

RT-PCR およびダイレクトシーケンスによる エンテロウイルス属の同定について

宮代 守¹・若月 紀代子²・樋脇 弘²

Studies on Detection of *Enterovirus* Using Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction and Nucleotide Analysis

Mamoru MIYASHIRO , Kiyoko WAKATSUKI , Hiroshi HIWAKI

要 旨

In Fukuoka Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases during 2002-April to 2003-March, 29 strains were isolated in cell culture from aseptic meningitis, herpangina patients and other cases. The strains were examined for *Enterovirus* detection, by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR product direct sequence.

The specific primer pairs gave positive signals, 28 strains could be identified to Echovirus types 13 and 22, Coxsackie A virus types 4,8,10 and 12, and Enterovirus type 71. Its result corresponded to the result of neutralization test, therefore RT-PCR assay and nucleotide analysis can be used for rapid detection of *Enterovirus*.

Key Words : エンテロウイルス属 *Enterovirus* , シーケンス sequence ,
中和試験 neutralization test , 福岡市 Fukuoka City

はじめに

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属は無菌性髄膜炎やヘルパンギーナをはじめ、様々な疾患を起こすウイルスであり、福岡市の感染症発生動向調査事業においてインフルエンザウイルスに次いで多く分離されるウイルスである。

エンテロウイルス属には血清型により 64 種のウイルスが知られており、その分離同定には時間を要している。さらに近年、エコーウイルス(以下 E と略す)30 型(E30)やエンテロウイルス(以下 EV と略す)71 型(EV71)のように標準株に対する抗血清で中和できない株が増えてきており、中和試験に代わる迅速かつ正確な同定法の開発が望まれるようになった。

そこで、今回 RT-PCR とダイレクトシーケンスによるエンテロウイルスの同定および解析を試みたので報告する。また、今年度全国的に流行した E13 の遺伝子解析についても若干の知見を得たのであわせて報告する。

1. 福岡市保健環境研究所 微生物部門(現保健科学部門)

(現所属:保健福祉局 生活衛生部 生活衛生課)

2. 福岡市保健環境研究所 微生物部門(現保健科学部門)

材料および方法

1. 材料

平成 14 年度の感染症発生動向調査事業の検体から細胞培養法(RD18S, CaCo2 および HEp-2 細胞を使用)で分離されたウイルス 29 株を材料とした。

2. RT-PCR

CPE の見られた細胞培養上清を QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) で RNA を抽出し、Access Quick RT-PCR System (Promega) を用いて One Tube RT-PCR を実施した。

プライマーは EVP-4/OL68-1, 187/011, 188/011, 189/011, 159S/162A を用いた(表 1)。

3. ダイレクトシーケンス

目的とする PCR 産物が得られた場合には、さらに QIA quick PCR purification Kit (QIAGEN) を使って PCR 産物を精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI310 (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、

GenBank 登録株との解析を行った。

ンカ生研製)による中和試験でも分離株の同定を行った。

また、同時に単味抗血清（国立感染症研究所またはデ

表 1 使用したプライマー

Primer	Sequence	Gene
EVP-4	5'-CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3'	5'-NCR
OL68-1	5'-GGTAAATTCCACCACCANCC-3'	VP2
187	5'-ACIGCIGYIGARACIGGNCA-3'	VP1
188	5'-ACIGCIGTIGARACIGGNG-3'	VP1
189	5'-CARGCIGCIGARACIGGNGC-3'	VP1
011	5'-GCICCIGAYTGITGICCRAA-3'	2A
159S	5'-ACYATGAAAYTGTGCAAGG-3'	VP3
162A	5'-CCRGTAGGKGTRCACGCRAC-3'	VP1

表 2 中和試験および RT-PCR の結果

株名	臨床診断名	検体の種類	中和試験	EVP-4/OL68-1	187/011	188/011	189/011	159S/162A
1	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
2	インフルエンザ	咽頭うがい液	E13	+	+	-	-	-
3	無菌性髄膜炎	咽頭ぬぐい液	E13	+	+	-	-	-
4	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
5	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
6	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
7	無菌性髄膜炎	ふん便	E13	+	+	-	-	-
8	無菌性髄膜炎	ふん便	E13	+	+	-	-	-
9	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
10	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
11	無菌性髄膜炎	髄液	E13	+	+	-	-	-
12	不明	咽頭ぬぐい液	E13	+	+	-	-	-
13	無菌性髄膜炎	ふん便	E13	+	+	-	-	-
14	感染性胃腸炎	ふん便	E13	+	+	-	-	-
15	無菌性髄膜炎	咽頭ぬぐい液	E13	+	+	-	-	-
16	肝炎	ふん便	E22(Parechovirus)	-	-	-	-	-
17	手足口病	ふん便	EV71	+	-	-	+	+
18	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	-	-
19	インフルエンザ	咽頭うがい液	CA4	+	-	+	-	-
20	手足口病	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	-	-
21	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	Not Tested	+	-	+	-	-
22	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	-	-
23	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	-	-
24	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	+	-
25	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA4	+	-	+	+	-
26	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA8	+	-	+	+	-
27	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	CA8	+	-	+	+	-
28	手足口病	咽頭ぬぐい液	CA10	+	+	+	+	-
29	感染性胃腸炎	ふん便	CA12	+	-	+	+	-
	無熱性けいれん							

[備考]

- ・ 26 と 27 株は 188/011 プライマーでもシーケンス可能だが N が多く、189/011 プライマーの方が良好であった。
- ・ 28 株は 189/011 プライマーの場合のみシーケンスが可能であった。
- ・ (VP4-2) および (VP1) の領域についてシーケンスを実施。

結果および考察

1. RT-PCRおよび中和試験

分離されたウイルス 29 株の中和試験および各プライマーに対する RT-PCR の結果を表 2 に示した。

EVP-4/OL68-1 プライマーを用いた場合、16 株を除く 28 株において、目的とするバンドの増幅が見られた。このことから EVP-4/OL68-1 はエンテロウイルス属のスクリーニングに有効なプライマーであることがわかった。さらに、これらの 28 株は、187/011, 188/011 および 189/011 のいずれのプライマーを用いても目的のバンドが増幅された。

また、中和試験でコクサッキー A ウイルス（以下 CA と略す）と同定された 11 株のうち、6 株（24 ~ 29）は 188/011 と 189/011 の両プライマーに反応した。

16 株は中和試験の結果、E22 であることがわかった。E22 と E23 は現在パレコ属 (*Parechovirus*) の human parechovirus type1 および 2 に分類され¹⁾、EVP-4/OL68-1, 187/011, 188/011 および 189/011 のプライマーでは増幅されないことが知られている。そのため、エンテロウイルス様のウイルスが分離され、これらのプライマーで増幅が見られなかった場合は、E22 または E23 を疑い中和試験により同定することが効率的であると考えられる。

159S/162A は EV71 を特異的に増幅するプライマーである²⁾。今回、17 株のみがこのプライマーにより増幅され、中和試験からも EV71 と同定された。EV71 はまれに重症の手足口病を引き起こすため³⁾、迅速な同定が求められており、この 159S/162A プライマーを用いた遺伝子検出は非常に有効と考えられ、今後、さらに多くの株数について検討する必要がある。

2. シーケンス

VP4-2 領域 (EVP-4/OL68-1) のシーケンスを、12, 17 ~ 21 および 28 ~ 29 の計 8 株について行い、GenBank 登録株と比較を行った。その結果、18 ~ 21 の 4 株は CA4, 17 株は EV71 と高いホモロジーを示し、中和試験と同様の結果を得ることができた。

しかし、12(E13), 28(CA10)および 29(CA12) 株については、高いホモロジーを示すものが GenBank 登録株に存在しなかった。E13, CA10, CA12 の VP4-2 領域の登録株が GenBank に少ないため、この部位での同定は現在のところ困難であると考えられる。

VP1 領域 (187/011, 188/011, および 189/011) のシーケンスは、16 株を除く 28 株について実施した。

その結果、E13 は 187/011 プライマー、CA4 は 188/011

プライマー、CA8, CA10, CA12 および EV71 は 189/011 プライマーを使うことで良好なシーケンス結果が得られることがわかった。

決定した 28 株の VP1 領域塩基配列を GenBank 登録株と比較した結果、E13 (15 株), CA4 (8 株), CA8 (2 株), CA10 (1 株), CA12 (1 株), EV71 (1 株) と同定され、中和試験の結果と一致した。

VP1 領域はプライマーの種類が多く非特異的な増幅も見られる反面、VP4-2 領域よりも確実に同定することが可能であった。

配列を決定した 28 株中、10 株の E13 および 1 株の CA10 について GenBank 登録を行った (表 3)。

E13 は、平成 13 年度以前国内でほとんど分離されておらず、平成 14 年度に入って E13 による無菌性髄膜炎の流行が全国的に報告されるようになった (図 1)⁴⁾。本市でも、感染症発生動向調査を開始して以来、初めて E13 が分離された。平成 14 年度に流行した E13 は、エンテロウイルスレファレンスセンター配布の中和用プール抗血清 EP95 では中和できないため、本来なら同定に苦慮することとなるが、遺伝子検査を併用することで同定を速やかに行うことができた。

GenBank に登録した E13 の 10 株について VP1 領域 674bp の解析を行った結果、各株間のホモロジーは、塩基配列で 98.2% ~ 100%、アミノ酸配列では 99.1% ~ 100% であった。また、福島県および広島県で分離された E13 (Accession number AB086858 および AB092984) と比較すると、塩基配列で 98.1% ~ 99.4%、アミノ酸配列で 99.1% ~ 100% のホモロジーであった。E13 の標準株である Del Carmen 株 (AF081327) とは、塩基配列で 80.1% ~ 81.0%、アミノ酸配列で 95.5% ~ 96.0% のホモロジーであり、大きな変異は示していないことがわかった。

今回実施した RT-PCR とダイレクトシーケンスによるウイルス同定法は、用いた全ての株において中和試験と同様の結果を得ることができた。しかし、シーケンス法の場合、データベースとの比較を行うため、GenBank に登録がない領域、あるいは登録されていないウイルスについては同定できないという欠点がある。今後、さらにデータが蓄積され、解析しやすくなることが望まれる。

表3 GenBank 登録を行った株

() 内は登録株名	organism	Accession number
1 (Fukuoka City 02-131)	Human echovirus 13	AB109377
3 (Fukuoka City 02-182)	Human echovirus 13	AB109378
4 (Fukuoka City 02-184)	Human echovirus 13	AB109379
5 (Fukuoka City 02-185)	Human echovirus 13	AB109380
8 (Fukuoka City 02-201)	Human echovirus 13	AB109381
10 (Fukuoka City 02-204)	Human echovirus 13	AB109382
11 (Fukuoka City 02-205)	Human echovirus 13	AB109383
12 (Fukuoka City 02-206)	Human echovirus 13	AB109384
13 (Fukuoka City 02-215)	Human echovirus 13	AB109385
14 (Fukuoka City 02-216)	Human echovirus 13	AB109386
28 (Fukuoka City 02-244)	Human coxsackievirus A 10	AB109018

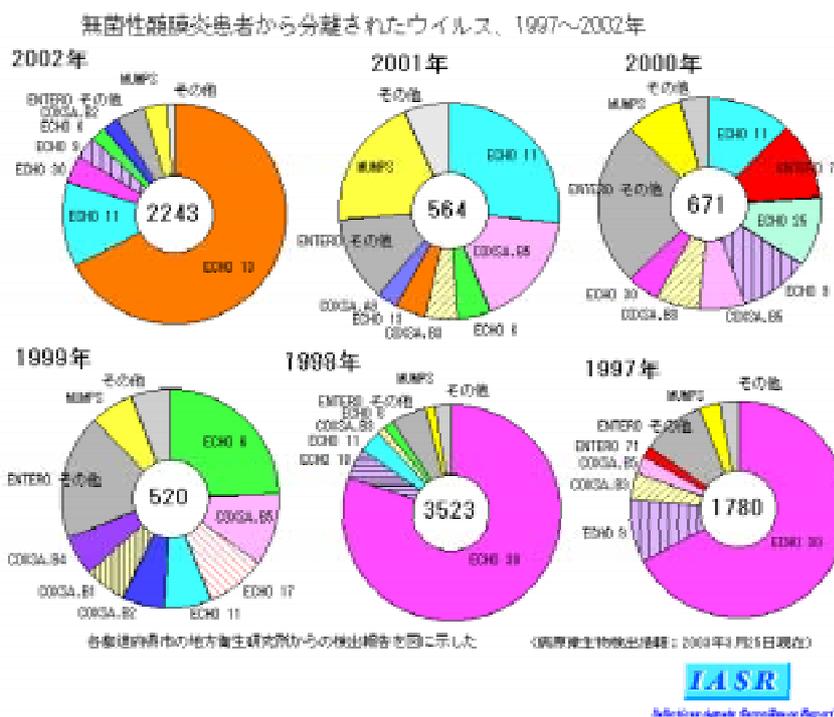


図1 全国における無菌性髄膜炎の流行(IASRより抜粋)

まとめ

細胞培養法によるエンテロウイルス分離には、CPE出現までに2代の継代が必要となることが多く、ウイルス同定には、定量試験と中和試験を実施するため、最低でも4週間は時間を要する。

エンテロウイルス属ウイルスの同定に、PCR法やダイレクトシーケンス法による遺伝子検査を併用した場合、ウイルス分離から同定までにかかる日数は細胞培養法に比べ3週間近く大幅に短縮され、検査の迅速化が可能となった。

文献

- 1) M.A. Mayo ほか：Virus taxonomy-1997 J.Gen.Virol. ,79, 1998
- 2) Betty A. Brown ほか：Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR, J.Clin.Viro. , 16, 2000
- 3) 塩見正司ほか：エンテロウイルス 71 型感染が原因で急死したと考えられた3症例 - 大阪市：IASR ,Vol.19, 1998
- 4) 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 1999～2002：IASR, Vol.23, 2002