狂犬病診断のための遺伝子検査法の改良

畠山 薫，内谷 友美，奥野 ルミ，貞升 健志，保坂 三継，甲斐 明美

Improved Genetic Methods for Rabies Diagnosis

Kaoru HATAKEYAMA, Yumi UCHITANI, Rumi OKUNO, Kenji SADAMASU
Mitsugu HOSAKA and Akemi KAI

東京都健康安全研究センター研究年報　第60号　別刷
2009

東京健安研セ年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 49-54, 2009

狂犬病診断のための遺伝子検査法の改良

畠山　薫[*]，内谷　友美[*]，奥野　ルミ[*]，貞升　健志[*]，保坂　三継[**]，甲斐　明美[***]

国内への侵入が危惧されている狂犬病の診断のために，リアルタイムPCR法を構築し，さらに現行法であるRT-PCR法の感度，特異性を向上するためにRT-nested PCR法への改良を試みた．リアルタイムPCR法ならびにRT-nested PCR法により，従来法より検出感度が1000倍向上した．同時に， RT-nested PCR法は，その増幅産物の遺伝子解析を行うことで疫学解析も可能であった．また，リアルタムPCR法とRT-nested PCR法を組み合わせることで，迅速かつ的確な狂犬病検査対応が可能となった．

キーワード：狂犬病，狂犬病ウイルス，RT-PCR法，RT-nested PCR法，リアルタイムPCR法，N遺伝子

はじめに

狂犬病は，ラブドウイルス科（*Rhabdoviridae*）リッサウイルス属（*Genus Lyssavirus*）に属する狂犬病ウイルス（Rabies virus）によっておこる動物由来感染症の一つであり，発症すると有効な治療法が無く，ほぼ100%死亡するリスクの高い感染症である．このウイルスに対して，哺乳動物のほとんどが感染可能であり，ヒトを含めて，イヌ，ネコ，ウシ，ウマなどの家畜や，キツネ，オオカミ，ジャッカル，アライグマ，スカンク，マングース，コウモリなどの野生動物が感受性動物として知られている．

この狂犬病の流行を媒介している動物は，国や地域により異なっている．アジア諸国等では，イヌに狂犬病が流行しており，ヒトは主にイヌからの咬傷で感染する．一方で，イヌの狂犬病制御がされているヨーロッパや北米では，コウモリ，アライグマ，スカンク，キツネ等に流行しており，これら野生動物からの咬傷による感染が報告されている．

日本では，1950年に制定された狂犬病予防法により，狂犬病対策が推進され，1957年以降狂犬病の発生は認められていなかった．しかしながら，日本のように狂犬病が清浄化されている国はイギリス，オーストラリア等の数カ国のみであり，今なお世界規模で流行し，年間5万人ものヒトが，狂犬病で亡くなっていると言われている[1)]．

2006年には日本人2名がフィリピンで狂犬病に感染し帰国後発症し死亡した[2,3)]．また，2008年の中国四川省大地震発生後に，震災地で狂犬病が流行した等，今なおアジア諸国では，狂犬病は身近な感染症であり，また，日本への侵入が危惧されている感染症の一つである．このため，疑似狂犬病患者や動物が発生した場合，迅速な診断を行いその拡散を未然に防ぐ必要がある．

現行の狂犬病の検査方法は，「狂犬病ガイドライン2001」[4)] にのっとり，①蛍光抗体法による脳組織からのウイルス抗原の検出，②RT-PCR法によるウイルス遺伝子検出，③マウス脳内接種によるウイルスの分離の3法で行っている．しかし，蛍光抗体法は，ヒト患者等の生前診断には使用できず，検出感度も70%と言われており[1)]，また，検体採取後の時間経過とともに偽反応がでるという問題点がある．遺伝子検査法であるRT-PCR法は，増幅産物の遺伝子解析により分子系統樹解析が行えるという利点はあるものの，検体中のウイルス量が少ないと検出できないという欠点がある．マウス脳内接種法は，検体を接種してから，マウスが発症するまで5日，その後経過観察の21～28日間を行うため，1ヶ月近くの時間を要する．

このため，迅速かつ的確な診断が行えるように，リアルタイム PCR法の構築や 従来法であるRT-PCR法の改良を目的とし，狂犬病の検査方法の改良をおこなったので報告する．

材料及び方法

1.狂犬病ウイルス株からのRNAの抽出

各検査法の陽性コントロールとして，狂犬病TCワクチン（RC-HL株）（化血研）を使用した．RNA抽出には，QIAamp viral RNA mini kit（QIAGEN）を使用した．また，凍結乾燥保存されていた狂犬病ウイルス固定毒（fixed rabies）株である西ヶ原株（病原体管理システム・菌株番号200900047）からはセパジーンRVR（三光純薬）を使用し，RNAの抽出を行った．

2. 狂犬病ウイルス遺伝子検出法

1）リアルタイムPCR法

狂犬病ウイルス検出系をTaq Man MGBプローブで設計した．検出用プライマー，蛍光プローブは，表１示した通りである．プライマーおよび蛍光プローブは，Gene Bankに登録された狂犬病ウイルスの核タンパク（N）遺伝子配列をもとに，Primer Express 2.0 (Applied Biosystems:ABI) を用いて設計し，ABI 社に合成を委託した．

リアルタイムPCR法は，ABI　PRSM7900HT (ABI) を使用し，Quanti Tect Probe RT-PCR（QIAGEN）試薬を用いて，RT反応およびPCR反応を行った．すなわち，試薬にRNA

[*] 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3-24-1
[**] 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
[***] 東京都健健康安全研究センター微生物部

表1.リアルタムPCR法用プライマーおよびMGBプローブ

遺伝子領域	プライマー，プローブ名		塩基配列
N 遺伝子	844F	F	5’-GAGACGGCTGTTCCTCACTCTTA-3’
	923R	R	5’-GCATTCGAATAAGGAGACTTCC－3’
	871T	P	5’-FAM-ATTCACTTCCGTTCACTAGG-MGB-3’

表2. RT-nested PCR 法用プライマー

遺伝子領域	プライマー名		塩基配列	増幅サイズ
N 遺伝子	10g-2	F	5’-CTACAATGGATGCCGACAAG-3’	約 510bp
	R11-2	R	5’-TCTATCCTATCTGCRATGTTTG-3’	
	F12	F	5’-TTGTATTCAGAGCTAATAATCAG-3’	約 490bp
	R13-2	R	5’-TTTTATAGTTACCRGTGTTTG-3’	

表3. RT- PCR 法用プライマー

遺伝子領域	プライマー名		塩基配列	増幅サイズ
N 遺伝子	10g	F	5’-CTACAATGGATGCCGAC-3’	1468bp
	304	R	5’-TTGACGAAGATATTGCTCAT-3’	

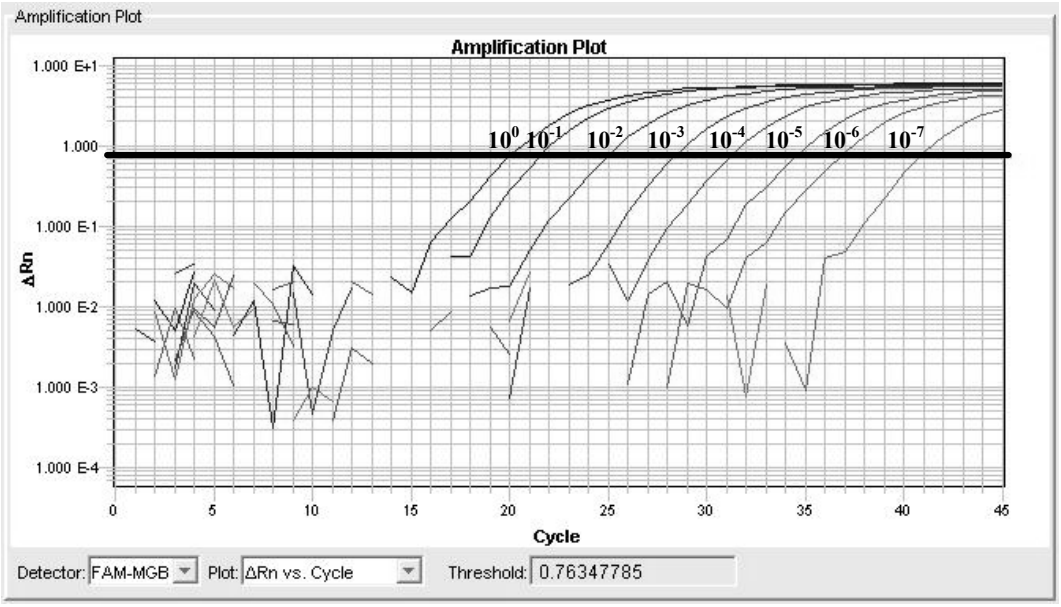

図1. リアルタイムPCR法による狂犬病ウイルス遺伝子検出

4μl とプライマーおよび蛍光プローブを加えて，50℃30分，95℃15分で RT反応後，94 ℃15秒，58 ℃１分の増幅反応を45サイクル繰り返した．これにより，特異的な遺伝子配列が形成された場合，反応チューブ内の蛍光強度が上昇し，判定ラインを通過した検出曲線が得られたものを陽性と判定とした．

2）逆転写反応

RT-nested PCR法およびRT-PCR法に使用するcDNA作成のために，表2，3 に示した10g-2プライマーおよび10gプライマーを用いて，逆転写（RT）反応を行いｃDNAの作成を行った．すなわち，ウイルスRNA 10μl に各プライマーを加え，95℃１分加熱後冷却し，これに4μl の2.5mM ｄNTP(TaKaRa)，4μl のRT buffer（Primega），1μ l の RNasin（Promega），1μl のAMV RTase（Promega）を加え，42 ℃45 分，95 ℃5 分間反応を行った．

3）RT-nested PCR法

cDNA を材料とし，一段階の逆転写PCR（RT-PCR）法を実施後に，プライマーを変え，PCRを行う nested PCR法を行った．プライマーは，狂犬病ウイルスN遺伝子配列を基に設計した．10g-2，R11-2 を一段階目のRT-PCRプライマーとし，さらに，この内側に新たなプライマーF12, R13-2を設計し使用した（表2）．PCR反応は，94℃１分後，94℃30秒，53℃30秒，72℃90秒を30サイクル，72℃７分の条件で行った．反応終了後，２％アガロースゲル電気泳動により490bpの特異バンドを認めたものを陽性とした．

４）RT-PCR法

狂犬病対応ガイドライン2001に記載されている表3 に示した10g，304プライマーによる方法を行った．ガイドラインに記載された方法[4)] に準拠し行い，2%アガロースゲル電気泳動によって，1468bp のバンドを認めたものを陽性と判定した．

3．各検査法の検出感度の検討

陽性コントロールより抽出したRNA（RC-HL株）を10倍に段階希釈した溶液（原液，10^{-1}～10^{-7}）を作成しリアルタイムPCR法，RT –nested PCR法，RT-PCR法の各検査法の検出感度を比較した．

4．塩基配列の決定

西ヶ原株ならびにRC-HL株について，今回開発したRT-nested PCR反応終了後，2%アガロース電気泳動により490bpの特異バンドを確認した．次いで，増幅産物を2.5%低融点アガロースゲル（NuSieve GTG Agarose）で電気泳動後，特異バンドを切り出し精製し，Applied Biosystems 3130ジェネティックアナライザーを用いたdye terminator cycle sequencing 法で塩基配列を決定した．RC-HL株ならびに西ヶ原株から得られた塩基配列は，Mega3を用いて，Neighbor-Joining 法による系統樹解析を行った．

結果および考察

1．狂犬病ウイルス遺伝子検査法の検出感度の比較

狂犬病ウイルスRNA希釈溶液（原液，10^{-1}～10^{-7}）を用いて，リアルタイムPCR法，RT-nested PCR法，RT-PCR法の各検査法による検出感度の比較を行った．リアルタムPCR法（図 1）および RT-nested PCR法では，10^{-7}希釈まで（図2）検出することができたが，RT-PCR法は，10^{-3}希釈までしか，検出することができなかった．(図 2)．このことから，リアルタイムPCR法ならびにRT-nested PCR法は，従来法であるRT-PCR法より検出感度を1000倍向上させることが判明した．

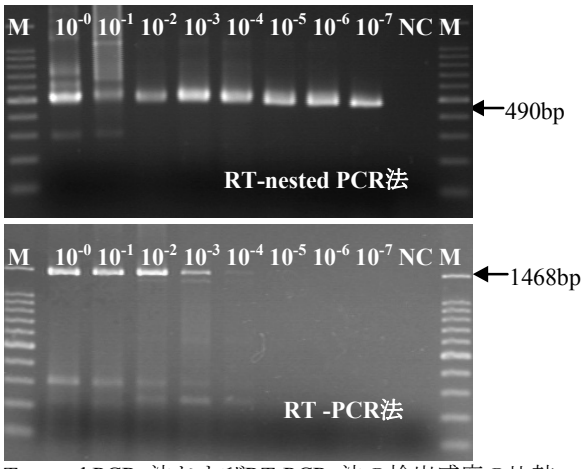

図2．RT-nested PCR 法およびRT-PCR 法の検出感度の比較
NC: 陰性コントロール, M: 100bp マーカー

2．系統樹解析

西ヶ原株およびRC-HL株ならびに，Gene Bank データーベスから得た，日本で研究用株として使用されている高免株，小松川株ならびに世界各地の狂犬病ウイルス[5) ~9)] 81株を選定し，RT-nested PCR法で増幅されるN遺伝子の同等部位である，490 bpを解析した（図3）．

その結果，狂犬病ウイルスは，ヨーロッパ，中近東，アフリカ，ロシア，北米，中米にまたがる最も広域のクラスター１に，中国，東南アジアに分布するクラスター２および北米に分布するクラスター３の３つに分かれた．その中で，高免株，小松川株，西ヶ原株，RC-HL株は，広域なクラスター１に属していた．

新井[5)] によれば，高免株，西ヶ原株ならびにRC-HL株は，同一由来株と推測されているが，我々の系統樹解析でも遺伝子的にほぼ同一であるという結果が得られた．一方，小松川株は，ロシアのハバロフスク地域のタヌキから分離されたウイルスとバイカル湖地域のキツネから分離されたウイルスと同じクラスターを形成し，新井の系統樹解析結果と同一となった．

新井[5)] は，従来法のRT-PCR法（増幅サイズ1,468bp）プライマーペアを用いて，系統樹解析を行っているが，今回，

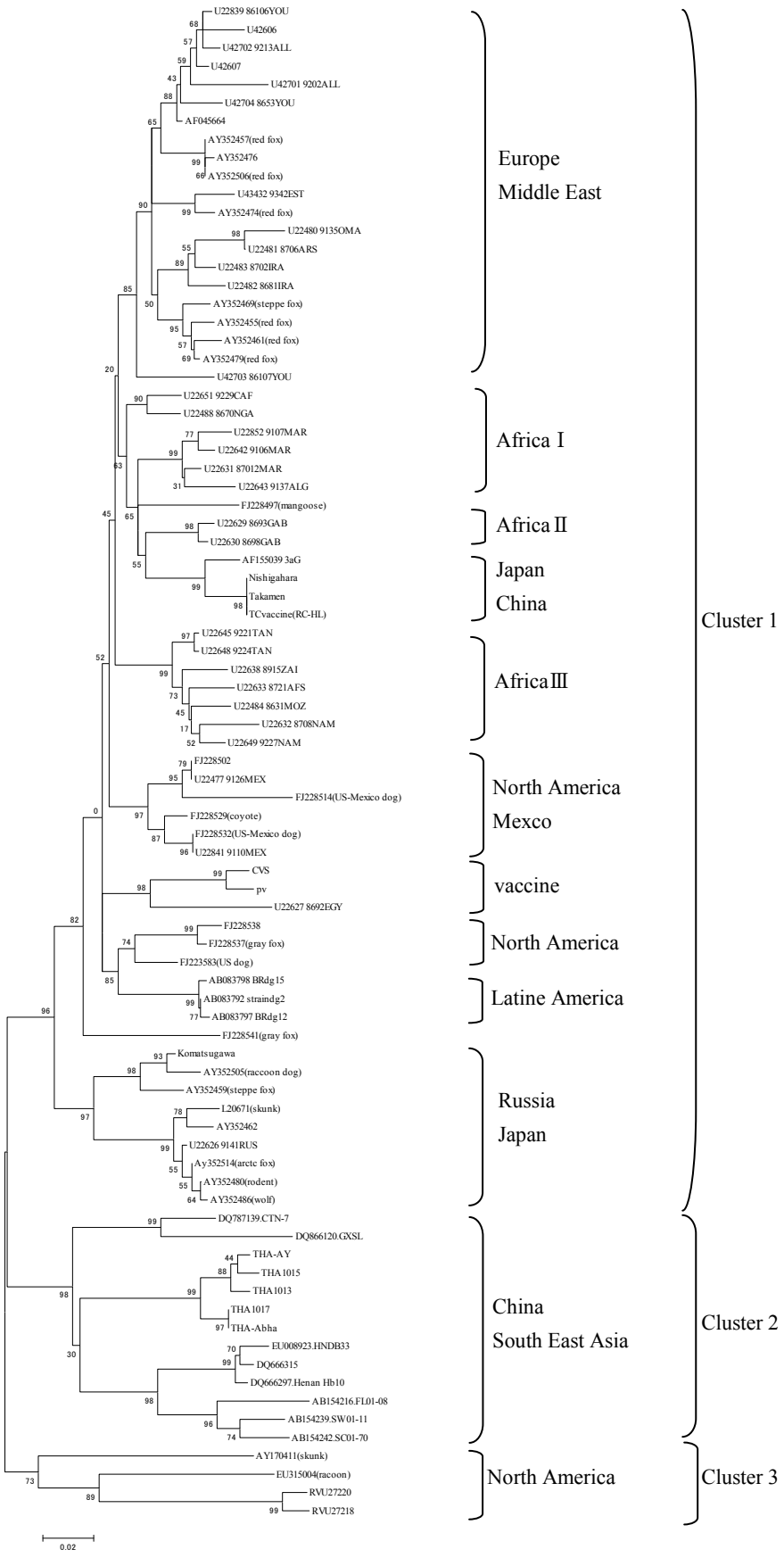

図3. 狂犬病ウイルスN 遺伝子 (490bp) の分子系統樹

改良したより感度の高いRT-nested PCR法で増幅された490bpの遺伝子サイズでも，狂犬病ウイルスの決定ができ，系統樹解析が可能であった．

以上の結果から，狂犬病検査において，今回開発したリアルタイムPCR法，RT-nested PCR法を導入することで，より迅速で的確な検査対応が可能となった．

文　　献

1) 山崎修道：感染症予防必携，第２版，02-106, 2005，日本公衆衛生協会，東京．
2) 高橋華子，相楽祐子，藤田せつ子，他：IASR Vol.28, 64-65, 2007.
3) 山本舜悟, 岩崎千尋, 大野博司, 他：IASR, Vol.28, 63-64, 2007.
4) 平戸浩二：狂犬病対応ガイドライン2001，第1版，106-117，狂犬病対策研究会，東京，2001.
5) 新井陽子：感染症学雑誌，**78**(9), 815-822, 2004.
6) Hervey B., Bachie K., Laurent.A, *et al.*: *Jurnal of General Virology,* **80**, 2545-2557, 1999.
7) Andres V., SerenaA.R., Lillan A.O.*, et al.*: *Emerging Infection Diseases*, **14**, 1849-1854, 2008.
8) Ivan V.K., AlexandreD.B., Lorraine M.M.*, et al.*: J*ournal of Wildlife Diseases*, **40**, 617-631, 2004.
9) Shoufeng Z., Qing T., Xianfu W., *et al.*: *Emerging Infection Diseases*, **15**, 946-949, 2009.

Improved Genetic Methods for Rabies Diagnosis

Kaoru HATAKEYAMA*, Yumi UCHITANI*, Rumi OKUNO*, Kenji SADAMASU*
Mitsugu HOSAKA* and Akemi KAI*

Real-time PCR and RT-nested PCR methods using novelly designed primer sets were developed for the detection rabies virus. Compared with the conventional PCR method, real-time PCR and RT-nested PCR can detect a lower number of virus copies (1000 times more sensitive). The nucleoprotein gene amplified by RT-nested PCR was subjected to sequencing and phylogenic analyses. These techniques successfully identified rabies virus, and they could also be useful for revealing the origin of rabies virus with a geographic area. The combination of real-time PCR and RT-nested PCR can therefore be considered useful for rabies diagnosis.

Keywords: rabies, rabies virus, RT-PCR, RT-nested PCR, real-time PCR, nucleoprotein gene

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan