

鳥インフルエンザ診断時における各検査法の検出感度比較

東部家畜保健衛生所 山本英次

はじめに

鳥インフルエンザ診断時における検査では、現在、簡易検査、PCR、ウイルス分離の3種類の検査を実施している。一般的にウイルス分離、PCR、簡易検査の順でウイルス検出感度（以下感度）が高いとされているが、実際に当所で実施している各検査間でどの程度の感度差があるのかは不明であった。また、高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針（以下指針）にはPCR検査に用いる各種検査キットについての指定は無く、キット間の感度差も不明であった。このため、当所における3種類の検査における検出感度を明らかにするとともに、使用しているPCR検査キット間の感度比較を実施した。また、他府県から既存プライマーを用いたリアルタイムPCR報告の有効性についての報告があり、この点についても検討した。

材料および方法

材料として、野生水禽糞便由来の鳥インフルエンザウイルス発育鶏卵培養漿尿液（血清亜型：H11N9、HA価：512～1024、50%発育鶏卵感染価EID₅₀：10^{7.5}/0.2ml）を用いた。

方法1、簡易検査キットの感度測定

材料のウイルス液を10¹～10⁸倍まで10倍段階希釈し、簡易キット使用説明書に従い各希釈液を検査した。

方法2、RNA抽出キット間でのRNA抽出効率の比較

市販キット間でのRNA抽出効率を比較するため、当所で用いている2種類のRNA抽出キットを用いてウイルス液からRNAを抽出し、吸光度測定によりRNA量を求めた。

方法3、PCRキット間での感度比較

PCRキット間での感度を比較するため、抽出RNAを10¹～10⁸倍まで10倍段階希釈し、当所で用いている2種類のPCRキットでの検出を実施した。

方法4、各検査における感度比較

簡易検査、PCR、ウイルス分離の3種類の検査について、その感度を比較した。

方法5、既存プライマーを用いたリアルタイムPCRでの感度測定

他府県からもすでに報告のある既存プライマーを用いたリアルタイムPCRでの感度を測定した。

結果

結果1、簡易検査キットの感度測定

簡易検査キットでは、10²のウイルス液まで検出可能であった。

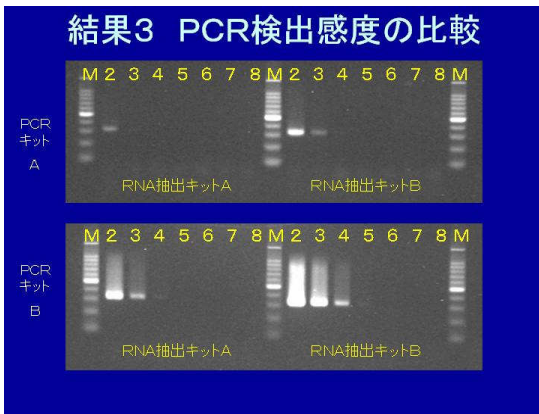


結果2、RNA抽出キット間でのRNA抽出効率の比較

メンブレン吸着法であるRNA抽出キットAでは2.4μg/ml、AGPC法によるRNA抽出キットBでは64μg/mlのトータルRNAが抽出された。ただし、当所では微量試料の測定が可能な吸光度測定器用のセルが無いため、RNA溶液を希釈して測定しており、この結果は誤差の大きいものである可能性がある。

結果3、PCRキット間での感度比較

PCRキットAでは、RNA抽出キットAで10²まで、Bで10³まで検出できた。PCRキットBでは、RNA抽出キットAで10³まで、Bで10⁴まで検出できた。



結果 4、各検査における感度比較

ウイルス分離における感度を、ウイルス液のE I D 5 0 値から2代以上継代すると考え 10^{-7} であるとする、ウイルス分離は簡易キットの 10^5 倍、PCR の 10^3 から 10^5 倍の感度であった。

結果

検査方法		検出可能倍率
簡易検査キット		10^{-2}
RNA抽出キットA	PCRキットA	10^{-2}
	PCRキットB	10^{-3}
RNA抽出キットB	PCRキットA	10^{-3}
	PCRキットB	10^{-4}
ウイルス分離		$10^{-7} \leq$

結果 5、既存プライマーを用いたリアルタイムPCRでの感度測定

既存プライマーを用いたリアルタイムPCRでは、RNA抽出キットAでは 10^6 、抽出キットBでは 10^7 まで検出することができた。

考察

当所で実施している簡易検査キット、PCR は、ウイルス分離に比べて検出感度がかなり低いことが判明した。このことから、検査材料によっては簡易検査キット陰性、PCR 陰性であっても、ウイルス分離が陽性となる事例がありうることが示唆された。このような事例では、PCR 陰性の結果が出てからウイルス分離が陽性となるまでの期間が 2 から 4 日間であり、防疫対応の遅れにつながる。このため、キット、PCR 陰性でも、疑う事例は再度の立入検査の実施や、現場段階で簡易キットの検体数を可能な限り増やすなど、このような事例を意識した防疫対応が必要であると考えられた。

また、PCR に用いる検査キットによって検出感度が多少異なることが判明したため、今後、他メーカーのキットも用いた比較を行い、より検出感度の高いものを採用する必要がある。

既存プライマーを用いたリアルタイムPCRでは、検出感度の向上がみられ、PCR産物の電気泳動等の手間も省けることから、今後の検査系の確立が期待された。