

動物由来ウイルスの遺伝子検査法の整備

研究分担者 高山 郁代

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

本研究では、ヒトに感染する鳥インフルエンザウイルスや新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)といった動物由来ウイルスの遺伝子検査法の整備や精度管理を実施した。結果、国内での検査体制の強化のみならず、周辺国のヒト感染例の確定診断にも活用され、WHO ネットワークの強化に繋がった。

A. 研究目的

鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例は日本国内では未だに確認されていないが、海外では散発的に報告され、近年は増加傾向にある。日本においても鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染する可能性は十分に考えられるため、その対策は重要である。また一方で、SARS-CoV-2 は発生以来、世界的な感染の収束は見通せず、インフルエンザウイルスとの同時流行の懸念など新たな課題が挙げられていて、それに備えた検査法の整備が必要とされている。

本研究では、日本における鳥インフルエンザウイルス感染のヒトでの発生に備えるため、直近に発生した周辺国の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例における臨床検体を入手し、解析・情報集積を行った。また、SARS-CoV-2 に対しては、インフルエンザウイルスの型/亜型同定検査と同時に遺伝子検査を実施できるよう、既存の検査法を改変した。

B. 研究方法

鳥インフルエンザに対する研究では、2019年3月にネパールで1例目となる高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が報告された際に、その臨床検体を入手し、診断や詳細な解析を実施した。

具体的には、2019年4月中旬に患者の咽頭ス

ワブ検体が日本に到着した後、すぐにリアルタイム RT-PCR 法による型および HA 亜型同定検査を実施し、さらに、次世代シーケンス法による NA 亜型の同定やその他の遺伝子解析を実施した。また、臨床検体から培養細胞ならびに鶏卵を用いたウイルス分離を実施し、得られた分離株についても、リアルタイム RT-PCR 法による型・亜型の同定や次世代シーケンス法による詳細な遺伝子解析を行った。

SARS-CoV-2 に対する研究では、SARS-CoV-2 病原体検出マニュアルに記載された N 遺伝子に対するリアルタイム PCR 検査法 N2 セットをインフルエンザ診断マニュアルの反応条件に合わせて改変し、検出感度や特異度に問題が見られないか検討を実施した。

具体的には、SARS-CoV-2 遺伝子検査法の反応試薬の種類の変更、1 反応当たりの試薬量のスケールアップ、温度等の反応条件の変更を試みた。検討に使用した検出系は、マニュアルに記載された TAMRA もしくは BHQ をクエンチャーに持つ 2 種類のプローブならびにリバープライマーが ver.1 と ver.2 の 2 種類の配列の場合に対し検討した。検出感度の評価は、SARS-CoV-2 N 遺伝子に対する合成 RNA と臨床検体由来のウイルス RNA の 2 種類のテンプレートを使用して実施した。特異度の評価は、インフルエンザ A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B 型

インフルエンザウイルスの分離ウイルス由来の RNA を用いて実施した。また、その他の呼吸器感染症を引き起こす A 型および B 型 RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 1、2、3 および 4 型、ヒトボカウイルス、ヒトコロナウイルス NL63、OC43、HKU1 および 229E、ヒトアデノウイルス、ライノウイルスの臨床検体由来のウイルス核酸も特異度の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

鳥インフルエンザウイルスに関する研究で入手した臨床検体については、WHO の世界インフルエンザ・サーベイランス及び対応システム (GISRS) のネットワーク内で診断を目的として送付されたものであり、倫理面で配慮されたものである。また、SARS-CoV-2 検査法改変に用いた臨床検体については、検査系の構築等を目的とした研究に使用することに対して同意を得られたものであり、倫理面での配慮がなされている。

C. 研究結果

鳥インフルエンザウイルスに対する研究では、臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法の結果から、ウイルスは A(H5)亜型であることが診断された。また、引き続き実施した次世代シーケンス法による遺伝子解析から、ウイルスは A(H5N1)亜型で、HA 遺伝子は配列上クレード 2.3.2.1a に分類されることが明らかとなった。

臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法の結果では、A(H5)亜型検出系の結果が TypeA 検出系の結果と比較して遅れが見られた。本来、インフルエンザウイルスの遺伝子は A(H5)亜型検出系のターゲットである HA 遺伝子と TypeA 検出系のターゲットである M 遺伝子が理論上同数であることから、いずれも同程度の感度の A(H5)亜型検出系と TypeA 検出系ではほぼ同じ Cq 値が得られるはずである。今回の結果から、A(H5)亜型検出系のプライマーおよびプローブ領域

に結果の遅れにつながる配列の不一致があるものと考え、ウイルスの遺伝子配列を調べた。しかし、結果の遅れにつながると考えられる変異は見つからなかった。一方で、分離株を用いたリアルタイム RT-PCR 法も実施したが、A(H5)亜型検出系の結果の遅れは、若干見られるものの大幅に小さくなった。以上の結果から、臨床検体中の HA 遺伝子が、保管状態の悪さなどの原因から M 遺伝子と比較してダメージをより受けて、PCR 反応の効率が低下したものと考えられた。分離株を用いても残る A(H5)亜型検出系の結果の遅れに関しては、現在も原因を考察中であるが、診断上問題となる遅れではなく、今回用いたリアルタイム RT-PCR 検出系は感度良く流行株を検出できる方法であることが確かめられた。

次世代シーケンス法により臨床検体ならびに分離株のウイルスのアミノ酸配列の比較解析を実施したところ、HA タンパク質および PB2 タンパク質の配列で哺乳類に親和性を示す変異が見つかった。これらの変異は、分離株の継代歴が増えるほど、変異が占める割合が大きくなり、よりヒトに感染しやすくなっていると考えられた。

SARS-CoV-2 に対する研究では、病原体検出マニュアルに記載されている SARS-CoV-2 リアルタイム PCR 検査法をインフルエンザ型/亜型同定検査法の反応プロトコルに合わせて改変させたところ、検出感度は変化しなかった。また、PCR 増幅曲線の形状はむしろきれいに検出され、Cq 値も全体的に 2 サイクル程度低めに検出され、結果判定がしやすくなった。

特異度の検討では、検討に使用したテンプレート全てに対して増幅を示さず、改変した検査法でも SARS-CoV-2 特異的な反応性を示した。最後に、検出系プライマー配列内に変異を持つ SARS-CoV-2 の臨床検体由来 RNA を用いた検討も実施したが、変異の大きな影響は見られず、正しく結果判定できることが確認された。以上の検討結果から、本研究で改変した SARS-CoV-2

遺伝子検査法を用いるとインフルエンザ型/亜型同定検査法と同一プレートで SARS-CoV-2 遺伝子検査を実施することが可能となり、検査効率の向上が見込まれた。

D. E. 考察ならびに結論

鳥インフルエンザウイルスに対する研究では、臨床検体の確定診断に用いたリアルタイム RT-PCR 法で若干の問題が確認されたものの、感度・特異度の面では診断上問題なく、最新の流行株も検出できることが確認され、引き続き、WHO のホームページ内で情報公開を続けている。

今回診断したネパールで 1 例目となる A(H5N1) ウイルスのヒト感染例の発生の背景としては、クレード 2.3.2.1a の A(H5N1)ウイルスが 2018 年 12 月から 2019 年 2 月にかけてインド北部の鳥の間でアウトブレイクが発生していたことや 2019 年 2 月中旬以降にネパールの家禽や野鳥の間で急速に流行していたことが挙げられる。野鳥や家禽で鳥インフルエンザウイルスが流行している地域では、ヒトへの感染リスクも高いため、引き続き周辺国での流行状況を注視する必要がある。

SARS-CoV-2 に対する研究では、当初懸念された COVID-19 とインフルエンザの同時流行は研究期間中に起こらなかったため、本研究で改変した SARS-CoV-2 検査法は使用されなかった。しかし、同時流行の可能性はまだ残されており、本研究で整備した SARS-CoV-2 とインフルエンザ型/亜型同定検査法を同一プレートで実施できる方法は有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, Fujisaki S, Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N. Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza

A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza. mSphere. 2021 1, 6(1), e01043-20

- ・ Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Development and Evaluation of New Real-time RT-PCR Assays for Identifying the Influenza A Virus Cluster IV H3N2 Variant. Jpn J Infect Dis. 2019 72(2):127-129

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

