

原 著

混合プライマーを用いた PCR 法によるインフルエンザウイルスの検出と同定

高尾 信一 金本 康生 妹尾 正登 野田 雅博 徳本 静代

Detection and identification of influenza virus by the PCR using mixed primers

SHIN-ICHI TAKAO, YASUO KANAMOTO, MASATO SENO, MASAHIRO NODA, SHIZUYO TOKUMOTO

(Received Sept. 30, 1994)

We developed a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) system for simultaneous detection and identification of influenza A(H1N1), A(H3N2), and B virus genes in a single reaction tube. The RT-PCR was performed by using a mixture of three pairs of primers corresponding to the sequences of the hemagglutinin (HA) genes of influenza A(H1N1), A(H3N2), and B viruses. The RT-PCR amplified type- or subtype-specific products corresponding to each of the influenza virus HA genes. The sensitivity of the RT-PCR was estimated to be 20-180 plaque forming unit (PFU)/50 μ l of influenza virus after the first round of amplification (1st PCR), and 0.8-8.5 PFU/50 μ l after the 2nd PCR. These results suggest that our RT-PCR system using mixed primers may be an effective rapid diagnostic technique for detection and identification of influenza virus in clinical specimens because of its specificity, sensitivity, and rapidity.

Key words : influenza virus, polymerase chain reaction, mixed primers, detection and identification.

はじめに

インフルエンザは、冬期に、短期間で爆発的な流行を引き起こすことから、特に流行初期の病因ウイルスを迅速に決定することが、流行状況の把握や防疫対策上重要である。従来よりインフルエンザウイルスの検出には、発育鶏卵や培養細胞を用いて、患者の咽頭ぬぐい液などからウイルスを分離し、赤血球凝集抑制 (HI) 試験によって同定する方法がとられている。しかしこうした方法では、ウイルスの分離・同定までに、少なくとも3~4日、場合によっては3週間以上を要することもある。そのため迅速診断の目的で、患者の咽頭ぬぐい液から蛍光抗体法 [1-3] やエライサ法 [4-6] を用いて直接インフルエンザウイルスを検出する方法も開発されているが、いずれも特異性や感度に問題がある。

近年、DNAポリメラーゼ反応を利用したDNA増幅法である polymerase chain reaction (PCR) 法が Saiki ら [7] によって開発された。この PCR 法は特異性、感度、迅速性に優れていることから、現在では各種感染症の診断に広く利用されるようになり [8]、インフルエンザの迅速診断にも用いられつつある

[9-12]。ところが、これまでに報告されたインフルエンザウイルスの PCR 法は、いずれも基本的には異なる型あるいは亜型のインフルエンザウイルスを、それぞれ個別の PCR 反応系で検出する方法で行っている。そのため、患者の検体からインフルエンザウイルスを検出し、その (亜) 型を同定するためには、複数の PCR 反応系を用意する必要があり、経済的にも、時間的にも多くの無駄を生じていた。

今回我々は、インフルエンザ A 型 (H1N1) 型、A 香港 (H3N2) 型、B 型の各 (亜) 型ウイルスに特異的なプライマーを混合した“混合プライマー”を調整し、それを cDNA 合成およびその後の PCR 操作に応用することで、異なる (亜) 型のインフルエンザウイルスを一度に検出・同定可能な方法を試みたので報告する。

材料と方法

1. 使用ウイルス

インフルエンザウイルスは、H1N1 型として A/Kyoto/1/81, A/Bangkok/10/83, A/Yamagata/120/86 を、H3N2 型として A/Philippines/2/82, A/Sichuan/

2/87, A/Hiroshima/10/90 を, B型として B/Ibaraki/2/85, B/Yamagata/16/88, B/Hiroshima/10/88 の合計 9 株の発育鶏卵感染しょう尿液を用いた. パラインフルエンザウイルスは C-35 株 (1 型), Greer 株 (2 型), C-243 株 (3 型) の, またアデノウイルス 3 型は当所で分離した株の感染培養細胞上清を用いた.

2. ウイルス遺伝子の抽出

検査材料 (感染発育鶏卵しょう尿液あるいは感染細胞培養上清液) からのインフルエンザウイルス RNA の抽出方法は Fig.1 に示した. なお, 抽出に際しては

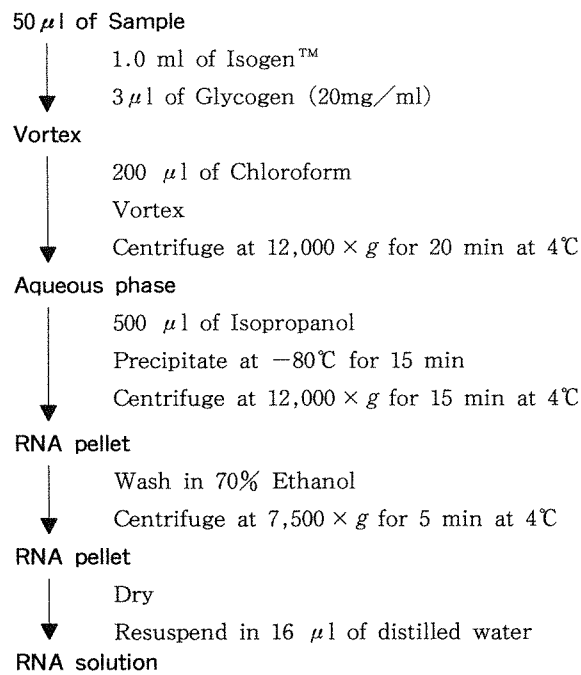


Fig.1 Preparation of viral RNA

市販の RNA 抽出試薬 (Isogen™ ; ニッポンジーン社) を用いた.

3. プライマー

H1N1 型, H3N2 型, B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素 (HA) 遺伝子のうち, 過去の遺伝子情報から型および亜型に特異的で, かつ変異のない領域を選び [15-19], それぞれ 20 塩基のプライマーを作成した (Table 1). それらのプライマー・ペアは, それぞれ単独で用いた場合には, H1N1 型は 512bp, H3N2 型は 456bp, B 型は 627bp の PCR 産物が得られる. 今回は, それらのプライマーを, センスおよびアンチセンスごとに, それぞれ 3 種類 (各 10 µM) ずつ混合した混合プライマーを, 逆転写反応および, その後の PCR に用いた.

4. PCR 法によるウイルス遺伝子の検出

抽出 RNA にトリ骨芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV RTase) とセンス混合プライマーを含む PCR 反応液 (最終濃度 ; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatin) を加え, 43°C で 1 時間反応させ cDNA を作成した. その後, Taq DNA ポリメラーゼ, 混合プライマー・ペアを含む PCR 反応液を加え, PCR により DNA を増幅させた (1st PCR). PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイド染色の後, 増幅された DNA のバンドの有無, およびその異動度を観察しウイルスの (亜) 型を判定した. 1st PCR の産物でバンドの検出されなかった検体については, PCR 反応液中に Taq DNA ポリメラーゼ (1.25 単位) を加え, さらに 30 回 PCR 反応を繰り返した (2nd PCR) (Fig.2).

Table 1 Oligonucleotide primers prepared for this study

Virus type (subtype)	Primer	Position	Sequence	Length (base pairs)
A(H1N1)	210	667-686 ^a	5'-AAA ATG CTT ATG TCT CTG TA-3'	512
	209R	1159-1178 ^a	5'-TTA ATC CGC AGC ATA GCC AG-3'	
A(H3N2)	840	337-356 ^b	5'-TTG TTG AAC GCA GCA AAG CT-3'	456
	842R	778-797 ^b	5'-TCA CGG TTT TAC TAT TGT CC-3'	
B	BH3	606-625 ^c	5'-ACC ATG CAT TTG TAC AAA AG-3'	627
	B9R	1213-1232 ^c	5'-TTA AGG TCT GCT GCC ACT GC-3'	

^aThe nucleotide numbers are according to the positive strand sequence of A/PR/8/34 (H1N1) HA gene (19).

^bThe nucleotide numbers are according to the positive strand sequence of A/Aichi/2/68 (H3N2) HA gene (18).

^cThe nucleotide numbers are according to the positive strand sequence of B/Lee/40 HA gene (15).

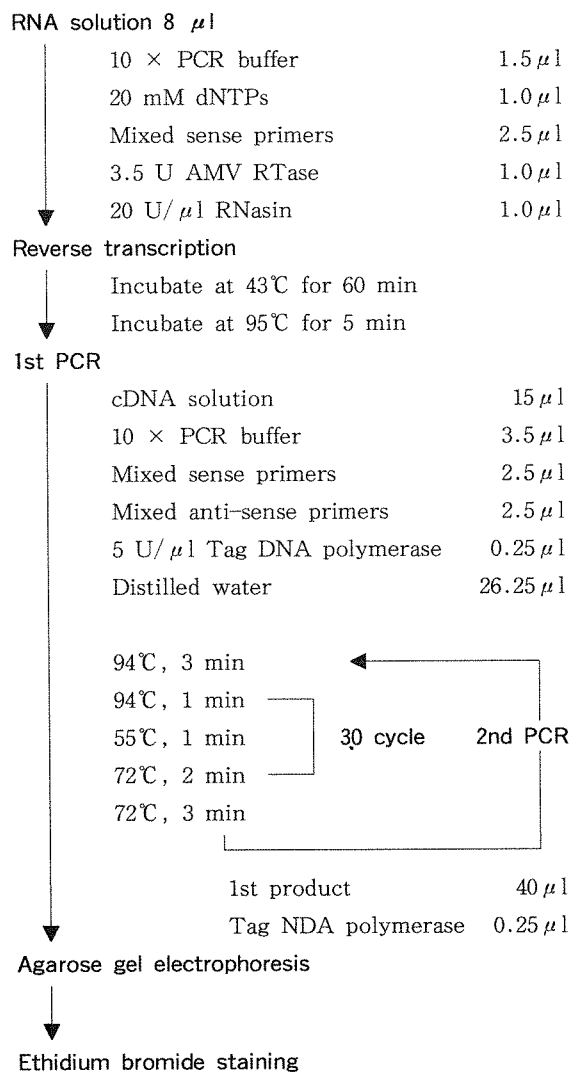


Fig.2 Protocol for the RT-PCR of influenza HA genes

結果

1. 混合プライマーを用いたPCR法の特異性

混合プライマーを用いたPCR法の特異性を確かめるために、H1N1型、H3N2およびB型インフルエンザウイルスを感染させた発育鶏卵しょう尿液、およびパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、アデノウイルス3型の感染培養細胞上清からRNAを抽出し、cDNAを合成した後、PCRを行った。その結果、各インフルエンザウイルスでは、各(亜)型に特異的なバンドのみが検出された。一方、パラインフルエンザウイルスやアデノウイルスではバンドは検出されなかった (Fig. 3)。

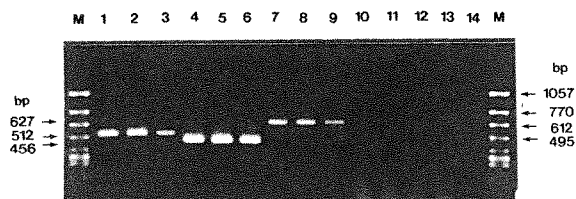


Fig.3 Specificity of the RT-PCR using mixed primers.

Lanes: M; DNA size marker (ϕ X 174 *Hinc* II digest); 1, influenza A/Kyoto/1/81(H1N1); 2, A/Bangkok/10/83(H1N1); 3, A/Yamagata/120/86(H1N1); 4, A/Philippines/2/82(H3N2); 5, A/Sichuan/2/87(H3N2); 6, A/Hiroshima/2/90(H3N2); 7, B/Ibaraki/2/85; 8, B/Yamagata/16/88; 9, B/Hiroshima/10/88; 10, parainfluenza type-1(PIV1); 11, PIV2; 12, PIV3; 13, adenovirus type-3; 14 negative control(throat swab obtained from a healthy adult).

2. 混合プライマーを用いたPCR法の感度

混合プライマーを用いたPCR法の感度を確かめるために、先に述べたインフルエンザウイルス9株について、それらの発育鶏卵感染しょう尿液を10倍階段希釈し、ブランク法により感染価を求めるとともに、PCR法でウイルス遺伝子を検出できる限界希釈を求め、それらの成績を比較した (Table 2)。その結果、1st PCR後の検出感度は、検体50 μ l当たり20-180 PFU、2nd PCR後のそれは0.8-8.5 PFUであった (Table 2)。

考察

通常行われているPCR法は、1対の特異的なプライマー・ペアを用いて、検査材料中に存在する目的の遺伝子配列を増幅・検出する方法が一般的である。しかし、そうした方法では、検査材料中に目的とする遺伝子が複数存在する可能性が考えられる場合には、それぞれに対するPCRの反応系を用意する必要がある。そのため最近では、PCRの際にプライマーを混合して用いることで、一度に異なるウイルスを検出しようとする試みが行われ、良好な成績が報告されている [18-21]。今回我々は、現在日本を含めた世界中で流行を繰り返しているH1N1型、H3N2型およびB型の異なる3つのインフルエンザウイルスを、一本の反応チューブ内で検出・同定する方法を開発した。我々のPCR法では、プライマーを混合して使用しているにもかかわらず、目的とする各(亜)型のインフル

Table 2. Sensitivity of RT-PCR for influenza HA gene determined by using mixed primers

Virus type (subtype)	Strain	Minimum detectable infective titer (PFU/50 μ l) ^a	
		1st PCR	2nd PCR
A(H1N1)	A/Kyoto/1/81	80	0.8
	A/Bangkok/10/83	20	2.0
	A/Yamagata/120/86	180	1.8
A(H3N2)	A/Philippines/2/82	32	3.2
	A/Sichuan/2/87	160	1.6
	A/Hiroshima/2/90	40	4.0
B	B/Ibaraki/2/85	85	8.5
	B/Yamagata/16/88	25	2.5
	B/Hiroshima/10/88	50	5.0

^aMinimum detectable infective titer of the RT-PCR was calculated from the infective titers obtained from the plaque assay.

ンザウイルスのHA遺伝子のみが増幅しており (Fig. 3), その特異性が確かめられた. また, その際の検出感度は, 1st PCR 後で検体 50 μ l 当たり 20-180 PFU, 2nd PCR 後で 0.8-8.5 PFU であった (Table 2). 通常, インフルエンザウイルスが分離された患者の咽頭ぬぐい液 50 μ l 中には, 15-250 PFU 程度のウイルス粒子が存在すると言われている [22] ことと併せ考えると, 今回示した PCR 法は分離法と同程度, あるいはそれ以上の感度でインフルエンザウイルスを検出できると考えられる.

インフルエンザウイルスの PCR 法においては, 検出感度およびその特異性を上げる目的で nested PCR 法を実施している報告もある [14]. しかし nested PCR 法は, 検体相互の汚染の可能性を増加させることから [10], 我々は, あえて nested PCR 法を採用しなかった. 今回我々が示した方法では cDNA の合成から 2nd PCR まで一本の反応チューブで操作をおこなえるために, 検体の相互汚染の可能性は nested PCR 法に比べて, より低いと考えられる.

インフルエンザウイルスの検査に PCR 法を用いる利点の 1 つは, 迅速に検査結果を得られることである. 従来から行われている発育鶏卵や培養細胞を用いてウイルスを分離する方法では, 検査結果を得るまでに長期間を要してしまう. しかし我々の方法では, 2nd PCR を行っても, 検査開始後 24 時間以内には検査結果が得られ, 検査の迅速化が図られると考えられる.

以上のように, 今回我々が示した混合プライマーを用いた PCR 法は, 操作が簡便で, 迅速かつ特異的, 高感度にインフルエンザウイルスを検出できる方法であることから, 集団発生のような突発的な事例での迅速診断に, あるいは流行初期の病因ウイルスの (亜)

型の決定に特に有用な検査法と考えられる.

文 献

- [1] Daisy, J.A., F.S.Life, and H.M.Friedman (1979): Rapid diagnosis of influenza A infection by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adults. *J.Clin.Microbiol.*, 9:688-692.
- [2] Fulton, R.E. and P.J.Middleton (1974): Comparison of immunofluorescence and isolation techniques in the diagnosis of respiratory viral infections of children. *Infect. Immun.*, 10:92-101.
- [3] Spada, B., K.Biehler, P.Chegas, J.Kaye, and M. Riepenhoff-Talty (1991): Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children. *J. Virol. Methods*, 33:305-310.
- [4] Coonrod, J.D., R.F.Betts, C.C.Linnemann, and L.C.Hsu (1984): Etiological diagnosis of influenza A virus by enzymatic radioimmunoassay. *J.Clin. Microbiol.*, 19:361-365.
- [5] Coonrod, J.D., P.Karathanasis, R.F.Betts, and J.C. Donofrio. (1988): Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigens for clinical diagnosis of influenza. *J.Med.Virol.*, 25:399-409.
- [6] Döller, G., W.Schuy, K.Y.Tjhen, B.Stekeler, and H.-J.Gerth (1992): Direct detection of

- influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding. *J.Clin.Microbiol.*, 30:866-869.
- [7] Saiki, R.K., D.H.Gelfand, S.Stoffel, S.J.Scharf, R.Higuchi, G.T.Horn, K.B.Millins, H.A.Erlich (1988):Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:478-491.
- [8] Wright, P.A.and D.Wynford-Thomas (1990): The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J.Pathol.* 162:99-117.
- [9] Bressoud, A., J.Whitcomb, C.Pourzand, O.Haller, and P.Cerutti (1990):Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167:425-430.
- [10] Claas, E.C.J., M.J.W.Sprenger, G.E.M.Kleter, R.Van Beek, W.G.V.Quint, and N.Masurel (1992):Type-specific identification of influenza viruses A, B, and C by the polymerase chain reaction. *J.Virol.Methods*, 39:1-13.
- [11] Yamada, A., J.Imanishi, E.Nakajima., K.Nakajima, and S.Nakajima (1991):Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, 35:259-265.
- [12] Zhang, W.and D.H.Evans (1991):Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J.Virol. Methods*, 33:165-189.
- [13] Krystal, M., R.M.Elliott, E.W.Berz, J.F.Young, and P.Palese (1982):Evolution of influenza A and B viruses:Conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 79:4800-4804.
- [14] Nakajima, S., K.Nakamura, F. Nishikawa, and K.Nakajima (1991): Genetic relationship between the HA genes of type A influenza viruses isolated in off-seasons and later epidemic seasons. *Epidemiol.Infect.*, 106:383-395.
- [15] Nakajima, S., F.Nishikawa, K.Nakamura, and K.Nakajima (1992): Comparison of the HA genes of type B influenza viruses in herald waves and later epidemic seasons. *Epidemiol. Infect.*, 109:559-568.
- [16] Verhoeyen, M., R.Fang, W.M.Jou, R.Devos, D.Huylebroeck, E.Saman, and W.Fiers (1980): Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. *Nature*, 286:771-776.
- [17] Winter, G., S.Fields, and G.G.Brownlee (1981): Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. *Nature*, 292:72-75.
- [18] Kimura, H., M.Shibata, K.Kuzushima, K.Nishikawa, Y.Nishiyama, and T.Morishima (1990): Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med.Microbiol. Immunol.*, 179:177-184.
- [19] Kirisawa, R., A.Endo, H.Iwai, and Y.Kawakami (1993):Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet.Microbiol.*, 36:57-67.
- [20] Nakajima, H., M.Inoue, T.Mori, K.Itoh, E.Arakawa, and H.Watanabe (1992): Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J.Clin.Microbiol.*, 30:2484-2486.
- [21] Tsai, Y.-L., B.Tran, L.R.Sangermano, and C.J.Palmer (1994): Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2400-2407.
- [22] 中村和幸, 西沢修一 (1980): 細胞の浮遊培養および浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離について, *感染症誌*, 54:306-312.

