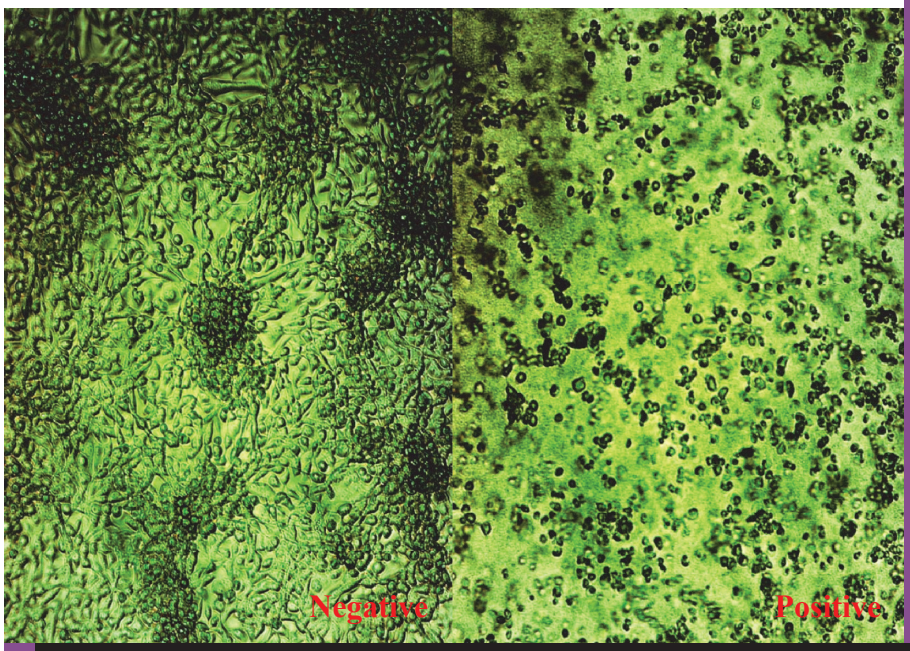
SHIMADZU

Application Note

島津アプリケーションノート No.27（ライフサイエンス）

Lifescience



微量な病原体遺伝子の検出・同定

ウイルス検出におけるリアルタイム PCR の落とし穴と電気泳動による確認の重要性

ー MultiNA の活用 ー

藤本　嗣人[*1]　　曽我部　有司[*2]
T. FUJIMOTO　　Y.SOGABE

1. はじめに

感染症は細菌，ウイルス，真菌，寄生虫などが人の体内に侵入することで起こります。患者さんの病気が起こっている部位から病原体を検出して病原体が何かを明らかにすること(同定)は，その原因を明らかにし，治療や感染拡大防止に役立てることができます。

国立感染症研究所　感染症情報センター 第四室では，原因不明疾患における病原体検索を日常的に実施しています。その際に，大変微量な病原体を検出することもあります。例えば，発症から時間が経った患者さんの場合では，ウイルス量が痕跡程度しか検出されない場合もあります。感度が高く，正確な検査法は重要です。そのため病原体を迅速に検出・同定する手法としてリアルタイムPCRが盛んに用いられています。

リアルタイムPCRには大きく分けて，①インターカレーション法(＊1)と②ハイブリダイゼーション法(＊2)に分けられます。現在，スクリーニング法としていずれかの方法を用いることが多いですが，一度に多項目の検査ができる②のハイブリダイゼーション法が多く用いられる傾向があります。

しかしながら，このリアルタイムPCR法でウイルス量が極微量な場合，陽性であるにもかかわらず陰性と判定されてしまうことが時々見られます。

本稿ではこのようなリアルタイムPCR法の落とし穴とその電気泳動による確認の重要性について述べたいと思います。

＊1 国立感染症研究所　感染症情報センター　第四室
＊2 ㈱島津製作所　分析計測事業部　応用技術部　京都ADC

2. リアルタイム PCR によるウイルス検査

2-1. なぜ今，リアルタイム PCR が用いられるのか？

近年，様々なウイルスに対してリアルタイムPCRが用いられているのは何故でしょうか。理由は，大まかに次のようなことが考えられます。

①迅速
②定量的に検出
③操作する行程が少ないため，反応チューブを開けずに検出でき，コンタミネーション(汚染)の危険性が少ない
④ウイルス分離(＊3)はウイルスの種類や変異によって細胞への感受性が変わることがある

そのため我々の研究室においてもリアルタイムPCRを用いて様々な病原体検査を実施しています。

リアルタイムPCRのハイブリダイゼーション法ではプローブ(＊4)が用いられます。プローブを用いることで目的とするPCR産物だけを検出する方法です。蛍光標識したDNAをプローブとして，PCR反応で増えたDNAとプローブが結合することを反応の原理としています。

2-2. リアルタイム PCR で注意すべきこと

PCR反応において感度や特異性を高めるために，たとえばFRET(＊5)プローブ，TaqMan(＊6)プローブ，サイクリングプローブ(＊7)など，さまざまなプローブが開発されています。

しかし，いずれのプローブを用いてもプローブがアニール(目的とする塩基配列と結合)する部位でミスマッチ(たとえばAがGに変っている)があった場合には，その検出効率は低下し，検出が陰性(偽陰性)となる場合があります。この場合，“ウイルスは変異しやすい”ことを常に念頭におく必要があります。

検出感度を上げるためPCR反応のサイクル数を増やした場合にはプローブが非特異的に加水分解することによる偽陽性も考慮する必要があります。

2-3. 電気泳動による分析

リアルタイムPCRが成功したか否かを知るには，増幅産物の大きさ(サイズ，bp)と量を知ることができる電気泳動による確認が有効な手段です。ところが，ほとんどの場合，リアルタイムPCRの結果が電気泳動で確認されることはありません。

マイクロチップ電気泳動装置MCE-202“MultiNA”は試薬の分注，サンプルのアプライ，分析後の洗浄を全自動で行う装置です。

リアルタイムPCRにおいて反応の立ち上がりが遅く，真の陽性か否かを迷う場合が多く見られます。従来から実施されているアガロースゲル電気泳動法と比べてMultiNAはおよそ一桁感度が高いことから，リアルタイムPCRにおける偽陽性および偽陰性対策にMultiNAを用いることは有効であると思います。次項ではその実例を紹介します。

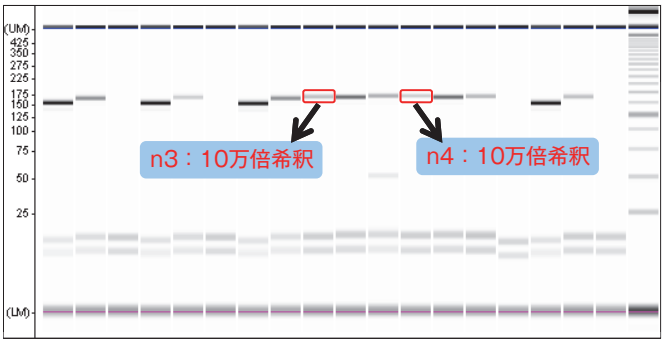
3. ウイルスが微量でリアルタイム PCR 偽陰性となるが MultiNA で陽性になった例

国立感染症研究所　感染症情報センター　第四室では，エンテロウイルス（＊8）を高感度で検出できるリアルタイムPCRによる検出系[1,2]を用いています。このリアルタイムPCRでエンテロウイルスの検出実験を繰り返し行いました（図１）。その結果，エンテロウイルスのコピー数が数（十）コピーの場合は，何度分析を行ってもTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRではすべて陽性でした。しかし，図1に示したとおり低コピー数（10万倍希釈：数コピー以下）の検体ではリアルタイムPCRで陰性であった9件中2件（コクサッキーA群6型（★）で6回中1回，エコーウイルス9型で3回中1回）においてはMultiNAでは陽性という結果が得られました。

このリアルタイムPCRの増幅産物のサイズは156bpです。図１のMultiNAの陽性結果は多少のばらつきはあるものの増幅サイズからすべて陽性であると推定されました。さらに，これらの検体については，塩基配列解析により非特異的な増幅でないことを確認することができました。

繰返し No.	n1	n2	n3	n4	n5	n6
原液	2.9×10^4	3.1×10^4	3.2×10^4	Not tested	Not tested	Not tested
10 倍	3.4×10^4	3.7×10^3	3.9×10^3	Not tested	Not tested	Not tested
100 倍	3.7×10^2	4.8×10^2	4.1×10^2	3.9×10^2	3.8×10^2	4.4×10^2
1000 倍	2.0×10	3.4×10	1.8×10	3.2×10	3.4×10	3.7×10
1 万倍	2.9	1.5	0.9	2.8	2.9	4.6
10 万倍	—	—	—	1.50E-01	—	—

リアルタイム PCR の定量結果

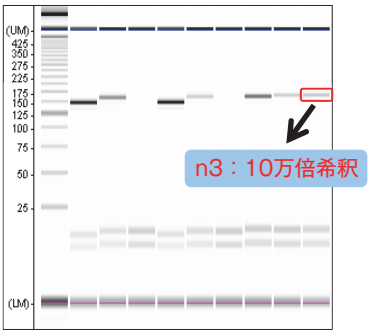


MultiNA 分析結果

a：コクサッキー A 群 6 型

繰返し No.	n1	n2	n3
100 倍	4.2×10^2	4.0×10^2	4.4×10^2
1000 倍	3.0×10	3.0×10	3.9×10
1 万倍	1.0	2.2	1.9
10 万倍	—	—	—

リアルタイム PCR の定量結果



MultiNA 分析結果

b：エコーウイルス 9 型

図１. エンテロウイルス（a: コクサッキー A 群 6 型，b: エコーウイルス 9 型）の希釈液のリアルタイム PCR の定量結果（上表）と MultiNA 解析結果（下図）の比較（繰返し実験）
図中の赤印は 10 万倍希釈で陽性になった検体です。

★エンテロウイルス（コクサッキーA群6型）は2011年に手足口病の全国的な流行を引き起こしました。

4. 無菌性髄膜炎症例からのエンテロウイルス遺伝子の検出

無菌性髄膜炎は，通常の検査では細菌がみつからない髄膜炎です。その85％はエンテロウイルスが病原体とされています。エンテロウイルスは，咽頭や糞便中からも検出されますが起因病原体として確定するには髄液からのエンテロウイルス検出同定が最も確実です。その方法として，ウイルス分離培養，PCR検査が主要な手法として用いられています。

髄液からのエンテロウィルス（エコーウィルス）検出は発症日から検体採取までの日数が経つにつれて分離率が下がる傾向があります（表1）。

表 1.　髄液中エンテロウイルスのリアルタイム PCR および MultiNA による検出結果とウイルス分離結果

発症から髄液採取までの日数	患者数	分離陽性数	リアルタイム PCR および MultiNA 陽性数	分離率（%）
発症当日	7	7	7	100
1 日	15	12	15	80
2 日	5	4	5	80
3 日	5	4	5	80
4 日	1	1	1	100
5 日	2	1	2	50
7 日	2	0	2	0
8 日	2	0	2	0
11 日	1	0	1	0

この分析において髄液のリアルタイムPCRで陽性となった検体で最もウイルス量が少なかったのは2.5コピーでした。

微量のウイルスは数コピーしかないのでリアルタイムPCRで陽性とならないのは，反応系にゲノムが入るか入らないかの確率論的なことであると言う指摘もあります。

しかし，我々は幾つかのメーカーのリアルタイムPCR機器を使用して，微量のウイルスゲノムが，ネステッドPCRで陽性であるのに，陰性と判定される例を経験しています。

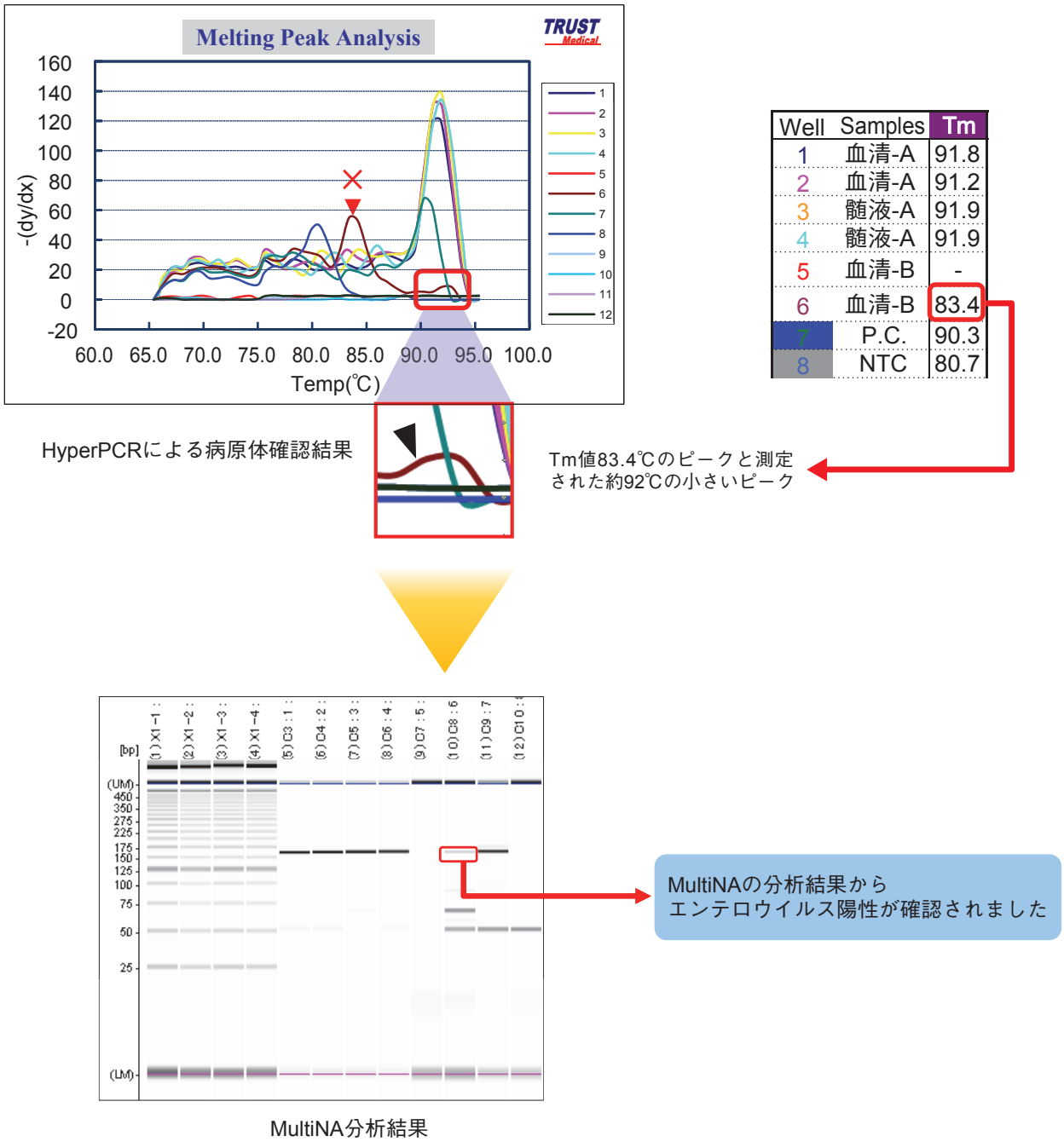
これは，装置自体が真の陽性以外の偽陽性（ノイズ）を拾わないように設定されているためと推測しています。

この表1から分かるように，発症から日が経つにつれて髄液からのエンテロウイルス分離率は下がります。リアルタイムPCRとMultiNAを組み合わせることで発症から7日以降の髄液からもエンテロウイルスを検出できました。

5.HyperPCR と MultiNA

通常のリアルタイムPCRでは反応時間に少なくとも1時間以上を要してしまいます。国立感染症研究所　感染症情報センター　第四室では，ウイルスのRNAをDNAに逆転写，PCRおよび融解曲線解析（Tm解析）を20分程度で終了するHyperPCR（＊9）（超高速PCR）法を開発しました[3]。

現時点でHyperPCR法はインターカレート法を用いています。図2に示すとおりHyperPCR法により小さなピークが検出された検体はMultiNAでは陽性と確認されました。



Well	Samples	Tm
1	血清-A	91.8
2	血清-A	91.2
3	髄液-A	91.9
4	髄液-A	91.9
5	血清-B	-
6	血清-B	83.4
7	P.C.	90.3
8	NTC	80.7

図 2. HyperPCR（超高速 PCR）を用いて血清から極微量のエンテロウイルス遺伝子を検出した例。
Tm 解析で小さなピークが検出された検体は MultiNA では陽性と確認できました。

6. まとめ

国立感染症研究所 感染症情報センター 第四室では様々な方法を駆使して病原診断を行っています。

病原診断は，治療，公衆衛生の向上など様々な目的で行われます。その際に，検査結果が陽性か陰性かはとても大切です。

近年のリアルタイムPCR法の病原診断への応用は迅速であり，感染症に対する有益な情報を与えてくれます。その結果が本当に信頼できるものかどうかは非常に大切です。

リアルタイムPCRでは偽陽性や偽陰性の可能性が排除できない場合があります。これら偽陽性や偽陰性などの落とし穴対策には，実際に増幅産物のサイズと量で確認できるMultiNAは非常に有効です。

MultiNAによる電気泳動の分析結果は，リアルタイムPCRの結果が実際の病態と異なるときや，リアルタイムPCRの結果が微妙なとき（たとえば4頁で紹介した“4.無菌性髄膜炎症例からのエンテロウイルス遺伝子の検出”）に有益な情報を与えてくれるものと思います。

また，MultiNAは多検体を簡便な操作で自動分析することができます。そのため汚染のリスクを抑えられること，ランニングコストが比較的安価なこともあわせて導入する側にとっての利点と言えるでしょう。

さらに，HyperPCR などの新しい超高速PCR法においても，結果の信頼性を担保する上で有用と思われます[4]。

（＊1）インターカレーション：2本鎖の核酸は水素結合によって塩基対を形成しています。この2本鎖の間に入り込む物質をインターカレーターと呼び，エチジウムブロマイドやSYBR GREEN Ⅰなどが良く知られています。

（＊2）ハイブリダイゼーション：一本鎖の核酸が相補的な配列を持つほかの核酸と水素結合により二本鎖となること。

（＊3）ウイルス分離：検体中に存在するウイルスを宿主となる適切な細胞などに植え付けて，一定期間培養後，ウイルスの増殖が認められた場合，ウイルスが分離できたといいます。また，表紙写真では左がウイルス分離陰性（正常細胞），右側がウイルス分離陽性です（細胞が破壊されています）。

（＊4）プローブ：蛍光色素などで標識（ラベル）された短いオリゴヌクレオチド，DNAやRNA断片のこと。

（＊5）FRET：（Fluorescence Resonance Energy Transfer）蛍光共鳴エネルギー転移：
通常，蛍光物質は，励起光（エネルギー）を吸収して励起した状態（励起状態）となり，蛍光エネルギー等を放出して元の状態にもどります。ところが，励起状態になった蛍光物質のそばに別の蛍光物質があると，その物質が励起状態になります。この原理を利用したプローブをFRETプローブといいます。

（＊6）TaqMan：FRETの改良型の方法。プローブ上にレポーターとクエンチャーと呼ぶ２つの蛍光色素を標識しておきます。リアルタイムPCR反応によりプローブが加水分解されると蛍光を発し，PCR産物の増加をモニターできます。

（＊7）サイクリングプローブ：RNAとDNAからなるキメラプローブです。ハイブリダイゼーション後にプローブのRNA部分がRNaseHにより切断されると強い蛍光を発します。

（＊8）エンテロウイルス：ピコルナウイルス科に属する多数のRNAウイルスの総称であり，ポリオウイルス，コクサッキーウイルスA群（CA），コクサッキーウイルスB群（CB），エコーウイルス，エンテロウイルス（68～71 型）など多くを含みます。ポリオウイルスによる急性灰白髄炎（ポリオ）や，エンテロウイルス71型[3]による手足口病，エコーウイルス30型による無菌性髄膜炎など様々な疾患を引き起こします。

（＊9）HyperPCR：PCRの反応時間（昇温，冷却時間）を大幅に短縮した超高速PCR装置です。この機器を使用したHyperPCRシステムは，トラストメディカル社（兵庫県加西市）と国立感染症研究所　感染症情報センター　第四室の共同研究により開発・改良されています。

7. マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合，ゲルの作成，電気泳動，結果の画像取得，後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度，分離，再現性，定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。

図３　マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

MultiNA特長

• わずか3ステップで分析

分析操作は非常にシンプル。分析スケジュールを作成したらあとは試薬とサンプルをセットしてスタートボタンをクリックするだけです。ゲルの作成は不要です。

• 最大120分析（108検体）まで自動分析

最大4枚セットすることができるマイクロチップで120分析（96+12検体）を自動分析します。

• 幅広い分野に活用

遺伝子研究用途をはじめ食品分析，ジェノタイピング，微生物分析，感染症分析，RNA分析など広い分野で活躍します。

図４　MultiNA 専用マイクロチップ

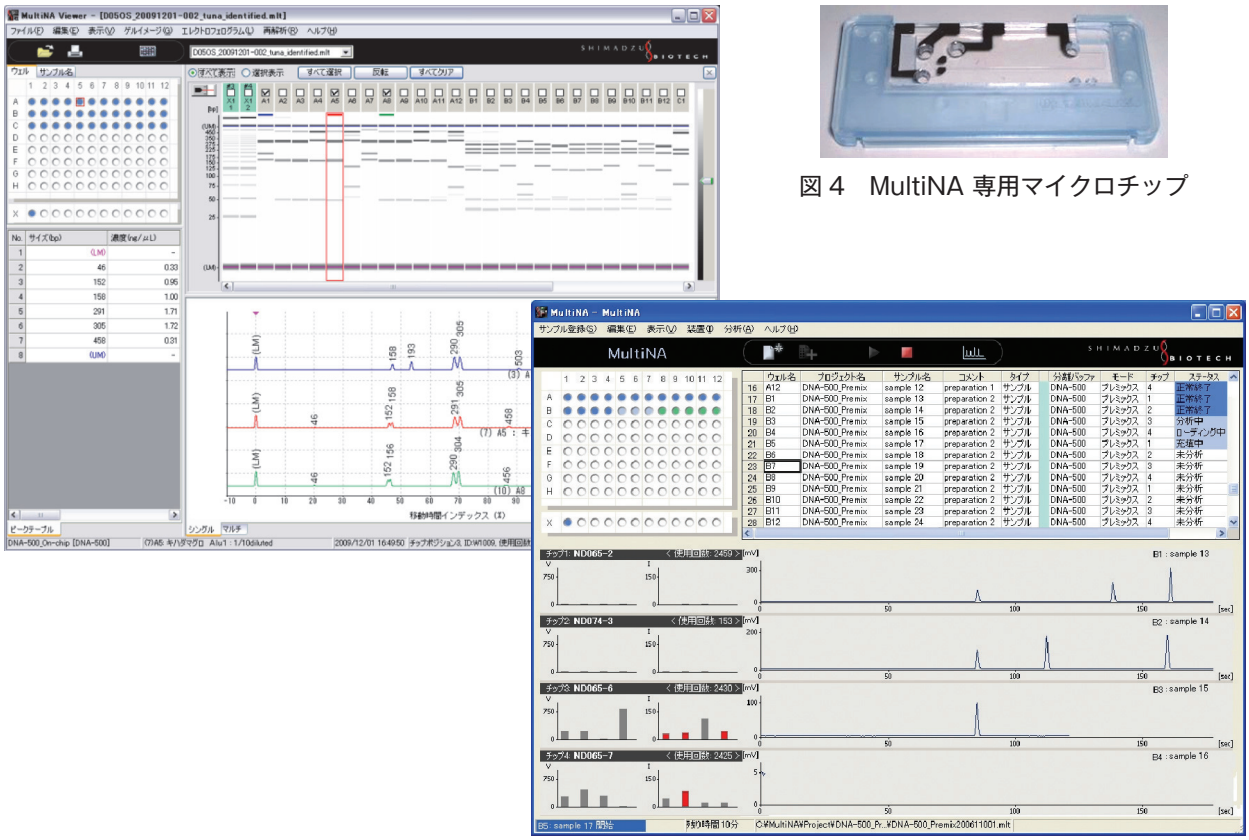


図５　MultiNA 操作画面

[引用文献]

1: Fujimoto T, Izumi H, Okabe N, Enomoto M, Konagaya M, Chikahira M, Munemura T, Taniguchi K. Usefulness of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the diagnosis of echovirus aseptic meningitis using cerebrospinal fluid. Jpn J Infect Dis. 2009 Nov; 62(6):455-7.

2: Fujimoto T, Yoshida S, Munemura T, Taniguchi K, Shinohara M, Nishio O, Chikahira M, Okabe N. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. Jpn J Infect Dis. 2008 Nov; 61(6):497-9.

3: Fujimoto T, Konagaya M, Enomoto M, Tsuboi K, Hashimoto K, Taniguchi K, Kodama T, Okabe N. Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan; 63(1):31-5.

4：藤本嗣人，花岡希，岡部信彦，牛島廣治，谷口清州．マイクロチップ電気泳動と超高速1step-RT-HyperPCRシステムを組み合わせた髄膜炎患者髄液からのエンテロウイルス高感度検出．臨床とウイルス．2011 May; 39 (2): S67（第52回日本臨床ウイルス学会抄録集）

表紙写真提供：国立感染症研究所　感染症情報センター　第四室
ヒトの横紋筋細胞由来の細胞株（RD細胞）においてエンテロウイルスにより細胞が破壊されていく様子（光学顕微鏡写真）
左：ウイルス分離陰性（正常細胞），右：ウイルス分離陽性（感染細胞）

初版発行　2011年11月

＊本資料は発行時の情報に基づいて作成されており，予告なく改訂することがあります。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 応用技術部

島津コールセンター　0120-131691　TEL:075-813-1691

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく,いろいろな情報サービスが受けられます。

3219-11102-20A-IK
2011.11