

# 鳥インフルエンザ検査におけるリアルタイム PCR のデータ解析法の比較検討

県央家畜保健衛生所

高山 環 英 俊征  
後藤 裕克 和泉屋 公一  
吉田 昌司

## はじめに

リアルタイム PCR（以下、r-PCR）では、DNA の増幅による蛍光シグナルから得られたデータをもとに、ある決められたアルゴリズムを用いて、一定のシグナル強度に達した時のサイクル数（Ct 値や Cp 値と呼ぶ）を算出することにより解析を行う。r-PCR の解析に用いるアルゴリズムは大きく 2 種類に分類され、一つ目は従来より多くのシステムで採用されている Crossing Point 法（以下、CP 法）であり<sup>1)</sup>、増幅曲線の指数関数的増幅域で Threshold Line（閾値）設定を行い、Threshold Line と増幅曲線との交点を Ct（Threshold Cycle）値とする。二つ目は、2nd Derivative Maximum 法（以下、SDM 法）であり、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cp（Cross point）値とし<sup>6)</sup>、現在、後者に対応しているシステムは一部に限られる<sup>9)</sup>。

今回、本県では家畜保健衛生所検査機器等整備事業において高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）検査体制の充実強化を目的に新たな r-PCR 装置の追加導入を行い、従来より保有している CP 法のみに対応したシステムに加え、CP 法及び SDM 法に対応できる新システムとの 2 台体制になった。これをうけ、鳥インフルエンザ（以下、AI）検査において、新システムによる SDM 法の有用性を確認するため、従来システムと新システムの CP 法及び SDM 法について比較検討を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1 r-PCR 装置

従来システム（旧 Applied Biosystems 製 Applied Biosystems7500 リアルタイム PCR システム、以下 ABI7500）及び新システム（Roche Diagnostics 製 LightCycler480 リアルタイム PCR システム、以下 LC480）の 2 台を使用した。

## 2 被検材料

逆転写反応は AI ウイルス陽性 RNA (H3、H5、H7eu、H7am) を鋳型とし、酵素に M-MuLV Reverse Transcriptase、プライマーに Random 6 mers を使用し相補鎖 DNA(以下、cDNA)を合成した。反応条件は 37°C で 15 分、85°C で 5 秒の酵素失活処理を行い<sup>5)</sup>、合成した各 cDNA を 10<sup>0</sup>~10<sup>-6</sup>倍まで 10 倍段階希釈したものを被検材料とした。

## 3 r-PCR 反応

高病原性鳥インフルエンザ及び低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<sup>4),5)</sup>に則り、NP、H5、H7eu、H7am を標的遺伝子とした 4 種類のプライマー、プローブセットを使用した(表 1)。Premix Ex Taq 10  $\mu$  l に 20 pmol/ $\mu$  l のフォワードプライマー及びリバースプライマー 2  $\mu$  l、10 pmol/ $\mu$  l の Taq Man Probe 2  $\mu$  l、ABI7500 は Rox Dye II の 5 倍希釈液 2  $\mu$  l と滅菌蒸留水 1  $\mu$  l で 19  $\mu$  l に、LC480 は滅菌蒸留水 3  $\mu$  l で 19  $\mu$  l にした後、各検体 1  $\mu$  l を加えて全量 20  $\mu$  l の反応液とし、それぞれを 96 ウェルプレートの各ウェルに 1 検体あたり 2 ウェルに添加した。反応条件は初期変性 95°C で 30 秒後、変性 95°C で 10 秒、アニーリング 50°C で 20 秒、伸長 60°C で 32 秒を 35 サイクルに設定した<sup>5)</sup>。r-PCR 反応は 2 つのシステムで全て同様の条件で行った。

**表 1 NP、H5、H7eu、H7am 遺伝子を検出するプライマー、プローブ**

		No.	Sequences
NP	Forward primer	#551F	5'-AGRTAYTGGGCYATAAGRAC-3'
	Reverse primer	#806R	5'-GCATTGTCCTCCGAAGAAATAAG-3'
	Probe primer	#553P	FAM-ATCGGGYTCGTYGCCTTTTCGTCY-BHQ
H5	Forward primer	#491F	5'-CCARTRGGKCKATAAAAYTC-3'
	Reverse primer	#820R	5'-GTCTGCAGC RTAYC CACTYC-3'
	Probe primer	#547P	FAM-ACCATKCCYTGCCAYCCYCCYTCT-BHQ
H7eu	Forward primer	#815F	5'-ATMAATAGCAGRGCARTRGG-3'
	Reverse primer	#496R	5'-GATCWATTGCHGAYTGRGTG-3'
	Probe primer	#817P	FAM-CCYTCYCCYTGTGCRITTYTG-BHQ
H7am	Forward primer	#816F	5'-ATCAACYCYAGRACWGTKGG-3'
	Reverse primer	#496R	5'-GATCWATTGCHGAYTGRGTG-3'
	Probe primer	#817P	FAM-CCYTCYCCYTGTGCRITTYTG-BHQ

## 4 解析

解析方法は各システムの使用方法<sup>1),6)</sup>に則り行った。従来システムでは解析を CP 法により行い、Base Line、Threshold Line を Manual で設定(以下、CP1)した。新システムでは CP 法による方法を Noise Line、Threshold Line を Manual で設定(以下、CP2)し、SDM 法による方法を Auto で

設定（以下、SDM）した。CP1、CP2でManual設定した各解析パラメーター値を表2に示した。

**表2 CP1、CP2の解析パラメーター値**

解析 パラメーター 標的遺伝子	CP1		CP2	
	Base Line	Threshold Line	Noise Line (Cycle Range)	Threshold Line
NP	0.1	3-15	3-35	5.9493
H5	0.1	3-15	12-35	6.0073
H7eu	0.1	3-15	3-35	3.5139
H7am	0.1	3-15	3-35	3.0609

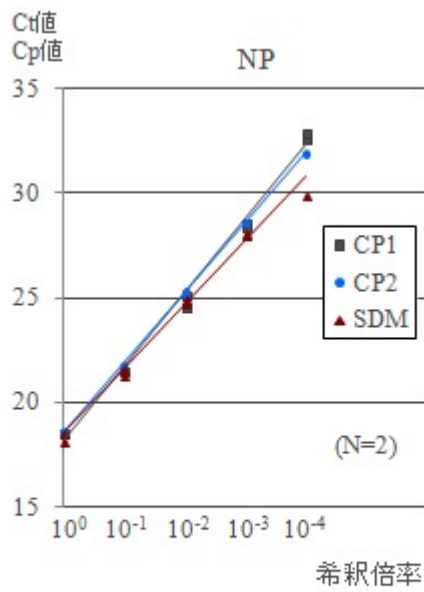
**結 果**

各標的遺伝子について、各解析法（CP1、CP2、SDM）における希釈倍率毎の Ct 値及び Cp 値を表3に示した。また、Ct 値及び Cp 値と希釈倍率との関係を図1に示した。各標的遺伝子における増幅効率（e）及び相関係数（R<sup>2</sup>）は各解析法共に良好な結果であった。また、得られた Ct 値及び Cp 値については解析法間に明らかな差は認められなかった。

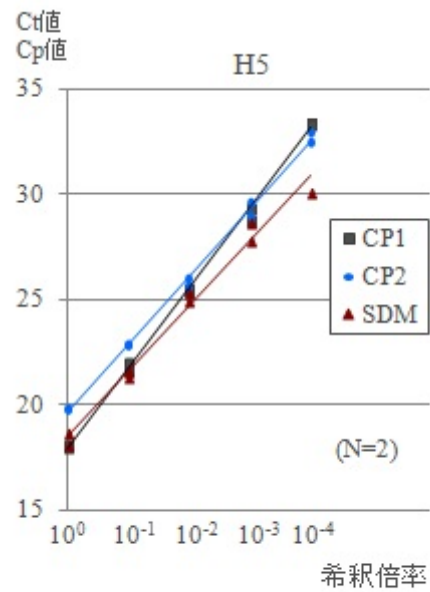
**表3 各解析法における、希釈倍率毎の Ct 値・Cp 値**

標的遺伝子	解析法	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
NP	CP 1	Ct値	18.53	21.50	24.87	28.53	32.76	
		Cp値	18.67	21.81	25.30	28.64	31.95	
	SDM	Cp値	18.43	21.55	24.92	28.13	30.00	
H 5	CP 1	Ct値	18.03	21.79	25.45	29.07	33.36	
		Cp値	19.82	22.87	25.78	29.27	32.66	
	SDM	Cp値	18.34	21.46	25.10	28.15	30.00	
H 7 eu	CP 1	Ct値	17.75	21.15	24.66	27.97	31.82	34.81
		Cp値	18.05	21.43	24.65	27.64	31.27	
	SDM	Cp値	17.85	21.06	24.30	27.44	30.00	
H 7 am	CP 1	Ct値	16.56	19.84	23.12	26.36	30.57	34.03
		Cp値	17.13	20.20	23.76	26.86	30.20	31.60
	SDM	Cp値	16.81	19.67	23.19	26.43	30.00	30.00

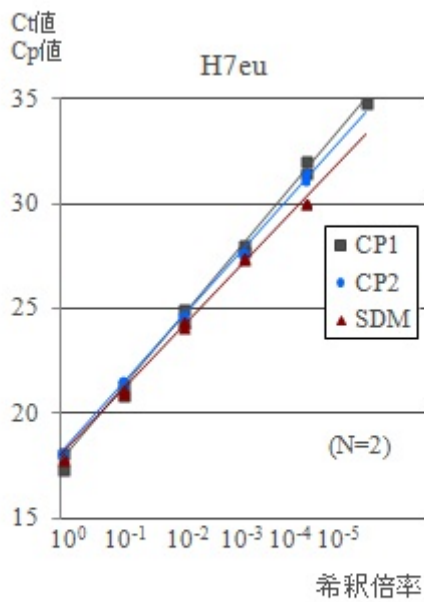
(N=2)



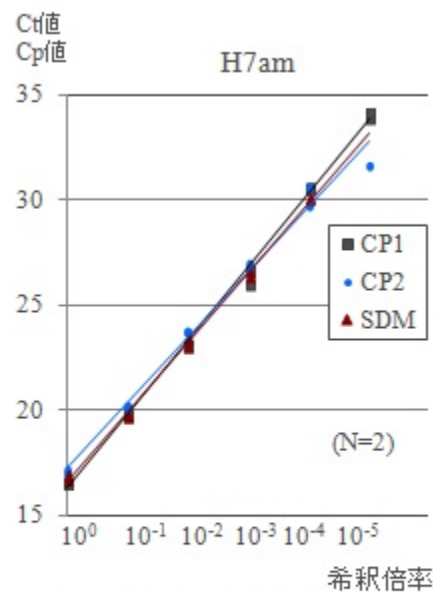
CP1  $e=0.913, R^2=0.995$   
 CP2  $e=0.993, R^2=1.000$   
 SDM  $e=1.128, R^2=0.992$



CP1  $e=0.834, R^2=0.998$   
 CP2  $e=1.050, R^2=0.997$   
 SDM  $e=1.104, R^2=0.986$



CP1  $e=0.945, R^2=0.997$   
 CP2  $e=1.025, R^2=0.999$   
 SDM  $e=1.120, R^2=0.999$



CP1  $e=0.928, R^2=0.999$   
 CP2  $e=1.102, R^2=0.990$   
 SDM  $e=1.003, R^2=0.998$

図1 各標的遺伝子 (NP、H5、H7eu、H7am) における Ct 値、Cp 値の比較

## 考 察

今回、AI 検査において、新たに導入した r-PCR システムでの SDM 法の有用性を確認するため、三つの解析法の比較検討を行った。その結果、新システムにおいて CP 法・SDM 法共に全ての標的遺伝子は正しく検出された。Shan Lu らは複数の遺伝子検出に対し本報と同様の比較検討を行ったところ、一部の遺伝子では解析法により異なった発現量を示したと報告している<sup>8)</sup>が、本報においては三つの方法で得られた Ct 値及び Cp 値に明らかな差は認められず、今回使用したプライマー及びプローブによる AI 検査では解析法間での遺伝子発現量に差はなかった。以上により新システムは AI 検査に用いることが可能であること、また解析法は CP 法及び SDM 法共に有効であることが示唆された。

CP 法は増幅曲線の指数関数的増幅域において、通常同時に増幅した複数の増幅曲線に対し共通する一本の Threshold Line を設定する。解析パラメーターの設定は Auto 設定も可能であるが<sup>1),6)</sup>、ノイズ蛍光や非特異的蛍光等の影響を受け検査系によってはうまく設定されないことも多く、その際、解析者の判断により Manual で各解析パラメーターの設定を行う必要がある。そのため解析者が異なったり、解析時が異なることで再現性が低くなることもあるといった問題がある。

一方、SDM 法は各増幅曲線に対して二次導関数により解析され、各解析パラメーターや結果の算出はシステムの自動計算により行われるため、同一の検出データで得られる Cp 値は解析者、解析時によって異なることはなく常に一定である<sup>6)</sup>。SDM 法は比較的新しい方法ではあるが、解析者のバイアスが排除され Cp 値が変動しないといった点からより客観性・再現性に優れた方法と言える<sup>6),9)</sup>。

従来からウイルス疾病の実験室内診断はウイルス分離及び血清学的診断による方法で行うのが基本であるが、結果判明までに長時間を要する上、ウイルスによっては分離や抗体検査自体が困難なものがある<sup>3),7)</sup>。そのため研究分野での利用を前提とした技術である遺伝子検査が、迅速診断法の一部として発展してきており<sup>3)</sup>、家畜衛生分野においても遺伝子検査上の性質を鑑みた上で補助的診断の位置づけで利用されてきた<sup>2),7)</sup>。しかし近年では家畜伝染病予防法に基づく検査法として診断に利用される傾向にあり<sup>2)</sup>、特に HPAI に係る診断では、迅速・的確な初動防疫を目的に r-PCR 検査の結果を疑似患者決定時の重要な判定材料とするなど<sup>5)</sup>、その位置づけが変化しつつある。

このような中 r-PCR による疾病診断には客観性・再現性に優れた公正性の高い解析法を用いることが必要であり、r-PCR の解析法に SDM 法を用いることは家畜伝染病の検査及び診断に有用で、今後の更なる活用が期待される。

## 引用文献

- 1) Applied Biosystems 7300/7500/7500Fast Real-Time PCR System, Relative Quantification Getting Started Guide,  
[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_042676.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042676.pdf)
- 2) 病性鑑定指針 平成 20 年 6 月 2 日付消安第 880 号農林水産省消費安全局通知, 13-18
- 3) David O. White, Frank J. Fenner : 医学ウイルス学 (第四版) , 173-174, 近代出版 (1996)
- 4) Kenji Tsukamoto, et al : J. Clin. Microbiol, Vol. 48, No. 11, 4275-4278 (2010)
- 5) 高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定防疫指針, 平成 23 年 10 月 1 付農林水産省大臣公表
- 6) Light Cycler480 Instrument Operator' s Manual Software version1  
<http://www.cbmg.umd.edu/files/cbmg/corelab/LightCyclerManual.pdf>
- 7) Sashi B. Mohanty, Sukanta K. Dutta : 獣医ウイルス学 (初版) 、83-91、文永堂 (1982)
- 8) Shan Lu, et al : Mol Cell Probes、1-6、2010
- 9) タカラバイオ リアルタイム PCR 実験ガイド  
<http://www.takara-bio.co.jp/goods/catalog/pdf/prt1-3.pdf>