

【短報】

病原体サーベイランスにおけるウイルス検査法の検討 (2021 年度)

徳島県立保健製薬環境センター

林 愛美・川上 百美子

Studies of Virus Detection Methods in Pathogen Surveillance (2021)

Manami HAYASHI and Yumiko KAWAKAMI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

当センターでは、5 類定点把握感染症の検査について、現在約 20 項目もの PCR 検査を個別に実施しているが、原因ウイルス特定までに数日を要し、検査迅速性が課題となっている。そこで、従来の検査法を改良し、呼吸器系疾患の原因ウイルスとして考えられる、8 種類のウイルス（インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス 1~3 型 (PIV1~3)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、RS ウイルス (RSV)、ヒトパレコウイルス (HPeV)、アデノウイルス (AdV)、EB ウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)) について、複数のウイルスを同時に検出できる Multiplex PCR 法の導入及びリアルタイム PCR 法の反応条件統一を検討し、原因ウイルスを検出する迅速検査法の確立を試みた。

Key words : 感染症発生動向調査事業 National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases Program, 呼吸器系疾患 Respiratory Diseases, Multiplex PCR, リアルタイム PCR real-time PCR

I はじめに

感染症発生動向調査事業は、昭和 56 年から開始され、平成 11 年 4 月に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律¹⁾」（平成 10 年法律第 114 号。以下「感染症法」という。）が施行されたことに伴い、感染症法に基づく施策として位置づけられている。

徳島県では、多様な感染症の発生及び蔓延を防止することを目的として、平成 15 年 3 月に「徳島県感染症発生動向調査実施要綱²⁾」を制定し、感染症の発生情報を県民や医療機関へ迅速に提供・公開している。

当センターは、県内の発生動向調査の病原体定点医療機関から搬入された 5 類定点把握感染症の検体について、原因と考えられる病原体の検査を実施し、その結果を医療機関等へ還元している。ウイルス検査については、現在約 20 項目もの

PCR 検査を実施しており、特に呼吸器系疾患については原因ウイルスが多く、検査に要する時間が課題となっている。

本研究では、8 種類の呼吸器系疾患ウイルスの検出方法について、Multiplex PCR 法の導入とリアルタイム PCR 法の反応条件の統一化を検討し、迅速かつ簡便な検査法を確立したので、その結果を報告する。

II 材料及び方法

1 材料

2017 年 8 月から 2021 年 12 月に、病原体定点医療機関から搬入された 95 検体（鼻咽頭拭い液 81 検体、糞便 12 検体及び髄液 2 検体）を検査材料とした。

また、各ウイルスの陽性コントロールは、過去に当センターで陽性となった検体のウイルス RNA 又は DNA を用いた。

2 方法

(1) 前処理

鼻咽頭拭い液は、3,000 rpm、10 分間遠心後の上清をフィルター（孔径 0.45 μm）濾過し、これを抽出用検体とした。

糞便は PBS (-) で 10% 乳剤とし、4°C、10,000 rpm、10 分間冷却遠心後の上清をフィルター（孔径 0.45 μm）濾過し、これを抽出用検体とした。

髄液は無処理のものを、そのまま抽出用検体とした。

(2) 遺伝子抽出

遺伝子抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。RNA は PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行った。

(3) Multiplex PCR 法

Multiplex PCR 反応には QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN) を用いて、表 1 に示すプライマーセット³⁻⁷⁾を含む反応液にテンプレート 2.5 μL を加え、全量 25 μL とした。

なお、C セットについては、反応性向上のため、1st, Nested

PCR のいずれも QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit 付属の 5x Q-solution を添加した。

反応条件は、94°C 1 分、(94°C 30 秒、57°C 1 分、72°C 1 分) ×40 回、72°C 10 分、4°C over night とした。

電気泳動には 1.5 又は 2% アガロースゲルを用い、PCR 増幅産物の電気泳動を行った後、イルミネーターで各増幅産物のバンドサイズの確認を行った。

また、新たに陽性バンドが検出された検体については、ダイレクトシーケンスによりウイルスの同定を行った。

(4) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 反応には AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher) を用い、表 2 に示すプライマープローブセット⁸⁻¹⁰⁾を含む反応液にテンプレートを加え、全量 25 μL とした。

反応条件は、インフルエンザウイルス検出・型別及び RSV 検出系では、48°C 10 分、95°C 5 分、(95°C 15 秒、55°C 1 分) ×45 回とし、RSV 型別系では、50°C 10 分、95°C 10 分、(95°C 15 秒、58°C 1 分) ×40 回とした。

表 1 呼吸器系疾患ウイルス Multiplex PCR 使用プライマー

1st PCR						
セット	検出ウイルス	プライマー	配列 (5'→3')	濃度 (μM)	バンドサイズ (bp)	出典
A	PIV1	PIP1+	CCT TAA ATT CAG ATA TGT AT	0.5	478	3)
		PIP1-	GAT AAA TAA TTA TTG ATA CG	0.5		
	PIV2	PIP2+	AAC AAT CTG CTG CAG CAT TT	0.5	508	
		PIP2-	ATG TCA GAC AAT GGG CAA AT	0.5		
	PIV3	PIP3+	CTG TAA ACT CAG ACT TGG TA	0.5	478	
		PIP3-	TTT AAG CCC TTG TCA ACA AC	0.5		
hMPV	hMPV-1f	CTT TGG ACT TAA TGA CAG ATG	1.0	450	4)	
	hMPV-1r	GTC TTC CTG TGC TAA CTT TG	1.0			
B	HPeV	VP3/VP1-1F	GAY AAT GCY ATM TAY ACW ATY TGT GA	1.0	433	5)
		VP3/VP1-1R	ACW GTR AAR ATR TCH ACA TTS ATD G	1.0		
AdV*	AdnU-S'2	AdnU-S'2	TTC CCC ATG GCN CAC AAY AC	0.2	554	6)
		AdnU-A2	TGC CKR CTC ATR GGC TGR AAG TT	0.2		
C	EBV	p23-1	ATC AGA AAT TTG CAC TTT CTT TGC	0.2	482	7)
		p23-2	CAG CTC CAC GCA AAG TCA GAT TG	0.2		
CMV	CMVOF	CMVOF	AAG GTT CGA GTG GAC ATG GT	0.2	396	
		CMVOR	CAG CCA TTG GTG GTC TTA GG	0.2		
Nested PCR						
A	PIV1	PIS1+	CCG GTA ATT TCT CAT ACC TAT G	0.5	317	3)
		PIS1-	CTT TGG AGC GGA GTT GTT AAG	0.5		
	PIV2	PIS2+	CCA TTT ACC TAA GTG ATG GAA T	0.5	204	
		PIS2-	GCC CTG TTG TAT TTG GAA GAG A	0.5		
	PIV3	PIS3+	ACT CCC AAA GTT GAT GAA AGA T	0.5	103	
		PIS3-	TAA ATC TTG TTG TTA AGA TTG	0.5		
hMPV	hMPV-2f	hMPV-2f	CAT GCC GAC CTC TGC AGG AC	0.5	357	4)
		hMPV-2r	ATG TTG CAY TCY YTT GAT TG	0.5		
B	HPeV	VP3/VP1-2F	TTY TCM ACH TGG ATG MGG AAR AC	0.5	304	5)
		VP3/VP1-2R	DGG YCC ATC ATC YTG WGC TGA	0.5		
C	EBV	p23-3	TTG ACA TGA GCA TGG AAG AC	0.5	363	7)
		p23-4	CTC CTG GTC GTG TTC CCT CAC	0.5		
CMV	CMV1F	CMV1F	GAG CCT TTC GAG GAG ATG AA	0.3	229	
		CMV1R	GGC TGA GTT CTT GGT AAA GA	0.3		

*AdVは1st PCRのみ

表2 リアルタイム PCR 使用プライマー・プローブ

インフルエンザウイルス検出・型別 / RSV検出系				
検出ウイルス	プライマー・プローブ	配列 (5'→3')	濃度 (μM)	出典
A型同定用	MP-39-67For	CCM AGG TCG AAA CGT AYG TTC TCT CTA TC	0.6	
	MP-183-153Rev	TGA CAG RAT YGG TCT TGT CTT TAG CCA YTC CA	0.6	
	MP-96-75ProbeAs	FAM- ATY TCG GCT TTG AGG GGG CCT G -MGB	0.1	
AH1pdm09 亜型同定用	NIID-swH1 TM Primer-F1	AGA AAA GAA TGT AAC AGT AAC ACA CTC TGT	0.6	
	NIID-swH1 TM Primer-R1	TGT TTC CAC AAT GTA RGA CCA T	0.6	
	NIID-swH1 Probe2	FAM- CAG CCA GCA ATR TTR CAT TTA CC -MGB	0.1	
H3亜型同定用	NIID-H3 TM Primer-F1	CTA TTG GAC AAT AGT AAA ACC GGG RGA	0.6	
	NIID-H3 TM Primer-R1	GTC ATT GGG RAT GCT TCC ATT TGG	0.6	
	NIID-H3 Probe1	FAM- AAG TAA CCC CKA GGA GCA ATT AG -MGB	0.1	
Influ	NIID-B TM Primer-F1	GGA GCA ACC AAT GCC AC	0.6	8)
	NIID-B TM Primer-R1	GTK TAG GCG GTC TTG ACC AG	0.6	
	NIID-B Probe1	FAM- ATA AAC TTT GAA GCA GGA AT -MGB	0.1	
B型同定用	TypeB HA F3vic v2	CCT GTT ACA TCT GGG TGC TTT CCT ATA ATG	0.6	
	TypeB HA R3vic v2	GTT GAT ARC CTG ATA TGT TCG TAT CCT CKG	0.6	
	FAM-Type B HA Victoria	FAM- TTA GAC AGC TGC CTA ACC -MGB	0.1	
B型ビクトリア系統 同定用	TypeB HA F3yam v2	CCT GTT ACA TCC GGG TGC TTY CCT ATA ATG	0.6	
	TypeB HA R3yam v2	GTT GAT AAC CTK ATM TTT TCA TAT CCT CTG	0.6	
	FAM-Type B HA Yamagata2	FAM- TCA GRC AAC TAC CCA ATC -MGB	0.1	
RSV RSV検出用	Forward	GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA	0.5	
	Reverse	TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G	0.3	9,11)
	Probe	FAM- CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT -BHQ	0.15	
RSV型別系				
RSV(A)同定用	Forward	GGA AAC ATA CGT GAA CAA GCT TCA	0.9	
	Reverse (A)	CAT CGT CTT TTT CTA GGA CAT TGT ATT	0.9	
	Probe	FAM-TGT GTA TGT GGA GCC TT-MGB	0.2	10,11)
RSV(B)同定用	Forward	GGA AAC ATA CGT GAA CAA GCT TCA	0.9	
	Reverse (B)	TCA TCA TCT TTT TCT AGA ACA TTG TAC TGA	0.9	
	Probe	FAM-TGT GTA TGT GGA GCC TT-MGB	0.2	

III 結果及び考察

1 検出限界の検討

Distilled Water (DW) を用いて各ウイルス陽性コントロールの段階希釈系列を作製し、従来法と変更法の各ウイルス遺伝子検査を行った際の検出限界の結果を表3に示す。ウイルス遺伝子の検出感度は、従来法と同等もしくはそれ以上であることが確認できた。

表3 各ウイルス陽性コントロールの検出限界

	Multiplex PCR法			
	1st PCR		Nested PCR*	
	従来法	変更法	従来法	変更法
PIV1	<10 ⁰ 倍	<10 ⁰ 倍	10 ⁻² 倍	10 ⁻⁴ 倍
PIV2	<10 ⁰ 倍	10 ⁰ 倍	10 ⁻³ 倍	10 ⁻³ 倍
PIV3	10 ⁰ 倍	10 ⁻³ 倍	10 ⁻⁶ 倍	10 ⁻⁹ 倍
hMPV	10 ⁻³ 倍	10 ⁻³ 倍	10 ⁻⁴ 倍	10 ⁻⁵ 倍
HPeV	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁷ 倍
AdV	10 ⁻³ 倍	10 ⁻³ 倍	—	—
EBV	10 ⁰ 倍	10 ⁰ 倍	10 ⁻⁴ 倍	10 ⁻⁵ 倍
CMV	10 ⁰ 倍	10 ⁻² 倍	10 ⁻⁹ 倍	10 ⁻¹⁰ 倍
リアルタイムPCR法				
	従来法	変更法		
Influ	Influ A	10 ⁻³ 倍	10 ⁻⁴ 倍	
	H1pdm09	10 ⁻³ 倍	10 ⁻⁴ 倍	
	H3	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁵ 倍	
	Influ B	10 ⁻⁶ 倍	10 ⁻⁷ 倍	
	ビクトリア	10 ⁻⁴ 倍	10 ⁻⁴ 倍	
RSV	山形	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁶ 倍	
	RSV(A)	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁶ 倍	
	RSV(B)	10 ⁻⁵ 倍	10 ⁻⁵ 倍	

*従来法、変更法ともにテンプレートは変更法の1st PCR産物とした

従来法では、各ウイルスを Single PCR 法で検出していたが、Multiplex PCR 法の導入により、複数のウイルスが同時に検査可能となった。さらに、Multiplex PCR 法では、A~Cセットの1st及びNested PCRの反応条件が全て統一され、1台のサーマルサイクラーでの対応が可能となった。

また、これまで Single PCR 法で検出していた RSV を国立感染症研究所 病原体検出マニュアル¹¹⁾記載のリアルタイム PCR 法に変更するにあたり、従来のインフルエンザウイルス検出系の反応条件を RSV 検出系と統一することで、反応時間が約1時間程度短縮し、検査の迅速化に繋がった。

2 既知検体での妥当性評価

2017年8月から2021年12月までに病原体定点医療機関から搬入された、含有ウイルス既知の95検体(鼻咽頭拭い液81検体、糞便12検体及び髄液2検体)を用いて、Multiplex PCR法及びリアルタイムPCR法の妥当性評価を行った結果を表4に示す。

妥当性評価の結果、HPeV及びCMVを除く全てのウイルスで、従来法と変更法の結果一致率が100%であった。HPeV及びCMVについては、結果一致率がそれぞれ91.7%及び72.7%であったが、これは従来法で陰性だったものが変更法で陽性となったためである。これらのウイルスは、陽性コントロールを用いた検出限界の検討で、従来法よりも変更法で検出感度が上昇することが認められており、従来法で検出で

きなかった検体についても、変更法で検出できたことによるものとする。また、CMV は初感染を受けた乳幼児では、不顕性感染の形で数年に渡って排出される¹²⁾ ため、他のウイルスと比較して検出率が高くなったと考えられる。

変更法で新たに HPeV 陽性となった検体について、ダイレクトシーケンスによりウイルスの同定を行った結果、全て HPeV-1 であった。CMV についても、新たに陽性となった検体について、ダイレクトシーケンスにより目的ウイルスであることを確認している。

表 4 既知検体を用いた妥当性評価

ウイルス	検体数	従来法		変更法		一致率(%)
		陽性	陰性	陽性	陰性	
PIV1	40	4	36	4	36	100
PIV	PIV2	0*	40	0	40	100
	PIV3	12	28	12	28	100
	hMPV	4	19	4	19	100
HPeV	36	3	33	6	30	91.7
AdV	34	2	32	2	32	100
EBV	19	2	17	2	17	100
CMV	22	1	21	7	15	72.7
Influ	H1pdm09	6	34	6	34	100
	H3	6	34	6	34	100
	ビクトリア	6	34	6	34	100
	山形	6	34	6	34	100
RSV	RSV(A)	3	21	3	21	100
	RSV(B)	7	17	7	17	100

*PIV2は陽性コントロールとした1検体以外は、当センターでの陽性検体無し

IV まとめ

呼吸器系疾患ウイルスを迅速かつ簡便に検出する検査法として、Multiplex PCR 法の導入とリアルタイム PCR 法の反応条件の統一化を検討した。

Multiplex PCR 法では、全ての反応条件の統一により、1 台のサーマルサイクラーで対応可能となったことで、他の検査も並行して実施しやすい環境が整備された。

リアルタイム PCR 法についても、変更法では、従来の反応時間よりも 1 時間程度短縮され、さらにインフルエンザウイルスと RSV が同時に検出可能となり、検査効率が向上した。

また、従来よりも検出感度が上昇したウイルスについては、これまでよりも検出率が向上することが期待される。ただし、CMV のような多くの小児が保有しているウイルスでは、原因ウイルスでなくても検出される可能性があるため、他のウイルスの検出状況や症状等を考慮して、総合的に判断する必要がある。

今後の研究では、Multiplex PCR 法の反応時間短縮や検出ウイルスの拡充を検討し、さらなる迅速検査法の確立を目指したい。

参考文献

- 1) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律, 平成 10 年法律第 114 号
- 2) 徳島県感染症発生動向調査実施要綱, 令和 3 年 4 月改正
- 3) Juan E. Echevarría, Dean D. Erdman, Ella M, Swierkosz, *et al.* : Simultaneous Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, and 3 from Clinical Samples by Multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (5), 1388-1391 (1998)
- 4) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル ヒトメタニューモウイルス, 平成 20 年 7 月 (2008)
- 5) H. Harvala, I. Robertson, E. C. McWilliam Leitch, *et al.* : Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (10), 3446-3453 (2008)
- 6) Rika Miura-Ochiai, Yasushi Shimada, Tsunetada Konno, *et al.* : Quantitative Detection and Rapid Identification of Human Adenoviruses, *Journal of Clinical Microbiology*, **45** (3), 958-967 (2007)
- 7) C. J. McIver, C. F. H. Jacques, S. S. W. Chow, *et al.* : Development of Multiplex PCRs for Detection of Common Viral Pathogens and Agents of Congenital Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, **43** (10), 5102-5110 (2005)
- 8) 国立感染症研究所: インフルエンザ診断マニュアル (第 4 版), 平成 30 年 12 月 (2018)
- 9) Alicia M Fry, Malinee Chittaganpitch, Henry C Baggett, *et al.* : The Burden of Hospitalized Lower Respiratory Tract Infection due to Respiratory Syncytial Virus in Rural Thailand, *PLoS ONE*, **5** (11), e15098 (2010)
- 10) Jane Kuypers, Nancy Wright, Rhoda Morrow : Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children, *Journal of Clinical Virology*, **31**, 123-129 (2004)
- 11) 国立感染症研究所: ヒトオルソニューモウイルス (RSウイルス) 病原体検出マニュアル2.0版, 令和2年6月 (2020)
- 12) 国立感染症研究所: IDWR 2003 年第 15 号, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/407-cmv-intro.html> (2022 年 7 月 11 日)