

13. 本県における高病原性鳥インフルエンザの 野外株に対する抗原検出法の比較検討

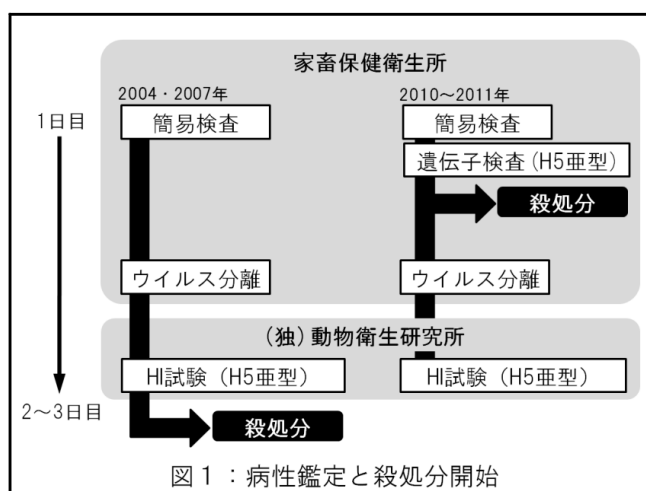
大分家畜保健衛生所

病鑑 壁村光恵・(病鑑) 首藤洋三・病鑑 長岡健朗

1. はじめに

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)に関する病性鑑定は、簡易検査、遺伝子検査、ウイルス分離などの抗原検出法があり、その検査結果により患畜、疑似患畜が決定され、初動防疫いわゆる殺処分が開始される。

近年、HPAIへの対応は迅速性が重要視され、2004年、2007年の国内発生では殺処分開始が通報から2～3日後であったのに対し、2010～2011年は通報から24時間以内に開始された。これは、ウイルス分離、遺伝子検査どの段階で殺処分開始を判断したかの違いである。2004年、2007年は、家畜保健衛生所(家保)でウイルス分離を実施し、分離されたウイルスが(独)動物衛生研究所(動衛研)におけるHI試験でH5亜型と判明後殺処分が開始された。一方、2010～2011年は家保でH5亜型特異遺伝子が検出された段階で“疑似患畜”と決定され、ウイルス分離の結果を待たずに殺処分が開始された(図1)。



このように、殺処분을開始する上で抗原検出法の結果が重要であるにもかかわらず、過去の発生事例において野外株での抗原検出法を比較検討した報告はない。そこで、2011年2月の県内発生時に実施した抗原検出法の検査結果を比較検討したので報告する。

2. 材料・方法

材料は、死亡鶏6羽、同居鶏5羽、計11羽の気管スワブ、クロアカスワブ、計22検体を供試し、以下の3つの抗原検出法を実施。

- (1)簡易検査：市販キット(Quick Vueラピッド SP influ)を用いた。
- (2)遺伝子検査：Leeらの報告に基づき、A型、H5亜型、H7亜型についてRT-PCRを実施¹⁾。
- (3)ウイルス分離：発育鶏卵尿膜腔内接種し、培養後の尿膜腔液を用い赤血球凝集性(HA)試験を実施。

3. 検査成績

(1)簡易検査：陽性は11検体（気管4検体、クロアカ7検体）。

(2)遺伝子検査：A型陽性は14検体（気管6検体、クロアカ8検体）、H5亜型陽性は13検体（気管6検体、クロアカ7検体）、H7亜型はすべて陰性。

(3)ウイルス分離：HA陽性が17検体（気管8検体、クロアカ9検体）、赤血球凝集抑制試験によりニューカッスル病ウイルスは否定、動衛研でHPAIウイルス・H5N1亜型と同定された(CK/Oita/1/2011)。

	簡易検査	遺伝子検査		ウイルス分離
所要時間	0.6時間	6.5時間		40時間
検出感度		A型	H5	
気管	4	6	6	8
クロアカ	7	8	7	9
合計	11	14	13	17

ウイルス分離で陽性と判定された17検体のうち、簡易検査では6検体、H5亜型遺伝子検査では4検体が陰性と判定される結果となった(表1)。

また、検体ごとの検査成績は5通りにパターン分けされ、①簡易検査、遺伝子検査(H5亜型)、ウイルス分離すべて陽性が10検体、②簡易検査のみ陰性が3検体、③ウイルス分離のみ陽性が3検体、④遺伝子検査のみ陰性が1検体、⑤すべて陰性が5検体であった(表2、図2)。

パターン	①	②	③	④	⑤
簡易検査	+	-	-	+	-
遺伝子検査(H5)	+	+	-	-	-
ウイルス分離	+	+	+	+	-
検体数	10	3	3	1	5

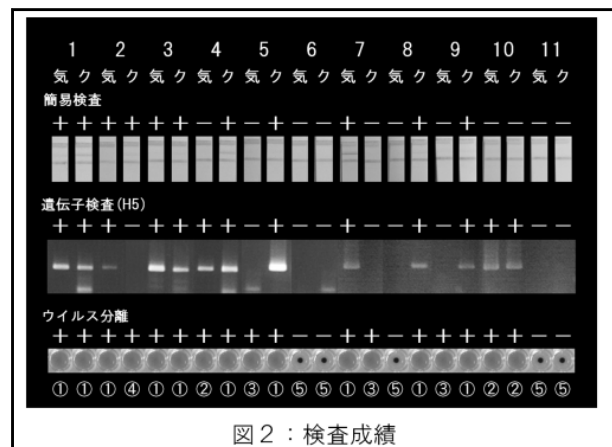


図2：検査成績

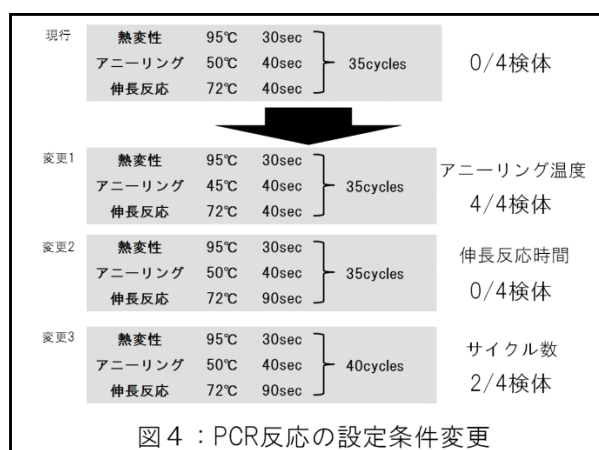
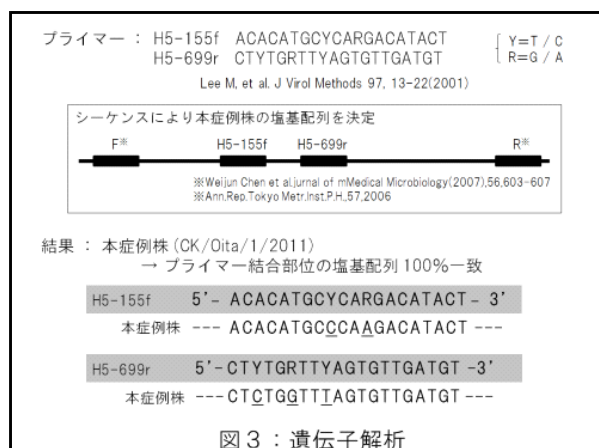
4. まとめ・考察

検出感度は、ウイルス分離、遺伝子検査、簡易検査の順で優れていた。ウイルス分離と遺伝子検査の検出感度はほぼ同等になると推察されたが、ウイルス分離陽性の4検体がH5亜型遺伝子検査では陰性と判定された。

ウイルスが存在するにもかかわらず、特異遺伝子が検出されなかったのはプライマーのミスマッチが原因と考え、遺伝子解析を実施した^{2,3)}。本症例株の両プライマー

結合部位の塩基配列をシーケンスにより決定した結果、その塩基配列は今回使用したプライマーの塩基配列と100%一致していることが判明した(図3)。このことから、本症例株に対するウイルス分離と遺伝子検査の検出感度の差は、プライマーのミスマッチではなく、他の要因によるものと考えられた。

そこで、遺伝子検査におけるPCR反応の設定条件を変更し、検出感度を比較した。材料は、本症例で検査に供試した22検体のうちウイルス分離陽性で、H5亜型特異遺伝子が検出されなかった4検体を供試し、アニーリング温度の低下、伸長反応時間の延長、サイクル数の増加の3通りを実施した。その結果、アニーリング温度の低下により4検体、サイクル数の増加で2検体が陽性となった(図4)。PCR反応の設定条件を変更することで遺伝子検査の検出感度がウイルス分離とほぼ同等になったことから、本症例株の検出感度の差は、PCR反応の設定条件によるものと考えられた。



5. 総括

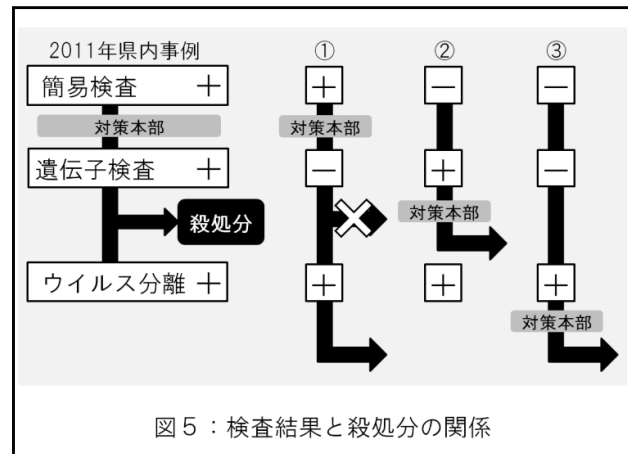
2010～2011年の国内発生事例9県24例は、遺伝子検査でH5亜型特異遺伝子が検出された結果を受け疑似患者と決定され殺処分が開始された。その後、防疫指針が改正され、遺伝子検査が疑似患者の判断の一つとして新たに記載された⁴⁾。

このように、近年、遺伝子検査による迅速な判定が求められているが、今回、野外株について抗原検出法の検出感度を比較したところウイルス分離が最も優れていることが判明した。また、本症例株と使用プライマー結合部位の塩基配列は100%一致していたにもかかわらず、ウイルス分離陽性の4検体がH5亜型遺伝子検査では陰性と判定される結果となった。つまり、遺伝子検査の陰性判定のみでは確実な陰性の証明にはならないことが示唆された。また、今回はプライマーのミスマッチは確認されなかったが、インフルエンザウイルスの変異率は非常に高いといわれていることから⁵⁾、今後侵入してくる野外株が現在のプライマーで検出できない可能性も考えられる。このことから、ウイルス分離はやはり必須の検査項目であり、簡易検査、遺伝子検査、ウイルス分離による総合的かつ慎重な判定が重要と考える。

また、H5亜型、H7亜型の遺伝子検査方法については防疫指針に記載されておらず、使用するプライマーを含めその方法は各都道府県に任されている。これもまた、イン

フルエンザウイルスが変異しやすいウイルスであるためと考えられるが、真症を遺伝子検査で陽性と判定することが強く求められているなかで、野外株に対するプライマーや PCR 反応の検討は重要であり、今回野外株を用いた PCR 反応の設定条件の検討は今後の HPAI に関する病性鑑定の一助となると考える。

また、防疫対応の観点から、必ずしもすべての抗原検出法で陽性となるとは限らないことは、検査結果によって殺処分開始が異なることが示唆された(図 5)。



2011 年県内事例では、簡易検査で陽性となり遺伝子検査結果が判明するまでの約 6 時間に対策本部の設置、動員者確保や資材搬入などの殺処分の準備ができた。しかし、プライマーのミスマッチなどが原因で簡易検査陽性、遺伝子検査陰性であった場合、殺処分開始は 48 時間後のウイルス分離の結果を待つことになる(①)。また、簡易検査陰性の場合、対策本部は設置されず、遺伝子検査もしくはウイルス分離の結果が判明してから、殺処分の準備を開始することとなる(②③)。このことから、今後発生した際に迅速・的確な初動対応ができるよう、検査結果と殺処分の関係を改めて理解した上で防疫体制を構築していくことが HPAI のまん延防止、早期収束に繋がると考える。

参考文献

- 1) Lee M, et al. J Virol Methods 97,13-22 (2001)
- 2) Weijun Chen et al. Journal of Medical Microbiology (2007), 56, 603-607
- 3) Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H., 57, 2006
- 4) 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防疫指針(平成23年10月1日農林水産大臣公表)
- 5) 新矢恭子：高病原性鳥インフルエンザの特性, 鶏病研究会報. 47, 1-5 (2011)