

## 狂犬病ウイルスの迅速検査を目的としたリアルタイム逆転写PCR法の検討

久保田 寛顕<sup>a</sup>, 小林 甲斐<sup>a</sup>, 安中 めぐみ<sup>a</sup>, 伊藤 仁<sup>a</sup>, 森 功次<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>b</sup>, 千葉 隆司<sup>c</sup>

(外部機関査読者: 鈴木 康規<sup>c</sup>)

1957年以降, わが国における狂犬病の発症例は輸入症例のみである. 今日の国内では, 報告が稀な感染症と言えるが, 発症した場合の有効な治療方法は確立されていないことから, 狂犬病ウイルスへの感染が疑われた場合には迅速な検査対応が求められる. 本検討では, 迅速検査に有効と考えられるリアルタイム逆転写 (RT) -PCRについて性能評価し, 従来法であるコンベンショナルRT-PCRとの感度の比較を行った. 狂犬病ワクチンから抽出したRNAを用いた検討において, リアルタイムRT-PCRはコンベンショナルRT-PCRよりも少なくとも100倍優れた感度を示した. また, コピー数既知の合成DNAを鋳型とした検討により, リアルタイムRT-PCRの検出感度は1wellあたり $5 \times 10^1$ コピー程度と考えられた. 本結果に加え, リアルタイムRT-PCRの検出法として特異的な蛍光プローブを用いる特長から, 狂犬病疑い事例に対する迅速対応に適する検査方法と考えられた.

**キーワード:** 狂犬病, 遺伝子解析, 迅速検査, コンベンショナルRT-PCR, リアルタイムRT-PCR

### はじめに

狂犬病は感染症法において4類感染症全数把握疾患に指定されており, 三種病原体である Rabies virus (*Lyssavirus rabies*: 狂犬病ウイルス) に感染することにより発症する. 感染は狂犬病ウイルスを保有するイヌや野生動物に咬まれたり, 引っ掻かれたりすることにより成立するが, 国内感染例は1957年以来確認されていない. 直近の輸入例としては, 2020年にフィリピンからの帰国者における発症が報告されている<sup>1)</sup>.

狂犬病は今日の国内では極めて稀な感染症ではあるものの, 発症した場合の治療方法は確立されていない疾患である. このため, 国内において狂犬病ウイルスへの感染が疑われた場合は, 患者の命に関わる臨床上の極めて重大な状況であるだけでなく, 公衆衛生上の緊急事態と言え, 迅速な検査対応の必要性に迫られる.

狂犬病ウイルスの検出方法として, 国立健康危機管理研究機構のホームページに掲載されている病原体検出マニュアル<sup>2)</sup>にはコンベンショナル逆転写 (RT) -PCRを用いた方法が示されている. その一方で, 一般的にコンベンショナル RT-PCR と比べて感度, 特異度ともにリアルタイム RT-PCR に優位性があると考えられている. また, 反応後はアガロースゲル電気泳動を必要とするコンベンショナル RT-PCR に比べると, 増幅反応終了とともに結果を得られるリアルタイム RT-PCR は迅速性に優れており, 緊急時の対応に最も適した方法と考えられる. そこで, 本検討ではこうした迅速検査に対応する方法として, リアルタイム RT-PCR による狂犬病ウイルス検出法の検討を試みた. 病原体検出マニュアルに示されたコンベンショナル RT-PCR

と, Wadhwa らのリアルタイム RT-PCR<sup>3)</sup>を比較検討し, 迅速検査への有用性を評価することを目的とした.

### 実験方法

#### 1. 供試サンプル

狂犬病組織培養不活化ワクチン (明治アニマルヘルス株式会社) からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) によりRNAを抽出し (以下, ワクチン抽出液), コンベンショナルRT-PCRならびにリアルタイムRT-PCRの両法に供試した.

また, 人工遺伝子合成サービス (ファスマック) にて1,634 bpの挿入配列を導入したpUCFqプラスミドを合成し, 陽性対照試料として使用した (以下, 合成スタンダード). 1,634 bpの挿入配列は, 今後の検査対応時における使用も考慮して, 狂犬病ウイルス BAI/BAINCR/2019-01/can株 (フィリピン系統) の全ゲノム配列 (MN857167.1) のうち, 各RT-PCRの増幅領域を含んだ1番目から1,534番目までの塩基配列の108番目の塩基の位置に*Anisakis simplex*のゲノムDNA100 bp (AB277822.1)の301番目から400番目を追加した配列である (図1).

#### 2. 希釈系列の調製

ワクチン抽出液についてはRNase Free Water (QIAGEN) を用いて抽出原液の10倍希釈系列 (10<sup>-4</sup>倍から10<sup>-8</sup>倍希釈液) を調製した.

合成スタンダードについては, RNase Free Waterを用いて10<sup>4</sup>から10<sup>0</sup>コピー/ $\mu$ Lとなるように10倍希釈系列を調製した.

<sup>a</sup> 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  
<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部  
<sup>c</sup> 東京農工大学

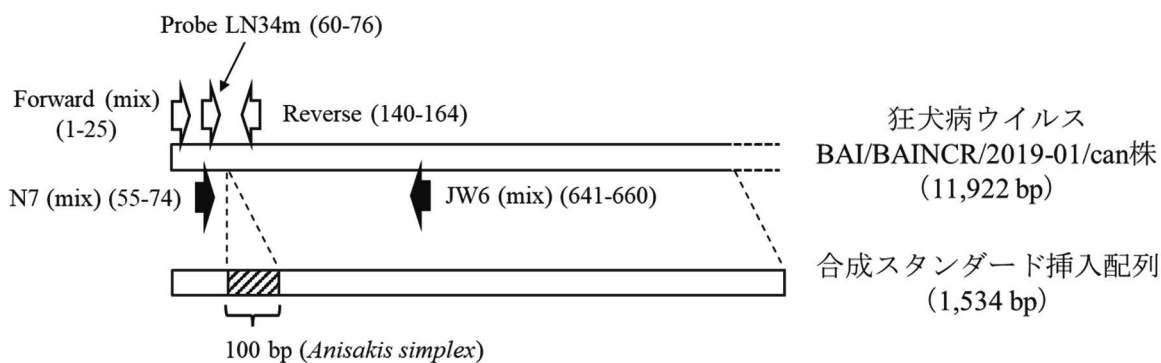


図1. 合成スタンダードの構造. 図中の番号はBAI/BAINCR/2019-01/can株における塩基番号を示している.

### 3. コンベンショナルRT-PCR

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) ならびに表1のプライマー<sup>2)</sup>を用いて50  $\mu$ Lの反応液を調製し, サーマルサイクラー (Veriti, ThermoFisher Scientific) において増幅反応を行った. 各反応にはワクチン抽出液ならびに合成スタンダードの希釈液各5  $\mu$ L, 陰性コントロールとしてRNase Free Water 5  $\mu$ Lを鋳型として使用した. 増幅反応は50°C30分, 95°C15分の後, 94°C30秒, 50°C30秒, 72°C60秒を35回繰り返し, 72°C10分を1回の条件で実施した.

得られたPCR産物のうち2 $\mu$ Lを, 2%アガロースゲルによる電気泳動に供し, Gel-Red (ニッポンジーン) を用いた染色により606 bp (ワクチン抽出液), あるいは706 bp (合成スタンダード) の増幅バンドを検出した.

表1. コンベンショナルRT-PCRのプライマー配列

ミックス	名称	配列 (5'→3')
N7(mix)	N7(C)	ATGTAACACCCCTACAATGG
	N7(T)	ATGTAACACCTCTACAATGG
JW6(mix)	JW6(DPL)	CAATTCGCACACATTTTGTG
	JW6(E)	CAGTTGGCACACATCTTGTG
	JW6(M)	CAGTTAGCGCACATCTTATG

### 4. リアルタイムRT-PCR

QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) ならびに表2のプライマー・プローブにより25  $\mu$ Lの反応液を調製し, リアルタイムPCR解析装置 (QuantStudio 12K Flex Real-time PCR System, ThermoFisher Scientific) により増幅反応・検出を行った. 鋳型にはワクチン抽出液ならびに合成スタンダードの希釈液各5  $\mu$ L, 陰性コントロールとしてRNase Free Water 5  $\mu$ Lを使用した. 増幅反応は50°C30分, 95°C15分の後, 94°C15秒, 50°C30秒, 72°C30秒を45回の条件で実施した.

各希釈段階に対して3 well試行し, 反応終了後はRelative Thresholdに設定した本装置の自動解析によりThreshold Cycle (C<sub>RT</sub>) を決定した. また, 96 wellプレートから反応産物を回収し, アガロース電気泳動に供し, Gel-Redを用いた染色により164 bp (ワクチン抽出液), あるいは

264 bp (合成スタンダード) の増幅バンドの検出により特異的な増幅を確認した.

表2. リアルタイムPCRのプライマー, プローブ配列

名称	配列 (5'→3')
Forward (mix)	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA
	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG
Reverse	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC
Probe LN34m	FAM-ACACCYCTACAATGGAT-MGB

## 結果及び考察

### 1. ワクチン抽出液での検出結果

アガロースゲル電気泳動によりコンベンショナルRT-PCRによる増幅を確認したところ10<sup>-5</sup>倍までの希釈液でバンド像が確認されたものの, 10<sup>-6</sup>倍ではバンド像は確認されなかった (図2).

(bp) M 10<sup>-4</sup>10<sup>-5</sup>10<sup>-6</sup>10<sup>-7</sup>10<sup>-8</sup>NC M

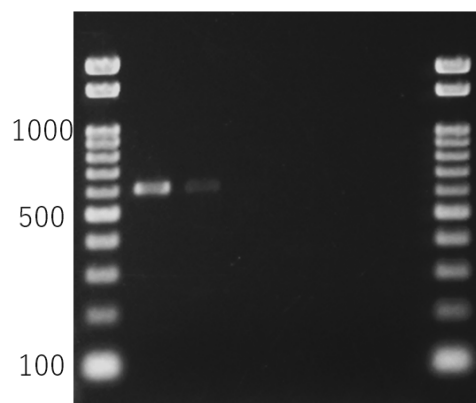


図2. コンベンショナルRT-PCRによる増幅産物のアガロースゲル電気泳動像. Mは分子量マーカー, NCは陰性コントロールを指す.

その一方, リアルタイムRT-PCRでは10<sup>-7</sup>倍まで3 well全てでC<sub>RT</sub>が得られ, 10<sup>-8</sup>倍希釈液では3 wellともに増幅がみられなかった (表3). また, 陰性コントロールからの増幅は見られなかった.

表3. ワクチン抽出液を鋳型としたリアルタイムRT-PCRにおける希釈倍率とC<sub>RT</sub>の関係

希釈倍率	C <sub>RT</sub>		
	Well #1	Well #2	Well #3
10 <sup>-4</sup>	28.8	28.6	28.7
10 <sup>-5</sup>	32.0	31.9	31.9
10 <sup>-6</sup>	35.1	35.0	34.6
10 <sup>-7</sup>	37.8	37.1	37.5
10 <sup>-8</sup>	Not amplified	Not amplified	Not amplified

2. 合成スタンダードでの検出結果

アガロースゲル電気泳動によりコンベンショナルRT-PCRによる増幅を確認したところ5×10<sup>3</sup>コピーまでは明瞭なバンド像が得られたものの、5×10<sup>2</sup>コピー以下のバンド像は不明瞭であった(図3)。

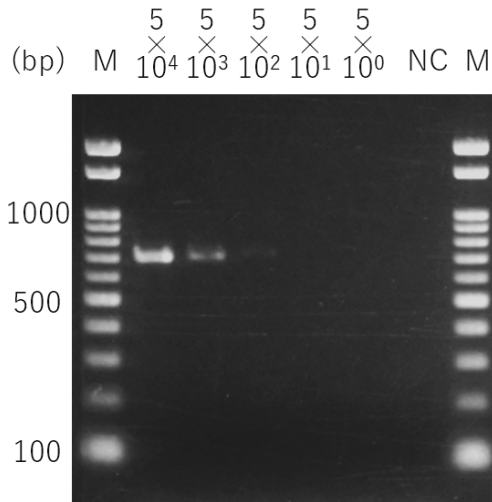


図3. コンベンショナルRT-PCRによる増幅産物のアガロースゲル電気泳動像. Mは分子量マーカー, NCは陰性コントロールを指す.

その一方, リアルタイムRT-PCRでは5×10<sup>1</sup>コピーまで3 well全てで増幅がみられ, 5×10<sup>0</sup>コピーでは3 well中1 wellのみ増幅がみられた. また, 陰性コントロールからの増幅は見られなかった.

表4. 合成スタンダードを鋳型としたリアルタイムRT-PCRにおける希釈倍率とC<sub>RT</sub>の関係

コピー数 /well	C <sub>RT</sub>		
	Well #1	Well #2	Well #3
5×10 <sup>4</sup>	28.4	28.4	28.3
5×10 <sup>3</sup>	31.8	31.9	31.8
5×10 <sup>2</sup>	34.9	34.8	34.9
5×10 <sup>1</sup>	37.1	37.9	37.0
5×10 <sup>0</sup>	Not amplified	38.1	Not amplified

3. リアルタイムRT-PCR反応産物の電気泳動結果

96 wellプレートからリアルタイムRT-PCR産物を回収し, アガロースゲル電気泳動に供したところ, 合成スタンダード, ワクチン抽出液を鋳型とした場合, それぞれ264 bp, 164 bpのバンドが認められた(図4a, b). また, これらのバンドは各反応において3 wellから検出された最小供試量(合成スタンダードにおいて5×10<sup>1</sup>コピー, ならびにワクチン抽出液において10<sup>-7</sup>希釈液)においても検出された.

本結果により, 合成スタンダードを陽性コントロールとしたリアルタイムRT-PCRにおいて実サンプルから増幅反応がみられた場合も, 本スタンダードの混入による誤陽性かをアガロースゲル電気泳動により簡便に判別することが可能と考えられた(図4b).

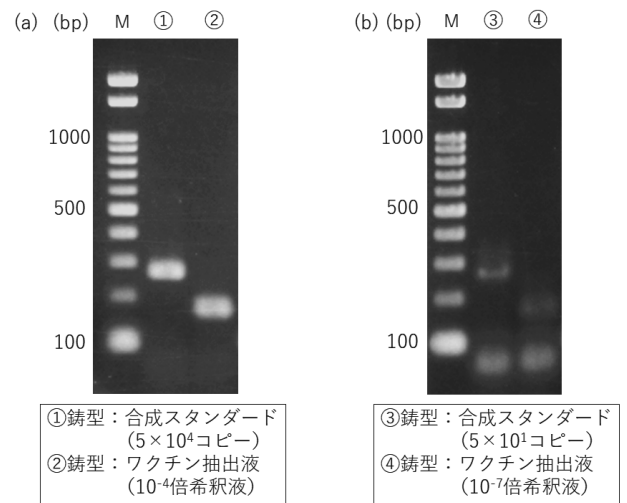


図4 リアルタイムRT-PCR産物のアガロースゲル電気泳動像. (a)は最大供試量, (b)は増幅が確認された最小供試量. Mは分子量マーカーを指す.

4. 検出感度の評価

ワクチン抽出液により逆転写反応を含めた両法の検出感度を直接的に比較したところ, コンベンショナルRT-PCRでは10<sup>-5</sup>倍希釈が陽性陰性を判定する限界であったのに対し, リアルタイムRT-PCRでは10<sup>-7</sup>希釈液まで増幅が確認された. これにより, 後者は前者に比べて100倍は感度が高いと考えられた. 合成スタンダードを用いた検討でも同等の結果が得られ, コンベンショナルRT-PCRでは5×10<sup>3</sup>ないし5×10<sup>2</sup>が検出限界とみられたのに対し, リアルタイムRT-PCRでは5×10<sup>1</sup>まで検出可能であった. 加えて, 逆転写反応を経ない値ではあるものの, 5×10<sup>1</sup>コピーという値は本リアルタイムRT-PCRの検出感度と考えられた.

ま と め

狂犬病ウイルスの検出法として, リアルタイムRT-PCRの性能を評価した. 不活化ワクチンから抽出したRNAを利用した検討により, リアルタイムRT-PCRは従来のコンベンショナルRT-PCRに比べて少なくとも100倍程度は検

出感度が良いことが判明した。逆転写反応を経由しないながらも、合成DNAを用いた検討では、リアルタイムRT-PCRの検出感度は $5 \times 10^1$ コピー程度であると考えられた。

また、インサート配列を追加した合成スタンダードを作成したことで、コンベンショナルPCR実施時だけでなく、リアルタイムRT-PCRにおいてもその増幅産物の大きさから陽性コントロールによるコンタミネーションの可能性を判断できることとなった。本検討により、特異性の高いリアルタイムRT-PCRによる検査系と合わせ、検査系の精度の向上が確保できた。

## 文 献

- 1) 東京都感染症情報センター, 狂犬病 Rabies, <https://idsc.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/diseases/rabies/> (更新日: 2023年8月1日)  
(2025年8月8日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 2) 国立健康危機管理研究機構, 感染症情報提供サイト, 病原体検出マニュアル, 狂犬病検査マニュアル, 2022年2月版,  
[https://idinfo.jihs.go.jp/relevant/manual/010/rabies\\_20220209.pdf](https://idinfo.jihs.go.jp/relevant/manual/010/rabies_20220209.pdf) (2025年8月8日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 3) Wadhwa A, Wilkins K, Gao J, et al.: *PLoS Negl Trop Dis.*, 11, e0005258, 2017.

## Development of Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction for Rapid Detection of Rabies Virus

Hiroaki KUBOTA<sup>a</sup>, Kai KOBAYASHI<sup>a</sup>, Megumi ANNAKA<sup>a</sup>, Hitoshi ITO<sup>a</sup>, Kohji MORI<sup>a</sup>, Kenji SADAMASU<sup>a</sup>  
and Takashi CHIBA<sup>a</sup>

(Reviewed by Yasunori SUZUKI<sup>b</sup>)

Since 1957, rabies infections in Japan have been limited to imported cases. Although now considered a rare infectious disease, there is still no established effective treatment once rabies has developed. Therefore, rapid detection is critical when rabies virus infection is suspected. In this study, we evaluated the performance of real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (real time RT-PCR), which is considered effective for rapid detection, and compared its sensitivity with that of conventional RT-PCR. In experiments using RNA extracted from rabies vaccines, real-time RT-PCR demonstrated a sensitivity at least 100-fold higher than that of conventional RT-PCR. Additionally, using synthetic DNA with a known copy number as a template, the detection sensitivity of real-time RT-PCR was estimated to be approximately 50 copies per well. Based on these findings, and considering the expected improvement in specificity through the use of fluorescent probes, real-time RT-PCR is considered suitable for the rapid detection of suspected rabies cases.

**Keywords:** rabies, genetic analysis, rapid detection, conventional RT-PCR, real-time RT-PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo University of Agriculture and Technology