAGATG	F (+)	3704-3724 ^{*d}
	hMPV-1r	GTCCTCCTGTGCTAACTTTG	F (-)	4153-4134 ^{*d}
Nested PCR	hMPV-2f	CATGCCGACCTCTGCAGGAC	F (+)	3750-3769 ^{*d}
	hMPV-2r	ATGTTGCAYTCYYTTGATTG	F (-)	4106-4087 ^{*d}

^{*a} Mix bases in degenerated primers and probe are as follows: Y, C or T; R, G or A.

^{*b} (+), Sense; (-), antisense.

^{*c} The MGB probe is labeled with FAM reporter dye at the 5' end, and with minor groove binder (MGB) and a nonfluorescent quencher (NFQ) at the 3' end of the oligonucleotide.

^{*d} Location is relative to the genome of HMPV genotype A1 strain NL/1/00 (accession number AF371337).

^{*e} Location is relative to the genome of HMPV genotype B2 strain NL/1/94 (accession number AY304362).

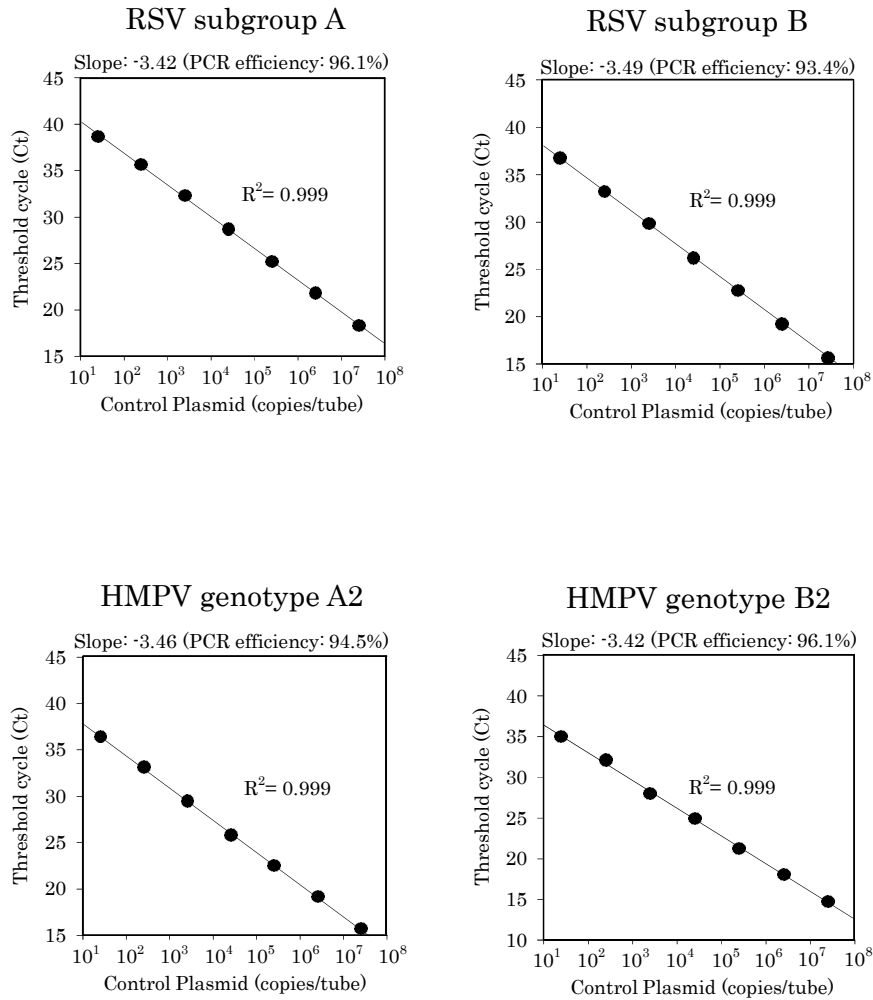


図1 RSV 及び HMPV の各コントロールプラスミドの 10 倍段階希釈系列を用いた Real-time RT-PCR 法による検量線

表3 Real-time RT-PCR、Conventional RT-PCR、及び Nested PCR による臨床検体からの RSV 遺伝子の検出感度と特異性の比較

RSV	Real-time RT-PCR		
	Positive	Negative	Total
Conventional RT-PCR			
Positive	31	0	31
Negative	9	114	123
Total	40	114	154
Nested PCR			
Positive	40	0	40
Negative	0	114	114
Total	40	114	154

表4 Real-time RT-PCR、Conventional RT-PCR、及び Nested PCR による臨床検体からの HMPV 遺伝子の検出感度と特異性の比較

HMPV	Real-time RT-PCR		
	Positive	Negative	Total
Conventional RT-PCR			
Positive	20	1	21
Negative	9	124	133
Total	29	125	154
Nested PCR			
Positive	24	19	43
Negative	5	106	111
Total	29	125	154