

RT-PCR法による 麻疹ウイルスの迅速同定・型別法

斎藤 博之 原田誠三郎 田中 恵子 佐野 健
須藤 恒久 森田 盛大

我々がこれまでに得た麻疹ウイルスに関する知見をもとに、麻疹ウイルスの存在を患者検体からPCRを用いて直接検査できる方法を開発した。これによって、これまで2週間を要していた検査が2日で行えるようになった。また、増幅されたDNA断片をSau3AIで切断することにより、近年問題になっている麻疹ウイルスの変異も同時に検出できた。

キーワード：麻疹ウイルス，PCR，RFLP

I はじめに

最近分離される麻疹ウイルスは、HA蛋白の性状がこれまで知られていたものとは異なっていることがすでに知られている¹⁻³⁾。すなわち、①血球凝集能の欠落、②分子量の増大、③6本目の糖鎖付加部位の新生である。また、近年になって臨床の現場から典型的な麻疹患者が減り、これに代わって、コプリック斑や発疹が不明瞭であるなどの診断がつけにくい症例が増えてきているとの声が聞こえてくるようになった。それを裏付けるかのように当所に送付されてくる麻疹検査の依頼も年々増加しており、流行の拡大防止の意味からも迅速な検査法の確立が求められるところとなった。しかしながら、B95a細胞を用いた最新のウイルス分離法⁵⁾を用いたとしても、細胞の準備から中和による同定に至るまで2週間を要するのが現状である。

我々は、前回の報告⁴⁾で最近分離される麻疹ウイルスのHA遺伝子の配列を明らかにした。今回は、この配列をもとにしてPCR法による迅速検査法と変異ウイルスの迅速鑑別法を開発したので報告する。

II 方法

検体として、麻疹患者の咽頭拭液の他、髄液、急性期血清、培養細胞を用いた。これらをグアニジンチオンアネートで溶解した後、フェノール抽出とエタノール沈澱にて麻疹RNAを調製した。ここで問題となるのがプライマーの設計である。近年問題となっている麻疹変異株に特徴的である糖鎖付加部位の新生²⁻⁴⁾は416番アミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンに置換することによって起こるが、これは1266番塩基のGからAへの置換が原因である。図1に示すとおりEdmonston株のように6本目の糖鎖付加部位が無いウイルス(classical type)はこの位置にSau3AI site (GATC)があり、

最近の分離株のように糖鎖付加部位が新生している株(contemporary type)ではこれが消滅する(AATC)。PCR法のプライマーは増幅断片の中にこの部分が含まれるようにデザインした。また、Edmonston株⁶⁾と、当所で遺伝子配列を決定したAK-1株⁴⁾の共通部分を用いているため、どちらの型のウイルスでも検査できるようになっている。2組のプライマーによるnested PCRにより最終的に349bpからなるDNA断片が増幅されるが、これをSau3AIで切断した場合、classical typeは198bp、95bp、56bpの3つの断片となり、contemporary typeは254bpと95bpの2つの断片となる(図1)。このことを利用してRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)解析を行い、両者の鑑別を試みた。プライマーの配列とPCRの反応条件は図2に示すとおりである。

III 結果

図3に示すとおりnested PCRにより、咽頭拭液、髄液、急性期血清から直接麻疹ウイルスゲノムを検出できた。増幅断片をSau3AIで切断した結果が図4(上段)である。従来型(classical type)であるEdmonston株とToyosima株では198bp、95bp、56bpの3つの断片となった。それに対して、最近の分離株(contemporary type)であるAK-1~AK-6株では254bpと95bpの2つの断片となった。また、その結果はHA蛋白の分子量の増大(図4、中段)や血球凝集能の欠落(図4、下段)とも一致することがわかった。

IV 考察

本法を用いることにより、約1日で結果を通知できるようになったため、迅速検査法の開発という当初の目的

図1 プライマーの設計と増幅断片のマップ

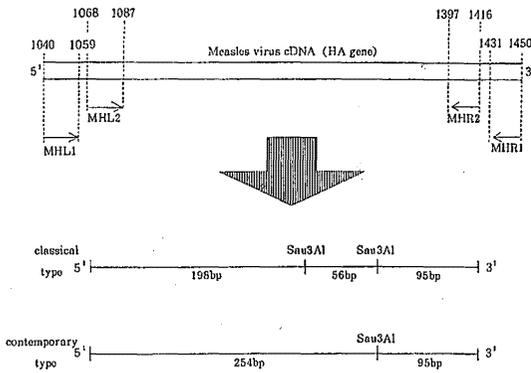


図2 プライマーの配列と反応条件

◎1st. PCR Primer (増幅断片: 411bp)
 MHL: 1 5 AACGGATGATCCAGTGATAG 3
 MHR: 1 5 TTGAATCTCGGTATCCCACTC 3
 Denaturation: 94°C. 2min
 Annealing: 53°C. 3min
 Extension: 72°C. 2.5min
 Cycle: 30
 Final Ext.: 72°C. 7min

◎2nd. PCR Primer (増幅断片: 349bp)
 MHL: 2 5 TACCTCTCATCTCACAGAGG 3
 MHR: 2 5 CACCTAAGGCTAGGTTCTTC 3
 Denaturation: 94°C. 2min
 Annealing: 55°C. 3min
 Extension: 72°C. 2.5min
 Cycle: 30
 Final Ext.: 72°C. 7min

◎使用機器: 理工化学, JAPH-90型 (地方衛生研究所全国協議会仕様)

は達成した。また、本法は引き続き Sau3AI による RFLP 解析が行えるようにデザインされているために、近年問題となっている麻疹ウイルスの変異に関する追跡調査にも有用と考えられた。

V 文 献

- 1) Saito. H. et al. Isolation and characterization of the measles virus strains with low hemagglutination activity. Intervirology, 1992; 33: 57-60.
- 2) Rota. J.S. et al. Genetic variability of the measles virus hemagglutinin. Virology, 1992; 188: 135-142.
- 3) Sakata. H. et al. Variation in field isolates of measles virus during an 8-year period in Japan. Microbiol Immunol, 1993; 37: 233-237.
- 4) Saito. H. et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding the HA protein of a hemagglutination-defective measles virus strain. Virus Genes, 1994; 8: 107-113.
- 5) Kobune. F., Sakata. H. & Sugiura. A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J Virol, 1989; 64: 700-705.
- 6) Alkhatib. G. & Briedis. D.J. The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. Virology, 1986; 150: 479-490.

図3 増幅断片の確認

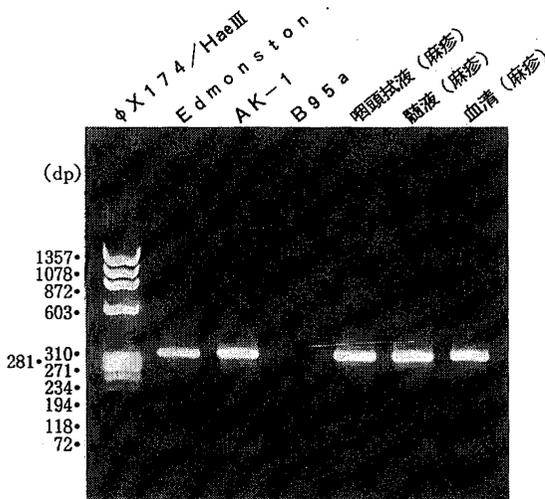


図4 RFLPによる型別

