研究情報

パンデミック（H1N1）2009 ウイルスと既存豚インフルエンザウイルスの迅速識別法

HIROMOTO Yasuaki
ウイルス・疫学研究領域　主任研究員　廣本　靖明

2009 年 4 月に出現したパンデミック（H1N1）2009（H1N1pdm）はその後世界中で流行し、2010-2011 年インフルエンザシーズン以降は、季節性インフルエンザとして認知されています。また、このウイルスの人での流行の拡大に伴って、豚などの家畜への感染も確認されています。現在、豚からは H1N1pdm ウイルスの他にも、従来から豚で循環している古典的豚 H1、欧州鳥型豚 H1、人型 H1、H3 および鳥型 H9 亜型ウイルスが分離される可能性が考えられます。豚から分離されたインフルエンザウイルスが H1N1pdm ウイルスであるか、古典的豚 H1、欧州鳥型豚 H1、人型 H1、H3 および鳥型 H9 亜型の豚インフルエンザウイルスであるかを識別することは、人から豚への H1N1pdm の侵入など、豚でのインフルエンザに関する疫学的理解のために重要です。

公衆衛生分野で用いられている H1N1pdm ウイルスを検出するリアルタイム PCR は、H1N1pdm ウイルスと 2009 年以前の季節性インフルエンザのソ連型（H1 亜型）との識別を目的としているため、赤血球凝集素（HA）遺伝子が同じ遺伝子系統に属する H1N1pdm と H1 亜型古典的豚インフルエンザウイルスとの識別が困難です。そこで、豚から分離される可能性のある H1N1pdm、古典的豚 H1、欧州鳥型豚 H1、人型 H1、H3 および鳥型 H9 亜型ウイルスを識別するため、それぞれの系統や亜型の HA 遺伝子を特異的に検出するリアルタイム PCR の系を構築しました。プローブには Minor Grove Binder（MGB）プローブを利用することにより、塩基配列のミスマッチの影響を低減する工夫をしました。構築したプローブ、プライマーセットによって異なる系統・亜型のウイルスを特異的に検出することが出来ました（表 1）。

構築した H1N1pdm、古典的豚 H1、欧州鳥型豚 H1、人型 H1、人型 H3 および鳥型 H9 検出用プローブ、プライマーセットの検出感度は、反応液中においてそれぞれ $10^{-1.5}$ ～ $10^{0.5}$、$10^{-1.5}$ ～ $10^{2.6}$、$10^{1.6}$、$10^{-1.2}$ ～ $10^{0.2}$、$10^{-0.7}$ ～ $10^{0.2}$、$10^{1.0}$ ～ $10^{1.2}$ EID_{50} または $TCID_{50}$ であり、これまで報告されている米国農務省農業研究部（USDA-ARS）や米国疾病予防対策センター（CDC）の H1N1pdm 検出用プローブ、プライマーセットと同等の感度を有していました（表 2）。

構築したプローブ、プライマーセットを用いることによって豚から分離されたインフルエンザウイルスが H1N1pdm ウイルスであるか、従来型の豚インフルエンザウイルスであるかを迅速に識別できることが明らかとなりました。この方法は国内外での豚インフルエンザウイルスサーベイランスに威力を発揮することが期待されます。一方で、インフルエンザウイルスの HA 遺伝子における塩基置換の蓄積に対応するため、プローブ、プライマーセットの継続的な更新が重要な課題です。

掲載誌　Hiromoto Y. et al., J. Virol. Methods. 170(1-2), 2010, 169-172.

表 2. 検出用プローブ、プライマーセットの感度

プローブ、プライマーセット	感度（log_{10} EID_{50} または $TCID_{50}$/反応液）	
H1 型	H1N1pdm	-1.5 ～ 0.5
	古典的豚	-1.5 ～ 2.6
	欧州鳥型豚	1.6
	人型	-1.2 ～ 0.2
H3 型	人型	-0.7 ～ 0.2
H9 型	鳥型	1.0 ～ 1.2

表 1. 検出用プローブ、プライマーセットの特異性

プローブ、プライマーセット		試験ウイルスの反応性（陽性ウイルス数 / 試験ウイルス数）							
		H1 型				H3 型		H9 型	H5 型
		古典的豚		鳥型	人型	人型		鳥型	鳥型
		H1N1pdm	古典的豚	欧州鳥型豚	季節性人	人型豚	季節性人		
H1 型	H1N1pdm	+（3/3）	-（0/13）	-（0/1）	-（0/4）	-（0/2）	-（0/4）	-（0/4）	-（0/2）
	古典的豚	+（3/3）	+（13/13）	-（0/1）	-（0/4）	-（0/2）	-（0/4）	-（0/4）	-（0/2）
	欧州鳥型豚	-（0/3）	-（0/13）	+（1/1）	-（0/4）	-（0/2）	-（0/4）	-（0/4）	-（0/2）
	人型	-（0/3）	-（0/13）	-（0/1）	+（4/4）	-（0/2）	-（0/4）	-（0/4）	-（0/2）
H3 型	人型	-（0/3）	-（0/13）	-（0/1）	-（0/4）	+（2/2）	+（4/4）	-（0/4）	-（0/2）
H9 型	鳥型	-（0/3）	-（0/13）	-（0/1）	-（0/4）	-（0/2）	-（0/4）	+（4/4）	-（0/2）