

研究情報

PCRによる鳥インフルエンザウイルスの亜型判定法の開発

TSUKAMOTO Kenji

人獣感染症研究チーム 上席研究員 塚本 健司

鳥インフルエンザ（AI）ウイルスはオルソミクソウイルス科に属す、エンベロープを持つ不定形粒子で、粒子表面にはHAとNAと呼ばれる2種類のスパイクが存在します。HAは細胞への吸着に、NAは細胞から離れる際に必要で、それらは抗原性状の違いから、HAは16種類に、NAは9種類に細分類されています。したがって、AIウイルスは高病原性と低病原性に分けられています。AIの診断においてはウイルスの亜型と病原性の判定が重要です。

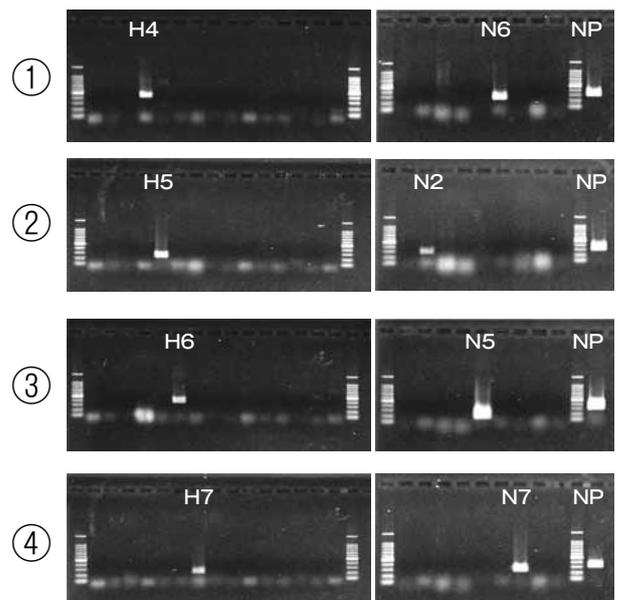
現在、亜型判定に用いられる世界標準法は、抗血清パネルを用いた血清学的方法であり、HA亜型は赤血球凝集抑制反応（HI）試験によって、またNA亜型はノイラミニダーゼ活性抑制（NI）試験で決定されます。これらは「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」においても採用されていますが、特異性、感度が必ずしも十分ではなく、操作が煩雑で、検査に時間を要します。そこで、標準法を補強するために、特異性及び感度が優れた亜型判定法として、PCRの開発を行いました。

AIウイルスは8本の遺伝子分節からなり、HA分節とNA分節もそれぞれ16HA亜型と9NA亜型に分類されています。我々はまず、遺伝子バンクから、できる限り多くのHA遺伝子をダウンロードし、比較したところ、それぞれの亜型に特異的な領域が見つかりました。そこで、それぞれの領域に複数のプライマーセットを設計し、いろいろな組み合わせの中から亜型特異性と検出率が高いセットを選抜し、毎年越冬カモ類から分離される新しいウイルスを用いて、遺伝子検出率を高める改良を重ねていきました。開発には4年の期間を要しましたが、先ずHA亜型判定法が、続いてNA亜型判定法が開発され、同じプロトコール上で検査できることが確認されました。

この検査法による検出率について、研究室で保有している参照株や越冬カモ類から分離したAIウイルス計356株（平均23.7株/HA亜型、39.5株/NA亜型）を用いて調べたところ、354株のHA遺伝子と350株のNA遺伝子が亜型特異的に検出されました。また、交差反応はほとんどなく、亜型特異性が高く、実際にカモ分離ウイルス105株中104株のHA亜型と101株のNA亜型を同時に判定することができました（図）。検査は3時間と迅速で、増幅産物の塩基配列解析から分子疫学解析も可能でした。さらに、H5、H7亜型ウイルスのHA遺伝子には病原性マーカーが存在しますが、我々はこれを検出できるようにプライマーを設計したの

で、増幅産物の塩基配列解析から、病原性の推定も可能です。実際、H5遺伝子50株、H7遺伝子30株の全てにおいて、鶏病原性が推定できました。

AIウイルスのHA遺伝子とNA遺伝子は多様で、今回調べた以外にも多くのウイルスが存在すること、またAIウイルスの変異は今後も進むことから、引き続きプライマーの改良を継続する必要があります。しかし、本法は迅速性、簡便性、精度に優れ、鳥類から分離されたH5、H7亜型ウイルスの病原性推定にも利用できることから、公定法を補強する有用な方法と考えられます。現在、大学や県で行われているカモ類のAIウイルスサーベイランスに利用されており、迅速な亜型判定が可能です。なお、亜型を確定したい場合にはHI試験とNI試験を行うか、塩基配列を決定することが必要です。また、病原性の判定には病原性試験が求められます。



- ① A/duck/Niigata/10/2007(H4N6)
- ② A/duck/Tsukuba/189/2008(H5N2)
- ③ A/duck/Shiga/66/2007(H6N5)
- ④ A/duck/Chiba/13/2008(H7N7)

図1. PCR法によるHAおよびNA亜型の判定