

—最近における動物衛生研究情報 (VI)—

高精度な PCR による鳥インフルエンザウイルスの 迅速な亜型判定法

塚本健司[†] (動物衛生研究所人獣感染症研究チーム上席研究員)



1 はじめに

高病原性鳥インフルエンザは養鶏産業に大きな被害を与える感染症で、その原因となるウイルスは変異しやすく、遺伝子は多様性に富んでいる。このため、ワクチンによる本病の制御は期待できず、早期摘発と早期殺処分が対策の基本である。高病原性の H5N1 ウイルスの感染が東アジアで続いており、ガン・カモ類によって国境を越えてウイルスが運ばれ、再び国内で本病が発生することが懸念されている。被害を最小限にするために、診断の迅速化が求められている。

鳥インフルエンザ (AI) の診断においては、ウイルスの亜型と鶏病原性を判定する必要がある。現在、亜型判定の公定法には、抗血清パネルを用いた血清学的検査法が用いられている。具体的には赤血球凝集素 (HA) 亜型の判定は赤血球凝集抑制試験 (HI) で、ノイラミニダーゼ (NA) 亜型の判定はノイラミニダーゼ抑制試験 (NI) で行われている。共に世界的に利用されているが、抗血清の供給が難しく、検出幅が狭く、検出漏れが起こる場合がある。また、判定に熟練を要し、多検体処理が難しく、NI 検査では2日間が必要である。一方、鶏病原性は、分離されたウイルスを4~8週齢の鶏8羽の静脈内に接種して、10日間の死亡率から判定する方法が公定法となっている。死亡率が75%以上であれば高病原性、それ未満は低病原性と判定されるが、常に4~8週齢の鶏を準備しておく必要があり、検査に時間を要し、一度に多くのウイルスを判定することはできない。

一方、PCRによる亜型判定法は高感度、迅速で、多検体処理が可能であるが、一部の亜型に対してのみ開発されていた。そこで我々は、H1~H15, N1~N9の各遺伝子と、A型インフルエンザウイルスに共通なNP遺伝子を同時に検出でき、精度が高いPCR法の開発に取り組んだ。

一方、PCRによる亜型判定法は高感度、迅速で、多検体処理が可能であるが、一部の亜型に対してのみ開発されていた。そこで我々は、H1~H15, N1~N9の各遺伝子と、A型インフルエンザウイルスに共通なNP遺伝子を同時に検出でき、精度が高いPCR法の開発に取り組んだ。

2 遺伝子の標的部位とプライマーの設計

AIウイルスは、8分節からなるネガティブ鎖、一本鎖のRNAをゲノムとして持つエンベロープを有するウイルスで、オルソミクソウイルス科、インフルエンザAウイルス属に属している。ウイルス粒子の表面にはHAとNAと呼ばれる2種類のスパイク蛋白質があり、それらは抗原性状の違いから、HAは16種類の亜型に、NAは9種類の亜型に細分類されている。

AIウイルスは、自然宿主であるガン・カモ類、シギ・チドリ類などの野生水鳥において、全てのHAとNAの亜型が保存されている。また、AIウイルスは病原性の違いから、呼吸器と消化器の粘膜上皮細胞だけで増殖する低病原性ウイルスと、全身の臓器で増殖できる高病原性ウイルスに分けられる。その違いはHAの開裂部位にあるアミノ酸配列と関係があり、HAの開裂部位に塩基性アミノ酸の集積があるものが高病原性ウイルスである。また、これまでに報告された高病原性ウイルスの亜型は全てH5またはH7亜型に限られている。このため、H5またはH7亜型のHA開裂部位が病原性の分子マーカーとなる。一方、AIウイルスは陸生家禽に馴化すると、NA遺伝子の軸部分に遺伝子の欠損が起こることが知られており、これが陸生家禽への馴化の指標のひとつとなっている。したがって、HAの開裂部分とNAの軸部分を遺伝子亜型判定法の標的部位にすれば、亜型判定に加えて、鶏病原性及び家禽への馴化を同時に推定することが可能になる。

HAとNAの各亜型は遺伝学的にユーラシア系統とアメリカ系統に大別されており、同一系統内でも大きな多様性があることが知られている。亜型判定法は両系統に属す多様な遺伝子の一方または両方を、亜型特異的に検出できなければならないが、その開発は困難が予想された。開発に着手した時点で、PCRによる亜型判定法の報告は一部の亜型に限定されるものがほとんどであった。また、Leeらの報告ではH1~H15のHA遺伝子を対象にしていたが、検証は不十分で、病原性を推定でき

[†] 連絡責任者：塚本健司 (動物衛生研究所人獣感染症研究チーム)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7802 E-mail : ktsukamo@affrc.go.jp

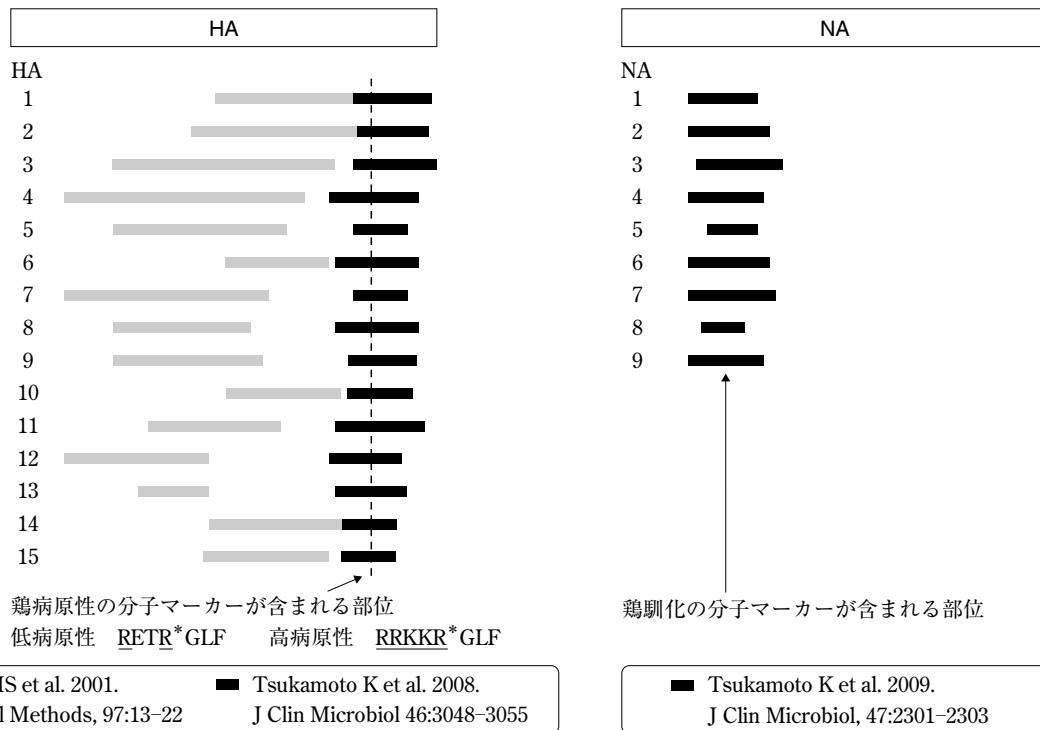


図1 PCRの標的部

なかった [1].

一方、我々は開発の途中で、①プライマーとウイルス遺伝子との間に3個以上のミスマッチがあると、遺伝子の検出遅延や検出漏れが起こること、②プライマーに混合塩基を用いることによって、遺伝子を幅広く検出できること、がわかった。そこで、混合塩基を含むプライマーの開発に取り組んだ。また、開発当初の2005年には遺伝子バンクに登録された遺伝子数は少なく、当所が保有していた参照株・分離株を加えても実用に耐えうる検査法の開発は困難と思われた。そこで、国内で越冬するカモ類から毎年新しいウイルスを分離して、これらを用いてプライマーの改良を重ねていった。

3 材料と方法

HAの標的部位は鶏病原性の分子マーカがあるHAの開裂部位であり、NAの標的部位は鶏への馴化の指標となる軸部位とした(図1)。各亜型に特異的で、かつその亜型内で広く保存されている領域にプライマーを複数設計し、亜型特異性と検出率が優れたものを選抜した。

開発されたプライマーセットは、HAが15組(H1~H15)、NAが9組(N1~N9)、NPが1組の計25組である [3, 4].

供試したウイルス数は計281株で、H1~H15, N1~N9をカバーしている。281株の内訳は、1949年から2007年3月までの参照株および分離株(計118株)と、2006年10月~2007年3月と2007年10月~2008年3月の2越冬シーズンに国内の越冬地でカモ類から分離し

表1 PCRによるHA及びNA遺伝子の亜型特異的な検出

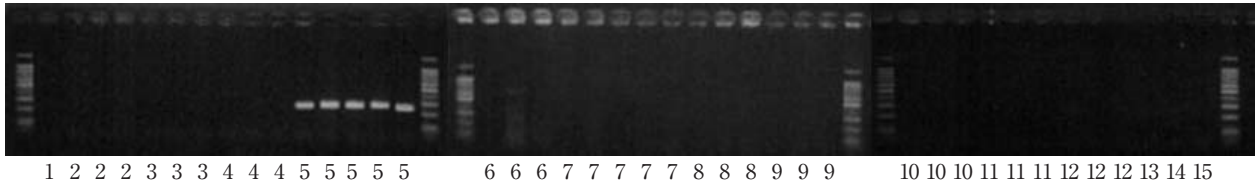
HA		NA	
亜型	陽性数/検査数	亜型	陽性数/検査数
H1	2/2	N1	11/11
H2	1/1	N2	31/31
H3	5/5	N3	19/19
H4	14/14	N4	6/6
H5	27/27	N5	12/12
H6	12/12	N6	17/17
H7	13/13	N7	5/5
H8	4/4	N8	6/6
H9	8/8	N9	11/11
H10	9/9		
H11	16/16		
H12	4/4		
H13	1/1		
H14	1/1		
H15	1/1		
計	118/118	計	118/118

検出数/検査数

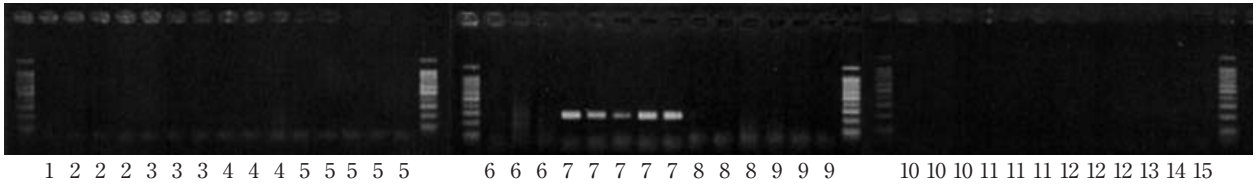
た株(163株)である。

ウイルスを含む感染尿膜腔液からキット(Qiagen)を用いてウイルスRNAを精製し、ランダムプライマーとPrimeScript reverse transcriptase (Takara)を用いて、相補DNAを合成した。PCRはEx Taq polymerase (Takara), GeneAmp PCR System 9700 (ABI)を用いた。反応プログラムは3種類の遺伝子を同時に検出できるように同一とし、94度1分(1回)→[94度×30

H5 Primers



H7 Primers



H9 Primers

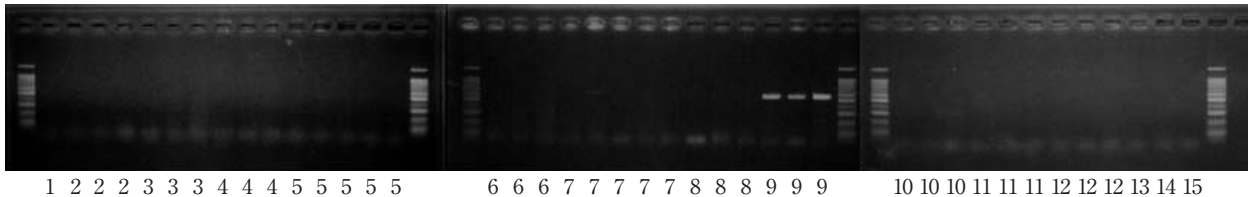


図2 交差反応性の検討：H5, H7, H9プライマーはHA遺伝子を特異的に検出する。

表2 越冬カモ類から分離された鳥インフルエンザウイルスのPCRによる迅速な亜型判定

NA亜型	HA亜型															計
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	
N1	2					10				2						14
N2		1	1	6	7	14			10		1					40
N3	4	8		1	2					6	3					24
N4			1			2		4		2						9
N5						1						9				10
N6				15												15
N7							7									7
N8			18			4						1				23
N9				1					2		18					21
計	6	9	20	23	9	31	7	4	12	10	22	10	0	0	0	163

H18年度（2006年10月～2007年3月）に分離した101株。H19年度（2007年10月～2008年3月）に分離した62株。

秒-50度×30秒-72度×30秒]（35回）→72度7分（1回）を採用した [3].

4 検査の精度と有用性

(1) 遺伝子の検出率

我々はHAおよびNA遺伝子を幅広く検出できるようにプライマーセットを確立した。このセットを用いて、1949年から2006年3月までに分離された、亜型判定済みの参照株・分離株計118株について、HAまたはNA遺伝子の検出率を調べた。その結果、供試した全ての株においてHAとNA遺伝子が亜型特異的に検出された (表1) [3, 4].

(2) 交 差 性

ヘテロな亜型の遺伝子との交差反応について、H1～

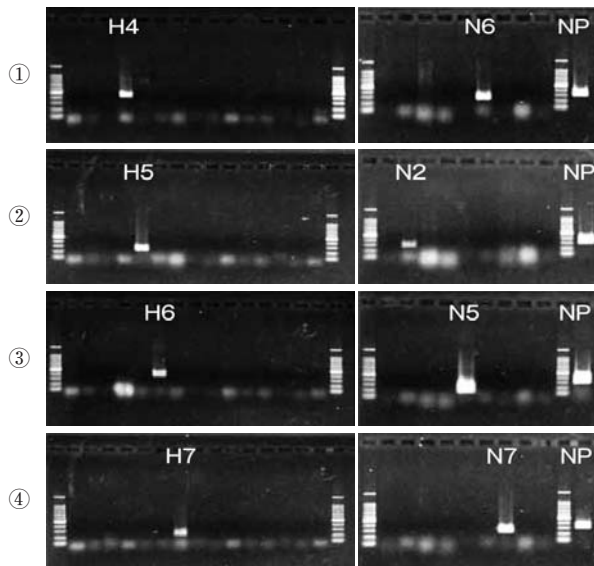
H15亜型からなる41株と、N1～N9亜型からなる45株を用いて調べた。その結果、非特異反応は時に弱く認められるものの、亜型特異的にHAとNA遺伝子を検出できることが確認された (図2) [3, 4]. マイナーな非特異産物や弱い交差反応は特異的増幅とは区別できるので、亜型の判定には影響しない。

(3) 感 度

遺伝子の検出感度を、HA亜型およびNA亜型ごとに発育鶏卵を用いた感染価と比較した。その結果、ウイルス株によって検出感度に幅はあるものの、HAおよびNA遺伝子ともに検出必要量は約 $10^2 \sim 10^4$ 感染価であった。これは、血清学的検査法と比較して約100～10,000倍ほど高感度である [4, 5].

(4) 亜型の判定

本亜型判定法の有用性について、国内で越冬するカモ類から分離した計163株を用いて調べた。その結果、全てのウイルス株について、NPの検出とHAおよびNAの亜型判定を同時に行うことができた(表2) [4]。その一例を図3に示す。全てのHAおよびNA亜型の判定結果が正しいことは、PCR産物の塩基配列から確認された。ただし、H1, H9, H12, N2, N9亜型において、ウイルス株によっては検出されたDNA量が少ない株があり、現在もプライマーの改良を続けている。なお、H7のプ



- ①A/duck/Niigata/10/2007 (H4N6)
- ②A/duck/Tsukuba/189/2008 (H5N2)
- ③A/duck/Shiga/66/2007 (H6N5)
- ④A/duck/Chiba/13/2008 (H7N7)

図3 PCRによるHAおよびNA亜型の同時判定

ライマーに関しては最新の論文を参考にされたい [4]。

(5) 病原性の推定

高病原性鳥インフルエンザウイルスHA遺伝子の開裂部位には、病原性の分子マーカーが存在する [3]。H5亜型ウイルス36株と、H7亜型ウイルス20株について解析したところ、鶏病原性の推定に利用できることが確認された(表3) [3]。

5 ま と め

本PCR法は、A型インフルエンザの同定と、HAおよびNAの亜型を3時間で同時に判定でき [3, 4]、検出スペクトル、特異性、感度の点で既報よりも優れている。また、PCRは一般検査機関でも使用でき、簡便で多検体処理も可能なことから、診断やサーベイランスの効率化や迅速化が期待される。5個以内の混合塩基を含むプライマーを用いれば、検出スペクトルが広がり、高い感度を維持できることを我々は証明している [5]。また、開発されたプライマーを用いて、PCR産物の塩基配列を分析すれば、ウイルスの鶏病原性や鶏への馴化の推定、ゲノム疫学解析も可能となる。以上のことから、本法は公定法を補強する検査法として、有用と思われる。

ただし、実用に耐えうる亜型判定用PCRの開発は世界でも初めてであり、今回開発に用いたウイルス株は自然界にあるウイルスのほんの一部に過ぎない。検出DNA量が少なかった亜型については、現在もプライマーの改良が続けられている。最新のプライマー情報については著者に問い合わせいただきたい。なお、本法はスクリーニング法であり、亜型や鶏病原性の確定には公定法による検査が必要である。

また、本法は多くの利点を有することから、世界に普及させる努力も必要と思われる。国内分離株は遺伝学的

表3 PCR産物の塩基配列解析による、鳥インフルエンザウイルスの鶏病原性の推定

ウイルス株	亜型	HA開裂部位のアミノ酸配列	鶏病原性の分子推定
A/tk/MN/3689-1551/1981	H5N2	PQRETR/GLF	低
A/ck/Ibaraki/1/2005	H5N2	PQRETR/GLF	低
A/ck/Yamaguchi/7/2004	H5N1	PQRERRKKR/GLF	高
A/ck/Suphanburi/1/2004	H5N1	PQRERRRKKR/GLF	高
A/ck/Miyazaki/H358/2007	H5N1	PQGERRRKKR/GLF	高
A/ck/Pennsyl/21525/1983	H5N2	PQKKKR/GLF	高
A/ck/Puebla/8623-607/1994	H5N2	PQRKRKTR/GLF	高
A/ck/Italy/330/1997	H5N2	PQRRRKKR/GLF	高
A/tern/South Africa/1961	H5N3	PQRETRRQKR/GLF	高
A/ck/NY/119055-7/2001	H7N2	PEKPKPR/GLF	低
A/dk/Shimane/18/2006	H7N7	PEIPKGR/GLF	低
A/tk/Italy/4580/1999	H7N1	PEIPKGSRRR/GLF	高
A/tk/England/1963	H7N3	PETPKRRRR/GLF	高
A/ck/Pakistan/447/1995	H7N3	PEIPKRKRKR/GLF	高
A/ck/Chile/184240-2/2002	H7N3	PEKPKTCSPLSRCKTR/GLF	高
A/ck/Netherlands/2586/2003	H7N7	PEIPKRRRR/GLF	高

に限られた集団であるが、全世界にはかなり多様な遺伝子の集団があると予想される。したがって、ヨーロッパ、北米、南米で分離されるウイルスの亜型判定に本法を直接、利用できる可能性は低いと思われる。本法を普及させるには、今回開発されたプライマー領域について、地域毎に最適なプライマーセットを作成することが必要と思われる。PCR法は増幅産物を電気泳動するため、判定が主観的で標準化が難しいが、リアルタイムPCR法は判定が客観的で、標準化しやすい。リアルタイムPCR法の開発が求められている。

最後に、野鳥調査への利用について紹介したい。強毒のH5N1ウイルスが2010年10月に北海道において、カモ糞から検出されたことが発端となって、2011年1月27日現在までに9道県で野鳥又は鶏から検出される事態となった。このことは、H5N1ウイルスが野生水鳥において保存されようとしていることを示唆している。今後は、越冬カモ類におけるH5N1ウイルスの実態調査が必要になると思われるが、この調査に本法を導入すれば、家畜保健衛生所独自で本調査を行うことが可能になる。また、これを全国展開すれば、越冬地におけるH5N1ウイルスの実態解明や発生注意報の発動につながると期待される。

参 考 文 献

- [1] Lee MS et al : Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J Virol Methods*, 97, 13-22 (2001)
- [2] Swayne DE., Halvorso DA : Influenza. In *Diseases of Poultry*, 11th edn, YM Saif, JH Barnes, JR Glisson, AM Fadly, LR McGougald, DE Swayne, Ames, Iowa State Press, 135-160, Iowa.
- [3] Tsukamoto K. et al : Subtyping of avian influenza viruses H1 to H15 on the basis of hemagglutinin genes by PCR assay and molecular determination of pathogenic potential, *J Clin Microbiol.* 46, 3048-3055 (2008)
- [4] Tsukamoto K et al : Use of reverse transcriptase PCR to subtype N1 to N9 neuraminidase genes of avian influenza viruses., *J Clin Microbiol*, 47, 2301-2303 (2009)
- [5] Tsukamoto K et al : Broad detection of diverse H5 and H7 hemagglutinin genes of avian influenza viruses by real-time RT-PCR using primer/probe sets containing mixed bases, *J Clin Microbiol*, 48, 4275-4278 (2010)