

狂犬病ウイルス遺伝子検査の精度向上に関する調査研究（第1報）

～参照陽性コントロールの作成と応用～

微生物部

水越 文徳 船渡川 圭次

要旨

狂犬病はアジア及びアフリカを中心に流行しており、毎年 55,000 人以上が犠牲になっている。日本は狂犬病の清浄国であるが、グローバル化した物流の発展に伴い、狂犬病ウイルスに感染した動物が侵入するリスクに常にさらされている。したがって、感受性動物の水際対策だけでなく、侵入した場合の検査体制の整備と維持は必要不可欠である。ウイルスの遺伝子検査は、感度・特異性が高く、ささいなエラーが結果に影響して誤った判定を導く危険性がある。そこで、狂犬病ウイルスの遺伝子検査の更なる精度向上をめざし、偽陽性・偽陰性を回避するシステムの構築を目的とした。本研究では、狂犬病ウイルスに外来性遺伝子を挿入した参照陽性コントロールを作成し、PCR 産物のサイズを大きくすることで、視覚的に野生株との区別が可能になった。従って、本研究の成果により、遺伝子検査の信頼性と妥当性を高めるシステムを構築することができた。

キーワード：狂犬病、遺伝子検査、参照陽性コントロール

1 はじめに

狂犬病は、リッサウイルス属の狂犬病ウイルスに感染して起こる動物由来感染症である。世界で毎年 5 万人以上が犠牲になっており、その多くがアジア及びアフリカに集中している。日本では狂犬病予防法が制定された 7 年後の 1957 年にネコの狂犬病事例が報告されたのを最後に、今日までヒト及び動物が国内で狂犬病に感染した報告はなく、狂犬病の清浄性は維持されている。しかしながら、狂犬病発生国で感染動物の咬傷を受けて感染し、帰国後に発症する事例が報告されており、狂犬病発生国へ渡航する際には十分な注意が必要である。また、清浄国だった台湾で 2013 年にイヌの狂犬病が発生したが、その後の調査で野生動物（イタチアナグマなど）が狂犬病ウイルスを保持していたことが確認された。日本でも、野生動物に関しては十分な調査は行われておらず、全国的なモニタリング調査は急務の課題となる。ゆえに、検査で陽性と判断することだけではなく、狂犬病が国内に存在しないデータを積極的に蓄積していくことも非常に重要である。さらには、物流のグローバル化に伴い、狂犬病発生国からのコンテナや貨物船に感受性のある哺乳類動物が侵入したまま入国されるケースがしばしば報告されている。そのため、ヒトへの健康被害防止のためにも、狂犬病が疑われる動物の検査が必要となる場合もある。従って、清浄国の日本であっても、狂犬病対策を徹底する必要がある。また、解剖と実験室内の検査によって狂犬病であるか否かを確認できる体制を確立し、それを維持することは、地方衛生研究所の重要な役割である。

狂犬病ウイルスなどの病原体検出では、感度の高い遺伝子増幅検査（PCR など）がよく用いられる。その遺伝子検査では、標的とするウイルス遺伝子そのものを陽性

コントロールとして使用することが多い。この方法では、検体に陽性コントロールがコンタミネーションした場合、実験室内で汚染されたか否かを区別することは困難であり、誤った判定を導いてしまう。そこで、このような偽陽性の危険性を防止するために、標的遺伝子に外来性遺伝子を挿入して増幅産物の分子量を変えて、野外株との違いを可視的に判断できる参照陽性コントロール（artificial positive control；APC）を作製した。

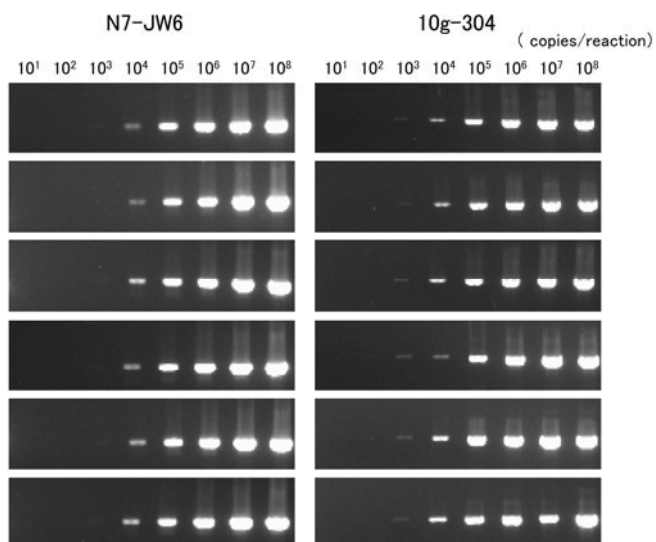
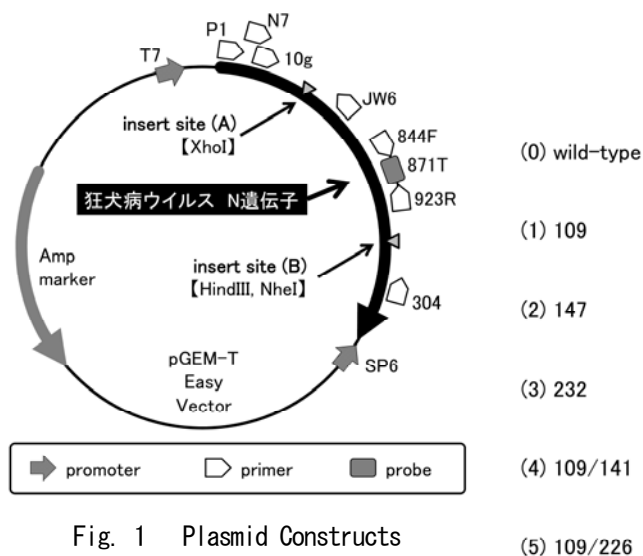
また、病原体の遺伝子検査では、組織細胞からの核酸抽出や PCR 反応系のテクニカルエラーにより偽陰性になる危険性もある。そこで、検体からの抽出 RNA をテンプレートに house keeping 遺伝子の増幅を行い、RNA 抽出や PCR 反応の正当性を確認することが推奨される。そこで、APC に挿入する外来性遺伝子をイヌ house keeping 遺伝子にして、偽陰性の可能性を否定するためにも有用なツールとして使用できるように APC のコンストラクトをデザインした。

2 材料と方法

APC は、狂犬病ウイルスの N 遺伝子を挿入したプラスミドをもとに作製した。詳細は Fig. 1 に示す。狂犬病ウイルスの N 遺伝子上のプライマー 10g と JW6 の領域の間（insert site A）、およびプライマー JW6 と 304 の領域の間（insert site B）に、外来性遺伝子を挿入した。それらの外来性遺伝子は、下記のイヌの house keeping 遺伝子の一部の領域をイヌの腎臓由来の MDCK 細胞株から抽出した RNA をテンプレートにして増幅した PCR 産物を用いた。【① β -Glucuronidase（BGLR；103 bp）、② Ribosomal protein S5（RPS5；141 bp）、③

Table 1 Plasmid Constructs と PCR 増幅産物のサイズ

プラスミド	挿入遺伝子		PCR 産物のサイズ	
	site A	site B	N7-JW6	10g-304
(0) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 (wild-type)			606 bp	1468 bp
(1) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins109	①BGLR	(-)	715 bp	1577 bp
(2) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins147	②RPS5	(-)	753 bp	1615 bp
(3) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins232	③GAPDH	(-)	838 bp	1700 bp
(4) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins109/141	①BGLR	②RPS5	715 bp	1718 bp
(5) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins109/226	①BGLR	③GAPDH	715 bp	1803 bp



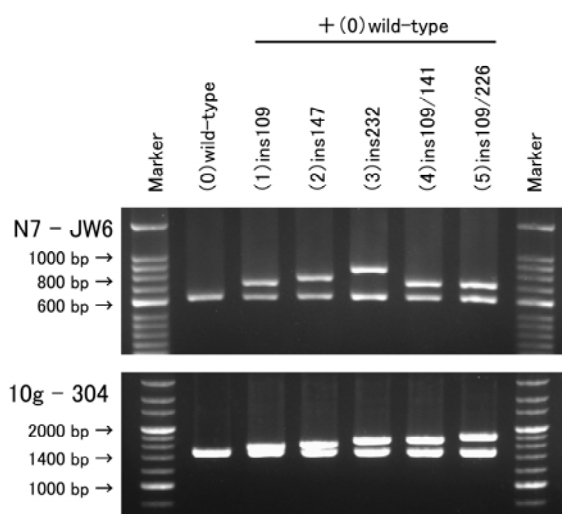
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH ; 226 bp)】

それらの外来性遺伝子を増幅させるプライマーには、増幅産物の外側に制限酵素が認識する配列を付加するように設定した。付加した制限酵素サイトを利用して分子生物学的手法により遺伝子を挿入した。Table 1 に、挿入した遺伝子の組合せと、N7-JW6 および 10g-304 の PCR 系で遺伝子を増幅させた場合の分子量を示す。狂犬病ウイルスの PCR 検査は、狂犬病検査マニュアル¹⁾に従って実施した。

また、イヌ house keeping 遺伝子である GAPDH の陽性コントロールとして APC が有用であるか否かを確認するため、GAPDH の PCR を実施した。

3 結果

狂犬病ウイルスの N 遺伝子の一か所、もしくは二か所に外来性遺伝子を挿入した 5 種類のプラスミドを作製し、N7-JW6 系、10g-304 系のプライマーペアで PCR を行って、



プラスミドのコピー数依存的な反応感度を確認した。その結果、いずれのプラスミドにおいても、野生株の N

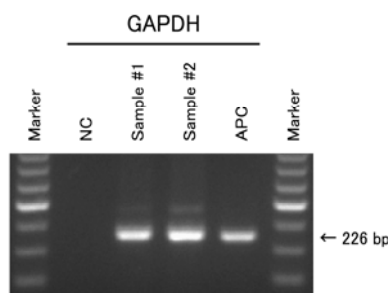


Fig. 4 PCRによるGAPDHの検出

遺伝子と同様の感度を示した (Fig. 2)。さらに、2つのプライマーペアのPCR系のそれぞれについて、視覚的な有用性を確認したところ、(5) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins109/226 のPCR産物が、オリジナルのN遺伝子と区別が最も容易であった (Fig. 3)。以上の結果より、APCとして(5)のプラスミドを用いることとした。

また、内在性遺伝子の陽性コントロールとしてのAPCの有用性を検証するために、脳検体 (Sample #1、#2) とともにGAPDHのPCRを行った。その結果、目的の分子量の遺伝子産物が得られたことから、GAPDHの陽性コントロールとしても有用であることが示された (Fig. 4)。

4 考察

ウイルスの遺伝子検査は高感度であるため、陽性コントロールが微量でもコンタミネーションすると誤った判定を導く。そのような危険性を避けるために可視的にウイルス陽性とコンタミネーションを区別できる参照陽性コントロール (APC) を作製した。しかしながら、外来性遺伝子を挿入した場合、伸長反応などのPCR条件に影響を受ける可能性がある。そこで、大きさが異なる3種類の外来遺伝子を一か所、もしくは二か所の領域に挿入したプラスミドを作製して、PCR感度の違いを検討した。PCRの感度はいずれの分子量の遺伝子においても野生株のN遺伝子と差はなく、標的遺伝子が増幅した。これらのうち、(5) pGEM-T Easy CVS11 P1/304 ins109/226 は、

電気泳動において可視的に区別が最も容易だった。したがって、このプラスミドをAPCとして活用することとした。

また、検体 (脳組織) からのRNA抽出やPCR反応系が正しく実施されていないと、偽陰性となってしまう。そのような偽陰性の可能性を除外するために、どの細胞にも普遍的に一定量のmRNAが存在するhouse keeping遺伝子を指標とすることが推奨される。そのようなhouse keeping遺伝子がPCRで検出できれば、RNA抽出、cDNA合成とPCR反応が適切に行われていることが示され、偽陰性の可能性が除去できる。このAPCは、イヌのhouse keeping遺伝子を外来性遺伝子として挿入したので、偽陰性を除外するためのコントロールとしても有用である。

さらに、このAPCは狂犬病ウイルスを検出するリアルタイムPCR²⁾で用いられるプライマー・プローブの領域には、遺伝子を挿入しておらず、そのままの状態である (Fig. 1)。したがって、リアルタイムPCRにおいて、コピー数が既知の陽性コントロールとしても有用である (data not shown)。

イヌの脳検体とAPCをテンプレートとして、狂犬病ウイルス遺伝子とhouse keeping遺伝子 (GAPDH) のPCR検査を実施した結果の解釈をTable 2に要約した。まず、APCをテンプレートとしても狂犬病ウイルスとGAPDHの遺伝子が検出されない場合 (Case 1)、PCR反応系にエラーが生じていることになる。また、GAPDHがAPCから検出され、脳検体から検出されなかった場合 (Case 2)、検体からRNAが抽出されていない可能性があり、テクニカルエラーによる偽陰性となる。つまり、脳検体とAPCからGAPDH、APCから狂犬病ウイルスの増幅産物を検出することは、検査系の正当性・妥当性には必須である。その条件を満たした上で、脳検体からの狂犬病ウイルスの増幅産物が検出されて、APCのサイズと同じだった場合 (Case 3)、APCのコンタミネーションの可能性があり、偽陽性となる。しかしながら、脳検体からの狂犬病ウイルスの増幅産物がAPC由来の増幅産物とサイズが異なる

Table 2 PCR結果の解釈

標的遺伝子 テンプレート	狂犬病ウイルス		GAPDH		結果の解釈
	脳検体	APC	脳検体	APC	
Case 1	—	—	—	—	偽陰性 (PCR 反応系のエラーなど)
Case 2	—	+	—	+	偽陰性 (RNA 抽出のエラーなど)
Case 3	+	+	+	+	偽陽性 (APC のコンタミネーション)
	同じサイズ				
Case 4	+	+	+	+	狂犬病ウイルス陽性
	異なるサイズ				
Case 5	—	+	+	+	狂犬病ウイルス陰性

場合 (Case 4)、本来の標的遺伝子のサイズと一致すれば、狂犬病ウイルスが陽性となる。一方、脳検体から狂犬病ウイルスが検出されなければ (Case 5)、検体はウイルス陰性となる。このように、高感度である遺伝子検査は些細なエラーが結果に影響するため、この APC は偽陽性だけでなく偽陰性の危険性も除外できる強力な検査ツールである。

今回作成した APC は、conventional PCR のみにおいて、偽陽性を判定することが可能である。一方、real-time PCR では、偽陽性の区別はできない。この APC をさらに改良し、real-time PCR でも偽陽性の可能性を判別できるシステムを構築する予定である。また、RNA の状態では非常に失活しやすいため、安定性を考慮して APC を plasmid DNA の状態で使用した。しかしながら、狂犬病ウイルスは RNA ウイルスであるため、コントロールも RNA であることが望まれる。そこで、plasmid 上の RNA polymerase promoter を利用して RNA を転写し、精製度や保存性を検証して、RNA での供給を目指す。

平成 26 年度に、国立感染症研究所と JICA のプログラムを介して、狂犬病発生国であるベトナムの関連機関(ベトナム国立衛生疫学研究所及びホーチミン・パスツール研究所)に、この APC を譲渡して診断技術支援を行い、現地で実用化することとなった。日本国内での狂犬病の発生は希少であるが、発生時に大きな社会的混乱が予想される。狂犬病は常に輸入動物由来感染症になりうる可能性があり、検査法の確立・維持を行い、啓発等を活用して公衆衛生対策を充実させることは重要である。従って、発生国などの研究機関と連携したラボラトリーネットワークを活用した上で、海外での最新の流行状況を把

握して、調査・研究等を行うことのメリットは大きい。今後も、ベトナム及び日本の関係者の間でコミュニケーションをとり、遺伝子検査の更なる向上と APC の改良・応用について検討と研究を進めていく。

5 結論

①PCR 検査で偽陽性と偽陰性を除外することが出来る参照陽性コントロール (APC) を作製。

②作製した参照陽性コントロール (APC) を、日本とベトナムの狂犬病検査で実用化。

6 謝辞

本研究の共同研究者である国立感染症研究所獣医科学部の井上智先生と野口章先生、東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科の畠山薫先生には、心から感謝の気持ちを申し上げます。並びに、この調査研究を遂行するにあたり、御支援を頂きました栃木県動物愛護指導センター、栃木県生活衛生課、及び健康増進課の皆様には、お礼を申し上げます。

7 参考文献

- 1) 狂犬病検査マニュアル (第 2 版; 国立感染症研究所)
- 2) Hatakeyama K, Uchitani Y, Okuno R, Sadamasu K, Hosaka M, Kai A, Improved Genetic Methods for Rabies Diagnosis, Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 60, 49-54, 2009