

表 3: 良好な結果が得られた試薬・機器の組み合わせ (麻疹検出用リアルタイム RT-PCR)

機器	試薬
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI 7500 Fast	One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)
Roche LightCycler 480 system II	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI stepOne Plus	QuantiTect Probe RT-PCR kit

表 4: 今回、問題があると考えられた試薬・機器の組み合わせ (麻疹検出用リアルタイム RT-PCR)

機器	試薬
Roche LightCycler 480	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI stepOne Plus	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix

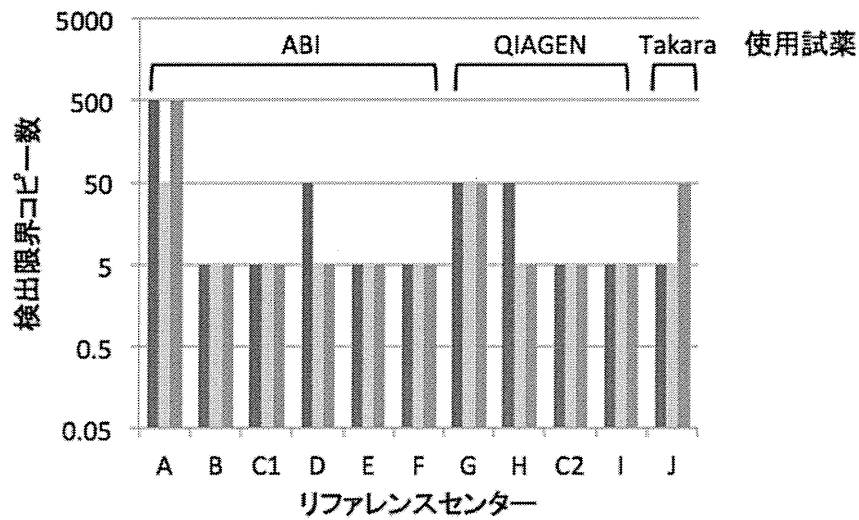


図1 風疹検出用リアルタイム RT-PCR の検出限界

段階希釈された風疹参照 RNA を用いて、風疹ウイルス遺伝子検出リアルタイム PCR を実施し、Ct 値 40 未満で検出された最高希釈濃度を検出限界とした。

Real-time RT-PCR 法による麻疹ウイルス N 遺伝子の検出

1. 概要

TaqMan プローブを用いた Real-time RT-PCR による麻疹ウイルス N 遺伝子の検出法について述べる。本方法を行う際は、陽性コントロールとして *in vitro* 転写により作製されたスタンダード RNA を用いる。陰性コントロールとして水および水を検体として RNA 抽出を行ったサンプル (RNA 抽出の陰性コントロール) を用いる。ここでは、クロスコンタミネーションの起こる可能性を最小限にするために、RT 反応と Real-time PCR 反応を同ウェル上で行う 1-step Real-time RT-PCR 法について記載するが、RNA 抽出後、先に RT 反応を行い合成した cDNA を用いて同様の試薬・手順で Real-time PCR のみを行う事も可能である。ここでは、アプライドバイオシステムズ社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。

2. 主な試薬・機器

ウイルス RNA 抽出キット (例: Qiagen Viral RNA mini kit ; キアゲン社)

Real-time RT-PCR 用マスターミックス (例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix ; アプライドバイオシステムズ社)

マイクロピペット (各容量のもの)

フィルター付きピペットチップ (上記のマイクロピペットに対応したもの)

1.5ml エッペンドルフチューブ

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate (例: Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL); アプライドバイオシステムズ社)

プレートシール (例: Optical Adhesive Covers; アプライドバイオシステムズ社)

遺伝子増幅装置 (例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム; アプライドバイオシステムズ社)

RNase free 水

N 遺伝子増幅用プライマーおよび検出用プローブ

• Forward Primer (MVN1139F): 5' TGGCATCTGAACTCGGTATCAC 3' (10 μ M)

• Reverse Primer (MVN1213R): 5' TGTCCTCAGTAGTATGCATTGCAA 3' (10 μ M)

• Probe (MVNP1163P): 5' FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGA-TAMRA 3' (6.25 μ M)

陽性コントロール

・スタンダード RNA (乾燥状態; 12 μ l に溶かして 10^7 コピー/ μ l) (RNA 保護剤として RNastable™ 添加)

3. 手順

3-1 スタンダード RNA を用いた試験の最適化

3-1-1 スタンダード RNA の希釈

- ① 乾燥状態のスタンダード RNA に、12 μ l の RNase free 水を加え、 10^7 コピー/ μ l の溶液を作製する。
RNase free 水を加えた後、15 分間ほど室温に放置してから、泡立てないようにマイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングを行い、溶解する。spin down して 4°C におく。
- ② チューブ 9 本に 90 μ l の水を分注し、「 5×10^6 」「 5×10^5 」「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」とラベルする。
- ③ 10^7 コピー/ μ l のスタンダード RNA 10 μ l を、「 5×10^6 」チューブに加え、マイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングで攪拌し、spin down する (5×10^6 コピー/ 5μ l となる)。
- ④ 「 5×10^6 」チューブの 10 μ l を「 5×10^5 」チューブに加え、軽く攪拌し spin down する。
- ⑤ ④と同様に、「 5×10^5 」から「 5×10^4 」、「 5×10^4 」から「 5×10^3 」と移していき、「 5×10^{-2} 」までの 10 倍段階希釈を作製する。
- ⑥ 「 5×10^6 」、「 5×10^5 」チューブは今回の最適化には使用しない。「 5×10^6 」は 10 μ l ずつに分注後、 -70°C 以下で保存し、「スタンダード RNA (5×10^6 コピー/ 5μ l)」として、次回以降の最適化に用いる。その際は、上記の④以降の希釈を行う。

3-1-2 反応液の調製 (以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

- ① プライマー 2 種類、プローブ、4 \times TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。
- ② 氷上にチューブを置き、別紙 1 に従って、9 ウェル分の反応液を調製する。(プライマーの終濃度が 400nM、プローブの終濃度が 250nM となる。)
- ③ 96well reaction plate の 8 ウェルに、② を 15 μ l ずつ分注する。(配置は別紙 2 を参照)
- ④ 別紙 2 に従い、水および 3-1-1 で作製したスタンダード RNA (« 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」の 7 種類) を 5 μ l ずつ対応するウェルに加える。
- ⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- ⑥ Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

Assay: 「Absolute Quantification (Standard Curve)」

Run Mode: 「Standard 7500」

Reporter: FAM、Quencher: TAMRA

50°C で 5 分、 95°C で 20 秒インキュベートした後、 95°C 15 秒、 60°C 1 分を 50 サイクル

3-1-3 データ解析

独立した3回の試験を実施し、以下の4つの基準を満たしていることを確認する。

- ① 段階希釈したスタンダードRNAで作製した検量線のslopeが-3.1から-3.8の間であること。
(1 サイクルで2 倍の DNA 断片に増幅する理想的な PCR 反応の場合、slope は-3.32 になる。)
- ② 段階希釈したスタンダード RNA で作製した検量線の R^2 値が 0.98 以上であること。
- ③ 5×10^1 コピー/反応のスタンダード RNA が $Ct \leq 40$ で検出されること。
- ④ 陰性コントロールである水が陰性 ($Ct > 40$) であること。

ただし、検量線は $Ct \leq 40$ で検出できた希釈までで作製する(通常、 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応)。これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。

3-2 検査の実施

3-2-1 ウイルスRNA抽出

ウイルスRNA(vRNA)の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体としてRNA抽出を行い、RNA抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出RNAは、 -80°C (-70°C 以下が望ましい)で保存する。

3-2-2 陽性コントロールの調整

5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の二点を陽性コントロールとして使用する。 5×10^0 コピー/反応が $Ct \leq 40$ の場合は 5×10^0 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に使用し、 5×10^0 コピー/反応が $Ct > 40$ の場合のみ 5×10^1 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に用いる。コンタミを避けるため、高濃度のスタンダードRNAを希釈する作業は3-2-3とは別の場所で行う。

3-2-3 Real-time RT-PCR 法による N 遺伝子の検出

まず、別紙 3~4 に必要事項を記入の上、必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール(水)、②RNA 抽出の陰性コントロール(水を検体として RNA 抽出したもの)、③陽性コントロール(スタンダード RNA、 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応)の3種類(4 サンプル)である。反応液の調整および反応条件は 3-1-2 と同様に行う。ただし、判定には $Ct=40$ までしか使用しないので、サイクル数を 50 サイクルから 40 サイクルに変更可能とする。

4. 試験成立条件

陰性コントロール(水、水を検体として RNA 抽出したもの)が陰性であり、陽性コントロール(5×10^1 コピー/反応)が $Ct \leq 40$ となった場合に試験が成立する。

5. 判定

3-2-2 に従って、判定に用いる陽性コントロールを選択する。検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」、Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断する。ただし、Real-time RT-PCR では PCR 産物のサイズ等を確認できないことから、判定には十分注意する。特に陽性と判断した場合は、従来の nested-PCR 法による増幅および増幅産物のシーケンスを必ず行う。陰性と判断する場合も 2 回以上の独立した Real-time RT-PCR を行う事が望ましい。判定保留の場合には、従来の nested-PCR 法等を行い、判定を行う。

6. トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は 3-1 を参照して試験系の再評価を行う。

別紙 1

スタンダード RNA を用いた試験系の最適化

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
スタンダード RNA (7 段階希釈)	7	
合計	8	
合計+1(反応数)	9	

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.6	68.4	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5	45	1 ×
MVN1139F (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVN1213R (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVNP1163P (6.25μM)	0.8	7.2	250nM
	15	(15 × 8 ウェル)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

Reporter: FAM, Quencher: TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50 cycle	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

別紙 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	水											
B	5×10^4 RNA	5×10^3 RNA	5×10^2 RNA	5×10^1 RNA	5×10^0 RNA	5×10^{-1} RNA	5×10^{-2} RNA					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

別紙 3

麻疹 N 遺伝子 Real-time RT-PCR 法

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
	1	水から RNA 抽出したもの
陽性コントロール	1	スタンダード RNA 5×10^0 コピー/反応
	1	スタンダード RNA 5×10^1 コピー/反応
検体数		
合計		
合計+1(反応数)		

	1 反応あたり(μ l)	必要量(\times 反応数)	終濃度
水	7.6		
4 \times TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5		1 \times
MVN1139F (10 μ M)	0.8		400nM
MVN1213R (10 μ M)	0.8		400nM
MVNP1163P (6.25 μ M)	0.8		250nM
	15	(15 \times 合計)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

Reporter: FAM, Quencher:

TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	40 (or 50) cycle	95 °C	15sec
		60 °C	1min

別紙 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Real-time RT-PCR 法による風疹ウイルスゲノムの検出

1. 概要

TaqMan プローブを用いた Real-time RT-PCR による風疹ウイルスゲノムの検出法について述べる。本方法を行う際は、陽性コントロールとして in vitro 転写により作製された風疹参照 RNA を用いる。陰性コントロールとして水および水を検体として RNA 抽出を行ったサンプル (RNA 抽出の陰性コントロール) を用いる。ここでは、アプライドバイオシステムズ社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。他の試薬および機器を用いる場合には各施設で条件設定を行う必要がある。

本 Real-time RT-PCR 法は、麻疹ウイルス N 遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法と同じ反応条件 (温度および反応時間) であることから、同一のプレートで並行して実施することが可能である。

2. 主な試薬・機器

ウイルス RNA 抽出キット (例: Qiagen Viral RNA mini kit ; キアゲン社)

Real-time RT-PCR 用マスターミックス (例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix ; アプライドバイオシステムズ社)

マイクロピペット (各容量のもの)

フィルター付きピペットチップ (上記のマイクロピペットに対応したもの)

1.5ml エッペンドルフチューブ

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate (例: Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL); アプライドバイオシステムズ社)

プレートシール (例: Optical Adhesive Covers; アプライドバイオシステムズ社)

遺伝子増幅装置 (例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム; アプライドバイオシステムズ社)

RNase free 水

プライマーおよび検出用プローブ

プライマーミックス^{注1}

NS(32-54)Fwd: 5' - CCTAHYCCCATGGAGAACTCCT -3' (10 μ M)

NS(143-160)Rev: 5' - AACATCGCGCACTTCCCA -3' (10 μ M)

注1 : Fwd と Rev の 10 μ M Mix を RNase-free の滅菌チューブ等に分注し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。

プローブ^{注2}

NS (93-106) Probe: 5' FAM-CCGTCGGCAGTTGG-MGB 3' (10 μ M)

注2：10 μ M に調製したものを RNase-free の滅菌チューブ等に分注し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。麻疹ウイルス N 遺伝子検出用プローブとはクエンチャーの種類が異なることに注意。

陽性コントロール

・風疹参照 RNA (従来の nested PCR に用いているもの)^{注3}

注3：以前配布した風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) を使用し、以下の試験の最適化および使用濃度の決定を行う。充分量がない場合には国立感染症研究所ウイルス第三部 森までご連絡下さい。

3. 手順

3-1 風疹参照 RNA を用いた試験の最適化

遺伝子増幅装置の機種や Lot. によって検出感度がわずかに異なることがあるので、各施設において試験系を設定する前に必ず行う。

3-1-1 風疹参照 RNA の希釈

- ① 風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) を氷上で溶解した後 vortex し spin down しておく。
- ② チューブ 1 本に 95 μ L の水 (あるいは RNA 希釈用バッファー: 例タカラバイオ EASY Dilution for Real Time PCR) を分注し、「5 \times 10⁴」とラベルする。
- ③ チューブ 6 本に 90 μ L の水 (あるいは RNA 希釈用バッファー: 例タカラバイオ EASY Dilution for Real Time PCR) を分注し、「5 \times 10³」「5 \times 10²」「5 \times 10¹」「5 \times 10⁰」「5 \times 10⁻¹」「5 \times 10⁻²」とそれぞれラベルする。
- ④ 風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) 5 μ L を、「5 \times 10⁴」チューブに加え、vortex し spin down する (5 \times 10⁴ コピー/5 μ L となる)。
- ⑤ 「5 \times 10⁴」チューブの 10 μ L を「5 \times 10³」チューブに加え、vortex し spin down する。
- ⑥ ⑤と同様に、「5 \times 10³」から「5 \times 10²」、「5 \times 10²」から「5 \times 10¹」と移していき、「5 \times 10⁻²」までの 10 倍段階希釈を作製する。
- ⑦ 「5 \times 10⁴」は 20 μ L ずつに分注後、-70 $^{\circ}$ C 以下で保存し、「風疹参照 RNA (5 \times 10⁴ コピー/5 μ L)」として、次回以降の最適化に用いる。その際は、上記の⑤以降の希釈を行う。

3-1-2 反応液の調製 (以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

- ① プライマーミックス、プローブ、4 \times TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。
- ② 氷上にチューブを置き、別紙 1<風疹>に従って、9 ウェル分の反応液を調製する^{注4}。

注4：プライマーの終濃度が 900nM、プローブの終濃度が 250nM となる。プライマー濃度は麻疹 Real-Time

RT-PCR と異なる。

- ③ 96well reaction plate の 8 ウェルに、② を 15 μ l ずつ分注する。(配置は別紙 2<風疹>を参照)
- ④ 別紙 2<風疹>に従い、水および 3-1-1 で作製した風疹参照 RNA (「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」の 7 種類) を 5 μ l ずつ対応するウェルに加える。(5 $\times 10^4$ ~ 5 $\times 10^{-2}$ コピー/反応となる)
- ⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- ⑥ Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

Assay: 「Absolute Quantification (Standard Curve)」

Run Mode: 「Standard 7500」

Reporter: FAM、Quencher: none ^{注5}

50°C で 5 分、95°C で 20 秒インキュベートした後、95° C 15 秒、60° C 1 分を 50 サイクル

注 5: 風疹ウイルスゲノム検出用プローブは非蛍光クエンチャーを標識しているため、TAMRA を標識した麻疹ウイルス N 遺伝子検出用プローブとは設定が異なる。Reporter および Quencher はウェル毎に設定できる。

3-1-3 データ解析

独立した3回の試験を実施し、以下の3つの基準を満たしていることを確認する。

- ① 段階希釈した風疹参照RNAで作製した検量線のslopeが-3.1から-3.8の間であること。
(1 サイクルで 2 倍の DNA 断片に増幅する理想的な PCR 反応の場合、slope は-3.32 になる。)
- ② 段階希釈した風疹参照 RNA で作製した検量線の R² 値が 0.98 以上であること。
- ③ 5 $\times 10^1$ コピー/反応の風疹参照 RNA が Ct \leq 40 で検出されること。
- ④ 陰性コントロールである水が陰性 (Ct > 40) であること。

ただし、検量線は Ct=40 以内で検出できた希釈までで作製する(通常、5 $\times 10^1$ ~ 5 コピー/反応)。

これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。それでも問題が解決されない場合には国立感染症研究所ウイルス第三部第二室 森 嘉生 (yoshiom@nih.go.jp) にご連絡下さい。

3-2 検査の実施

3-2-1 ウイルスRNA抽出

ウイルスRNA (vRNA) の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体としてRNA抽出を行い、RNA抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出RNAは、-80°C (-70°C 以下が望ましい) で保存する。

3-2-2. 風疹参照RNAの調整

5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の参照RNA希釈液二点を陽性コントロールとして使用する。 5×10^0 コピー/反応が $Ct \leq 40$ の場合は 5×10^0 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に使用し、 5×10^0 コピー/反応が $Ct > 40$ の場合のみ 5×10^1 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に用いる。状況に応じて濃度を変更できるが、高濃度参照RNAは 5×10^1 コピー/反応を越えないようにする。コンタミを避けるため、高濃度の風疹参照RNAを希釈する作業は3-4とは別の場所で行い、分注して -70°C 以下で保存する。

3-2-3 Real-time RT-PCR 法による風疹ウイルスゲノムの検出

まず、別紙 3~4<風疹>に必要事項を記入の上、必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール(水)、②RNA抽出の陰性コントロール(水を検体としてRNA抽出したもの)、③陽性コントロール二点(原則として 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の風疹参照RNA)の4つである。反応液の調整および反応条件は3-1-2と同様に行うが、判定には $Ct=40$ までしか使用しないので、PCR反応サイクル数は40-50の範囲で変更が可能とする。

4. 試験成立条件

陰性コントロール(水、水を検体としてRNA抽出したもの)が陰性であり、陽性コントロール(5×10^1 コピー/反応)が $Ct \leq 40$ となった場合に試験が成立する。

5. 判定

3-2-2に従って、判定に用いる陽性コントロールを選択する。検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が40以下の場合に「判定保留」、 Ct 値が40より大きい場合に「陰性」と判断する。判定保留の場合には、従来の nested-PCR法(NS領域増幅 RT-PCR)等を行い、判定を行う。

6. トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は3-1を参照して試験系の再評価を行う。

別紙 1<風疹>

風疹参照 RNA を用いた試験系の最適化

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
風疹参照 RNA (7段階希釈)	7	
合計	8	
合計+1(反応数)	9	

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.7	69.3	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5	45	1 ×
プライマーミックス (10μM)	1.8	16.2	900nM
NS (93-106) Probe (10μM)	0.5	4.5	250nM
	15	(15 × 8 ウェル)に分注	
サンプル	5		
	20		

Reporter: FAM、Quencher: None

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50cycle	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

別紙 2<風疹>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	水											
B	5×10^4 RNA	5×10^3 RNA	5×10^2 RNA	5×10^1 RNA	5×10^0 RNA	5×10^{-1} RNA	5×10^{-2} RNA					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

別紙 3<風疹>

風疹ウイルスゲノム検出 Real-time RT-PCR 法

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	2	水 水から RNA 抽出したもの
陽性コントロール(高濃度および低濃度)	2	至適濃度の風疹参照 RNA
検体数		
合計		
合計+1(反応数)		

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.7		
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5		1 ×
プライマーミックス (10μM)	1.8		900nM
NS (93-106) Probe (10μM)	0.5		250nM
	15	(15 × 合計)に分注	
サンプル	5		
	20		

Reporter: FAM、Quencher: None

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50cycle*	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

*40cycle まで減少させても良い

別紙4<風疹>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

百日咳レファレンスセンターにおける病原体サーベイランス活動

研究分担者	蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	宮地悠輔	国立感染症研究所	細菌第二部
	大塚菜緒	国立感染症研究所	細菌第二部
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所	微生物部
	勝川千尋	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部
	梅田 薫	大阪市立環境科学研究所	微生物保健グループ

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、レファレンス関係の国内配布ならびに遺伝子検査の整備・拡充を行った。平成25年度は遺伝子検査キットを含むレファレンスの配布を21件行い、地方衛生研究所とともに新規検査法である4PlexリアルタイムPCR法の臨床評価を開始した。また、ワクチン抗原パータクチン (Prn) を欠損する百日咳流行株について調査を行い、わが国でも欧米と同様にPrn欠損株が流行していることを確認した。現在Prn欠損株の出現理由が不明のため、平成26年度も引き続き調査を実施する予定である。

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症であるが、近年多くの先進国で青年・成人患者の増加が認められている。百日咳の起原菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) であり、同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌 (パラ百日咳菌, *B. holmesii*), *Mycoplasma pneumoniae*, その他ライノウイルスなどの呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、現在の報告患者数には多くの紛れ込みを含むことが指摘される。

百日咳は米国, オーストラリア, 英国で大きな流行が認められ, わが国でも2008-2010年に大規模な流行が発生した。病原体解析から定着因子パータクチン (Prn) を欠損する流行株の存在が確認され,

Prn がワクチン抗原であることからワクチン有効性との関係が議論されている。わが国でも Prn 欠損株が出現し, その出現理由が不明なことから本菌の発生動向には監視が必要である。

本研究は百日咳レファレンスセンター活動として, 1) 病原体鑑別に有用な遺伝子検査ならびにレファレンスの整備・配布, 2) 国内における Prn 欠損株の流行調査, を地方衛生研究所とともに実施した。

B. 研究方法

1. レファレンス関係

百日咳類縁菌 *B. holmesii* の遺伝子検査として, LAMP 法を用いたキットを作製した。プライマー類は既法 (Otsuka et al., *Microbiol Immunol*, 2012) に従って調製し, 48 試験分を 1 キットとした。4Plex リアル

タイム PCR は百日咳菌, *B. holmesii*, パラ百日咳菌, *M. pneumoniae* を標的とし, リアルタイム PCR 装置 ABI7500 および 7500Fast 用にキットを構築した。なお, 本キットは臨床評価を目的に配布を行った。陽性コントロール DNA は百日咳菌, パラ百日咳菌, *B. holmesii* からそれぞれ DNA を精製し, conventional PCR およびリアルタイム PCR 用に濃度を調整したものを作製した。

2. Prn 欠損株の流行調査

地方衛生研究所および国内医療機関に百日咳臨床分離株の分与を依頼し, 2013 年の臨床分離株 9 株を収集した。菌株は Bordet-Gengou 培地を用いて培養し, SDS-lysis buffer により全蛋白質を抽出後, イムノブロット法により Prn 蛋白質を検出した (Otsuka et al., PLOS ONE, 2012)。なお, 本解析には疫学的な関連性を持たない菌株, 例えば兄弟 2 名から分離された場合は 1 株のみを供試した。

C. 研究結果

1. レファレンス関係

百日咳レファレンスセンターは 6 ブロックの 9 地方衛生研究所および感染研細菌第二部の計 10 施設で構成されている (表 1)。平成 25 年度のレファレンスセンターへの配布は *B. holmesii*-LAMP キットが 2 件, 4Plex リアルタイム PCR キットが 1 件であり, 陽性コントロール DNA の配布実績は 0 件であった (表 2)。一方, センター以外の地研には *B. holmesii*-LAMP キット 6 件, 4Plex リアルタイム PCR キット 3 件, 陽性コントロール DNA 9 件を配布した。

宮崎衛研では 4Plex リアルタイム PCR の臨床評価が実施され, *M. pneumoniae* の患者検体 1 件で LAMP 法との検査不一致が認

められた。また, パラ百日咳菌の患者検体で *B. holmesii* (*recA*) の偽陽性が認められ, 非特異反応に関し問題点が指摘された。

2. Prn 欠損株の流行状況

国内臨床分離株 (184 株) における Prn 欠損株の出現状況を図 1 に示した。Prn 欠損株は 1997 年に初めて出現し, その後増加傾向を示し, 2006 年には臨床分離株の 73% (8/11) を占めた。2008-10 年の百日咳流行では分離率が 27% (3 年間の平均分離率) に低下したが, 2011 年には 41% に上昇した。2012 年の分離率は 14% であり, 2013 年の分離株については現在解析中である。

D. 考察

百日咳レファレンスセンターでは病原体サーベイランスの精度向上を目的に, 国内における遺伝子検査の配布・拡充を進めている。平成 25 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キットを配布し, 本法の臨床評価を地研とともに開始した。これまでの評価により, 本法に非特異的反応が確認され, パラ百日咳菌 DNA の存在下で非特異的反応が生じることが指摘された。現在, 非特異的反応を解消する条件について検討を進めている。

平成 25 年度はレファレンスセンターへのレファレンス配布は前年度より減少した。平成 23 年度は 8 施設 18 件, 平成 24 年度は 5 施設 10 件であったが, 平成 25 年度は 3 件にまで減少した。この原因は *B. holmesii*-LAMP キットの国内整備が前年度までにほぼ終了したこととあり, 国内では *B. holmesii* の検査体制が整ったと考えられる。

Prn 欠損株の流行調査により, わが国でも欧米と同様に欠損株の流行が継続していることが確認された。わが国では 2008-10