

# 狂犬病ウイルス遺伝子検査の精度向上に関する調査研究 (第2報)

## ～参照陽性コントロールを用いたリアルタイムPCRの構築～

微生物部

水越 文徳 船渡川 圭次 桐谷 礼子

### 要旨

日本は狂犬病の清浄国ではあるが、グローバル化した物流の発展に伴い、狂犬病ウイルスに感染した動物が侵入するリスクに常にさらされている。したがって、感受性動物の水際対策だけでなく、侵入した場合の検査体制の整備と維持は必要不可欠である。狂犬病ウイルスの検査で用いられるPCRなどの遺伝子増幅試験は、感度も特異性も高いため、偽陽性や偽陰性の危険性がある。以前、我々はConventional PCRの狂犬病ウイルス検査において、参照陽性コントロールを作成し、コントロールの標的遺伝子の分子量を大きくして、偽陽性・偽陰性を除外するシステムを構築した。本研究では、迅速かつ簡便に解析できるリアルタイムPCRでも応用可能にするため、野生型とは異なるシグナルが検出されるように参照陽性コントロールを改良した。その結果、リアルタイムPCRでも容易にコンタミネーションによる偽陽性を除外することが可能となった。

**キーワード:** 狂犬病、遺伝子検査、リアルタイムPCR、参照陽性コントロール

### 1 はじめに

狂犬病は、リッサウイルス属の狂犬病ウイルス (Rabies Virus; RaV) に感染して起こる動物由来感染症である<sup>1)</sup>。世界で毎年5.5万人以上が犠牲になっており、その多くがアジア及びアフリカに集中している。日本では、狂犬病予防法が制定された7年後の1957年にネコの狂犬病感染事例が報告されたのを最後に、今日までヒト及び動物が国内で狂犬病に感染した報告はなく、狂犬病の清浄性は維持されている。

しかしながら、狂犬病発生国で感染動物の咬傷を受けて感染し、帰国後に発症する事例が報告されており、狂犬病発生国へ渡航する際には十分な注意が必要である。また、清浄国だった台湾で2013年にイヌの狂犬病が発生したが、その後の調査で野生動物 (イタチアナグマなど) がRaVを保持していたことが確認された。日本では、野生動物に関しては十分な調査は行われておらず、全国的なモニタリング調査は急務の課題となる。さらには、物流のグローバル化に伴い、狂犬病発生国からのコンテナや貨物船に感受性のある哺乳類動物が侵入したまま入国されるケースがしばしば報告されている。したがって、清浄国の日本であっても、狂犬病対策と検査体制の確立・維持が今後の重要な課題である。

RaVなどの病原体検出では、感度の高い遺伝子増幅検査が良く用いられる。その遺伝子増幅検査では、標的とするウイルス遺伝子をそのまま陽性コントロールとして使用することが多い。この方法では、検体への陽性コントロールのコンタミネーションが発生した場合、実験室内で汚染されたか否かを区別することは困難であり、誤った判定を導いてしまう。また、検体 (組織の一部など) からの核酸抽出やPCR反応系のテクニカルエラーにより偽陰性になる危険性もある。そこで、このような偽陽性・

偽陰性の危険性を防止するために、参照陽性コントロール (artificial positive control ; APC) を用いた遺伝子検査系の構築を検討した。以前、我々はConventional PCRのRaV検査において、標的遺伝子の分子量を大きくする事で偽陽性を除外するシステムを構築した<sup>2)</sup>。一方、リアルタイムPCRは迅速かつ簡便に解析できて、感度も非常に高いことから、様々な病原体の検査で実用化が進んでいる。本研究では、リアルタイムPCRにおいて、陽性コントロールに付加的な塩基配列を挿入することによって、野生型とは異なる種類のシグナルが検出されるように改良した。その結果、リアルタイムPCRでも偽陽性の危険性を回避できるようにシステムを樹立したので報告する。

### 2 材料と方法

本研究では、狂犬病ウイルスのN遺伝子にイヌの内在性遺伝子のGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、 $\beta$ -Glucuronidase (BGLR) を挿入したConventional PCR用のAPCを基に<sup>2)</sup>、リアルタイムPCRのprobe領域に隣接する部位に別のprobeを認識する塩基配列を挿入した。デザインの詳細は、図1に示す。その挿入された塩基配列は、Porcellato I *et al* の報告よりイヌの18Sを検出するprobeの配列を参考にした<sup>3)</sup>。遺伝子の組み替え・挿入は、制限酵素を用いたクローニングやinverse PCR法を用いた変異導入などの分子生物学的手法を用いた。RaVとGAPDHのConventional PCRは、狂犬病検査マニュアルとFrisk AL *et al* の報告に従ってそれぞれ実施した<sup>4,5)</sup>。また、RaVとGAPDHを標的としたリアルタイムPCRは、Hatakeyama K *et al*<sup>6)</sup>、Jane E. Sykes, *et al*<sup>7)</sup> の方法をそれぞれ用いた。それらのリアルタイムPCRの反応系に、付加的に挿入した塩基配列を認識す

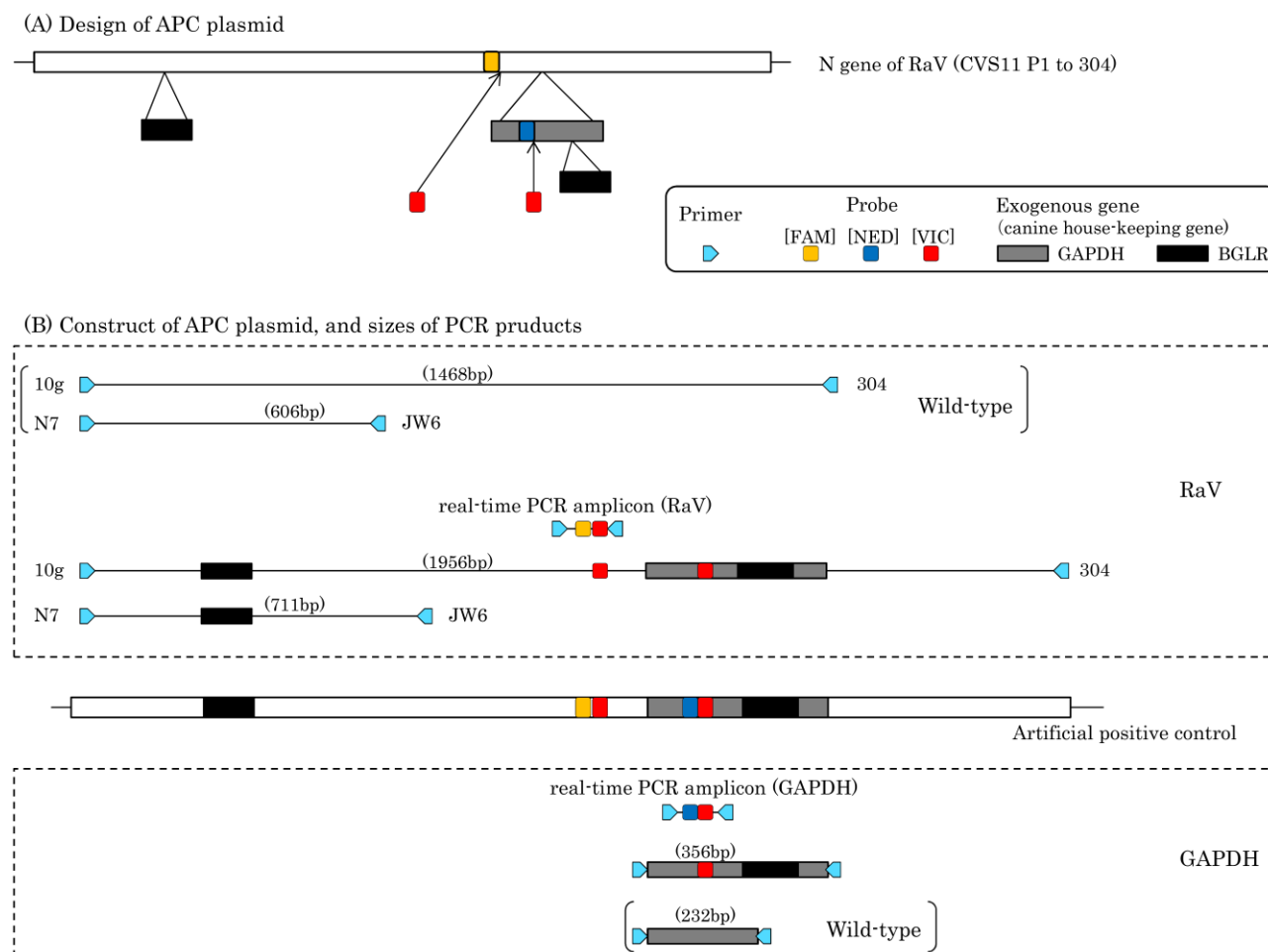


図 1 (A) APC のデザイン (B) APC の構造と PCR 産物のサイズ

る probe を添加して、duplex 系で検出した。RaV には FAM、GAPDH には NED、付加的な配列として挿入した 18S には VIC のシグナルを割り当てた (primer と probe の塩基配列は、参考文献 6、7 を参照)。

### 3 結果

作成した APC の有用性について、リアルタイム PCR、および Conventional PCR で検討した。本研究で構築したシステムは、特異性や感度などの精度を保つために、RaV を検出する系と内在性遺伝子である GAPDH を検出する系を独立して実施した。

#### 3.1 リアルタイム PCR における RaV 検出系の検討

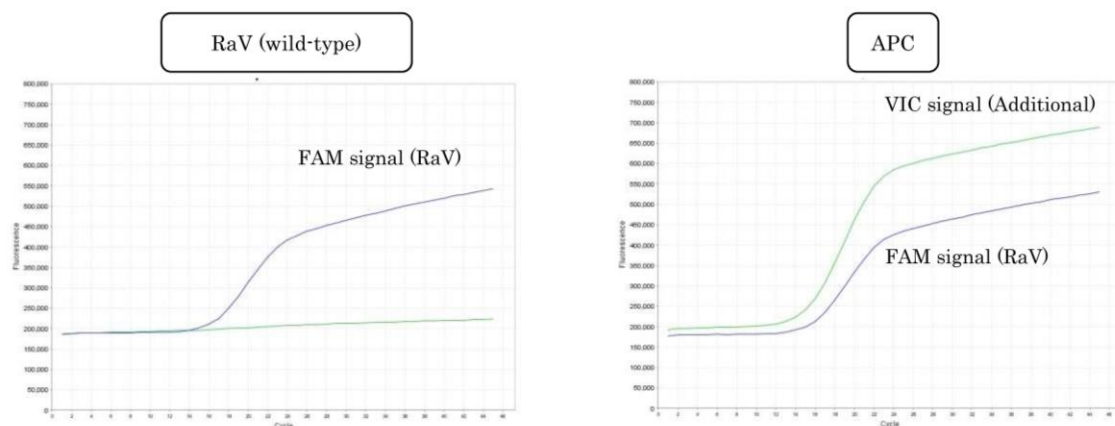
RaV を認識する probe (FAM シグナル) に加えて、付加的に挿入した 18S の配列を認識する probe (VIC シグナル) を同じ反応系に添加し、野生型の RaV 遺伝子と APC をテンプレートとして比較した (図 2A)。野生型 RaV 遺伝子からは、RaV を認識する probe のシグナル (FAM) のみが検出された。一方、APC からは RaV と 18S を認識する probe のシグナル (FAM と VIC) が同時に検出された。このように、野生型の RaV と陽性コントロールである APC では検出されるシグナルが異なる。よって、サンプル中へ陽性コントロールが混入した場合は、付加的なシグナル (VIC) が検出されるので、容易にコンタミネーションが

判断できるようになる。

#### 3.2 リアルタイム PCR における内在性遺伝子 GAPDH 検出系の検討

病原体の遺伝子検査では、組織片の細胞からの核酸抽出や、逆転写反応や PCR 反応系のテクニカルエラーにより偽陰性になる危険性もある。特に RaV 検査で検体となる脳組織のような脂肪を多く含む組織では、核酸抽出の効率がしばしば低下することもある。そこで、検体からの核酸抽出液をテンプレートにして、どの細胞にも普遍的に一定量の mRNA が存在する内在性遺伝子の検出を指標とすることが推奨される。したがって、イヌ内在性遺伝子の GAPDH を挿入した APC は陽性コントロールとして有用である。RaV の反応系と同様に、GAPDH を認識する probe (NED シグナル) と、挿入した 18S を認識する probe (VIC) を同じ反応系で実施し、野生型 GAPDH と APC をテンプレートとして比較した (図 2B)。野生型からは GAPDH を認識する probe のシグナル (NED) のみ検出された。この結果より、検体から確実に核酸が抽出されていることが証明され、検査の妥当性を高めることができる。一方、APC からは GAPDH と 18S を認識する probe のシグナル (NED と VIC) が検出されるので、検体への陽性コントロールのコンタミネーションが発生した場合の指標にもなる。

(A) Detection of RaV



(B) Detection of GAPDH

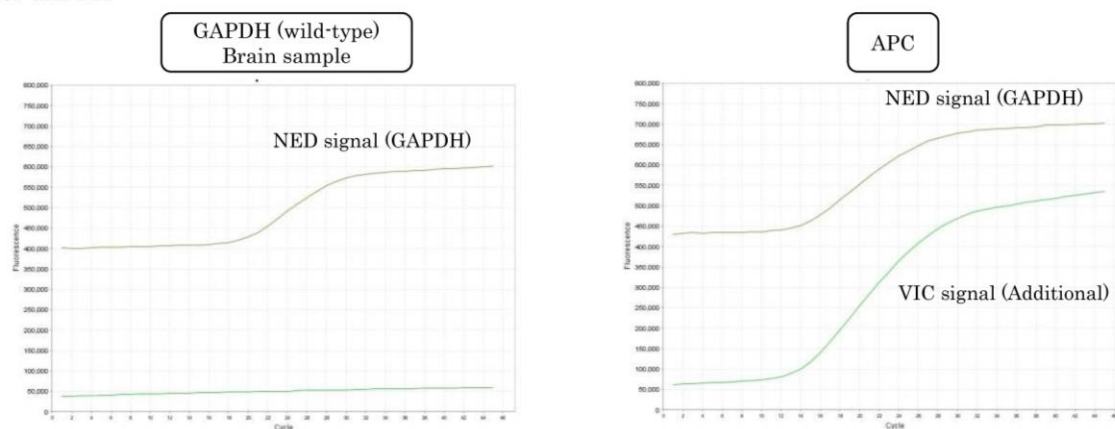


図2 リアルタイムPCRにおける反応性（シグナル検出）の比較

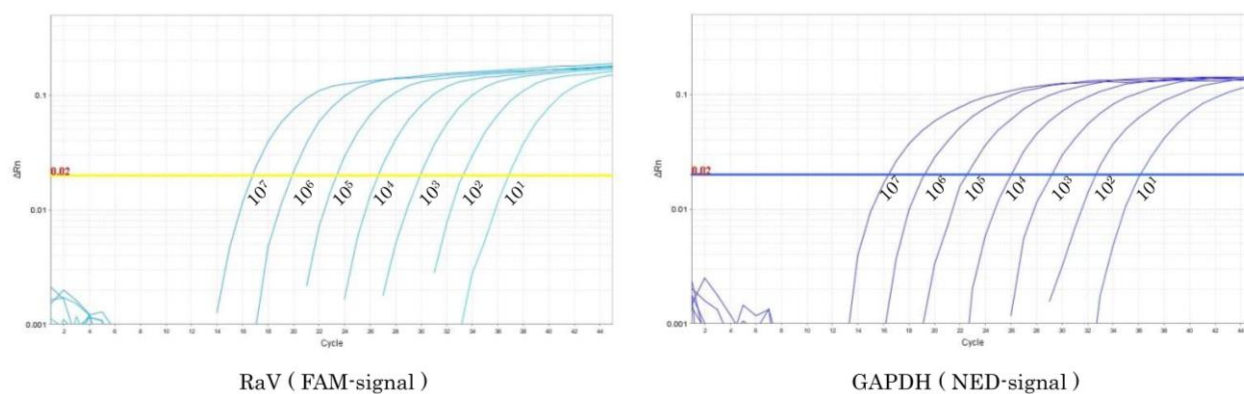


図3 リアルタイムPCRにおける濃度依存的増殖曲線

3.3 リアルタイムPCRにおける濃度依存的反応

RaV と GAPDH に対するシグナル（それぞれ FAM、NED）は、コピー数依存的に検出が可能であった（図 3）。よって、検量線を作成することで、検体中の RaV 量の定量にも応用できる。

3.4 Conventional PCR の確認

APC は、以前に報告したプラスミドを基に改良したものであり<sup>2)</sup>、Conventional PCR でも活用できる。図 4 に示すように、挿入した遺伝子により、野外型に比べて増幅産物の分子量が大きくなる。視覚的に野生株との区別が可能であり、遺伝子検査の信頼性と妥当性を高めることができる。

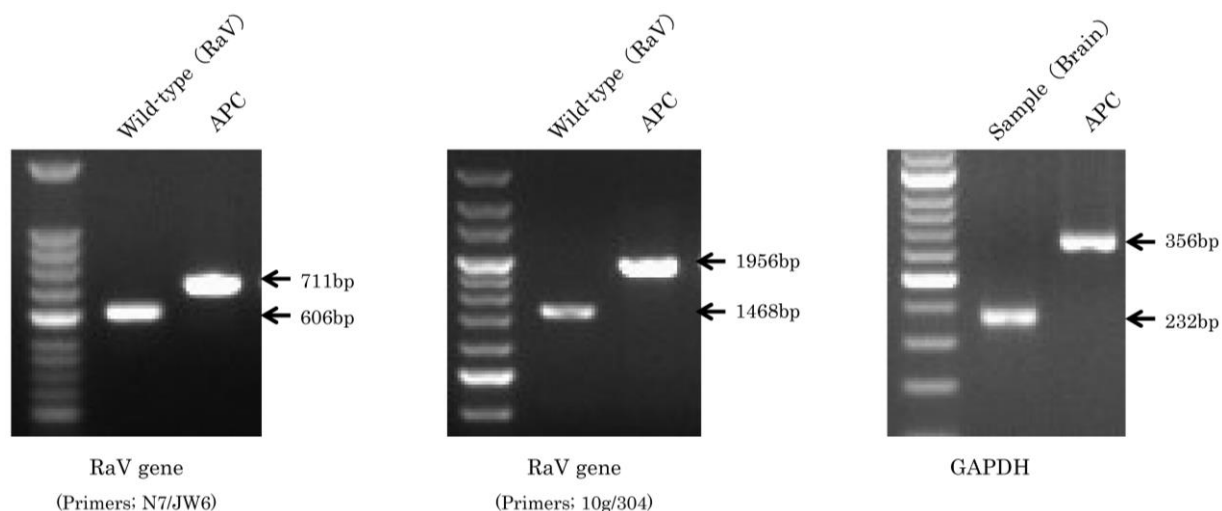


図 4 Conventional PCR における分子量の比較

表 1 検体のリアルタイム PCR 結果の解釈

標的遺伝子	RaV		GAPDH (内在性遺伝子)		結果
	FAM	VIC	NED	VIC	
シグナル					
Case 1	—	—	—	—	偽陰性 (RNA 抽出のエラーなど)
Case 2	+	+	+	+	偽陽性 (APC のコンタミネーション)
Case 3	—	—	+	—	RaV ; 陰性
Case 4	+	—	+	—	RaV ; 陽性

#### 4 考察

本研究では、Conventional PCR だけでなく、リアルタイム PCR でも偽陽性と偽陰性を除外することが出来る APC を作製し、検査精度を向上させた。そのリアルタイム PCR の判定基準を表 1 に示す。APC から FAM/VIC、NED/VIC がそれぞれの系から検出されていることが、試験の反応系の成立には必須条件である。検体から内在性遺伝子の GAPDH のシグナルが不検出の場合、RNA 抽出・逆転写反応などの行程にテクニカルエラーがあり、偽陰性となる (case 1)。次に、検体から付加的なシグナルが検出された場合、陽性コントロール (APC) のコンタミネーションによる偽陽性となる (case 2)。したがって、検体から付加的なシグナルが不検出で、かつ GAPDH が検出されることが検査の成立条件となる。これらの条件を満たした上で、RaV のシグナルが不検出ならば陰性になり (case 3)、RaV のシグナルが検出されれば陽性となる (case 4)。

このように、本研究で構築した APC のシステムを使用することで、リアルタイム PCR と Conventional PCR の両方でクオリティーの高い結果を得ることが可能となる。現在、この APC を日本国内の一部の衛生研究所やベトナム、台湾、モンゴル、フィリピン、タイの関連機関に分与し、実用化に向けてデータを集積している。本研究で

構築したシステムは偽陽性と偽陰性の危険性を回避することが可能となり、この APC は RaV の遺伝子検査の信頼性と妥当性を向上させる強力な検査ツールとなる。

#### 5 参考文献

- 1) 井上智、畠山薫、水越文徳、野口章、国境を超える感染症 狂犬病、Dokkyo J Med Sci.、42、215-223、2015
- 2) 水越文徳、船渡川圭次、狂犬病ウイルス遺伝子検査の精度向上に関する調査研究 (第 1 報) ~参照陽性コントロールの作成と応用~、栃木県保健環境センター年報 平成 26 年度版、20、37-40、2015
- 3) Porcellato I, Brachelente C, Guelfi G, Reginato A, Sforza M, Bongiovanni L, Mechelli L, A retrospective investigation on canine papillomavirus 1 (CPV1) in oral oncogenesis reveals dogs are not a suitable animal model for high-risk HPV-induced oral cancer, PLoS One, 9(11):e112833, 2014
- 4) 狂犬病検査マニュアル ([http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/rabies\\_%2020120608.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/rabies_%2020120608.pdf))
- 5) Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W.

Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol*, 37, 3634-3643, 1999

- 6) Hatakeyama K, Uchitani Y, Okuno R, Sadamasu K, Hosaka M, Kai A, Improved Genetic Methods for Rabies Diagnosis, *Ann Rep Tokyo Metr Inst Pub Health*, 60, 49-54, 2009
- 7) Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM, Use of Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Epidemiology of Hemoplasma Infections in Anemic and Nonanemic Cats, *J Vet Intern Med*, 21 685-693, 2007