

[技術資料]

インフルエンザウイルスの迅速分析法及び高感度分析法

ウイルス課 安藤 克幸 大串 和弘 野田 日登美
角 典子

キーワード：インフルエンザウイルス 一斉分析 SYBR Green 2step

1 はじめに

季節性インフルエンザであるA型やB型インフルエンザウイルスによる感染は、毎年多くの人々の間で流行し、さらに2009年には、ブタ由来新型H1N1ウイルス(H1N1pdm09)によるパンデミック(世界的流行)が起きている。

そして、渡り鳥や家禽の間で流行しているH5N1およびH5N2鳥インフルエンザウイルス、さらには昨年中国においてヒトへの感染が確認されているH7N9ウイルス等がある。このH7N9ウイルスについては、人から人に感染してパンデミックを起こす可能性も指摘されている。

このため、鳥インフルエンザによるパンデミックを想定した緊急的な迅速分析、また、季節性インフルエンザの流行を適確に解析するための高感度分析について検討した。

2 方法

(1)材料

4ウイルスの陽性コントロールは感染症発生動向調査及びインフルエンザの集団発生事例で収集し、原因ウイルスが確定したものをを用いた。

(2)分析方法

①迅速分析法

感染研推奨のOne Step RT-PCR と One Step RT-PCR に SYBR Green を加えた方法を比較した。

②高感度分析

感染性胃腸炎の一斉分析法で確立した方法(DNase, RT)とRTに特異primersを使用する方法について比較検討した。

※2つの方法とも分析後、引き続き遺伝子解析が可能である方法とした。

③primers

感染研推奨及び既報の primer を用いた。

3 結果と考察

(1)結果

①迅速分析法

○Conventional One Step RT-PCR (Real Time PCR with SYBR GREEN QIAGEN キットを用いた方法)

ア Roche Kits 等によるRNA抽出

イ DNase 処理

ウ One Step RT-PCR (with SYBR GREEN QIAGEN) (RT は各 primers を使用)

※One Step RT-PCR を実施した後、必要に応じてNested PCR を行う。

[技術資料]

○ 分析条件

Holding 50°C 30 min
 Holding 95°C 15 min

Cycle ; 45

94°C 30sec
 50°C 50sec (AH3 , HA のみの場合は 56 °C)
 72°C 1 min 20sec
 Holding 72°C 10 min

Melt Curv 95°C 15sec
 60°C 1min (データ取得の刻みは 0.3~0.5°C。数値が
 95°C 15sec 小だと分析が長時間になる。)

※Step One Plus で測定する場合の陽性判定基準

amplification plot が 1.75 (liner)10.0 以上の場合は偽陽性の可能性が高い)以上であり、Melt Curve の融解離温度 (T_m) の変動幅が標準物質の T_m 値の 1.0 未満であること。

○各 primers の融解離温度 (T_m °C)

AH1;

H1 HA1-BEGIN-F ; AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA

H1 R10-R ; GCTATTTCTGGGGTGAATCT (729 bp)

T_m 値 ; 80.743 °C

AH1pdm09;

NIID-swH1 ConvPCR Primer-F1 ; TGCATTTGGGTAAATGTAACATTG

NIID-swH1 ConvPCR Primer-R1 ; AATGTAGGATTTTRCTGAKCTTTGG

T_m 値 ; 80.292 °C (349 bp)

AH3;

H3HA1-BIGIN-F ; AGCAAAAGCAGGGGATAATTC

H3HA1-END-R ; TGCCTGAAACCGTACCAAC (1,143 bp)

T_m 値 ; 80.242 °C

B;

BHA1-N-F ; AATATCCACAAAATGAAGGC

BHA1-C-R ; AGCAATAGCTCCGAAGAAAC (1,116 bp)

T_m 値 ; 81.186 °C

[技術資料]



※AH1、AH1pdm09、AH3 および B

②高感度分析

感染性胃腸炎の分析から One step と Two step では Two step の方が 10~100 倍 増幅効率が高いことが分かっているが、Random primers 等 と特異 primers で 10 倍ほどの増幅効率の違いがあった。

そして、この Two step(特異 primers)で作成した cDNA を通常使用するポリメラーゼ①(TAKARA; Extaq)、ポリメラーゼ②(ABI; AmpliTaq Gold DNA Polymerase)及び強力ポリメラーゼ(KAPA; KAPA2G Robust HS RM with dye)の 3 種類で比較した結果、Two step と強力ポリメラーゼの組合せでは、Nested PCR に匹敵する増幅効率があることが判明した。

○DNase 処理 (20 又は 30 μ l)

↓

↓ (10 又は 5 μ l(半量系))

[技術資料]

N9;(ユーラシアタイプ亜型)

N9-64Feu CY004701 ; GTAATAGGCACRATYGCAGT

N9-290Reu ; CCTTTRGTYARRTTATTGAA (227bp)

H5;

H5-918F U69277 ; CCARTRGGKGCKATAAAAYTC

H5-1178R ; GTCTGCAGCRTAYCCACTYC (261bp)

N1;

N1-54F CY003931 ; TCARTCTGYATGRYAAAYTGG

N1-298R ; GGRCARAGAGAKGAATTGCC (245bp)

(2) 考察

今回検討した方法では、Amplification plot と Melt Curve (T_m 値) によりインフルエンザウイルスの迅速な分析が可能となるとともに、特異的 primers を用いた Two step の Reverse Transcription と強力な DNA ポリメラーゼを併用することにより Nested PCR (2nd PCR) に匹敵するインフルエンザウイルスの高感度な分析が実施可能となった。

今後見直しが必要となる点は、ウイルスに大きな Mutation が起きた場合に、核酸配列の変異に対応した primers の設計変更が必要になると考える。

4 文献

(1) Tsukamoto K, Javier PC, Shishido M, Noguchi D, Pearce J, Kang HM, Jeong OM, Lee YJ, Nakanishi K, Ashizawa T.

SYBR green-based real-time reverse transcription-PCR for typing and subtyping of all hemagglutinin and neuraminidase genes of avian influenza viruses and comparison to standard serological subtyping tests. J Clin Microbiol. 2012 Jan;50(1):37-45.

(2) Falchi A, Amoros JP, Arena C, Arrighi J, Casabianca F, Andreoletti L, Turbelin C, Flahault A, Blanchon T, Hanslik T, Varesi L.

Genetic structure of human A/H1N1 and A/H3N2 influenza virus on Corsica Island: phylogenetic analysis and vaccine strain match, 2006-2010.

10.1371/journal.pone.0024471