

RT-PCR およびダイレクトシーケンスを用いた エンテロウイルスの同定 (第2報)

若月紀代子・山崎俊治・真鍋和義

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Studies on Detection of *Enterovirus* using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Nucleotide Analysis ()

Kiyoko WAKATSUKI, Shunji YAMASAKI and Kazuyoshi MANABE

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) - direct sequence method for the detection of *Enterovirus* was evaluated. In Fukuoka City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases, 26 strains of *Enterovirus* were isolated. They were experimented for the identification by RT-PCR- direct sequence and neutralization test (NT). The result was that all of 24 strains could be identified by RT-PCR-direct sequence, although 2 strains (*Enterovirus* 71) could not be identified by NT. When this method was applied in 2 group cases where *Enterovirus* infection was suspected, virology diagnosis could be made in short term.

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

はじめに

福岡市では平成 14 年度より RT-PCR およびダイレクトシーケンスを用いたエンテロウイルスの同定を検討している。

エンテロウイルスはピコルナウイルス科に属し, 1 本鎖 RNA をもつエンベロープのないウイルスで, 夏季を中心に流行する。本ウイルスは口から侵入し, 咽頭や腸管で増殖して, 発熱や上気道症状, 下気道症状, 発疹, 中枢神経系疾患など, ささまざまな症状を引き起こす。

エンテロウイルスの同定は, 現在, 中和試験が主流であるが, 抗原変異などにより既存の抗血清では中和できないことや, 交差反応により判定が困難なこともある。また, 中和試験による同定には細胞培養を含めると通常 3~5 週間程度の時間を要し, さらに使用する抗血清や分

離ウイルスの希釈が適切でないと中和を何度も試みることになり, 非常に時間がかかってしまう。

そこで, 平成 15 年度も昨年度に引き続き, 感染症発生動向調査および集団感染事例で採取された検体について, 中和試験と RT-PCR およびダイレクトシーケンスを用いたエンテロウイルスの同定を行い, シーケンスによるウイルス同定と遺伝子解析の有用性について若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 材料

1) 感染症発生動向調査

平成 15 年度感染症発生動向調査では, 26 名 (29 検体) からエンテロ様ウイルスが分離された。複数の検体から

ウイルスが分離された患者についてはどちらか1検体を選び、計26検体の細胞培養液を実験に供試した。

2) 集団感染事例

平成15年度、エンテロウイルスが疑われる集団感染の検査依頼が2例あった(事例AおよびB)。

事例Aは、平成15年6月に市内児童福祉施設で発生した。患者は10名で、エンテロウイルスによる感染が疑われ、有症者2名の糞便が搬入された。

事例Bは、平成15年11月に市内の病院で発生した。患者は0ヶ月~2才児で、発疹・発熱を呈していた。院内での感染が疑われ、有症者6名(疑い例2名含む)、無症者4名の計10検体の糞便が搬入された。

両事例とも、糞便から10%乳剤を作成し、細胞培養を実施するとともに、10%乳剤および細胞培養液からRNA抽出を行った。

2. 方法

RNA抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、RT-PCRをAccessQuick RT-PCR System (Promega)で実施した。プライマーはVP1領域増幅のため、187/011, 188/011, 189/011¹⁾を用い、必要に応じてEV71を検出するため、EVP-4/OL68-71R (5'-NCR/VP4/VP2領域)²⁾と159S/162A (VP1領域)³⁾を使用した(Fig.1)。

PCR陽性となった場合、PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を使って精製し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)を用いてダイ

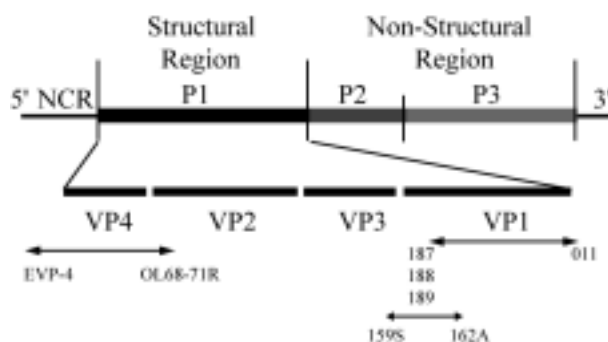


Fig.1 Primers used for RT-PCR and sequencing

レクトシーケンスを行った。なお、187/011, 188/011, 189/011は、同じ領域を増幅しているため、陽性となったいずれかのプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行った。

また同時に、細胞培養で分離した株は単味抗血清(国立感染症研究所またはデンカ生研製)を用いて中和試験を行った。

実験結果

1. 感染症発生動向調査

Table 1に中和試験とシーケンスの結果を示した。

エンテロウイルスが分離された患者の臨床診断名は、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、発疹症の他にも、インフルエンザ、胃腸炎など多様であった。

2株(No.22, 23)が中和困難となったが、その他の株では中和試験とシーケンスの結果は一致した。これら2

Table 1 The result of neutralization test (NT) and sequence analysis

Sample No.	Clinical diagnosis	Specimen	NT	Sequence analysis
No.1, 2	Influenza	Throat swab	CA4	CA4 (VP1 region)
No.3	Herpangina	Throat swab	CA6	CA6 (VP1 region)
No.4-6	suspected Varicella, Exanthema	Throat swab, Feces	CA9	CA9 (VP1 region)
No.7-13	Herpangina, HFMD	Throat swab, Throat gargle	CA10	CA10 (VP1 region)
No.14	Influenza	Throat gargle	CB1	CB1 (VP1 region)
No.15, 16	Herpangina, HFMD	Throat swab	CB5	CB5 (VP1 region)
No.17-19	Herpangina, Influenza, Aseptic meningitis	Throat swab, Feces	E6	E6 (VP1 region)
No.20	Influenza	Throat swab	E16	E16 (VP1 region)
No.21	Fever of unknown origin	Feces	E18	E18 (VP1 region)
No.22, 23	HFMD	Feces	Unidentified	EV71 (VP1, 5'-NCR/VP4/VP2 region)
No.24, 25	HFMD	Throat swab	EV71	EV71 (VP1, 5'-NCR/VP4/VP2 region)
No.26	Gastroenteritis	Feces	PV1	PV1 (VP1 region)

HFMD: hand-foot-and-mouth disease, CA: Human coxsackievirus A, CB: Human coxsackievirus B, E: Human echovirus, EV: Human enterovirus, PV: Human poliovirus

株について、EV71 特異的プライマー159S/162A で RT-PCR を行ったところ、どちらも陽性となった。また、VP1 領域、5'-NCR/VP4/VP2 領域でも EV71 と相同性を示したため、EV71 と同定した。

なお No.22 は、平成 14 年度 3 月に搬入され、中和試験により同定した EV71 の分離株⁴⁾と VP1 領域、5'-NCR/VP4/VP2 領域でともに塩基配列が 100% 一致した。

2. 集団感染事例

事例 A では、10%乳剤から直接 RT-PCR を行ったところ 2 検体とも陽性になった。そのため搬入翌日の時点でエンテロウイルスが原因であることがほぼ判明したが、塩基配列の決定に時間がかかり、CA9 と判定できたのは 19 日目のことであった。一方中和試験で CA9 と確認できたのは 22 日目であった。

2 検体の塩基配列を比較したところ、VP1 領域で 100% 一致し、同一株による集団感染であることが推察された。また、Table 1 の No.4~6 の 3 株とは 91.0~99.6% の相同性を示した。

事例 B について、シーケンスおよび中和試験で同定結果が判明するまでの日数を、Table 2 に示した。10%乳剤から直接 RT-PCR を行った結果はいずれも陰性であった。5 日目の培養液より RT-PCR を行ったところ、2 検体 (No.1, 2) が陽性となった。シーケンスの結果、2 検体の塩基配列は E18 と相同であることがわかり、7 日目にはこの事例を E18 による集団感染と判断し、直ちに中間報告として病院へ伝えた。

Table 2 The day when the identification was finished by NT or sequence analysis in case B.

Day	Sample No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5th										
7th										
13th										
23rd										
24th										
29th										
40th										

Sample No.3-8 ; patient of symptom

Sample No.1,2,9,10 ; patient of no symptom

: RT-PCR product was gained.

: Sequencing was finished.

: NT was finished.

検体 No.3~8 は 13 日目に、検体 No.9 も 24 日目に細胞培養液が RT-PCR 陽性となり、29 日目までには 9 検体の塩基配列が決定できた。なお、最短では RT-PCR 後 2 日で塩基配列の決定が可能である。また、検体 No.10 はウイルスが分離されず陰性であった。

塩基配列を比較すると、陽性となった 9 検体は VP1 領域で 99.9~100% 一致し、同一株による集団感染と考えられた。これらは、同じ時期に市内小児科定点から搬入された検体 (Table 1 の No.21) とは 95.8% の相同性であった。

また、RD18S および HEp-2 細胞では検体 No.1~8 から 13 日目に、CaCo2 細胞では検体 No.1~9 から 24 日目にウイルスが分離された。これらの細胞で中和が終了し、E18 と確認できたのは 40 日目であった。

考察

我々は、感染症発生動向発生調査や集団感染事例で分離した株について塩基配列を決定し、平成 15 年度は 41 検体を GenBank に登録した。今回、中和困難であった EV71 はデータベースが充実していたため、配列の比較が容易であった。しかしながら、データベースが十分でなく、判断に迷う検体もあった。今後登録数を増やし、シーケンスによる同定を、より確実な手法として構築していくことが望まれる。

今回の集団感染 2 事例は、いずれも施設内で発生しており、疫学的にも、同一由来株であることは容易に推察できた。しかし、ウイルス感染症が、地域的流行として広範囲で発生した場合、流行原因究明には、ウイルス同定だけでは不十分であり、シーケンスで得られた各株の塩基配列を比較し、より細かな疫学解析を行っていくことが必要である。

中和試験の場合、使用する抗血清の選定に頭を悩ませることが多いが、今回シーケンスを用いたことで、中和試験に使用する抗血清の見当をつけることができ、比較的容易に同定することが可能であった。

RT-PCR やダイレクトシーケンスシーケンスは、ウイルスについての知識や検査の経験をそれほど必要とせずに行うことが可能である。しかし、これらは、単に特定の遺伝子を検出する方法であり、感染性のあるウイルス粒子 (蛋白) を検出する従来法とは本質的に異なる。それらを理解した上で、シーケンスによる迅速診断と中和試験による確認を併用していくことが、今後のエンテロウイルス検査として有用な方法と思われる。

今回の集団感染事例では重症患者の発生はなかったが、EV71 のように死亡例が報告されているものもある⁵⁾。また、健康危機管理上重要な SARS ウイルス、鳥イ

ンフルエンザウイルス，ウエストナイルウイルスといった感染症の発生もある．このような事態に備え，RT-PCR およびダイレクトシーケンスを用いた迅速診断法を確立していく必要があると考えられた．

ま と め

RT-PCR およびダイレクトシーケンスを用いてエンテロウイルスの同定を行い，中和試験との結果を比較した．

感染症発生動向調査で得られた 26 株のエンテロ様ウイルスは，いずれも RT-PCR およびダイレクトシーケンスにより同定された．しかし，このうち EV71 株と同定された 2 株については，中和困難であった．

集団感染 2 事例について，RT-PCR およびダイレクトシーケンスを応用したが，中和試験と比較すると，短期間にウイルス同定結果が得られた．

文 献

- 1)Oberste M.S. 他：Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses, *J.Clin.Microbiol*, 38(3), 1170-1174, 2000
- 2)Hiroyuki Shimizu 他：Enterovirus 71 from Fatal and Nonfatal Cases of Hand, Foot and Mouth Disease Epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998 , *Jpn.J.Infect.Dis*, 52, 12-15, 1999
- 3)Betty A. Brown 他：Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR, *J.Clin.Viro*, 16, 107-112, 2000
- 4)平成 14 年度 感染症発生動向調査事業関連のウイルス検査結果，福岡市保健環境研究所報，218-219, 28, 2002
- 5)国立感染症研究所：手足口病，*IASR*, Vol.19, 150-151, 1998