

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860608

研究課題名(和文)新規超高速PCR法によるウイルス性気道感染症迅速診断法の確立

研究課題名(英文)Development of new rapid PCR method for viral respiratory tract infections

研究代表者

高田 美也子(TAKATA, MIYAKO)

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：50523643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザの診断に際して、現在医療機関で行われている検出キットの方法は非常に短時間で簡便に検出できるが、感染初期など、陰性と判定してしまうことがある。そこで、高感度のPCR法によってそのような事象を削減することを目的とする。具体的には、本来はインフルエンザに罹患しているにもかかわらず陰性と判定され投薬せず、感染拡大につながったり、易感染者の容態の悪化を防ぐということである。本研究では、キット陰性例であったが、PCR陽性例が認められた。このことで、感染初期のPCR法の効果が期待された。

研究成果の概要(英文)：Immunological testing method for infectious disease, such as influenza virus is simple and quickly. However, this method have problem with limit of detection. This study revealed that development of high sensitivity PCR method. In particular, there is possibility that flu test showed negative and patient wasn't prescribed appropriate medicine. Establishment of high sensitivity detecting method provide with prevention in the symptom aggravation for compromised patient and the infection from spreading. This study, flu test showed negative but PCR method showed positive. In short, PCR method is effective for early stage.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：PCR インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

一般に成人における急性気道感染症の主要な起炎ウイルスは、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどが知られている。最近、オランダの Osterhaus らにより、ヒトメタニューモウイルスも新しい気道感染症の起炎ウイルスであることが発見された。このウイルスは、普遍的に感染をお繰り返しているが、その診断は一部ウイルスにペーパークロマトグラフィー法を利用したキットが実用化されているのみである。さらに、最近ノイラミニダーゼ阻害剤耐性ウイルスの存在も報告されている。現在これらのウイルス性気道感染症を、その耐性を含めて網羅的に位置反応で迅速に検出できる検査法は開発されていない。

しかしながら、昨今の中国の H7N9 鳥インフルエンザ、新型インフルエンザ特別措置法の施行などから、臨床において、迅速に薬剤耐性を含めた起炎ウイルス検出システムは強く求められている。さらに、このシステムは高感度であることはもちろん、新たに出現するウイルスに柔軟に対応でき、なおかつ迅速に検出できることを特徴とする。

今回は以上の背景をもとに主にインフルエンザについて従来型装置での PCR 法によるものと、超高速リアルタイム PCR 装置による高感度検出の開発に試みる。

2. 研究の目的

インフルエンザ等のウイルス性感染症は普遍的ではあるが、高齢者・合併症のある患者では致死的となりうる重要疾患である。本研究では、一般に成人における気道感染症の主要なウイルスであるインフルエンザ A 型、B 型について、PCR 法の有用性を検討する。今回は従来のキットによる判定と PCR 法による結果の一致率を調べるとともに超高速 PCR 法による検討を行う。

この超高速 PCR システムは高感度であることはもちろん、新たに出現するウイルスに柔軟に対応でき、なおかつ迅速に検出できることを特徴とする。本装置 (UR104MK) は熱板の上をサンプルを封入した円盤プレートが高速に回転することで PCR を行うものである。(図1) またリアルタイム機能も整備しているため電気泳動を行う必要もないため時間の短縮が見込まれる。

外来診療中や、入院患者のインフルエンザ感染時のアウトブレイクの阻止に役立たせるこ

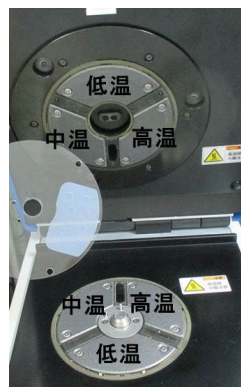


図1

とを目的とする。

3. 研究の方法

(1) One-step RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス発現の確認

ウイルス分離株の RNA 抽出物により、one step PCR 法により、従来型 PCR 装置における PCR 反応条件の検討を行い、臨床検体での発現を確認する。臨床検体は、インフルエンザ様症状がみられる患者を対象とし、鼻咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルス輸送培地 3ml に拭き取り液の綿棒を浸し、その溶液から RNA 抽出キットにより抽出を行い、one step RT-PCR キットにより発現を電気泳動により確認する。この時、キットの結果との一致率を確認する。電気泳動で陽性であった検体についてシーケンスにより、インフルエンザ A 型、あるいは B 型であることを確認する。

(2) Multiplex 法の確立

ウイルス分離株の RNA 抽出物について cDNA 合成を行った後、インフルエンザ A 型¹⁾及び B 型²⁾の 2 種類のプライマーを混合させ、既知のインフルエンザ A 型あるいは B 型のサンプルで Multiplex PCR キットによる PCR 法の反応条件および組成を適切化するために従来型装置で検討する。

(3) ウイルス分離株の RNA 抽出物について超高速 PCR 装置による PCR 反応条件および反応組成の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 従来型 PCR 装置における One step PCR 法による臨床検体の検討

インフルエンザ A 型あるいは B を調べるためのプライマーで、別々の反応条件で PCR 増幅を行ったところ、図2で示すように検体番号 P16 で示すようにキットで陰性であったもの

検体番号	キット判定	PCR判定 (FluA)	PCR判定 (FluB)
P1	A+B-	+	-
P2	A-B-	-	-
P3	A-B+	-	+
P4	A-B+	-	+
P5	A-B-	-	-
P6	A-B-	-	-
P7	A-B-	-	-
P8	A+B-	+	-
P9	A-B-	-	-
P10	A-B-	-	-
P11	A-B-	-	-
P12	A+B-	+	-
P13	A-B+	-	+
P14	A-B-	-	-
P15	A-B+	-	+
P16	A-B-	-	+

図2

が、PCR 判定ではインフルエンザ B 型を示し、PCR 法がより高感度である可能性が示された。またその PCR 判定がインフルエンザ B 型ウイルスであることを確かめるために、シーケンス法により確認した。

(2) ウイルス分離株における Multiplex 法の確立

インフルエンザ A 型、B 型を両方含むプライマー混合液のうち、A 型プライマーを B 型の 2 倍の濃度で反応を行ったところ、

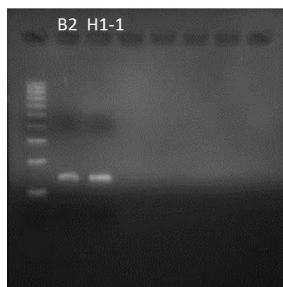


図3

それぞれの陽性検体が PCR でも確認することができた。B2 はインフルエンザ B 型陽性検体であり、H1-1 はインフルエンザ A 型陽性検体である。

未知の検体を調べる際、インフルエンザ A 型、B 型ともに同一の PCR 条件で行うことができるため、効率よく判定することが可能となった。この結果をもとに臨床検体で、インフルエンザ A 型、B 型同時に検出可能な Multiplex 法を行うことで、さらなる有用性が期待される。

(3) ウイルス分離株におけるインフルエンザ B 型の超高速 PCR 装置での応用

ウイルス分離株を 4 種類用い、超高速 PCR 装置での反応条件の検討をしたところ、陰性コントロールにはインフルエンザ A 型の検体を用い、インフルエンザ B 型の特異的な増幅が見られた。今回は各々について、電気泳動も行い視覚的にバンドの検出を確認した。

今後、インフルエンザ A 型についても、できるだけ同様のプログラムで特異的検出が可能になるよう、PCR 組成の工夫などを追及していくことにより、今後のさらなる迅速性をもった PCR 法の確立することが可能となる。

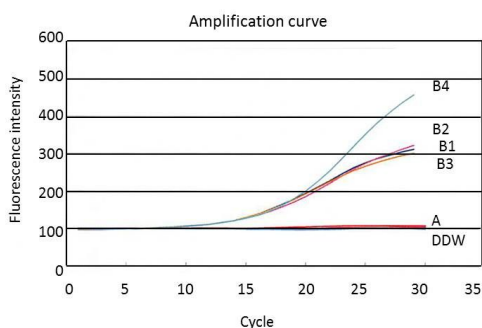


図4

< 引用文献 >

Nakauchi M, Yasui Y, Miyoshi T, Minagawa H, Tanaka T, Tashiro M, Kageyama T. One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H3N2 viruses. *Journal of virological Methods* 2011; 171 : 156-162

Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC and Claas EC. Rapid and sensitive method using Multiplex Real-time PCR for Diagnosis of infections by influenza A and Influenza B viruses, respiratory syncytial viruses, and Parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of clinical microbiology* 2004;42:1564-1569

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田美也子 (MIYAKO TAKATA)
鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員
研究者番号：50523643

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()