

# 平成 29 年度・衛生研究所研究費事業報告

## A 種エンテロウイルスの血清型別法の構築

(計画年度：平成 29 年度)

研究代表者

ウイルス担当 小川泰卓

共同研究者

ウイルス担当 中川佳子\* 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴 青沼えり 内田和江  
 感染症検査室長 篠原美千代

### 目的

エンテロウイルスは手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等、多様な疾患を引き起こすウイルスである。A-D の4種に分類され、さらにそれぞれの種は多くの血清型に分類される。数年おきに異なる血清型のウイルスが流行し、時に麻痺や脳炎等の重症例も発生する。

血清型別は従来、抗血清を用いた中和試験により行われてきたが、近年では抗原性を最も反映するVP1領域の塩基配列又はアミノ酸配列の解析に基づく血清型別が主流となっている。VP1領域の解析は、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルに基づきVP1領域の共通プライマーを用いたPCR法（従来法）を実施しているが、遺伝子を増幅することが困難な検体がある。このような検体は、その他の領域を解析し型別を試みるが、多くの時間を費やしても型別できない、型別ができて成績書の発行が大幅に遅れ、流行初期の段階で県民及び医療機関へ迅速に流行ウイルスに関する情報を提供することができない、解析領域が異なるため国内外の検出株と比較ができないという問題が発生している。

これらの問題を解決するため、検出頻度の高い血清型であるコクサッキーウイルスA6型（CA6型）、コクサッキーウイルスCA16型（CA16型）及びエンテロウイルスA71型（EV-A71型）について、従来法に比べ検出感度が良く、VP1領域全長を増幅可能なRT-(semi-)nested PCR法（本法）の構築を試みた。

### 成果概要

既知のエンテロウイルスの塩基配列データをもとに、検出頻度の高いCA6型、CA16型及びEV-A71型について、それぞれのVP1領域全長を増幅するためのプライマーを設計した。感染症発生動向調査の病原体検査でVP1領域の解析によりCA6型、CA16型及びEV-A71型と同定されたEV分離株を各血清型につき2株ずつを材料とし、設計したプライ

マーを用いた1st PCR及びnested PCR（CA6型及びCA16型に適用）またはsemi-nested PCR（EV-A71型に適用）を行い、電気泳動により目的とするサイズの遺伝子増幅が確認された。

従来法と本法の検出感度の比較及び定量 RT-リアルタイムPCRにより遺伝子コピー数の測定を行った。本法は3つの血清型とも従来法に比べ100倍から1000倍感度が高いことが認められ、cDNA 1µlあたり30コピー以上の遺伝子が存在すれば増幅が可能であることが認められた。

従来法では型別不能であり、他の領域の解析により型別を行った臨床検体、各血清型4検体ずつ計12検体を材料として、本法による型別を試みたところ、全ての検体で増幅産物が確認され、VP1領域における型別ができた。抗原性を最も反映するVP1領域を解析する従来法では、これまで遺伝子量の少ない検体を解析することはできなかった。このような検体においても本法を用いることによりVP1領域全長の解析が可能になることが確認された。

これらの結果から、エンテロウイルスの中で検出頻度の高いCA6型、CA16型及びEV-A71型の3つの血清型について、これまで用いていた従来法に比べ、検出感度が100倍から1000倍高く、VP1領域全長を増幅可能な血清型別法を構築することができた。

### 展望

当初は3つの血清型それぞれに特異的なプライマーの設計を試みたが、適した配列がなかったため目的とする血清型以外の血清型についても増幅する可能性を残すプライマーセットとなった。本プライマーが他の血清型のVP1領域をどの程度増幅するか、増幅する場合は目的とする血清型と同様に、型別にも適用できる十分な感度をもつかどうかについて今後検討する必要がある。

\*現 食品微生物担当