

34. real-time PCR 法を用いた ヒトライノウイルス検出法の構築および流行解析

○改田 厚（大阪市立環境科学研究所）

【背景・目的】

ヒトライノウイルス（HRV）は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される一本鎖（+）RNA ウイルスである。呼吸器感染症の主要病原体の一つであり、従来、上気道炎との関連が報告されていたが、最近、下気道炎にも関与することが示唆され、注目が高まりつつある(1, 2)。HRV は、100 種以上の血清型に分類され、遺伝学的にはグループ A（HRV-A）、HRV-B に分類されていた(3)。2007 年、HRV-A、HRV-B に属さない HRV に関する詳細な解析の結果、新たな遺伝グループ C（HRV-C）が証明された(4, 5)。日本国内において、HRV の各遺伝グループの流行期について、包括的に解析した報告はほとんどない。本研究では、① HRV の遺伝グループ別の流行期の解析、② real-time PCR 法を用いた HRV 遺伝子検出系の構築、を目的とした。

【材料と方法】

1. 臨床検体

RT-PCR 法による HRV 遺伝子検出と遺伝グループ型別については、2008 年 11 月から 2009 年 10 月の期間に大阪市感染症発生動向調査事業で検査をおこなった急性呼吸器症状（咽頭炎、クループ、気管支炎、気管支肺炎、細気管支炎、喘息性気管支炎、肺炎と診断された症例）の患者 333 名の呼吸器由来検体 336 検体を対象とした。患者（男性 183 名、女性 150 名）の年齢は、0 か月～74 歳で、5 歳未満が全患者数の 74.1%を占めた。

一方、real-time PCR 法の検討については、2009 年 10 月から 2010 年 9 月の期間に検査をおこなった 12 歳以下の急性呼吸器症状患者来検体 392 検体を対象とした。

2. ウイルス RNA の抽出および cDNA 合成

検体からのウイルス RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて添付のプロトコールに従っておこなった。抽出後、ランダムヘキサマープライマー及び SuperScript III RT- reverse transcriptase（Invitrogen）により cDNA を合成した。

3. HRV 遺伝子検出方法（RT-PCR 法、real-time PCR 法）

HRV の遺伝子検出は、RT-PCR 法および real-time PCR 法を用いて検討した。RT-PCR は、作製した cDNA を鋳型として、VP4/VP2 遺伝子領域を標的として 0L68-1, EVP4 プライマー(6)および *TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version*（タカラバイオ）を用いて実施した。反応条件は、94 °C 2 分の熱変性後、94 °C 30 秒、61 °C 30 秒、72 °C 1 分の反応を 50 サイクルおこなった。PCR 産物については、アガロースゲル電気泳動をおこな

い、特異的増幅産物（約 530 bp）が確認されたものを HRV 陽性とした〔同一の反応で、エンテロウイルス(HEV) は、約 650 bp 付近に増幅産物が認められる〕。一方、real-time PCR 法については、Tapparel ら (7) が報告した HRV/HEV 共通検出用および HEV 特異的検出用プライマー、TaqMan プローブの一部を改変して、QuantiTect Multiplex PCR kit (QIAGEN)を用いて、添付のプロトコールに従って実施した。すなわち、HRV/HEV 検出用には、Panenterhino/Ge/08 F1 (forward), 5' -AGCCTGCGTGCKGCC -3' ; Panenterhino/Ge/08 F2 (forward), 5' - CYAGCCTGCGTGG-3' ; Entero/Panenterhino/Ge/08 R (reverse), 5' -GAAACACGGACACCCAAAGTAGT-3' ; Panenterhino/Ge/08-probe, 5' - (VIC) CCCTGAATGYGGCTAA (MGB) -3' を用いた。一方、HEV 特異的検出用には、Entero/Ge/08 F (forward), 5' -GCTGCGYTGCGGCC-3' を使い、reverse プライマー、プローブは、HRV/HEV 検出用と同一のものを使用した。HRV、HEV を検出する反応系の中で、多項目呼吸器ウイルスを探索する一環として、ヒトコロナウイルス (HCoV) (229E, OC43, NL63, HKU1)の検出も同時に試みた。すなわち、各反応ウェルで、[HRV/HEV(VIC-MGB), HCoV-OC43(Cy5-BHQ3), HCoV-NL63(FAM-BHQ1)], [HEV (VIC-MGB), HCoV-229E (Cy5-BHQ3), HCoV-HKU1(FAM-BHQ1)] の検出を試みた(カッコ内は、TaqMan プローブの蛍光色素、クエンチャーの組合せを記載)。real-time PCR の反応条件は、95 °C 15 分の反応後、94 °C 60 秒、60 °C 90 秒 を 40 サイクルおこなった。判定基準は、以下に従った。① 増幅曲線の陽性、陰性の判定はコンピューターの自動判定に基づいた、② HRV/HEV 共通検出反応で陽性、HEV 特異的検出反応で陰性となった検体は HRV 陽性と判定、③ HRV/HEV 共通検出反応で陽性、HEV 特異的検出反応で弱陽性 (HEV の Ct 値が HRV の Ct 値と比較して 10 以上高い場合) については、交差反応の可能性が高いことから HRV 陽性と判定、④ HRV/HEV 共通検出反応で陽性、HEV 特異的検出反応で陽性 (HEV と HRV の Ct 値の差が 5 以内の場合) については、HEV 陽性と判定。

4. 系統樹解析

遺伝グループ型別をおこなうため、RT-PCR 法で増幅された VP4/VP2 遺伝子領域の一部 [387 塩基、HRV-C 024 株 (EF582385) の 616-1002 塩基に相当]について、Genetic Analyzer 3130 (アプライドバイオシステムズ)を用いて塩基配列を決定した。MEGA5.03 ソフトウェアを用いて、アライメントをおこなった後、Kimura-2-パラメータ法を用いて遺伝学的距離を算出し、近隣接合法により系統樹を作成した。系統樹の樹型については、ブートストラップ検定を 1000 回おこない、検証した。

【結果】

1. 患者検体からの HRV 遺伝子の検出

検査した 336 検体のうち、84 検体 (25.0%) が HRV 遺伝子陽性であった。陽性株について、遺伝グループ型別を実施した結果、HRV-C が 30、HRV-A が 54 であった。HRV-B は検出されなかった。HRV-C 陽性患者の年齢は、2 ヶ月～18 歳であり、5 歳未満が 80.0%

を占めた。一方、HRV-A 陽性患者の年齢は、0 ヶ月～38 歳であり、5 歳未満が 88.9%を占めた。HRV-C 陽性株について、世界で過去に報告された HRV-C 株とともに系統樹解析をおこなった結果、大阪市株は、北部アメリカ、ラテンアメリカ、アジア、オセアニア、ヨーロッパ検出株らと様々なクラスターを形成した (図 1)。

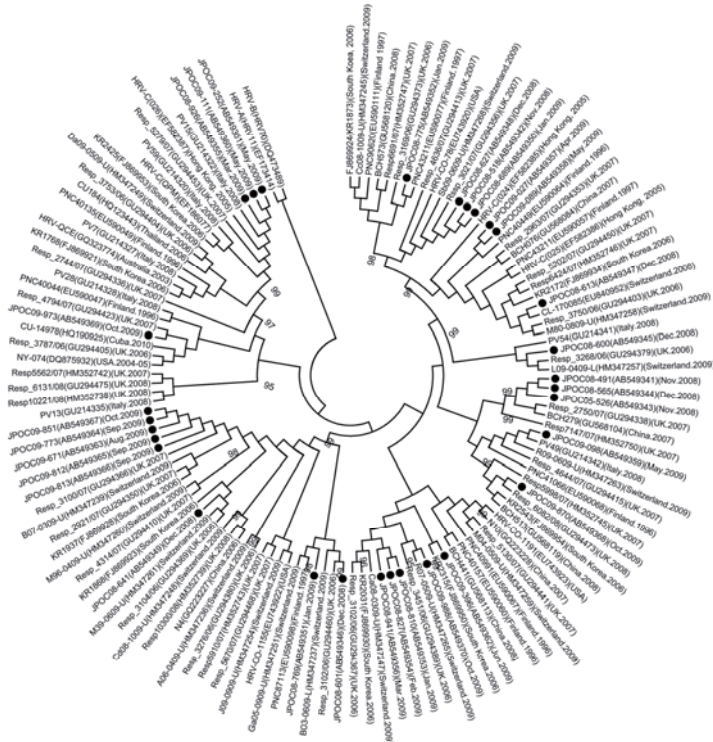


図 1. ヒトライノウイルス (HRV)-C の系統樹解析

VP4/VP2 遺伝子領域の一部 (387 塩基) を用いて系統樹を作製した。大阪市株には、●を付記した。

() 内には、GenBank 参照番号、検出国、検出年を記載。ブートストラップ値 (%) を分岐点に記載した。

2. 1 年間にわたる HRV 遺伝グループ別の月別検出状況

2008 年 11 月から 2009 年 10 月までの 1 年間の HRV 遺伝グループ別の月別検出状況を示した (図 2)。HRV-C は、2009 年 7 月以外は、調査したすべての月で検出された。一方、HRV-A は調査したすべての月で検出された。HRV-C の検出数、検出率は、2008 年 12 月にいずれも最高値であった。HRV-A の検出数は 2009 年 4 月、6 月が最も高く、検出率は、2009 年 4 月が最高であった。HRV-C の検出率は、2008 年 12 月、2009 年 1 月において、HRV-A よりも有意に高く (Fisher's exact test、 $p=0.0269$)、2009 年 2 月、3 月、10 月において、HRV-A と同等であった。HRV-C と HRV-A の検出率の高低は、2008 年 11 月～12 月、2009 年 1～4 月を境に入れ替わっていた。HRV-C の流行期は、9 月～3 月の冬季を中心とした時期であり、HRV-A の流行期は、3 月～11 月と推定された (赤池の情報基準量、一般化線形混合モデルを用いた解析結果にもとづく)。

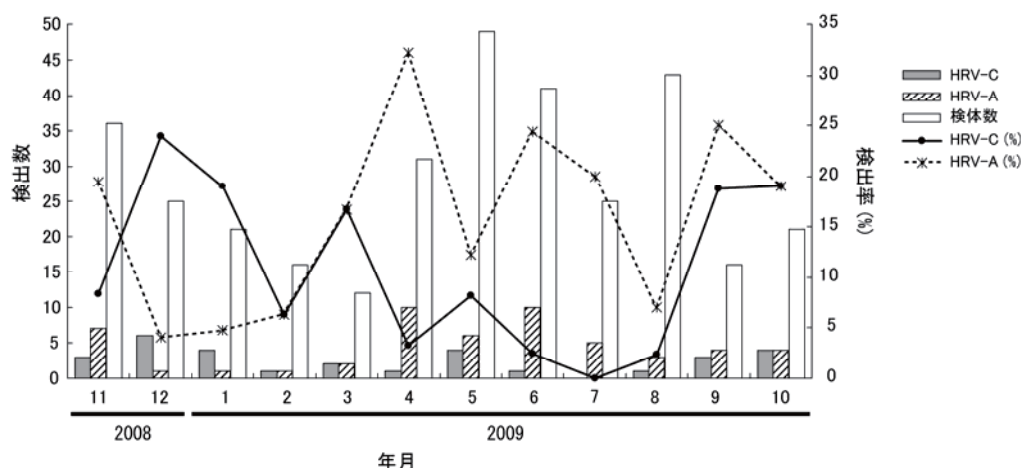


図2. ヒトライノウイルス (HRV)-C と HRV-A の月別検出状況
(2008年11月～2009年10月)

3. real-time PCR 法を用いた HRV 検出法の構築と RT-PCR 法との結果比較

real-time PCR 法を用いた検討の結果、86 検体 (21.9%) が HRV 陽性、45 検体 (11.5%) が HEV 陽性であった。RT-PCR 法の結果は、112 検体 (28.6%) が HRV 陽性、25 検体 (6.4%) が HEV 陽性、6 検体 (1.5%) が HRV、HEV の共検出であった。real-time PCR 法で陽性となった HRV 86 検体のうち 80 検体 (93.0%) は RT-PCR 法においても HRV 陽性であった。一方、RT-PCR 法で HRV 陽性となった 112 検体のうち 77 検体 (68.8%) は、real-time PCR 法においても HRV 陽性であった。HRV 検出については、本研究で構築した real-time PCR 法は、RT-PCR 法と比較すると検出率は低い、有用であると考えられた。

【考察】

本研究の結果、HRV-C と HRV-A の流行期の違いが示唆された。しかしながら、1年間のみの調査をもとにした解析結果のため、より詳細な解析には複数年にわたる調査、解析が必要と考えられた。

real-time PCR 法での HRV 陽性検体は、RT-PCR 法を用いた場合においても高い割合で陽性と判定されることから、有用な検出法であると考えられた。しかしながら、RT-PCR 法と比較すると HRV の検出率が低かった。本研究で用いた real-time PCR 法では、同一検体中の HRV と HEV の共存を検出できず、判定基準では、HEV のみ陽性と判定されてしまう。また、HRV と HEV の遺伝学的な類似性から、HRV 陽性の際、HEV との交差反応が HEV の弱陽性という結果で認められることがある。real-time PCR 法による HRV 検出方法は、他の検出方法と併用することが効果的であると考えられた。

【参考文献】

1. Broberg, E., Niemela, J., Lahti, E., et al. (2011). Human rhinovirus C-Associated severe pneumonia in a neonate. *J Clin Virol*, 51, 79–82.

2. Mackay, I. M. (2008). Human rhinoviruses: the cold wars resume. *J Clin Virol*, 42, 297–320.
3. Savolainen, C., Blomqvist, S., Mulders, M. N., et al. (2002). Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol*, 83, 333–340.
4. Lau, S. K., Yip, C. C., Tsoi, H. W., et al. (2007). Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol*, 45, 3655–3664.
5. Lee, W. M., Kiesner, C., Pappas, T., et al. (2007). A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One*, 2, e966.
6. Ishiko, H., Miura, R., Shimada, Y., et al. (2002). Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology*, 45, 136–141.
7. Tapparel, C., Cordey, S., Van Belle, S., et al. (2009). New molecular detection tools adapted to emerging rhinoviruses and enteroviruses. *J Clin Microbiol*, 47, 1742–1749.

【研究成果】

Kaida A, Kubo H, Takakura KI, Togawa M, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Molecular epidemiology of human rhinovirus group C in acute respiratory tract infections in Osaka City, Japan *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2011 (in press).

【謝辞】

本研究に研究助成をして頂きました 財団法人 大同生命厚生事業団に深謝いたします。

【経費使途明細】

DeltaGraph v6 windows 通常版、1点	34,785 円
英文校正、一式	23,625 円
QuntiTect Multiplex real-time PCR Mix、2点	32,130 円
PrimeScript RT reagent Kit、1点	33,915 円
合成オリゴ、39点	38,130 円
TaqMan MGB Probe, 1点	117,600 円
生化学試薬 (buffer 等)、5点	16,814 円
細胞培養用培養液、4点	2,310 円
振込手数料	734 円
合計	300,043 円