

## Real-time PCR 法によるヒトボカウイルス遺伝子の検出

西川 和佳子、坂本 美砂子、横井 一

(環境保健研究所 健康科学課)

**要 旨** 急性呼吸器感染症に関与するウイルス検出の迅速化を目的として、Real-time PCR 法によるヒトボカウイルス (HBoV) 遺伝子の検出系の構築について検討した。HBoV の NP1 遺伝子を標的配列として選択し、プライマーと TaqMan プローブを新たに設計した。その結果、 $1.0 \times 10^1$  copies/tube から  $1.0 \times 10^7$  copies/tube の範囲で HBoV 遺伝子の定量が可能であった。本法の検出感度は Conventional PCR 法と比較して 10 倍高く、他の呼吸器系ウイルス等との交差反応も認められなかった。臨床検体からの検出においても本法の検出感度は Conventional PCR 法よりも高く、特異度については、ほぼ同等であった。以上の結果から、今回検討した Real-time PCR 法は HBoV 遺伝子の検出に有用であると考えられた。

**Key Words :** ヒトボカウイルス, Real-time PCR, 急性呼吸器ウイルス感染症

### 1. はじめに

ヒトボカウイルス (HBoV) は、2005 年にスウェーデンの呼吸器感染症患者の鼻咽頭液から発見された DNA ウイルスで、パルボウイルス科パルボウイルス亜科ボカウイルス属に分類される<sup>1)</sup>。HBoV ゲノムは主に乳幼児の呼吸器感染症患者から検出され、その患者は発熱、咳嗽、鼻汁、多呼吸、喘鳴、呼吸困難等の非特異的で多彩な症状を呈する。一般的に HBoV 感染症の重症化は少ないと考えられているが、基礎疾患のある乳児で重篤な細気管支炎を起こした報告などがあり、基礎疾患をもつ患者などでは注意が必要である<sup>2)</sup>。

HBoV は、細胞培養による検出は困難で、一般的に遺伝子検査による検出が行われている。また、HBoV が検出される呼吸器感染症の症例では、HBoV 以外のウイルスが同時に検出されることが多いことから<sup>3)</sup>、当所では、急性呼吸器ウイルス感染症の全体像を明らかにする目的で、市内の小児科及び内科医療機関で採取された臨床検体について急性呼吸器ウイルスの網羅的検索を行ってきた。

しかし、対象ウイルス全ての検出を Conventional (RT)-PCR 法及びシーケンス解析によって実施することは、作業工程が多岐にわたるため、結果を得るまでに多くの労力と時間を要する。今回、我々は急性呼

吸器ウイルス感染症に関与するウイルス検出の迅速化を目的として、迅速性、高感度、定量性を兼ね備えた Real-time PCR 法による HBoV 遺伝子の検出系の構築について検討を行ったので報告する。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 供試検体

本法の検出限界を確認するため、HBoV が検出された臨床検体から抽出したウイルス核酸を TE buffer にて 10 倍階段希釈 ( $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  倍希釈) し、この希釈系列を Real-time PCR 法及び Conventional PCR 法に供した。

また、HBoV 以外の呼吸器系ウイルス等との交差反応の有無を確認するため、細胞培養により分離されたウイルス株及び HBoV 以外のウイルス遺伝子が検出された臨床検体から抽出したウイルス核酸を Real-time PCR 法に供した。対象ウイルスは、分離株が A 型インフルエンザウイルス (5 株)、B 型インフルエンザウイルス (2 株)、RS ウイルス (4 株)、ヒトメタニューモウイルス (4 株)、麻疹ウイルス (3 株)、コクサッキー A 群ウイルス (7 株)、コクサッキー B 群ウイルス (5 株)、エンテロウイルス A71 (1 株)、エコーウイルス (2 株)、ムンプスウイルス (1 株)、アデノウイルス (4

株)及び単純ヘルペスウイルス(1株)、また、臨床検体がパルボウイルス B19(1検体)、パラインフルエンザウイルス(3検体)、ヒトライノウイルス(3検体)及びヒトパレコウイルス(2検体)とした。

さらに、臨床検体における本法の有用性(感度と特異度)を確認するため、2017年4月から9月までの期間に上気道炎や下気道炎(気管支炎、肺炎)の急性呼吸器症状等を呈した患者から採取された臨床材料 201検体(鼻汁 153検体、咽頭ぬぐい液 34検体、その他 14検体)から抽出したウイルス核酸を Real-time PCR 法及び Conventional PCR 法に供した。

## 2.2 Real-time PCR のプライマー及び TaqMan プロープの設計

HBoV の NP1 遺伝子領域を Real-time PCR 法の標的配列に選択した。Gene Bank に登録されている HBoV 29 株の配列アライメントを行い、各株に共通する配列を検索した。

検索の結果、各株に共通の sense プライマーと antisense プライマーを設計し、TaqMan プロープは FAM 標識とした(表 1)。なお、各プライマーの合成は Invitrogen、TaqMan プロープは Applied Biosystems (ABI) に依頼した。

## 2.3 ウイルス核酸の抽出

ウイルス分離株の培養上清 200 $\mu$ L、または臨床検体の遠心上清 200 $\mu$ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche)を使用してウイルス核酸の抽出を行った。

## 2.4 コントロールプラスミドの作製

臨床検体を用いて HBoV の NP1 遺伝子の PCR 産物を TA クローニングすることによりコントロールプラスミドを作製した。すなわち、後述の T.Allander らの方法<sup>1)</sup>に準拠した Conventional PCR 法(表 1)により増幅させた PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen)を用いて pCR4-TOPO vector にサブクローニングし、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により確認した。Plasmid Mini Kit (QIAGEN)により精製した環状プラスミドを制限酵

素 *Spe* I で切断して直鎖状プラスミドとした後、UV260nm の OD 値を測定し、コントロールプラスミドのコピー数を算出した。TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0; 1mM EDTA, pH8.0)にて  $1.0 \times 10^9$  copies/ $\mu$ L の濃度に調整し、使用時まで -80 $^{\circ}$ C 保存とした。

## 2.5 Real-time PCR 法

1tube あたり 25 $\mu$ L の反応量で Real-time PCR 法を実施した。20 $\mu$ L の Real-time PCR 反応液(QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)、sense プライマー及び antisense プライマー(最終濃度各 0.4 $\mu$ M)、TaqMan プロープ(最終濃度 0.1 $\mu$ M)及び RNase-free 滅菌蒸留水を混合)に 5 $\mu$ L の DNA 溶液を加え、ABI 7300 Real-time PCR system (ABI) を使用して増幅反応を行った。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 15 分(DNA polymerase の活性化)を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 15 秒(熱変性)と 56 $^{\circ}$ C 75 秒(アニーリングと伸長反応)を 45 サイクルとした。また、コントロールプラスミドについては、TE Buffer を使用して  $1.0 \times 10^7$  から  $1.0 \times 10^1$  copies/5 $\mu$ L までの 10 倍階段希釈系列を作製し、DNA 溶液と同様に増幅反応を行った。反応終了後に ABI Sequence Detection System Software ver. 1.4 を使用し、ウイルス遺伝子の検出と定量解析を実施した。

## 2.6 Conventional PCR 法

HBoV の NP1 遺伝子に設計された T.Allander ら<sup>1)</sup>のプライマーセット(表 1)を用いて Conventional PCR 法を行った。PCR 反応は、10 $\times$  Ex Taq Buffer 5.0 $\mu$ L、50 $\mu$ M プライマー各 0.5 $\mu$ L、2.5mM dNTP Mix 4.0 $\mu$ M、5units/ $\mu$ L Ex Taq Hot Start Vesion (TaKaRa) 0.25 $\mu$ L、および RNase-free 滅菌蒸留水 34.75 $\mu$ L を混合した反応液に DNA 5.0 $\mu$ L を加え、94 $^{\circ}$ C 2 分の反応後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、54 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分の反応を 40 回繰り返した。PCR 産物は、2.5% (w/v) アガロースゲル電気泳動により目的のバンドを確認した。なお、PCR 産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索による確認を行った。

表 1 Real-time PCR 及び Conventional PCR のプライマーと TaqMan プロープの配列

検出法	プライマー/プロープ	塩基配列(5' $\rightarrow$ 3')	塩基配列(5' $\rightarrow$ 3') <sup>*a</sup>	設定位置 <sup>*b</sup>
Real-time PCR	HBoV-Fa3	CTCGGGCTCATATCATCAG	sense	2483-2501
	HBoV-Ra	CACTTGGTCTGAGGCTTCGA	antisense	2558-2538
	HBoV-TPf2	FAM- ATCARCCACCTATYGTCTTGCACTGC -TAMRA	sense	2511-2536
Conventional PCR	188F	GAGCTCTGTAAGTACTATTAC	sense	2281-2301
	542R	CTCTGTGTTGACTGAATACAG	antisense	2634-2614

<sup>\*a</sup> Mix bases in degenerated probe is as follows: R, G or A ; Y, C or T

<sup>\*b</sup> Location is relative to the genome of HBoV st1 (accession number DQ000495)

### 3. 結果

#### 3.1 Real-time PCR 法の定量性と特異性

HBoV のコントロールプラスミドの 10 倍階段希釈系列について、Real-time PCR 法による増幅曲線及び検量線の検討を実施した。その結果、 $1.0 \times 10^1$ copies/tube から  $1.0 \times 10^7$ copies/tube の範囲内で、PCR サイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X 軸にコントロールプラスミドのコピー数（対数表示）、Y 軸に PCR サイクル数（Ct 値）をプロットした場合の検量線は、図 1 に示すように  $R^2=0.999$ 、Slope : -3.43 と直線性を示した。以上の結果から、本法による HBoV 遺伝子の検出と定量が可能であることが明らかとなった。また、検出感度は  $1.0 \times 10^1$ copies/tube であると推定された。

また、他の呼吸器系ウイルス等（A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、麻疹ウイルス、コクサッキーA 群ウイルス、コクサッキーB 群ウイルス、エンテロウイルス A71、エコーウイルス、ムンプスウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、パルボウイルス B19、パラインフルエンザウイルス、ヒトライノウイルス、ヒトパレコウイルス）に対する本法の交差反応性について確認した結果、遺伝子の増幅は認められなかった。

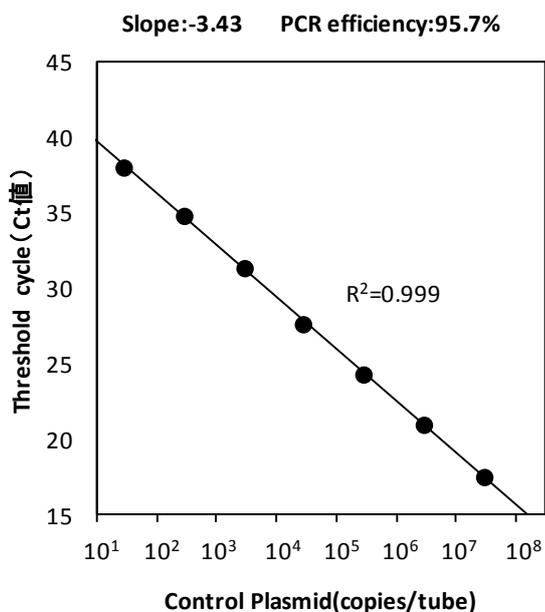


図 1 コントロールプラスミドによる検量線の作成

#### 3.2 Real-time PCR 法による HBoV 遺伝子の検出限界

HBoV が検出された臨床検体から抽出したウイルス核酸を TE buffer にて 10 倍階段希釈 ( $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  希釈) し、Real-time PCR 法の検出限界について確認した。その結果、 $10^{-4}$  希釈 (9.9copies/tube、Ct 値 : 37.76) まで遺伝子が検出された。一方、同じウイルス核酸の 10 倍階段希釈系列を用いて Conventional PCR 法を行ったところ、 $10^{-3}$  希釈 (82 copies/tube) まで遺伝子が検出された (表 2)。

#### 3.3 臨床検体からの HBoV 遺伝子の検出

臨床検体から抽出したウイルス核酸を用いて Real-time PCR 法の感度と特異度の確認を行った結果、Real-time PCR 法によって 201 検体のうち 24 検体から HBoV 遺伝子が検出され、Conventional PCR 法によって 17 検体から遺伝子が検出された。Real-time PCR 法の感度は 100%、特異度は 96.2%、Conventional PCR 法の感度は 70.8%、特異度は 100%であった (表 3)。

また、Real-time PCR 法で陽性となった 24 検体のコピー数は、 $3.5 \times 10^6$  から  $3.2 \times 10^0$ copies/tube であった (図 2、表 4)。これら 24 検体について他の急性呼吸器ウイルスの網羅的検索<sup>4)</sup>を行ったところ、HBoV 単独検出の 3 検体と他の急性呼吸器ウイルスが共検出された 21 検体の間では、HBoV 遺伝子のコピー数に明確な差はみられなかった (表 4)。

表 2 Real-time PCR 法と Conventional PCR 法の検出限界の比較

DNA濃度 (copies/tube)	遺伝子が検出された最終希釈	
	Real-time PCR	Conventional PCR
$1.06 \times 10^5$	$10^{-4}$ (Ct:37.76)	$10^{-3}$

表 3 Real-time PCR 法と Conventional PCR 法の感度と特異度の比較

検出法	Conventional PCR			
	陽性	陰性	計	
Real-time PCR	陽性	17	7	24
	陰性	0	177	177
	計	17	184	201

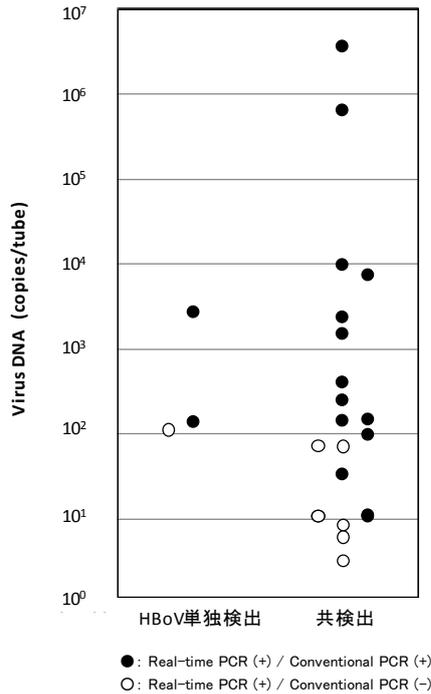


図2 臨床検体における Real-time PCR 法により  
検出された HBoV 遺伝子コピー数

表4 臨床検体における Real-time PCR 法により検出された  
HBoV 遺伝子コピー数及び共検出ウイルス

検体No.	Real-time PCR		Conventional PCR	共検出ウイルス	
	コピー数 (copies/tube)	Ct値			
1	$3.5 \times 10^6$	19.01	(+)	hMPV	HRV
2	$6.5 \times 10^6$	21.55	(+)	hMPV	HRV
3	$9.9 \times 10^3$	27.80	(+)	HRV	
4	$7.4 \times 10^3$	28.23	(+)	HRV	
5	$2.7 \times 10^3$	29.73	(+)	(-)	
6	$2.3 \times 10^3$	29.96	(+)	hMPV	HRV
7	$1.5 \times 10^3$	30.60	(+)	HRV	
8	$4.0 \times 10^2$	32.58	(+)	PIV	
9	$2.5 \times 10^2$	33.27	(+)	ADV	
10	$1.5 \times 10^2$	34.07	(+)	hMPV	RSV
11	$1.4 \times 10^2$	34.13	(+)	HRV	RSV
12	$1.4 \times 10^2$	34.16	(+)	(-)	
13	$1.1 \times 10^2$	34.37	(-)	(-)	
14	$9.9 \times 10^1$	34.67	(+)	PIV	
15	$7.3 \times 10^1$	35.12	(-)	hMPV	HRV
16	$7.2 \times 10^1$	35.15	(-)	PIV	
17	$3.4 \times 10^1$	36.27	(+)	PIV	
18	$1.1 \times 10^1$	37.83	(+)	RSV	
19	$1.1 \times 10^1$	37.94	(+)	Flu	
20	$1.1 \times 10^1$	37.96	(-)	RSV	
21	$1.1 \times 10^1$	38.00	(+)	PIV	
22	$8.5 \times 10^0$	38.33	(-)	RSV	
23	$6.1 \times 10^0$	38.68	(-)	HRV	
24	$3.2 \times 10^0$	39.77	(-)	HRV	

(+): 検出, (-): 不検出  
hMPV: ヒトメタニューモウイルス, HRV: ヒトライノウイルス, PIV: パラインフルエンザウイルス  
ADV: アデノウイルス, RSV: RSウイルス, Flu: インフルエンザウイルス

#### 4. 考察

本研究で構築した Real-time PCR 法は、HBoV の NP1 遺伝子を標的配列として選択し、プライマーとプローブを設計した。その結果、 $1.0 \times 10^1$ copies/tube 以上の遺伝子が存在すれば、HBoV 遺伝子の検出と定量が可能であり、他の呼吸器系ウイルス等との交差反応がなかったことから、高い特異性を有することが確認された。また、本法の検出感度は Conventional PCR 法と比べて 10 倍高いことが確認された。臨床検体を用いた検討においても、NP1 遺伝子に対する Conventional PCR 法よりも本法の感度は高く、特異度はほぼ同等であり、さらに  $3.2 \times 10^0$ copies/tube の検体からも HBoV 遺伝子の検出が可能であった。このことから、本法は HBoV を対象とした遺伝子診断に有用であることが明らかとなった。

これまでに、本法と同様に Real-time PCR 法による HBoV 遺伝子の検出系が Neske ら<sup>5)</sup>によって報告されている。Neske らも NP1 遺伝子領域にプライマーとプローブを設計しており、検出感度と臨床検体での検出率は本法と同等であった。本法が対象としている検体は呼吸器系サンプルであるのに対し、Neske らは呼吸器系サンプルに加えて糞便と血清も対象としている。

しかしながら、Real-time PCR 法と Conventional PCR 法の比較では、Conventional PCR 法で検出、かつ、Real-time PCR 法で不検出であった検体が鼻咽頭吸引液で 2 検体報告されている。Neske らと比較しサンプル数は少ないものの、このような検体は本法では認められなかったことから、呼吸器系サンプルを対象とした場合、本法の検出感度が若干ではあるが高いものと思われた。

本研究で構築した Real-time PCR 法は、従来の Conventional PCR 法と比較して PCR 反応後の電気泳動や PCR 産物のシーケンス解析が不要であることから、簡便で迅速に、かつ高感度に HBoV 遺伝子の検出と定量が可能である。従って、地域における流行状況調査の他、急性呼吸器感染症の集団発生時における疫学調査にも応用可能であることが考えられた。

また、呼吸器系ウイルスの遺伝子検索を実施した際に、HBoV を含む複数のウイルスが同一検体から検出されることが多く<sup>4), 6), 7)</sup>、このことは急性呼吸器系ウイルス感染症の遺伝子検査には網羅的検索が必要であることを示唆しており、今回構築した Real-time PCR 法は、検査効率の向上に貢献できるものと考えられた。

一方、HBoV と他のウイルスが同時に検出された場

合の意義については未だ解明されておらず<sup>2)</sup>、今回の臨床検体を用いた検討においても HBoV 遺伝子の単独検出と他の急性呼吸器ウイルスとの共検出における HBoV のウイルス量の関連性については明らかにならなかった。HBoV 感染症の病態解明には、さらなる網羅的検索の積み重ねが必要と考えられた。

## 文 献

- 1) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B : Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples, Proc Natl Acad Sci, Vol.102 no.36, 2005, pp.12891-12896
- 2) 石黒信久, 遠藤理香 : ヒトボカウイルス感染症, 臨床検査, Vol.53 no.1, 2009, pp.97-104
- 3) 石黒信久, 遠藤理香, 有賀正 : ヒトボカウイルス感染症, モダンメディア, 53 巻 10 号, 2007, pp.259-266
- 4) 西川和佳子, 坂本美砂子 : 千葉市におけるヒトライノウイルス検出状況, 千葉市環境保健研究所年報, 第 24 号, 2017, pp.61-67
- 5) Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth H, Weissbrich B : Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis, J Clin Microbiol, Vol.45, 2007, pp.2116-2122
- 6) 田中俊光, 小林圭子, 横井一 : 千葉市内の 1 小児科クリニックにおける重症呼吸器ウイルスの検出状況, 千葉市環境保健研究所年報, 第 18 号, 2011, pp.49-51
- 7) 土井妙子, 水村綾乃, 小林圭子, 横井一 : 千葉市の感染症発生動向調査における急性呼吸器ウイルスの検出状況, 千葉市環境保健研究所年報, 第 20 号, 2013, pp.49-52