

PCR 法によるインフルエンザ感染症の迅速診断 —インフルエンザウイルス HA 遺伝子のうがい液からの検出—

¹⁾愛知県衛生研究所, ²⁾国立公衆衛生院, ³⁾名古屋市立大学医学部

森下 高行 小林 慎一 三宅 恭司 石原 佑式
磯村 思无¹⁾ 中島 節子²⁾ 中島 捷久³⁾

(平成 4 年 2 月 17 日受付)

(平成 4 年 3 月 6 日受理)

Key words: PCR, influenza virus, detection of HA gene, rapid diagnosis

要 旨

インフルエンザウイルス感染症診断の PCR 法による迅速性, 有用性の確立を目的としインフルエンザウイルス AH1, AH3, B 型それぞれの HA 遺伝子検出のためのプライマーを作製し, その検出感度, 特異性について検討した. また, インフルエンザウイルス集団発生から得られたうがい液から PCR 法によりインフルエンザウイルス HA 遺伝子の検出を試み, MDCK 細胞による分離と比較有用性を検討した.

今回, 我々が作製した 3 種類のプライマー対は亜型および型特異性を示し, いずれのプライマーも他の亜型, 型のインフルエンザウイルスに対し特異バンドを示さなかった. 検出感度は H1 プライマーでは 2pfu/50 μ l, H3 では 3.5pfu/50 μ l, B は 1.1pfu/50 μ l であった. PCR 法によるうがい液からのインフルエンザ遺伝子の検出率は MDCK 細胞によるウイルス分離率と比較し 2 ~ 3 倍高く, PCR 法のインフルエンザ感染症診断における迅速性, 有用性が示唆された.

序 文

インフルエンザウイルスは冬期に, 短期間で爆発的な流行を引き起こす. このため特に流行早期の病因ウイルスの決定が流行状況の把握や防疫対策のため要求される. インフルエンザウイルスの迅速診断法としては ELISA 法¹⁾²⁾, IF 法³⁾による臨床材料からの検出が既に報告されているが検出感度およびその精度が問題とされている. 最近, 臨床材料から PCR 法による A 型インフルエンザウイルスの検出が報告されている⁴⁾⁵⁾. しかし, B 型についてはそのような報告はない. また PCR 法による HA 遺伝子の検出と従来から行われているウイルス分離法を比較した報告はこれまで AH3 型についてのみである. 比較対象のうがい液

はインフルエンザ様疾患患者のうがい液について行われ小学校などの閉鎖集団における比較検討は行われず検出感度とウイルス分離率はほぼ同程度とされている. そこで我々は PCR 法によるインフルエンザ感染症診断の迅速性, 有効性を確立するため A 型インフルエンザウイルス (H1, H3) と B 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子のプライマーを作製し, プライマーの特異性, 検出感度についても検討すると共に過去にインフルエンザウイルスによることが確認されている集団発生の際, 採取された 63 件のうがい液について PCR 法による HA 遺伝子の検出と MDCK 細胞によるウイルス分離の比較検討を行った.

材料と方法

1) RNA の調製

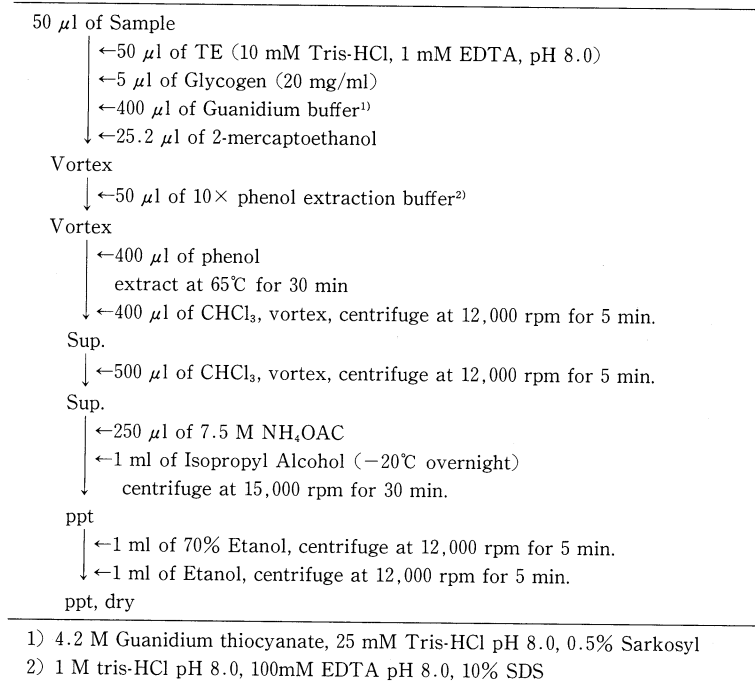
Fig. 1 に RNA の調製方法を示した. 検体 50 μ l

別刷請求先: (〒462) 名古屋市北区辻町字流 7-6

愛知県衛生研究所

森下 高行

Fig. 1 Preparation of RNA



よりグアニジン、ホットフェノール法により RNA を抽出、イソプロパノール沈殿により RNA をベレットとした。

2) プライマー

AH1, AH3, B 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子のうち過去の遺伝子情報^{6)~11)}をもとに変異のない領域を選び、それぞれ20塩基のプライマーを作製した (Table 1)。

3) cDNA の調製

cDNA はベレットを14.5 μ l の RT 反応液(最終濃度: RT reaction buffer [10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% (W/V) gelatin], 1.25 μ M sense primer) に溶解し 100°C, 2 分間, 37°C, 15分間インキュベートした。40U RNasin (生化学工業), 7U AMV RT (生化学工業), 100mM DTT 1 μ l, 10mM dNTPs 2 μ l

Table 1 Originucleotide primers for PCR amplification of influenza viruses

Virus type	Position	Sequence	Amplimer length (bp)
AH1	921-940 ¹⁾	5'-CAA AGA CCC CAG GGA GCT AT-3'(+)	450
	1,351-1,370 ¹⁾	5'-CAG TAG AAC CAA CAA TTC TG-3'(-)	
AH3	337-356 ²⁾	5'-TTG TTG AAC GCA GCA AAG CT-3'(+)	727
	1,047-1,063 ²⁾	5'-TCT AGT TTG TTT CTC TGG TA-3'(-)	
B	402-421 ³⁾	5'-AAT CTT CTC AGA GGA TAT GA-3'(+)	549
	931-950 ³⁾	5'-TCT GCT TCA CCA ATT AAA GG-3'(-)	

1) The nucleotide bases are numbered according to the positive strand sequence of A/PR/8/34 (H1N1) HA gene⁶⁾.

2) The nucleotide bases are numbered according to the positive strand sequence of A/Aichi/2/68 (H3N2) HA gene⁹⁾.

3) The nucleotide bases are numbered according to the positive strand sequence of B/Great Lakes/54 HA gene¹¹⁾.

を加え、全量20 μ lとし43 $^{\circ}$ C、60分間インキュベートした。

4) PCR

cDNA 20 μ lのうち10 μ lを使用した。PCR反応液（最終濃度：PCR reaction buffer [10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% (M/V)gelatin], 200 μ M dNTPs, 0.5 μ M primer pairs, 1.25U Taq Polymerase (TAKARA)) 50 μ lの系で行った。温度設定は94 $^{\circ}$ C、5分間インキュベートした後94 $^{\circ}$ C、1分間、55 $^{\circ}$ C、2分間、72 $^{\circ}$ C、3分間で35サイクル実施し、さらに72 $^{\circ}$ C、7分間インキュベートした。(DNA Thermalcycler: Perkin Elmer, Cetus, USA)

HA 特異 DNA バンドの検出は PCR プロダクト 10 μ l を TBE 緩衝液にて作製した 1.5% アガロースゲルを用い電気泳動を行った後、EtBr 染色により HA 特異バンドの検出を行った。

5) PCR の検出感度

使用したウイルスは AH1 型 ウイルス A/Yamagata/120/86, AH3 型 ウイルス A/Sichuan/2/87, B 型 ウイルス B/Yamagata/16/88 の MDCK 培養上清を使用しブラック法によりウイルス力価を測定した。それぞれの培養上清を 10 段階希釈し 10^{-2} ~ 10^{-6} までの希釈液を作製し 50 μ l から RNA を調整した。それぞれのプライマーを用い 1st PCR を行いさらに 2nd PCR を行ったのちウイルス HA 特異 DNA バンドの検出を行った。

6) プライマーの特異性

AH1 型は A/PR/8/34, A/FM/1/47, A/NJ/8/76, A/Bangkok/10/83, A/Yamagata/32/89, AH3 型は A/Victoria/3/75, A/Philippines/2/82, A/Hukuoka/C-29/85, A/Sichuan/2/87, A/Aichi/1/91, B 型は B/Lee/40, B/Kagoshima/1/68, B/Victoria/2/87, B/Yamagata/16/88, B/Aichi/1/90 までのそれぞれ 5 種類の MDCK 培養上清 50 μ l を使用した。

7) うがい液からのウイルス分離と PCR による HA 遺伝子の検出

1986 年から 91 年の間にインフルエンザウイルス集団発生より得られたうがい液 63 件を使用した。

ウイルスの分離は MDCK 細胞を使用し、うがい液 50 μ l を接種し、初代で CPE の認められなかった検体については 2 代継代した。PCR による HA 遺伝子の検出はうがい液から 50 μ l から RNA を抽出、cDNA を作製し PCR を実施した。1 回目の PCR 産物から HA 特異バンドが検出されなかった検体については PCR 産物から 5 μ l とり 50 μ l の系でさらに PCR を行った。

結 果

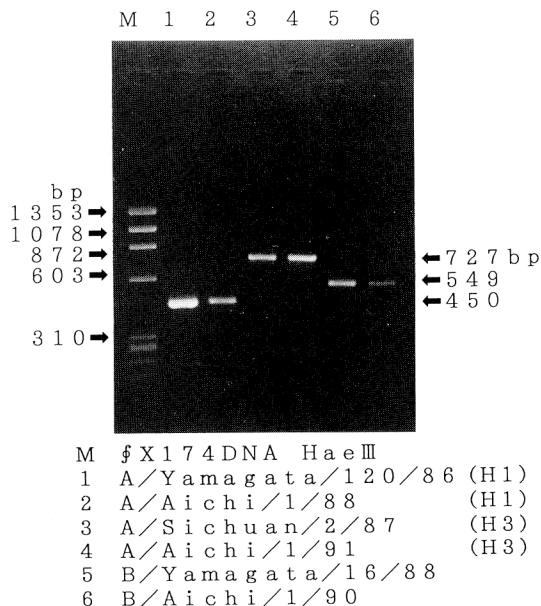
1) プライマーの検出感度

1st PCR において AH1 型は 200pfu/50 μ l, AH3 型は 350pfu/50 μ l, B 型は 110pfu/50 μ l の検出感度を示した。さらに 2nd PCR を行うことにより AH1 型 2.0pfu/50 μ l, AH3 型 3.5pfu/50 μ l, B 型 1.1pfu/50 μ l まで HA 特異 DNA バンドの検出が可能となった。

2) プライマーの特異性

Fig. 2 に今回我々が作製したプライマーを使用し近年、我々が分離したウイルスと標準株 3 種の PCR 後のアガロースゲル電気泳動像を示した。AH1 型ウイルスは 450 bases に、AH3 型ウイルスは 727 bases に、B 型ウイルスは 549 bases に

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of HA gene



HA 特異 DNA バンドを確認することができる。また過去の標準ウイルスに対しても AH1型プライマーは A/PR/8/34, A/FM/1/47, A/NJ/8/76, A/Bangkok/10/83, A/Yamagata/32/89までの MDCK 培養上清に対し450 bases のウイルス特異バンドを, AH3型プライマーは A/Victoria/3/75, A/Philippines/2/82, A/Fukuoka/C-29/85,

A/Sichuan/2/87, A/Aichi/1/91の, B 型プライマーは B/Lee/40, B/Kagoshima/1/68, B/Victoria/2/87, B/Yamagata/16/88, B/Aichi/1/90の MDCK 培養上清に対しそれぞれ727 bases, 549 bases のウイルス特異バンドを認めた。いずれのプライマーも異なった型のウイルスに対して用いられた場合には HA 特異バンドは検出されなかった (Table 2)。

3) インフルエンザウイルスの MDCK 細胞による分離と PCR 法によるウイルス検出の比較 (Table 3)

1. MDCK 細胞によるインフルエンザウイルスの分離

1985/86, 1987/88に採取された AH1型による流行であることが確認された集団23名からは3株 (13.0%) の AH1ウイルスが分離された。1990/91年 AH3型ウイルスによる流行であることが確認された集団20名からは11株 (55%) の AH3型ウイルスが, 1989/90年 B 型ウイルスによる流行であることが確認された集団20名からは8株 (40%) の B 型ウイルスが MDCK 細胞により分離された。

2. PCR 法による HA 遺伝子の検出

AH1型の流行が確認された集団からは1st PCR では2件 (8.7%), AH3型では10件 (50.0%), B 型11件 (55.0%) からそれぞれウイルス特異バンドがアガロースゲル電気泳動により検出された。さらに1st PCR で検出されなかった検体の PCR 産物の1/10を用い, 2nd PCR を行う事により

Table 2 Specificity of primer for PCR

Virus strain	Primer		
	AH1	AH3	B
AH1	A/PR/8/34	+ ¹⁾	- ⁴⁾
	A/FM/1/47	+	-
	A/NJ/8/76	+	-
	A/Bangkok/10/83	+	-
	A/Yamagata/32/89	+	-
AH3	A/Victoria/3/75	-	+ ²⁾
	A/Philippines/2/82	-	+
	A/Hukuoka/C-29/85	-	+
	A/Sichuan/2/87	-	+
	A/Aichi/1/91	-	+
B	B/Lee/40	-	- ³⁾
	B/Kagosima/1/68	-	-
	B/Victoria/2/87	-	-
	B/Yamagata/16/88	-	-
	B/Aichi/1/91	-	-

1) 450 base pair band was visible when samples were amplified using AH1 primers.

2) 727 base pair band was visible when samples were amplified using AH3 primers.

3) 549 base pair band was visible when samples were amplified using B primers.

4) No visible band was detected

Table 3 Comparison for detection of influenza virus in gargle between virus isolation and PCR

Sero type	Number of sample ¹⁾	Isolation positive ²⁾ (%)	Detection of HA gene ³⁾	
			1st PCR (%)	2nd PCR (%)
AH1	23	3(13.0)	2(8.7)	8(34.7)
AH3	20	11(55.0)	10(50.0)	20(100.0)
B	20	8(40.0)	11(55.0)	20(100.0)

1) Samples were obtained from the outbreak of influenza (AH1, AH3, B) in school children.

2) Virus isolation was carried out using MDCK cells.

3) HA gene was detected by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis.

PCR 法による検出率は AH1 型ウイルス侵淫集団は 8 件 (34.7%), AH3 型 20 件 (100%), B 型 20 件 (100%) を示した。また, MDCK 細胞分離陽性で HA 遺伝子の検出されなかったものはなかった。

考 察

インフルエンザウイルスのように冬期短期間に爆発的な流行を引き起こし, さらに経過の早い感染症にとって流行早期の病因ウイルスの決定が防疫上要求される。現在インフルエンザウイルスの分離は MDCK 細胞およびふ化鶏卵法により行われている。MDCK 細胞, ふ化鶏卵法は分離同定までにあらかじめ細胞, ふ化鶏卵が用意されている場合でも早くて 3~4 日の分離同定期間を要する。またインフルエンザウイルス集団発生のように突発的な検体の搬入にそなえ絶えず MDCK 細胞, ふ化鶏卵を用意しておくことは経済的にも労力的にもかなりの負担となる。さらに, インフルエンザウイルス集団発生の初発からはウイルスが分離されにくいことが多い。そこでインフルエンザウイルスの迅速診断法の確立を目的としてインフルエンザ集団発生から得られたうがい液から PCR 法により HA 遺伝子の検出を試み MDCK 細胞によるウイルスが分離法と比較検討を行った。今回我々が作製したプライマーはそれぞれの型, 亜型特異性を示し, AH1 型プライマーは A/PR/8/34, A/FM/1/47, A/NJ/8/76, A/Bangkok/10/83, A/Yamagata/32/89, AH3 型は A/Victoria/3/75, A/Philippines/2/82, A/Fukuoka/C-29/85, A/Sichuan/2/87, A/Aichi/1/91, B 型は B/Lee/40, B/Kagoshima/1/68, B/Victoria/2/87, B/Yamagata/16/88, B/Aichi/1/90 の 5 種類のウイルスに対してウイルス特異バンドを検出した。また検出感度は 1st PCR では AH1 型は 200pfu/50 μ l, AH3 型は 350pfu/50 μ l, B 型は 110 pfu/50 μ l でさらに 2nd PCR を行うとそれぞれ 2.0pfu/50 μ l, 3.5pfu/50 μ l, 1.1pfu/50 μ l であった。これらのプライマーを使用し, 小学校などのインフルエンザウイルス集団発生という閉鎖集団からの MDCK 細胞によるウイルス分離と PCR 法による HA 遺伝子の検出の比較を行った。その結果, 1st PCR においてはほぼ MDCK 細胞と同

程度の検出を示し, 2nd PCR を行うことにより MDCK 細胞で分離陰性の検体も HA 遺伝子が検出された。PCR 法によるウイルス遺伝子の検出率は MDCK 細胞による分離と比較し 2~3 倍の検出率を示し PCR 法の有効性を示唆した。通常ウイルス分離陽性者中のうがい液には $3 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ pfu/ml のウイルス粒子が存在すると言われている¹²⁾。今回我々が作製したプライマーの検出感度を比較してみると 1st PCR で得られる検出感度とはほぼ一致し, さらに 2nd PCR を行うことにより MDCK で分離されるウイルスはすべて 2 回の PCR により検出できると考えられる。PCR 法を用いることにより検体搬入から抗原の検出まで最短 1 日で, 2nd PCR を行うと 1 日半で病因ウイルスの決定が可能となった。このように PCR 法は緊急を要し, また, ウイルスが分離されにくいことが多いインフルエンザウイルスの初発ならびに流行閉期における MDCK 分離陰性の検体においてもウイルスが検出される可能性を示し, インフルエンザウイルスのサーベランスに有用であると考えられる。

文 献

- 1) Berg, P.A., Yolken, R.H., Ronnard, S.I., Dolin, R., Murphy, B.R. & Straus, S.E.: New enzyme immunoassays of influenza A/Victoria/3/75 virus in nasal wash-es. *Lancet*, 1: 851-853, 1980.
- 2) Coonrod, J.D., Karathanasis, P.F. & Donofio, J. C.: Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigen for clinical diagnosis of influenza. *J. Med. Virol.*, 25: 399-409, 1988.
- 3) Daisy, J.A., Lief, F.S. & Friedman, M.H.: Rapid diagnosis of influenza A infection by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adult. *J. Clin. Microbiol.*, 9: 688-691, 1970.
- 4) Katz, J.M., Wang, M. & Webster, R.G.: Direct sequencing of HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J. Virol.*, 64: 1808-1811, 1990.
- 5) Yamada, A., Imanishi, J., Nakajima, E., Nakajima, K. & Nakajima, S.: Detection of influenza virus in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, 35: 259-265, 1991.

- 6) Winter, G., Fields, S. & Brownlee, G.G.: Nucleotide sequence of haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. *Nature*, 292: 72—75, 1981.
- 7) Concannon, P.C., Cummings, I.W. & Salser, W. A.: Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 hemagglutinin gene. *J. Virol.*, 49: 276—278, 1984.
- 8) Nakajima, S., Nakamura, K., Nishikawa, F. & Nakajima, K.: Genetic relationship between the HA gene of type A influenza viruses isolated in off-seasons and later epidemic seasons. *Epidemiol. Infect.*, 106: 383—395, 1991.
- 9) Verhoeven, M., Fang, R., Jou, W.M., Devos, R., Huylebroeck, D., Saman, E. & Fiers, W.: Antigenic drift between the hemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. *Nature*, 286: 771—776, 1980.
- 10) Nakajima, S., Takeuchi, Y. & Nakajima, K.: Location on the evolutionary tree of influenza H3 hemagglutinin genes of Japanese strains isolated during 1985—6 season. *Epidemiol. Infect.*, 100: 301—310, 1988.
- 11) Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W.M. & Palese, P.: Influenza B virus evolution: Co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology*, 163: 112—122, 1988.
- 12) 中村和幸, 西沢修一: MDCK 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, 1980.

Rapid Diagnosis of Influenza Infection by PCR Method —Detection of Influenza Virus HA Gene in Throat Swab—

Takayuki MORISHITA, Shin-ichi KOBAYASHI, Takashi MIYAKE, Yuichi ISHIHARA,
Shin ISOMURA¹⁾, Setsuko NAKAJIMA²⁾ & Katsuhisa NAKAJIMA³⁾

¹⁾Aichi Prefectural Institute of Public Health

²⁾The Institute of Public Health

³⁾Nagoya City University Medical School

We studied the detection of the HA gene of human influenza viruses in throat swabs obtained from the outbreaks of influenza in school children utilizing the polymerase chain reaction (PCR) method. Sensitivity and specificity of the PCR method was compared to conventional virus isolation using MDCK cells.

Three pairs of primers for PCR in detecting the HA genes of AH1, AH3, and B influenza viruses showed both subtype and type specificity. The dilution experiments showed that influenza viruses, as few as 1.1—3.5 plaque-forming units per 50 μ l, were sufficient for the detection of HA genes by PCR method and the detection rate by PCR method was 2—3 fold higher than that by conventional method.

Our results showed that the PCR method was a fast, sensitive and reliable method for the diagnosis of influenza infections.