

## 鳥インフルエンザウイルス PCR 検査の検討

紀北家畜保健衛生所  
○黒田順史 鳩谷珠希  
豊吉久美 松田基宏

### 【目的】

鳥インフルエンザウイルスの確定診断はウイルス分離が基本になるが、近年防疫処置の迅速化のため、ウイルス分離を待たずに PCR 検査の結果で防疫対応が開始され、PCR 検査の重要性が増してきている。

PCR の陽性コントロールとして動物衛生研究所（動衛研）から RNA が配付されているが、実際、PCR を行うには気管スワブおよびクロアカスワブから RNA を抽出して実施することから、RNA の抽出感度によって PCR の結果が異なってくるとも考えられる。そこで、RNA の抽出キットの種類により感度が異なるのか比較検討した。また、PCR 検査、簡易キット、ウイルス分離について、検査ごとの検出感度の比較および PCR 検査時間の短縮について検討し、発生に備えた検査態勢の整備を行った。

### 【材料および方法】

材料は、昨年度和歌山県内で発生した鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の気管スワブプール材料を PBS で 10 倍段階希釈して用いた。RNA 抽出キットには、当所で使用している 3 種類のキット（A：ISOGEN-LS（ニッポンジーン）、B：QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）、C：RNeasy Mini Kit（QIAGEN））を使用した。

今回は、次の 3 項目のことについて比較検討した。

- ① RNA 抽出キットの違いによる PCR 検査感度の比較
  - ② コンベンショナル PCR 検査・リアルタイム PCR 検査・ウイルス分離・簡易キットの検出感度の比較
  - ③ PCR 検査時間の短縮
- ①の方法は、材料から各キットの使用 방법에準じて RNA を抽出後、従来から当所で実施している one-step PCR 検査を実施し、何倍希釈まで検出可能か調査するとともに、作業時間および単価についても調査した。
- ②の方法は、①で使用した材料を RNA 抽出キット B で抽出し、その RNA を用いて、one-step PCR 検査は、TaKaRa の試薬と Lee らの H5 プライマー（H5-155 f : aca cat gcy car gac ata ct、H5-699r : cty tgr tty agt gtt gat gt）を用いて行い、two-step PCR 検査は PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time) を用いて RNA から cDNA を合成後、TaKaRa の試薬と Lee らの H5 プライマーを用いて当所で従来から行われている方法で実施した。また、リアルタイム PCR 検査は、動衛研から配付された試薬を用いて実施した。ウイルス分離は 10 日齢発育鶏卵を用いて、材料を 0.2ml 尿膜腔内に接種し実施した。簡易キットはエスプラインを

用いて実施した。

③の方法は、Lee らの H5 プライマーを用いて one-step PCR の反応条件を図 1 に示すように少し条件を変更して PCR を行った。また、通常の PCR 検査に使用している平成 8 年度に購入した古いサーマルサイクラーとリアルタイム PCR に使用している平成 20 年度に購入した新しいサーマルサイクラーを用いて PCR を実施し、検査に要した時間を測定した。

## 【結果】

①の結果については、A,B,C3 種類のキットすべてで 10 倍希釈まで検出でき、同等の感度であった (図 2)。

作業時間と単価は、表 1 の通り単価が高いものほど作業時間が短い結果であった。

②について、リアルタイム PCR では、Ct 値で H5 については 10 倍希釈まで検出でき、鳥インフルエンザウイルスに共通の NP 遺伝子については 100 倍希釈まで検出できたが、波形がわかりづらく、これだけで判定は難しいため (図 3)、リアルタイム PCR 産物を電気泳動した (図 4)。結果は、リアルタイム PCR 産物の電気泳動がもっとも感度が良く 100 倍希釈まで検出でき、続いて発育鶏卵を用いたウイルス分離とコンベンショナル PCR 検査が 10 倍希釈まで検出でき、簡易キットがもっとも感度が低く原液のみ検出可能であった (表 2)。コンベンショナル PCR 検査は one-step PCR 検査のほうが良好で two-step PCR 検査ではバンドが検出されなかった。two-step PCR の反応液を変更することで、バンドが検出できるようになったが、one-step PCR 検査のほうが安定していて、コンタミも少ないことから、当所では鳥インフルエンザの PCR 検査は one-step PCR 検査を用いることにした。

③の結果は、one-step PCR 検査の条件を変更することで、2 時間 50 分かかったものが、2 時間 35 分で終了し、15 分ほどの時間短縮になった。PCR 産物を電気泳動した結果、同様にバンドが検出された (図 5)。また、サーマルサイクラーの比較では、古いサーマルサイクラーで 2 時間 35 分かかったものが、新しいサーマルサイクラーでは、2 時間 10 分と 25 分ほどの時間短縮になり、最初の検査時間から 40 分ほどの時間短縮になった。

## 【考察】

RNA 抽出キットの違いによる PCR 検査の感度にはほとんど差は無く、どのキットを使用しても問題ないと思われた。

鳥インフルエンザウイルスの検査では、リアルタイム PCR でも電気泳動が必要であると思われた。また、鳥インフルエンザウイルスの PCR 検査とウイルス分離ではほとんど感度に差が無く、PCR 検査は決して感度が低いわけではないと思われた。また、one-step PCR とリアルタイム PCR を併用することで、迅速で確実な診断を行えることが確認できた。

検査時間の短縮結果から、PCR 検査の時間短縮のためにも、新しいサーマル

サイクラーを購入する必要があると思われた。

今年度の鳥インフルエンザウイルス PCR 検査態勢はリアルタイム PCR と one-step PCR を併用して行い、検体数が 10 検体ほどであれば、検査時間も約 5 時間で行えるような態勢で行いたい（図 6）。