

症状が類似した疾患の病原体を迅速・同時に検出するリアルタイムPCR法の検討

池田 稔^{*1}、長田 綾美、赤星 諒^{*2}、高嶋 絵実

Real-time PCR for rapid and simultaneous detection of pathogens in clinically similar diseases

Minoru Ikeda, Ayami Nagata, Ryo Akahoshi, Emi Takashima

Key words : 感染症発生動向調査Infectious disease surveillance、Multivirus Real-time PCR

はじめに

国立感染症研究所（（現）国立健康危機管理研究機構）感染病理部が開発・実施しているMultivirus Real-time PCRは、Real time PCRを用いたウイルスの網羅的解析法の一つで、163種類のウイルスを96ウェルのプレート上で同時に検出する解析法である¹⁾。当センターでは、今回、同解析法を応用したウイルスの限定網羅的なスクリーニング検査系の確立を目指し、感染症発生動向調査（小児科病原体定点疾患 病原体サーベイランス）における検査業務への導入を検討したので報告する。

同調査において、症状が似ている疾患（類症）については、従来法では、個別の疾患ごとに原因と推定される複数の候補病原体の検査を順次実施しているが、本解析法を導入することで同時に複数の病原体検出が可能となることから、検出病原体以外の個別検査の大部分が省略でき検査業務が効率化できる。

また、今回、検査業務への応用にあたり以下の項目を検討時の留意点とした。1. 症状の似ている疾患の原因病原体グループに限定した網羅的な同時検出（個別検査の効率化）。2. 複雑なマルチプレックスを使用しない（系の単純化）。3. TaqManプローブを使用しない（検査の低コスト化）。4. 現在、使用用途がなく大量保管中の新型コロナウイルス検査キット（タカラバイオ）付属試薬の活用（検査資材の有効活用）。1. については、発熱・発疹を引き起こす8疾患の主な原因となる病原体をモデルケースとして設定した。2. について、文献1ではTaqManプローブ（HEX, FAM）を用いたDuplex PCRの設

定（1ウェルあたり2病原体を検出）であったが、反応時の干渉を避けるためシングルでの設定とした。3. については、今後、検査パネルの対象病原体が多いほど導入時の初期コストがかかるため、インターラーテーを使用した低コストでの系を初期設定とした。4. について、同試薬は、当センターにおいて安定的に使用してきた実績もあるため活用することとした。

材料及び方法

1 主な材料

RNAおよびDNA抽出：

QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)

反応試薬：

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit(タカラバイオ)付属試薬 2×RT-qPCR Mix、100×dsGreen for Real-Time PCR（フナコシ）

各種病原体検出系プライマーセット（表1）

臨床検体（咽頭ぬぐい液）12検体（それぞれ以下の病原体を過去に検出、超低温保管）：

アデノウイルス2型、コクサッキーウィルスA6型、コクサッキーウィルスA16型、コクサッキーウィルスB3型、エコーウィルス18型、ライノウイルスA型、パレコウイルス3型、VZVウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型、ヒトヘルペスウイルス7型、ムンプスウイルス、パルボウイルスB19型

2 方法

RNAおよびDNA抽出：

キット添付のプロトコルに従って実施。

検出系とリアルタイムPCR実施方法：

発熱・発疹を引き起こす8種のウイルスを検出す

* 1 大分県食肉衛生検査所

* 2 大分県西部保健所

るリアルタイムPCR検出系（インターラーティ法）プライマーセットを設定した（表1）。同反応系は、96ウェルプレートあるいは8連チューブを使用し、同一の温度条件下で1ウェルあたり1病原体を検出できるよう設定した。1検体あたり8ウェル（各8種の病原体検出系）に各種病原体検出臨床検体からの抽出核酸あるいは同希釈系列を分注しリアルタイムPCRを実施した。（リアルタイムPCR装置：LightCycler96 (Roche)）

リアルタイムPCR反応試薬組成：

RNase free Water 7.0μL, 2×RT-qPCR Mix 10.0μL, 10μM Forward Primer 0.4μL, 10μM Reverse Primer 0.4μL, 100×dsGreen for Real-Time PCR 0.2μL, 各DNA or RNA template 2μL添加

リアルタイムPCR温度条件（病原体核酸の種類によらず統一条件とした）：

(RT)52.0°C 5min 4.4°C/sec, 95.0°C 10sec 4.4°C/sec, (PCR)95.0°C 5sec 4.4°C/sec, 60.0°C 30sec 2.2°C/sec, 35cycles、(Cooling)40.0°C 30sec 2.2°C/sec、(melt curve)95.0°C 5sec 4.4°C/sec, 65.0°C 15sec 2.2°C/sec, 95.0°C 0sec, 5Readings/°C

各検出系の特異性：

検出系ごとに、12種の病原体に対する特異性を検討した。

各検出系のPCR能力：

各種病原体検出臨床検体の希釈系列を用い検出系ごとに検量線を作成し、融解曲線、增幅効率※および再現性を検討した。なお、エンテロウイルス検出系はコクサッキーウィルスA6型検体を用い、検出限界については各ウイルスのコピー数が不明であったため参考とした。

※検出系の增幅効率：

$$\text{增幅効率} (\%) = \{(10^{-1/(検量線傾き)}) - 1\} \times 100$$

結果

12種の病原体検出臨床検体に対する特異性については以下の通りであった（図1）。アデノウイルス検出系では、アデノウイルス2型検体（Cq値：27.2cycles, Tm値：82.7°C（単位は以下省略））において検出した。エンテロウイルス検出系では、コクサッキーウィルスA6型検体（Cq：25.2, Tm：81.0）、コクサッキーウィルスA16型検体（Cq：30.4, Tm：81.5）、コクサッキーウィルスB3型検体（Cq：25.1, Tm：81.5）、エコーウィルス18型検体（Cq：31.8, Tm：81.5）、ライノウイルスA型検体（Cq：29.7, Tm

：78.5）、ムンプスウイルス検体（Cq：33.4, Tm：72, 81）において検出した。パレコウイルス3型検出系では、パレコウイルス3型検体（Cq：29.5, Tm：74.5）、エコーウィルス18型検体（Cq：33.4, Tm：71.0）において検出した。VZVウイルス検出系では、VZVウイルス検体（Cq：28.1, Tm：77.2）において検出した。ヒトヘルペスウイルス6型検出系では、ヒトヘルペスウイルス6型検体（Cq：31.7, Tm：78.0）、パルボウイルスB19型検体（Cq：33.7, Tm：78.5）において検出した。ヒトヘルペスウイルス7型検出系では、ヒトヘルペスウイルス7型検体（Cq：32.1, Tm：73.3）、コクサッキーウィルスA6型検体（Cq：33.0, Tm：73.5）、ムンプスウイルス検体（Cq：32.0, Tm：73.5）において検出した。ムンプスウイルス検出系では、ムンプスウイルス検体（Cq：29.8, Tm：75.0）において検出した。パルボウイルスB19型検出系では、パルボウイルスB19型検体（Cq：23.8, Tm：79.2）において検出した。

各検出系のPCR能力については以下の通りであった（図2）。增幅曲線についてどの検出系においても阻害等は認められなかった。アデノウイルス検出系では、Tm：82.7°C（低コピーでは77, 78°C付近）、增幅効率：85.7%、R²：0.99であった。エンテロウイルス検出系では、Tm：81.0°C（低コピーでは72.0°C付近）、增幅効率：104.2%、R²：0.99であった。パレコウイルス3型検出系では、Tm：74.5°C（低コピーでは71.5°C付近）、增幅効率：96.5%、R²：0.99であった。VZVウイルス検出系では、Tm：77.2°C（低コピーでは73.5°C付近）、增幅効率：116.2%、R²：0.98であった。ヒトヘルペスウイルス6型検出系では、Tm：78.0°C、增幅効率：106.6%、R²：0.82であった。ヒトヘルペスウイルス7型検出系では、Tm：73.3°C、增幅効率：59.5%、R²：1.00であった。ムンプスウイルス検出系では、Tm：75.0°C、增幅効率：92.9%、R²：0.98であった。パルボウイルスB19型検出系では、Tm：79.2°C（高コピーでは81.5-83.5付近、低コピーでは74, 75°C付近）、增幅効率：96.9%、R²：1.00であった。

考察

今回構築した各検出系において、各種病原体検出臨床検体からいずれも想定される病原体がそれぞれ検出可能であった（図1）。エンテロウイルス検出系では、同属のコクサッキーウィルス、エコーウィルスおよびライノウイルスの他に、ムンプスウイル

ス検体から高Cq値で検出されたが融解曲線分析で固有のTm値（高Cq値の場合に認められたTm値も含む）に近い値であったため、混合感染の可能性が否定できなかった。同様に、パレコウイルス3型検出系でのエコーウィルス18型検体、ヒトヘルペスウイルス6型検出系でのパルボウイルスB19型検体、ヒトヘルペスウイルス7型検出系でのコクサッキーウィルスA6型検体およびムンプスウイルス検体においても混合感染の可能性が否定できなかった。なお、これらを従来法で確認したところ、コクサッキーウィルスA6型検体からヒトヘルペスウイルス7型を検出したが、同検体以外からは検出されなかった（未掲載データ）。ヒトヘルペスウイルス7型は幼小児期に初感染し健康成人の唾液から高率に分離されることから³⁾、今回の検討でも検出された可能性が考えられた。このように、混合感染と考えられる増幅が一部認められたものの、過去に検出が認められた病原体については漏れなく検出されたことから、スクリーニング検査系として有用と考えられた。加えて、非特異と考えられる増幅については、各反応系で実施する融解曲線分析において個別のTm値と比較することである程度判別可能と考えられた。

次に、各検出系のPCR能力については、今回、臨床検体からの希釈系列・検量線作成であったため、元々コピー数が少ないヘルペスウイルス6型検体やヘルペスウイルス7型検体の場合は、信頼性がやや低く追加検討が必要と考えられた。融解曲線分析については、高Cq値（低コピー数）を示す検体の場合、固有のTm値からピークが低温領域にシフトする傾向が認められた。また、原因是不明であるが、パルボウイルスB19型検体のように安定しない検体も認められた。増幅効率については、ヘルペスウイルス7型検出系の59.5%を除き、一般的に有効とされる80～120%の範囲内に収まっていた。再現性についても、ヘルペスウイルス6型検出系の0.82を除き、0.98以上であった。従って、大方の検出系でPCR能力について遜色ない結果であり、一部追加検討が必要な検出系を除き、検査系として採用しても問題ないと考えられた。

また、検査系として採用の場合、当初掲げた「個別検査の効率化」、「系の単純化」、「検査の低コスト化」、「検査資材の有効活用」に沿ったかたちとなり得る。

今回の検討結果は、感染症発生動向調査（小児科

病原体定点疾患 病原体サーベイランス）における代表的な病原体について、本検査法の可能性を検討したものである。対象とする病原体の検査系については、組み換え可能であるため、今後、実務に則した検査系パネルの設定、塩基配列解析なども含めた検査フローの検討や細菌⁴⁾・寄生虫も含めた食中毒スクリーニング検査への応用等、さらに検討の余地が広がるものと考えられた。

参考文献

- 1) Harutaka Katano, et al. : A Novel Real-Time PCR System for Simultaneous Detection of Human Viruses in Clinical Samples From Patients With Uncertain Diagnoses, *Journal of Medical Virology*, 83 : 322—330 (2011)
- 2) 国立健康危機管理研究機構 病原体検査マニュアル 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査・診断マニュアル（第4版）改訂第1版 令和7年1月
- 3) 国立健康危機管理研究機構 病原体検査マニュアル 突発性発疹 Human herpesvirus 6(HHV-6) およびHuman herpesvirus 7(HHV-7) (改訂版) 平成27 (2015) 年8月3日
- 4) Hitomi Fukumoto., et al. : Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples, *Int J Clin Exp Pathol* , 8(11) : 15479-15488(2015)

表1 各種病原体検出系プライマーセット

アデノウイルス検出系（咽頭結膜熱関連）	
セット名：汎アデノウイルス（文献2）	(5'-3') 増幅産物長：139bp
Hexon3	GACATGACTTCGAGGTCGATCCCATGGA
Hexon4	CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA
エンテロウイルス検出系（手足口病、ヘルパンギーナ関連）	
セット名：No.75 Enterovirus（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：156bp
Enterovirus_F	TCCTCCGGCCCCCTGA
Enterovirus_R	AATTGTCACCATAAGCAGCCA
パレコウイルス3型検出系	
セット名：No.111 Parechovirus 3（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：81bp
Parechovirus 3_F	CCTTTTTATTCAAACAAGCCTCTGA
Parechovirus 3_R	GTGCATCATTGGTCTACACATAAGAA
VZVウイルス検出系（水痘・帯状疱疹関連）	
セット名：No.35 Varicella zoster virus（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：139bp
Varicella zoster virus_F	GATGGTGCATAACAGAGAACATTCC
Varicella zoster virus_R	CCGTTAAATGAGGCGTGACTAA
ヘルペスウイルス6型検出系（突発性発疹関連）	
セット名：No.38 Human herpesvirus 6（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：110bp
Human herpesvirus 6_F	TTAACAAACTCTACTTATTGACTCTC
Human herpesvirus 6_R	GTGGGCGGTGAGCAGTTCTATA
ヘルペスウイルス7型検出系（突発性発疹関連）	
セット名：No.39 Human herpesvirus 7（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：74bp
Human herpesvirus 7_F	TCCAGAAATGATAGACAGATGTTGGT
Human herpesvirus 7_R	CATGGGCACATTTGTACTTCAAAG
ムンプスウイルス検出系（流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）関連）	
セット名：No.139 Mumps virus（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：79bp
Mumps virus_F	TCTCACCCATAGCAGGGAGTTATAT
Mumps virus_R	GTTAGACTTCGACAGTTGCAACAA
パルボウイルスB19型検出系（伝染性紅斑（リンゴ病）関連）	
セット名：No.25 Parvovirus B19（文献1）	(5'-3') 増幅産物長：76bp
Parvovirus B19_F	AAGCCGTGTGCACCCATT
Parvovirus B19_R	GTACTGGTGGGCGTTAGTTACG

図1-1 8検出系の各病原体検出検体における特異性（增幅曲線およびmelting curve）

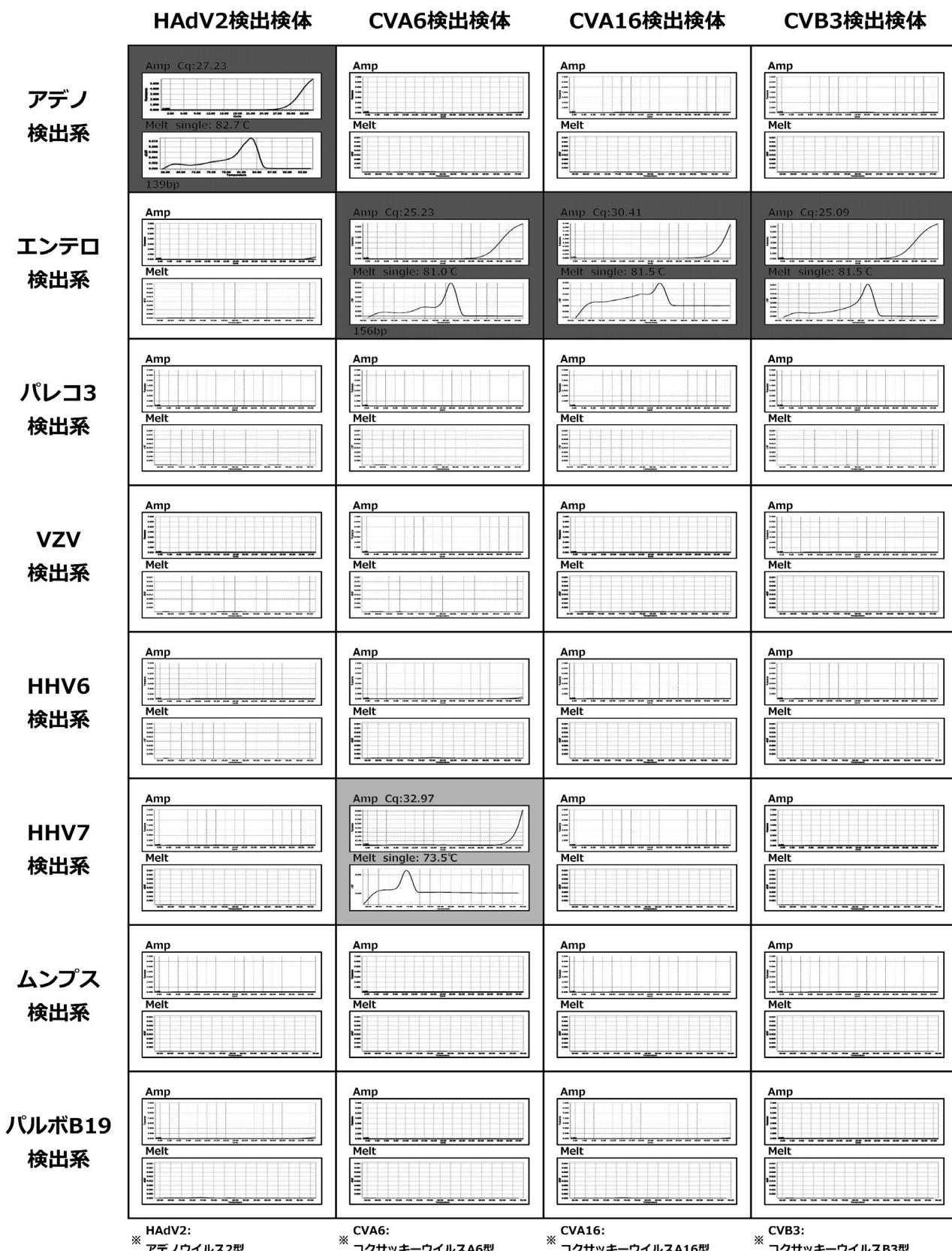
HAdV2:
※ アデノウイルス2型CVA6:
※ コクサッキーウイルスA6型CVA16:
※ コクサッキーウイルスA16型CVB3:
※ コクサッキーウイルスB3型

図1-2 8検出系の各病原体検出検体における特異性（增幅曲線およびmelting curve）

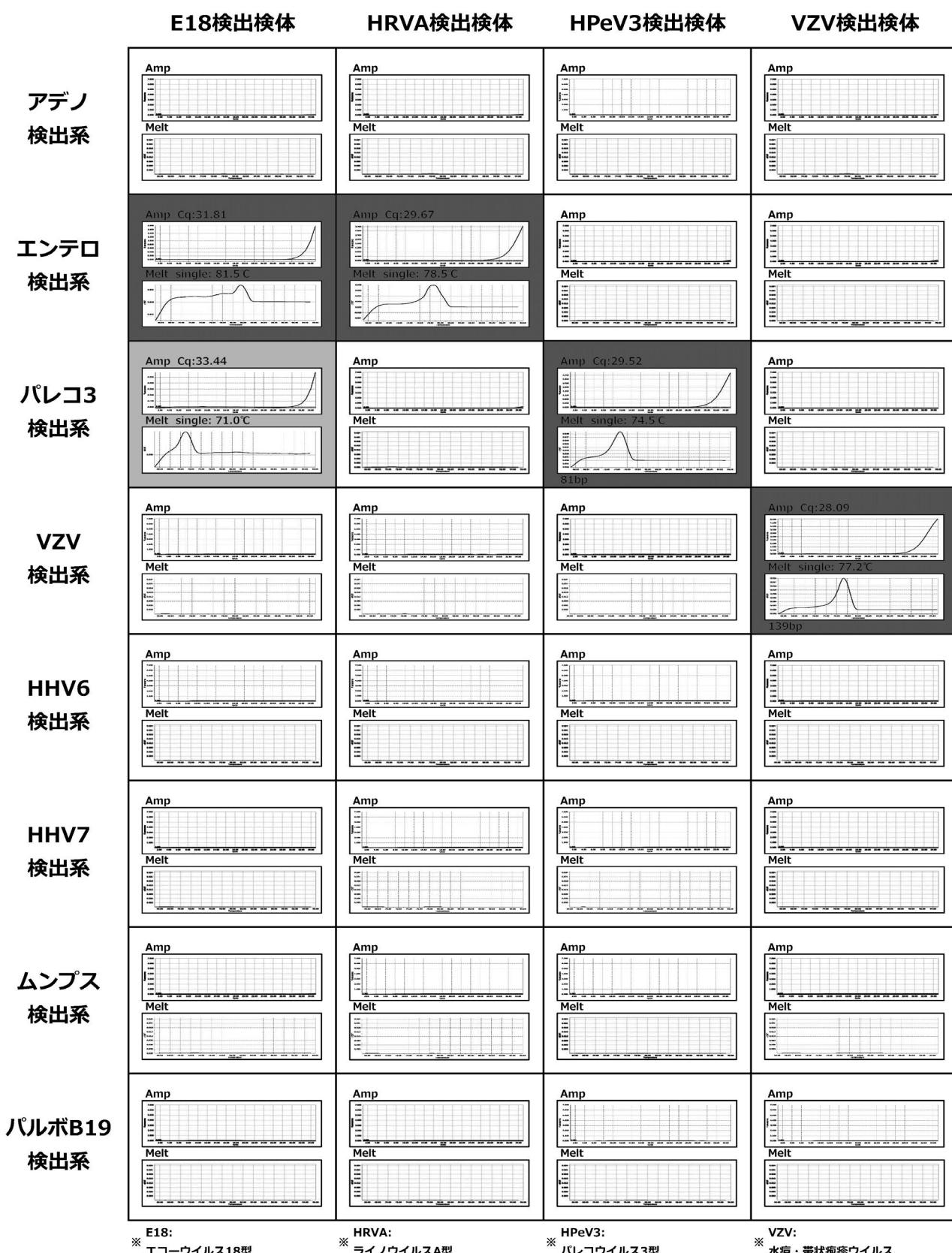


図1-3 8検出系の各病原体検出検体における特異性（增幅曲線およびmelting curve）

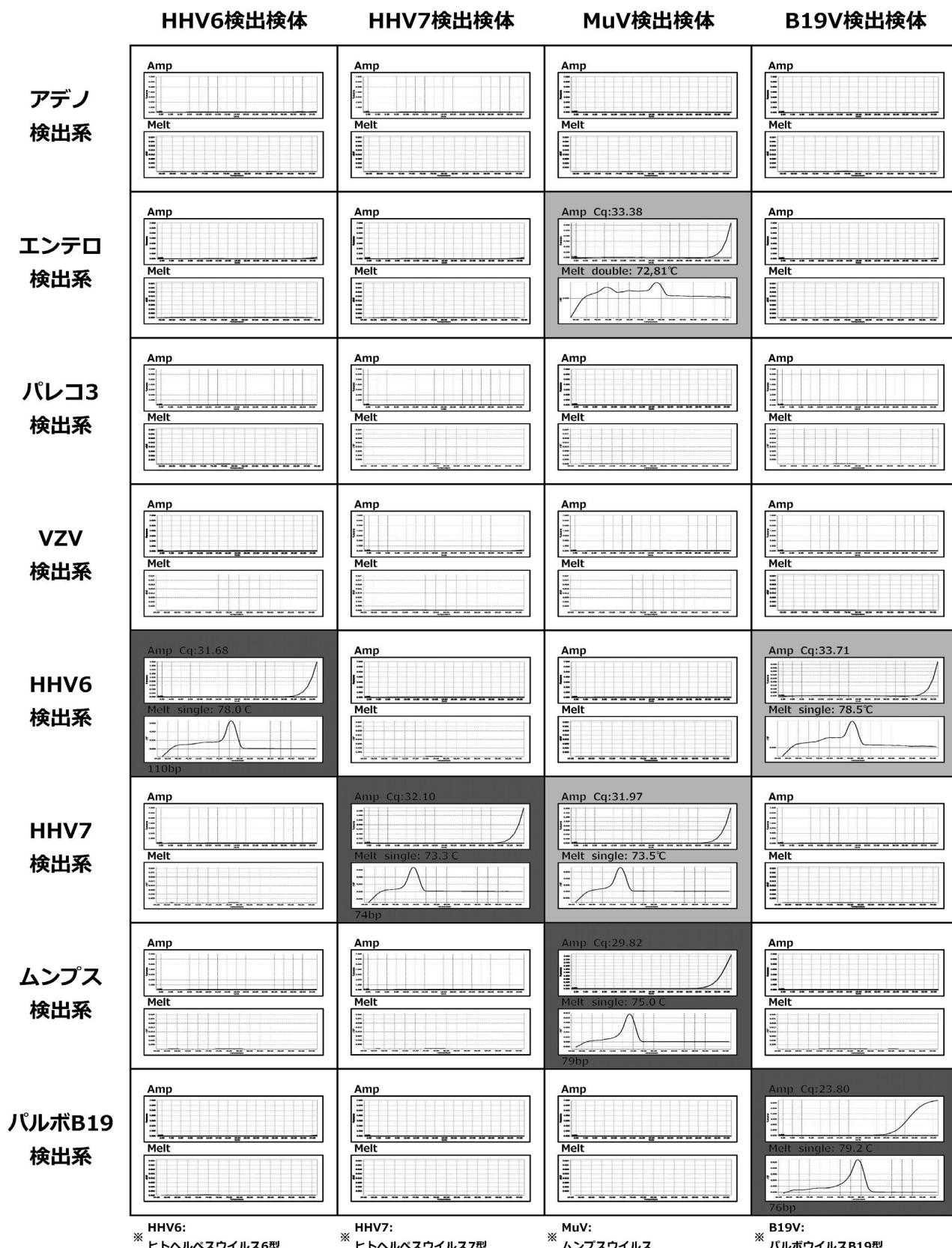
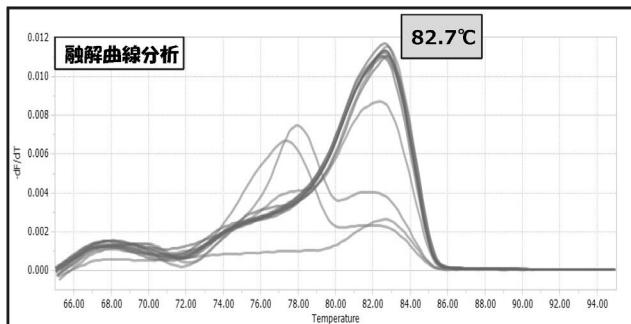
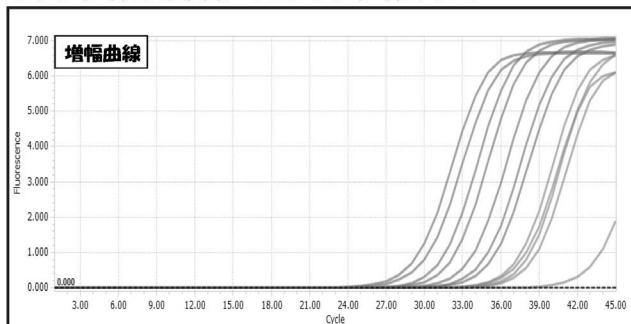


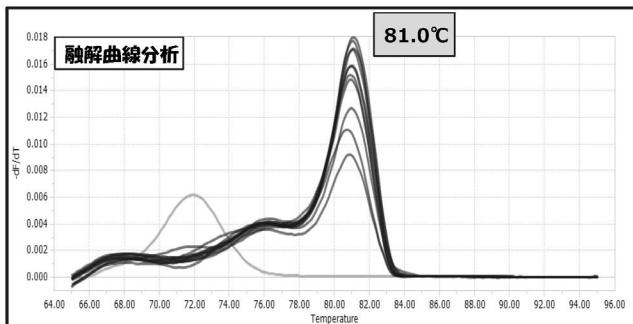
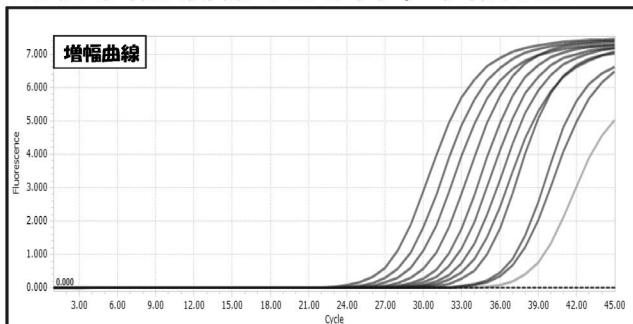
図2-1 各検出系のPCR能力

アデノウイルス検出系 PC:アデノウイルス2型

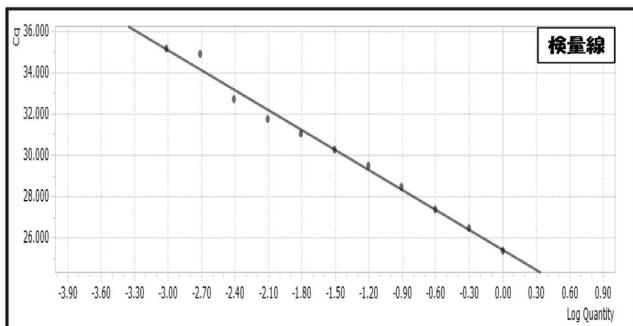
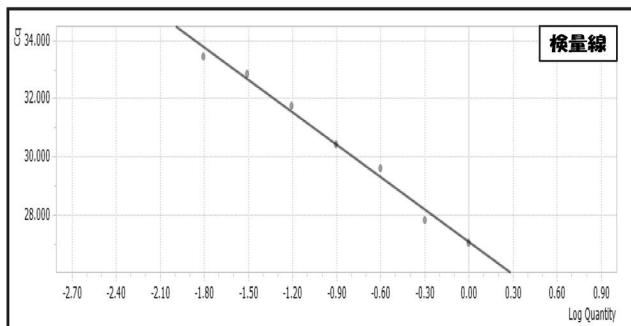


Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
A1	27.04	1	1.000000000000	0.00
A2	27.82	2	0.500000000000	-0.30
A3	29.60	4	0.250000000000	-0.60
A4	30.41	8	0.125000000000	-0.90
A5	31.74	16	0.062500000000	-1.20
A6	32.83	32	0.031250000000	-1.51
A7	33.44	64	0.015625000000	-1.81
A8	35.63	128	0.00781250000	-2.11
A9	35.45	256	0.00390625000	-2.41
A10	36.65	512	0.00195312500	-2.71
A11	36.30	1024	0.00097656250	-3.01
A12	41.47	2048	0.00048828125	-3.31

エンテロウイルス検出系 PC:コクサッキーウィルスA6型



Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
B1	25.35	1	1.000000000000	0.00
B2	26.47	2	0.500000000000	-0.30
B3	27.37	4	0.250000000000	-0.60
B4	28.46	8	0.125000000000	-0.90
B5	29.50	16	0.062500000000	-1.20
B6	30.26	32	0.031250000000	-1.51
B7	31.04	64	0.015625000000	-1.81
B8	31.75	128	0.00781250000	-2.11
B9	32.68	256	0.00390625000	-2.41
B10	34.89	512	0.00195312500	-2.71
B11	35.17	1024	0.00097656250	-3.01
B12	37.01	2048	0.00048828125	-3.31



PCR能力

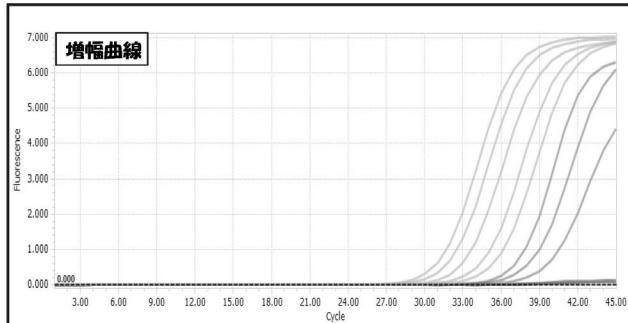
Slope (傾き)	-3.72
增幅効率 (%)	85.7
R ²	0.99
検出限界希釈倍数 (参考)	≥2048

PCR能力

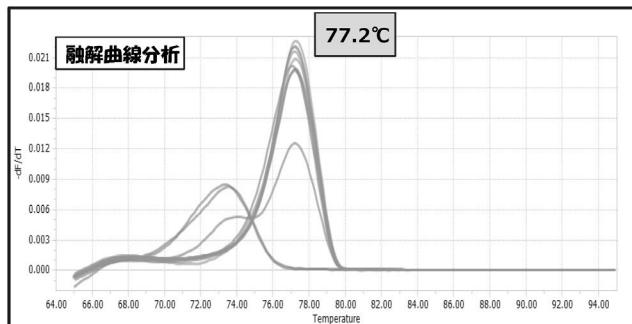
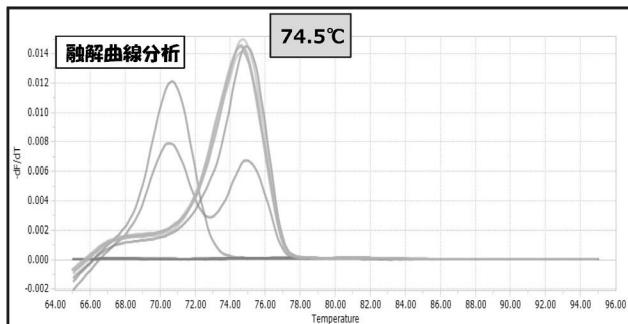
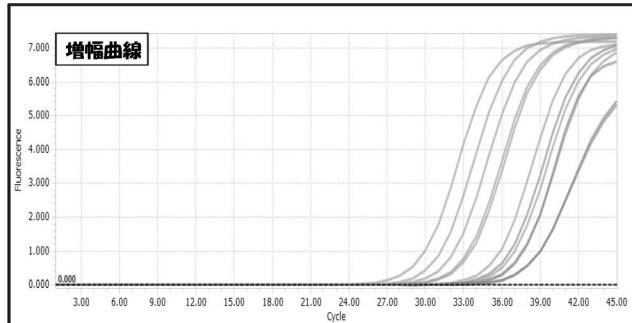
Slope (傾き)	-3.23
增幅効率 (%)	104.2
R ²	0.99
検出限界希釈倍数 (参考)	≥2048

図2-2 各検出系のPCR能力

パレコウイルス3型検出系 PC:パレコウイルス3型

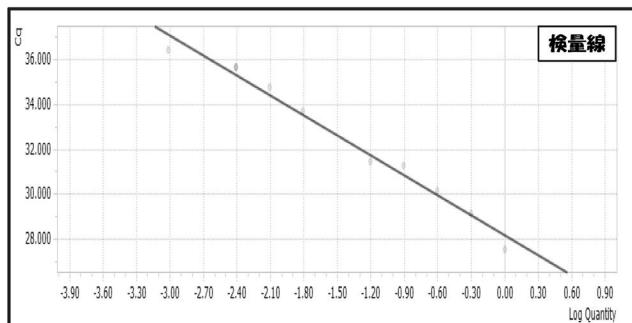
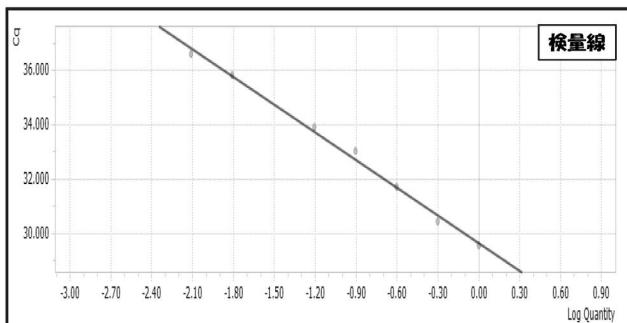


VZVウイルス検出系 PC:VZVウイルス



Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
C1	29.56	1	1.000000000000	0.00
C2	30.40	2	0.500000000000	-0.30
C3	31.70	4	0.250000000000	-0.60
C4	33.02	8	0.125000000000	-0.90
C5	33.91	16	0.062500000000	-1.20
C6	38.02	32	0.031250000000	-1.51
C7	35.82	64	0.015625000000	-1.81
C8	36.57	128	0.007812500000	-2.11
C9	-	256	0.003906250000	-2.41
C10	-	512	0.001953125000	-2.71
C11	-	1024	0.000976562500	-3.01
C12	-	2048	0.00048828125	-3.31

Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
D1	27.51	1	1.000000000000	0.00
D2	29.11	2	0.500000000000	-0.30
D3	30.14	4	0.250000000000	-0.60
D4	31.24	8	0.125000000000	-0.90
D5	31.45	16	0.062500000000	-1.20
D6	34.42	32	0.031250000000	-1.51
D7	33.70	64	0.015625000000	-1.81
D8	34.76	128	0.007812500000	-2.11
D9	35.64	256	0.003906250000	-2.41
D10	35.34	512	0.001953125000	-2.71
D11	36.44	1024	0.000976562500	-3.01
D12	36.47	2048	0.00048828125	-3.31



PCR能力

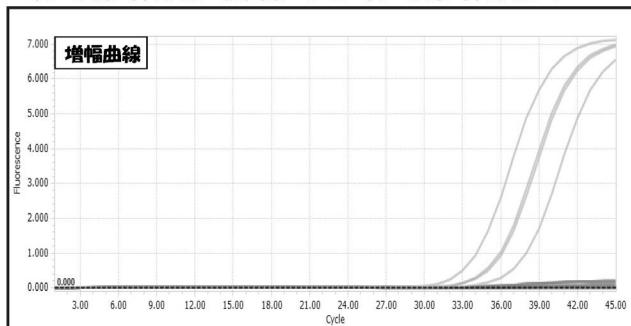
Slope (傾き)	-3.41
增幅効率 (%)	96.5
R ²	0.99
検出限界希釈倍数 (参考)	128

PCR能力

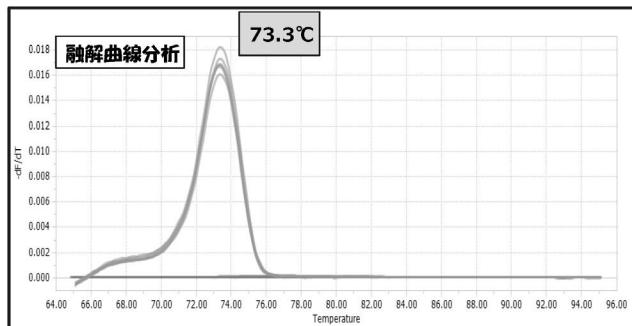
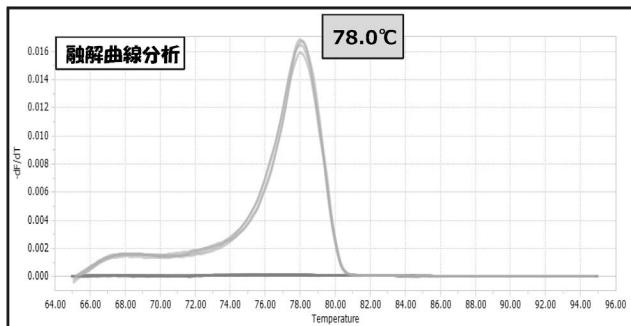
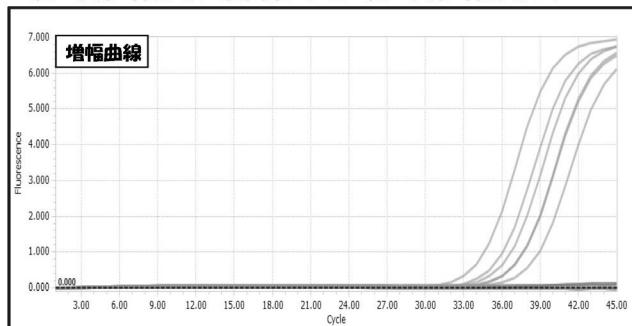
Slope (傾き)	-2.99
增幅効率 (%)	116.2
R ²	0.98
検出限界希釈倍数 (参考)	≥2048

図2-3 各検出系のPCR能力

ヘルペスウイルス6型検出系 PC:ヘルペスウイルス6型

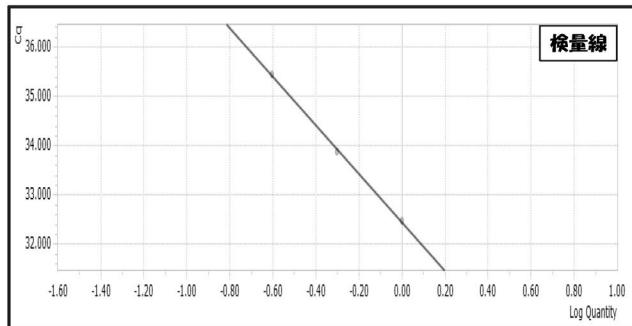
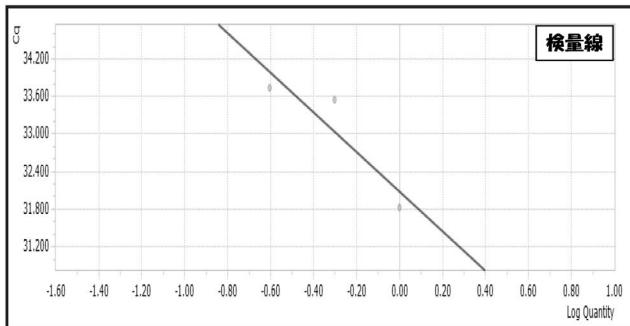


ヘルペスウイルス7型検出系 PC:ヘルペスウイルス7型



Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
E1	31.82	1	1.000000000000	0.00
E2	33.55	2	0.500000000000	-0.30
E3	33.73	4	0.250000000000	-0.60
E4	-	8	0.125000000000	-0.90
E5	-	16	0.062500000000	-1.20
E6	35.50	32	0.031250000000	-1.51
E7	-	64	0.015625000000	-1.81
E8	-	128	0.007812500000	-2.11
E9	-	256	0.003906250000	-2.41
E10	-	512	0.001953125000	-2.71
E11	-	1024	0.000976562500	-3.01
E12	-	2048	0.00048828125	-3.31

Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
F1	32.47	1	1.000000000000	0.00
F2	33.87	2	0.500000000000	-0.30
F3	35.44	4	0.250000000000	-0.60
F4	34.45	8	0.125000000000	-0.90
F5	35.35	16	0.062500000000	-1.20
F6	36.52	32	0.031250000000	-1.51
F7	-	64	0.015625000000	-1.81
F8	-	128	0.007812500000	-2.11
F9	-	256	0.003906250000	-2.41
F10	-	512	0.001953125000	-2.71
F11	-	1024	0.000976562500	-3.01
F12	-	2048	0.00048828125	-3.31



PCR能力

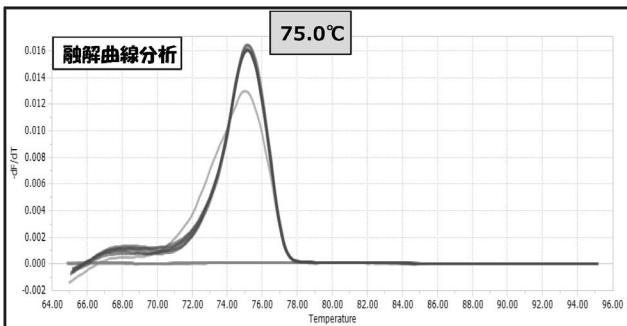
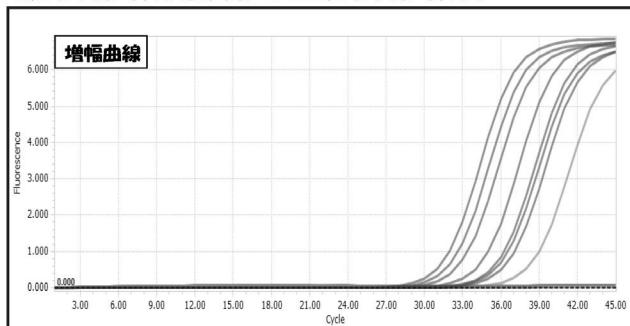
Slope (傾き)	-3.17
增幅効率 (%)	106.6
R ²	0.82
検出限界希釈倍数 (参考)	4

PCR能力

Slope (傾き)	-4.93
增幅効率 (%)	59.5
R ²	1.00
検出限界希釈倍数 (参考)	32

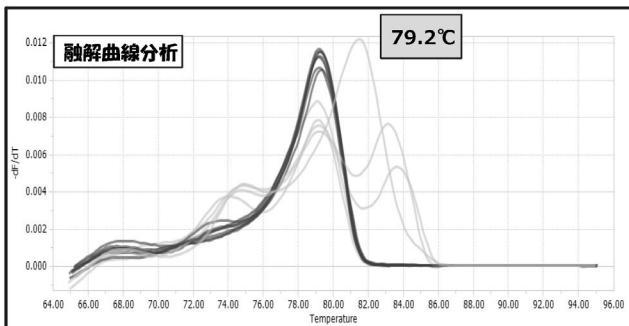
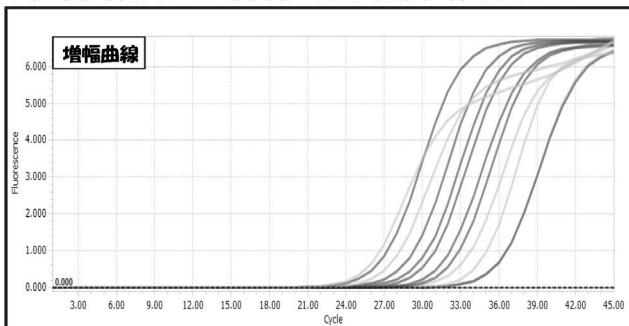
図2-4 各検出系のPCR能力

ムンブスウイルス検出系 PC:ムンブスウイルス

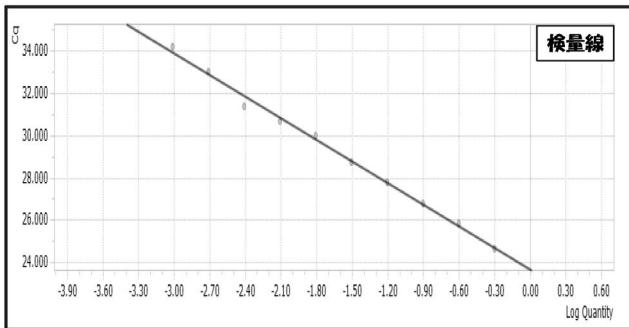
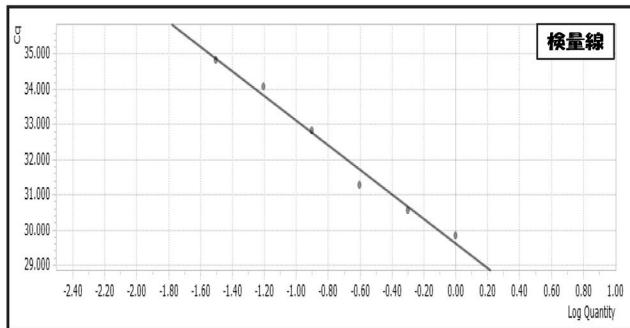


Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
G1	29.85	1	1.000000000000	0.00
G2	30.55	2	0.500000000000	-0.30
G3	31.27	4	0.250000000000	-0.60
G4	32.84	8	0.125000000000	-0.90
G5	34.06	16	0.062500000000	-1.20
G6	34.81	32	0.031250000000	-1.51
G7	34.35	64	0.015625000000	-1.81
G8	36.63	128	0.007812500000	-2.11
G9	-	256	0.003906250000	-2.41
G10	-	512	0.001953125000	-2.71
G11	-	1024	0.000976562500	-3.01
G12	-	2048	0.00048828125	-3.31

パルボウイルスB19型検出系 PC:パルボウイルスB19型



Position	Cq	希釈倍数	濃度（相対値）	LOG
H1	24.29	1	1.000000000000	0.00
H2	24.65	2	0.500000000000	-0.30
H3	25.83	4	0.250000000000	-0.60
H4	26.77	8	0.125000000000	-0.90
H5	27.76	16	0.062500000000	-1.20
H6	28.75	32	0.031250000000	-1.51
H7	29.96	64	0.015625000000	-1.81
H8	30.69	128	0.007812500000	-2.11
H9	31.37	256	0.003906250000	-2.41
H10	33.00	512	0.001953125000	-2.71
H11	34.17	1024	0.000976562500	-3.01
H12	34.16	2048	0.00048828125	-3.31



PCR能力

Slope (傾き)	-3.50
增幅効率 (%)	92.9
R ²	0.98
検出限界希釈倍数 (参考)	128

PCR能力

Slope (傾き)	-3.40
增幅効率 (%)	96.9
R ²	1.00
検出限界希釈倍数 (参考)	≥2048