

RT-PCR 法による H5 鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出 (第 2 版)

国立感染症研究所ウイルス第 3 部インフルエンザウイルス室

注意事項：

- 本マニュアルでは 2005 年に茨城県で発生した H5N2 型鳥インフルエンザウイルスの検出にも対応できるように、第 1 版 (2004 年 1 月掲載) を全面的に改訂した。
- 主な変更項目
 1. one-step 法から two-step 法 (RT 反応と PCR 反応を分けて行う) にした。
これによって、感度が約数十倍向上した。
 2. RT 反应用プライマー (Uni 12) の採用
 3. PCR 反应用プライマー (H5 103f) への変更 (プライマー H5 1220r は変更なし。従って、PCR 産物の長さが 1168bp となった)
 4. PCR 反応条件の変更
- 2004 年に配布した陽性コントロール cDNA は、使用可能である。
(参考希釈 ; $10^7 \sim 8$ 倍希釈まで検出可能)

はじめに

1997 年に香港で高病原性鳥インフルエンザウイルス A/H5N1 が 18 名のヒトに感染し 6 名の死亡者を出した。2003 年 2 月には同亜型ウイルスが再びヒトに感染し、2 名の感染者中 1 名の死亡者を出す事例が起こっている。更に、同年後半から東アジアを中心に高病原性鳥インフルエンザウイルスが家禽の間で大流行し、1 億 5 千万羽以上の家禽が斃死または殺処分され、それと並行して東南アジア諸国では 100 名を越す感染者が確認され、そのうち 54 名が死亡している。

一方、2004 年初頭には、わが国でも H5N1 ウイルスによる家禽の大量死が発生したことから、感染源となる家禽の全殺処分による感染拡大防止策がとられた。その後、2005 年 6 月には、茨城県において H5N2 型の鳥インフルエンザが確認されたことから、近隣の養鶏場への感染拡大防止とヒトへの感染監視が行われているところである。現在、このウイルスの浸潤状況を把握するため、鳥インフルエンザのサーベイランスが全国的な規模で実施されている。感染研では各地方衛生研究所で H5 ウイルスの遺伝子検出検査が必要になった場合に備えて、感染研で現在行っている RT-PCR 法について解説し、参考として供することとした。なお、今後、推奨するプライマーを変更することもあるので随時 HP の最新情報を参照されたい。

< RT-PCR 法の実際 >

1 感染研が現在使用しているプライマーについて

cDNA 合成用プライマー :

ゲノム末端共通配列プライマー Uni 12 5' -AGCAAAAGCAGG-3'

PCR 用プライマー :

H5 103f (sense primer) 5' - ARATYTGTCATYGGTTAYCATGCA

H5 1220r (antisense primer) 5' - GTGTTCAATTTTGTTAATGAT

PCR 産物の長さ : 1168bp

下記の PCR 条件においては、上記プライマーは H5 亜型の最近の分離株から古い年代の分離株まで広く反応し、ウイルスあるいは臨床検体から抽出した RNA を用いた検討では、非特異反応産物は見られていない。上記プライマーは H6 亜型にも反応する可能性があるが、陽性検体については感染研で H5 亜型の確定診断を行うこととする。

2 臨床検体またはウイルス分離株からの RNA の抽出

感染研情報センター HP へ掲載の SARS 診断・検査の PCR マニュアル (<http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update99-PCR.html>) に準ずる。RNA の抽出は市販のキット、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用し最終的に 60 μ l の AVE buffer で溶出し、そのうち最大 11 μ l (ウイルス分離株からの RT-PCR の場合はより少量の RNA 抽出液から検出可能) を cDNA 合成反応に使用する。残りの RNA は -80 $^{\circ}$ C に保存し、再検が必要な場合に使用する。

3 cDNA 合成

cDNA の合成は、Invitrogen 社の Super Script III Reverse Transcriptase に添付されているマニュアルを参照している。

RNA とプライマーを以下のように混合し、65 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートする。インキュベート後、氷上に移して 1 分以上置く。

RNA 抽出液	11 μ l
プライマー (10 μ M)	1 μ l
dNTP (10 mM each)	1 μ l
Total	13 μ l

試薬と RNA /プライマー混合液を以下のように混合し、50°C で 2 時間反応させる。
反応後、70°C で 15 分間インキュベートし、反応を止める。

RNA /プライマー混合液	13 μ l
5×RT Buffer	4 μ l
0.1MDTT	1 μ l
Super Script III	1 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l
Total	20 μ l

cDNA はすぐに PCR に用いるか、-20°C で保存する。

4 PCR 反応

PCR 反応は、Takara 社の Takara Ex Taq Kit に添付されているマニュアルを参照している。

キットに含まれている試薬、亜型特異的なプライマーおよび cDNA を以下のように混合し反応させる。

試薬	使用量	最終濃度
cDNA	5 μ l	
10 x Ex Taq Buffer	5 μ l	1 x
dNTP (2.5 mM each)	4 μ l	0.2 mM
Takara Ex Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l	0.1 U/ μ l
sense (+) primer (10 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
antisense (-) primer (10 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
滅菌蒸留水	31.75 μ l	
Total	50 μ l	

94°C	2min.	
	↓	
94°C	30sec.	} x40 cycles
50°C	40sec.	
72°C	2min.	
	↓	
72°C	10min.	
4°C	∞	

(注意)

1. 本プロトコールで特定のメーカーの商品名を示しているのは、それらの使用を推奨しているものではなく、本研究所での実施条件を明らかにする目的からである。
2. PCR が one-step 法から two-step 法に変更されたことから、操作中のコンタミネーションには細心の注意が必要である。
3. WHOが推奨している鳥インフルエンザウイルス実験室診断マニュアル (2005 年 6 月 版) (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html) に採用されているプライマー (H5-1, H5-3) は、非特異反応が多く、また、茨城県で分離された H5N2 型鳥インフルエンザウイルスには反応しないことから、注意を要する。