

高病原性および低病原性鳥インフルエンザのための 高精度なリアルタイム PCR 法

TSUKAMOTO Kenji

ウイルス・疫学研究領域 上席研究員 塚本 健司

高病原性および低病原性の鳥インフルエンザは、H5 または H7 亜型のウイルスによる家きんの呼吸器ならびに全身性の感染症で、ひとたび発生すれば、養鶏産業に甚大な被害をもたらします。また、海外では感染家禽との濃密な接触によるヒトの感染・死亡例が報告されており、公衆衛生の観点からも、家禽の感染を防止することが重要です。我が国では、「高病原性鳥インフルエンザ及び低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」（平成 23 年 10 月 1 日）において、その発生と蔓延を防止するための対策が具体的に定められています。動衛研はこの指針の中で分離ウイルスの亜型と病原性を判定する国家参照機関になっていますが、同時に研究の中核機関として、診断法等の開発が求められています。そこで、我々は地方検査機関でも利用できる、迅速で特異性の高いリアルタイム PCR 法を開発に取り組みました。

本ウイルスの HA 遺伝子は多様性に富むために、遺伝子検査法を開発するにはこれを幅広く検出する必要があります。先の研究で我々は本ウイルスの HA と NA の亜型を判定できる遺伝子検査法（PCR 法）を開発していましたが、その研究において、多様な HA 遺伝子を幅広く検出するには、プライマーに混合塩基を利用する必要があることが確認されました。しかし、法定伝染病の検査にこれを採用するには解決しなければならない点が残されていました。例えば、混合塩基を利用することによって、非特異反応、交差反応が増加するのか、感度は低下しないのか、プライマー当たり何個までなら混合塩基を使

用できるのか、検出漏れをゲノム解析から予測できるのかなどです。そこで、混合塩基を用いたプライマーの有用性と問題点について、多くの参照株、野外株を用いて詳細に検討を重ねた結果、精度の高いリアルタイム PCR 法（プローブ法）が開発されました。

このプローブ法は、欧州や米国で利用されている方法と比較して、感度は同等ですが、検出スペクトルが広い利点があります。これまで日本で分離された H5N1 亜型ウイルス（2004 年、2007 年、2008 年、2010 年）と H5N2 亜型ウイルス（2005 年）はもちろん、感染鶏の臨床材料（スワブや肺乳剤）からもウイルス遺伝子を高感度に検出できます。多くの基礎データが蓄積されたことで、検出漏れをゲノム解析から予測できるようになり、それを元に解析したところ、ほぼ全株のバンク登録遺伝子（H5 亜型、2,112 個；H7 亜型、607 個）を検出できることもわかりました。

全国の家畜病性鑑定施設に設置されている 10 機種種の PCR 機器について、2011 年 8 月から 11 月にかけて、本法の動作を検証したところ、8 機種ではプローブ法を採用できることがわかりました。また、カメラの感度が低く、プローブ法を導入できなかった 2 機種については、同一プライマーを用いた、サイバークリーン法が採用されました。これらの方法は 2012 年 1 月から全国で利用されています。発症鶏のスワブからウイルス遺伝子を約 3 時間で検出できることから、仮に本病が発生しても、迅速な摘発によって被害を最小限にできると期待されています。