

A種エンテロウイルスの血清型別法の構築

小川泰卓 中川佳子 富岡恭子 鈴木典子
峯岸俊貴 青沼えり 内田和江 篠原美千代

Development of a serotyping PCR method for *Human enterovirus A*

Yasutaka Ogawa, Keiko Nakagawa, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki,
Toshitaka Minegishi, Eri Aonuma, Kazue Uchida, and Michiyo Shinohara

はじめに

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。病型と血清型は必ずしも対応するわけではないが、中枢神経症状を呈して重症化する頻度の高い血清型や特異な症状を呈する血清型も一部判明している。このため、感染症発生動向調査の病原体検査において、流行初期に流行ウイルスの血清型を把握することは、その後の流行への注意喚起や病原性を予測する上で重要である。

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、抗血清が供給されている血清型は限られており、また難培養性のウイルスも多く存在することから、中和試験の適用範囲は限定されている。このため、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領域の解析には、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアル¹⁾に基づきVP1領域の共通プライマーを用いたPCR法(以下、従来法という)²⁾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、型別ができても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、当所の検査で検出されるエンテロウイルスの約8割を占めるA種エンテロウイルスの内、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A16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-nested PCR法(以下、本法という)の構築を試みた。

材料

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型と同定されたエンテロウイルス分離株を各血清型につき2株ずつ、あわせて6株を材料とした(表1)。さらに、従来法であるVP1領域の解析による型別ができなかったため、VP2またはVP4領域の解析によりCA6型、CA16型及びEV-A71型と型別されたエンテロウイルスを含む臨床検体を各血清型につき4検体ずつ、あわせて12検体を材料とした(表2)。

方法

1 ウイルス核酸抽出及び逆転写反応によるcDNAの作製
QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用いて、材料140 μ lからウイルス核酸を抽出し、DEPC処理水60 μ lに溶出した。核酸溶出液10 μ lを用いてPrimeScript RT reagent kit(TAKARA BIO)により逆転写反応を行い、20 μ lのcDNA溶液を作製した。核酸抽出及び逆転写反応は、それぞれのキット説明書に従って行った。

2 VP1領域増幅プライマーの設計と確認

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領域を特異的に増幅するためのプライマーを設計した(表3)。CA6型、CA16型及びEV-A71型と同定されているエンテロウイルス分離株を用いて、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)(以下、両者を合わせて(semi-)nested PCRという)を行い、電気泳動により目的とするサイズの遺伝子増幅を確認した。PCRの反応条件は項目4と同様とした。

3 プライマー終濃度の検討

項目2で各プライマーセットを用いたエンテロウイルス分離株のPCR増幅を確認後、プライマー終濃度を0.2 μ M、0.4 μ M、0.6 μ M、0.8 μ M、1.0 μ Mに設定し、1st PCRを行った。PCR後の電気泳動で、目的とするサイズの遺伝子増幅が明

表1 分離株の情報及び系統解析結果

	血清型	由来検体			培養細胞	subgenotype
		検体採取年	臨床診断名	患者年齢		
分離株1	CA6型	2017年	手足口病	1歳0か月	RD	F
分離株2	CA6型	2017年	手足口病	2歳5か月	RD	F
分離株3	CA16型	2017年	手足口病	1歳1か月	FL	B1a
分離株4	CA16型	2017年	手足口病	2歳10か月	RD	A
分離株5	EV-A71型	2017年	手足口病	5歳8か月	RD	B5
分離株6	EV-A71型	2017年	手足口病	8歳3か月	FL	C1

表2 臨床検体の疫学情報及び系統解析結果

	血清型	検体採取年	臨床診断名	患者年齢	検体種類	subgenotype
検体1	CA6型	2013年	脳炎	1歳5か月	咽頭拭い液	F
検体2	CA6型	2013年	手足口病	1歳0か月	咽頭拭い液	F
検体3	CA6型	2014年	手足口病	0歳10か月	咽頭拭い液	F
検体4	CA6型	2016年	手足口病	0歳6か月	咽頭拭い液	F
検体5	CA16型	2014年	手足口病	4歳0か月	咽頭拭い液	B1a
検体6	CA16型	2014年	脳炎	3歳5か月	咽頭拭い液	B1b
検体7	CA16型	2015年	手足口病	1歳	咽頭拭い液	B1b
検体8	CA16型	2015年	手足口病	31歳	咽頭拭い液	B1b
検体9	EV-A71型	2013年	ヘルパンギーナ	1歳	咽頭拭い液	B5
検体10	EV-A71型	2013年	手足口病	4歳8か月	咽頭拭い液	B5
検体11	EV-A71型	2013年	無菌性髄膜炎	0歳2か月	糞便	B5
検体12	EV-A71型	2013年	無菌性髄膜炎	0歳1か月	糞便	B5

表3 設計プライマー配列及びシーケンス用プライマー配列

血清型	プライマー名	用途	配列(5'-3')	position※	増幅サイズ
CA6型	CA6-F2	1st PCR	GTR GTD CCA CCA GAY ACC C	2321-2339	1st PCR 1322bp
	CA6-R2		GAC TGR TAY CTA GCA GGR TAR TAC TC	3642-3617	
	CA6-F3	nested PCR	GCY AAC ATT YTA GCT CTT GGA GC	2348-2370	nested PCR 1076bp
	CA6-R3		GCR AGR TGT CGG TTT ACY ACT C	3423-3402	
CA16型	CA16-F1	1st PCR	CCA CYG GCA YBA TAA CHA TAT GG	2288-2310	1st PCR 1134bp
	CA16-R1		YCC ART CRT TRT GYG TGG C	3421-3403	
	CA16-F2-2	nested PCR	GCA ARG AYA CDG ARG AYA TTG AGC	2405-2428	nested PCR 968bp
	CA16-R2		RAC RTA TAT RGC RCC WGA YTG YTG	3372-3349	
EV-A71型	EV71-F2	1st及びsemi-nested PCR	GCR GCY CAR AAR AAY TTY ACY ATG	2367-2390	1st PCR 1080bp semi-nested PCR 1019bp
	EV71-R1	1st PCR	RTC NCG AGA GCT GTC TTC C	3446-3428	
	EV71-R2	semi-nested PCR	TTN ACC ACY CTR AAR TTR CCC AC	3385-3363	
血清型共通	487	シーケンス	ATG TWY GYI CCI CCI GGI GCN CC	2898-2920	
	488		GTI GGR TAI CCI TCI TAR AAC CAY TG	3067-3042	

R:A or G, W:A or T, Y:C or T, D:A or T or G, H:A or T or C, N:A or C or G or T

※CA6型:AY421764 CA16型:U05876 EV-A71型及び血清型共通:U22521 に基づく

瞭に認められたプライマー濃度のPCR産物を用い、(semi-)nested PCRで目的遺伝子の増幅を確認した。プライマー終濃度以外の反応条件は項目4と同様とした。

4 1st PCR及び(semi-)nested PCR

1st PCR, (semi-)nested PCRともに、Premix Taq (Ex Taq Version 2.0) (TAKARA BIO)を用いて行った。1st PCR反応液は、Premix Taq 25 μ lに、フォワードプライマー及びリバースプライマーを終濃度 0.2 μ Mとなるように添加し、DEPC処理水を加え45 μ lとした後、cDNAを5 μ l加えた。反応条件は、94 $^{\circ}$ C 2分の初期反応後、変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C 1分を35サイクル行い、最終伸長反応を72 $^{\circ}$ C 3分を行った。(semi-)nested PCRは、テンプレートとして1st PCR産物2 μ lを用いて、その他の条件等は1st PCRと同様とした。

5 感度の比較検討

従来法と本法の検出感度を比較するため、エンテロウイルス分離株から核酸を抽出し、逆転写反応によりcDNAを複製した後、10¹⁰倍希釈まで10倍段階希釈した。このうち10⁴倍希釈から10⁸倍希釈のcDNAを用いて1st PCRのみからなる従来法と1st PCR及び(semi-)nested PCRからなる本法を行い、電気泳動により目的遺伝子の増幅を確認した。

また、10⁰倍希釈から10¹⁰倍希釈のcDNAについて、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。定量のための検量線は、既知濃度の合成遺伝子を用いて作製した。RT-リアルタイムPCRは、Nijhuisらの方法³⁾に準じて行った。

6 臨床検体への本法の応用

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(表2)を材料として、本法による型別を試みた。

7 塩基配列の決定及び系統解析

本法による(semi-)nested PCRにより得られた増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、BigDye Terminator V. 1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いたサイクルシーケンス反応後、

3500 Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)で解析した。なお、シーケンス用プライマーには設計した(semi-)nested PCR用プライマーに加え、Obersteらが報告した487及び488プライマー⁴⁾(表3)を用いた。得られた塩基配列は、BLAST検索による同源性解析、Enterovirus Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/#/>)による血清型別及び近隣結合法による系統樹解析を行った。系統樹解析は、近年の株と比較を行うため、従来法により塩基配列を決定した領域において行った。また、2012年から2017年に当所における感染症発生病原体検査で検出された株(以下、埼玉県検出株という)を含めて解析した。

なお、本研究は埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。

結果

1 設計プライマーの確認及びプライマー終濃度の検討

分離株1, 2についてCA6型用1st PCRプライマーを用いた検討では、プライマー終濃度0.2 μ M-1.0 μ Mの全てで、目的とするサイズの遺伝子増幅を認めた。また、非特異的な増幅はなかった。さらに、プライマー終濃度を0.2 μ Mとして、分離株3-6について、それぞれの血清型に対応する1st PCRプライマー及び(semi-)nested PCR用プライマーを用いてPCRを試行したところ、全て目的とするサイズの遺伝子増幅を認めた。これらの結果より、プライマー終濃度は最も低い0.2 μ Mとした。

2 感度の比較検討

従来法によるPCR、本法による(semi-)nested PCR、及び定量RT-リアルタイムPCRの結果を表4に示した。

(1) CA6型

従来法では分離株1は10⁴倍希釈では増幅が認められず、分離株2は10⁴倍希釈で増幅が認められた。本法による(semi-)nested PCRでは、どちらの分離株も10⁵倍希釈から10⁷倍希釈まで増幅が認められた。RT-リアルタイムPCRによる定量では10⁷倍希釈のcDNA 1 μ l中の遺伝子コピー数は、分離株1が9.0コピー、分離株2が16.3コピーであった。

表4 従来法及び本法の感度比較結果及び遺伝子コピー数

	血清型	従来法		本法 (semi-)nested PCR			10 ⁷ 倍希釈cDNA 1 μ l中の 遺伝子コピー数
		10 ⁴ 倍希釈	10 ⁵ 倍希釈	10 ⁵ 倍希釈	10 ⁶ 倍希釈	10 ⁷ 倍希釈	
分離株1	CA6型	—	—	+	+	+	9.0
分離株2	CA6型	+	—	+	+	+	16.3
分離株3	CA16型	—	—	+	—	—	9.3※
分離株4	CA16型	+	+	+	+	+	25.8
分離株5	EV-A71型	+	+	+	+	+	29.9
分離株6	EV-A71型	—	—	+	+	+	56.2

—:陰性、+:明瞭な増幅

※分離株3については、10⁵倍希釈cDNA 1 μ l中の遺伝子コピー数

(2) CA16 型

従来法では分離株 3 は 10^4 倍希釈では増幅が認められず、分離株 4 は 10^4 倍希釈及び 10^5 倍希釈で増幅が認められた。本法による (semi-)nested PCR では、分離株 3 は 10^5 倍希釈で増幅が認められた。分離株 4 は 10^5 倍希釈から 10^7 倍希釈まで増幅が認められた。定量 RT-リアルタイム PCR による cDNA 1 μ l 中の遺伝子コピー数は、分離株 3 の 10^5 倍希釈が 9.3 コピー、分離株 4 の 10^7 倍希釈が 25.8 コピーであった。

(3) EV-A71 型

従来法では分離株 5 は 10^4 倍希釈及び 10^5 倍希釈で増幅が認められた。分離株 6 は 10^4 倍希釈で増幅が認められなかった。本法による (semi-)nested PCR では、どちらの分離株も 10^5 倍希釈から 10^7 倍希釈まで増幅が認められた。RT-リアルタイム PCR による定量では 10^7 倍希釈の cDNA 1 μ l 中の遺伝子コピー数は、分離株 5 が 29.9 コピー、分離株 6 が 56.2 コピーであった。

3 臨床検体への本法の応用

従来法では型別不能であり、VP1 以外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) 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 (表 2)。

4 塩基配列の決定及び系統解析

感度の比較に用いた分離株 6 株及び臨床検体 12 検体、あわせて 18 検体の VP1 領域全長の塩基配列を決定し、系統解析を行い subgenotype を決定した (表 1, 2)。

(1) CA6 型

系統樹解析の結果を図 1 に示した。臨床検体 1-4 及び分離株 1, 2 は 2012 年から 2017 年の埼玉県検出株 20 株と共に全て subgenotype F に分類された。2016 年及び 2017 年の埼玉県検出株は、2015 年以前の埼玉県検出株とは異なる 2 つのクラスター (図 1 クラスター I 及び II) を形成し、それぞれのクラスターは系統樹上でやや離れた場所に位置した。クラスター内の株同士の相同性はクラスター I では 98.4%-99.3%、クラスター II では 94.8%-99.7%であった。異なるクラスターの株同士では 92.2%-93.5%の相同性であった。

(2) CA16 型

系統樹解析の結果を図 2 に示した。臨床検体 5 及び分離株 3 は 2014 年から 2017 年埼玉県検出株と共に subgenotype B1a に分類された。臨床検体 6-8 は 2014 年及び 2015 年の埼玉県検出株と共に subgenotype B1b に分類された。subgenotype B1c には 2012 年の埼玉県検出株 2 株が分類された。2012 年から 2015 年の埼玉県検出株は系統樹上で subgenotype B1a, B1b 及び B1c に散在したが、2016 年、2017 年の埼玉県検出株及び分離株 3 は subgenotype B1a の中で 1 つのクラスターを形成した。分離株 4 は系統樹上で他の

株とは離れた場所に位置し、Enterovirus Genotyping Tool では subgenotype A に分類された。

(3) EV-A71 型

系統樹解析の結果を図 3 に示した。臨床検体 9-12 及び分離株 5 は 2013 年の埼玉県検出株 5 株と共に subgenotype B5 に分類された。この内、分離株 5 は他の株とはやや離れた場所に位置した。分離株 6 は 2017 年の埼玉県検出株 1 株と共に subgenotype C1 に分類された。2013 年の埼玉県検出株 1 株は、subgenotype C2 に分類された。

考察

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、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-nested PCR 法の構築を試みた。

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は今後検討する必要がある。さらにまれな例ではあるが、異なる血清型のエンテロウイルスが重複感染した場合の検体に関しては、本法の他にどのような検査法を組み合わせることが適当か、検討する意義があると考えられる。

従来法と本法の感度の比較を検討したところ、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た。また本法では、cDNA 1 μ l 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判明した。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。しかし、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。

従来法よりも感度が高く、VP1 領域を解析可能な手法の 1 つに CODEHOP 法⁵⁾があり、2016 年より当所でも用いている。しかし、CODEHOP 法の解析領域は約 340bp と短く、系統樹解析を行うにはより長い配列を用いて解析することが望ましいとされている¹⁾。今回、CODEHOP 法との感度の比較は行っていないが、本法では VP1 領域全長 (約 1000bp) を解析することが可能であり、本法を用いることでより詳細な解析を行うことが可能になると考えられる。

系統樹解析の結果から、CA6 型の 2016 年、2017 年の埼玉県検出株及び 2017 年採取検体由来の分離株 1, 2 はこれまでの検出株とは異なる 2 つのクラスター I 及び II を形成した。埼玉県では 2016 年以降、遺伝子的に異なる 2 種類の CA6 型が流行していた可能性が示唆された。

CA16 型は 2012 年から 2015 年までは subgenotype B1a, B1b 及び B1c の複数の subgenotype が検出されたが、2016

年及び2017年は subgenotype B1a のウイルスが流行の主体になったことが示唆された。Enterovirus Genotyping Tool により subgenotype A に分類された分離株 4 は、2009 年にペルーで採取された株と最も相同性が高く、2012 年及び2014 年にフランスで採取された株とも近縁であった。系統樹上では subgenotype A の参照株とは離れた場所に位置しており、さらに詳細な解析をする必要があると考えられる。

EV-A71 型は埼玉県では 2013 年に検出されて以来 4 年ぶりに検出された。subgenotype B5 に分類された株のうち、2017 年採取検体由来の分離株 5 は、2013 年に採取された臨床検体及び埼玉県検出株とは系統樹上でやや離れた場所に位置し、2017 年に東京で検出された株と最も相同性が高かった。このため、2017 年に流行した subgenotype B5 株は、2013 年に流行した株とは遺伝的に異なると考えられた。分離株 6 は subgenotype C1 に分類され、東京で 2017 年に採取された別の株と最も相同性が高く、2017 年には 2 つの subgenotype が同時に流行していたと推測された。

CA6型、CA16型及びEV-A71型の3つの血清型に限定はされるが、従来法に比べ100倍から1000倍検出感度が高く、より長い塩基配列情報が得られる (semi-)nested PCR法を開発した。この方法を用いることで、より効率的に、より詳細な病原体情報を得ることが可能となった。その結果、医療機関等に迅速な情報提供ができると考えられる。

文献

- 1) 清水博之, 西村順裕, 吉田弘, 他: 無菌性髄膜炎病原体検出マニュアル. 国立感染症研究所
- 2) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et. al : Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses . *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1170-1174, 2000
- 3) Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, et. al : Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3666-3670, 2002
- 4) Oberste MS, Maher K, Williams AJ, et. al : Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *Journal of General Virology*, 87, 119-128, 2006
- 5) Nix WA, Oberste MS, and Pallansch MA : Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens . *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2698-2704, 2006

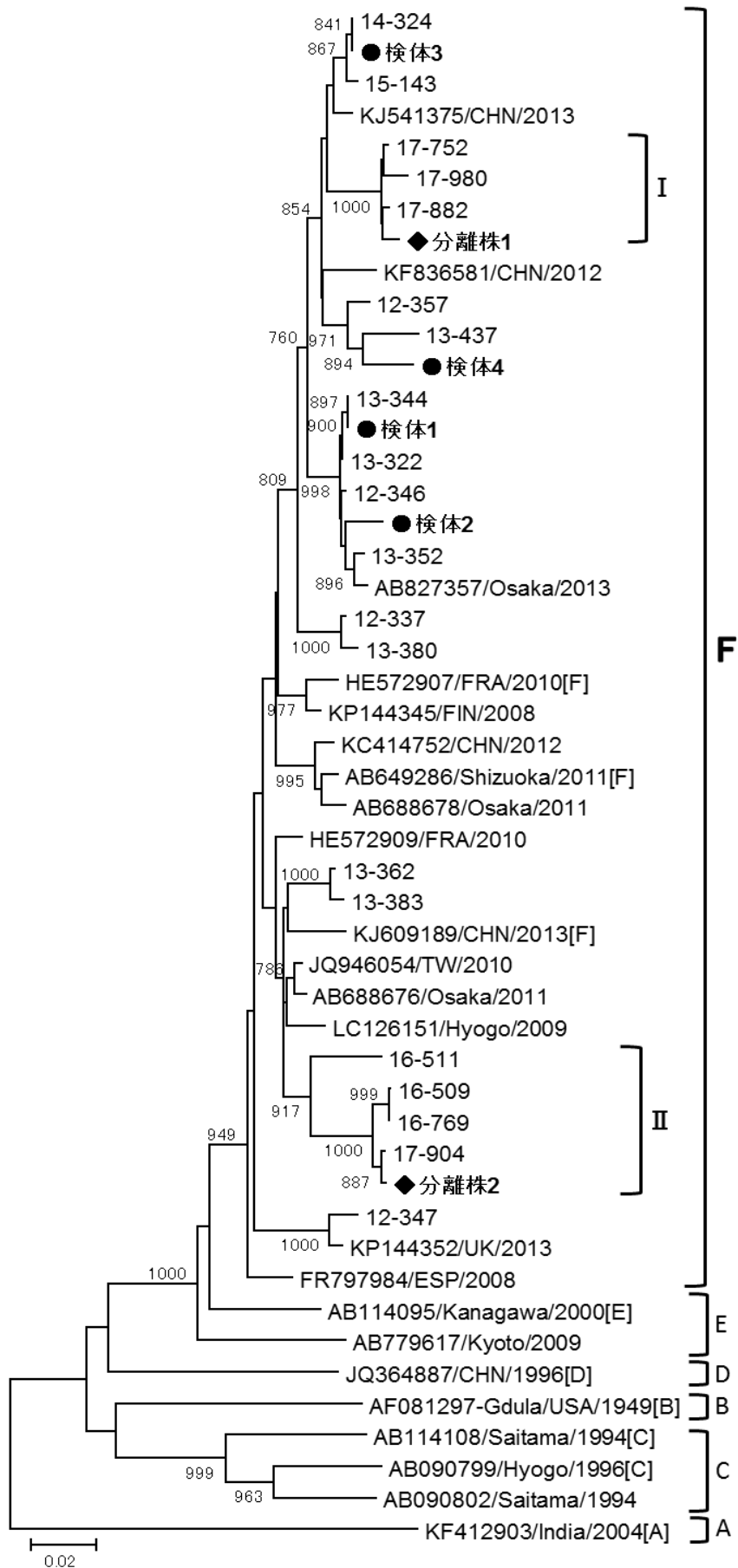


図1 CA6型VP1領域711塩基を用いた分子系統樹(近隣結合法)

◆: 本研究で解析した分離株 ●: 本研究で解析した臨床検体

埼玉県検出株: 採取年—検体番号, 参照株: 登録番号/採取地/採取年 []内に subgenotype を示した

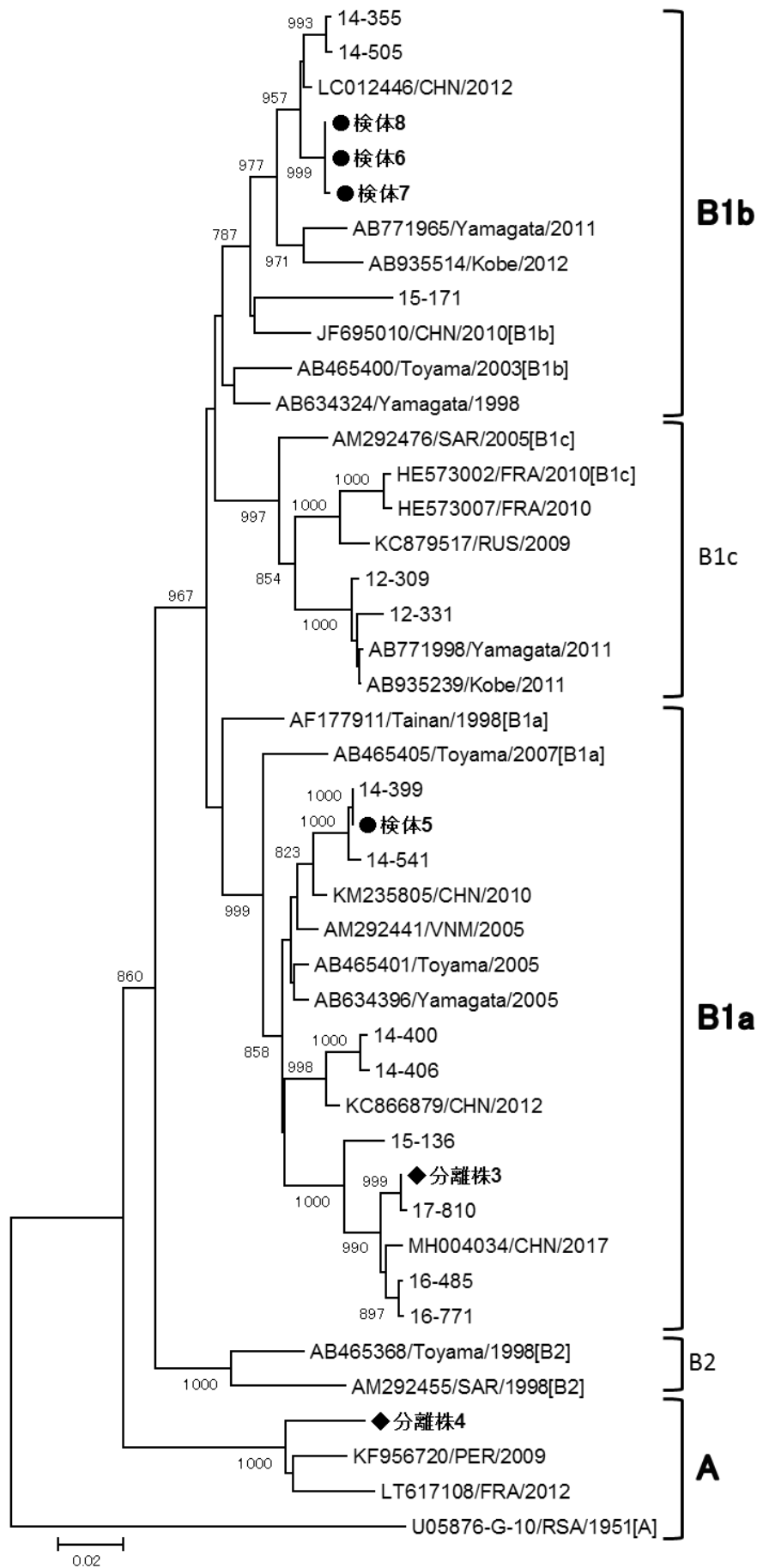


図2 CA16型VP1領域681塩基を用いた分子系統樹(近隣結合法)

◆: 本研究で解析した分離株 ●: 本研究で解析した臨床検体

埼玉県検出株: 採取年-検体番号, 参照株: 登録番号/採取地/採取年 []内に subgenotype を示した

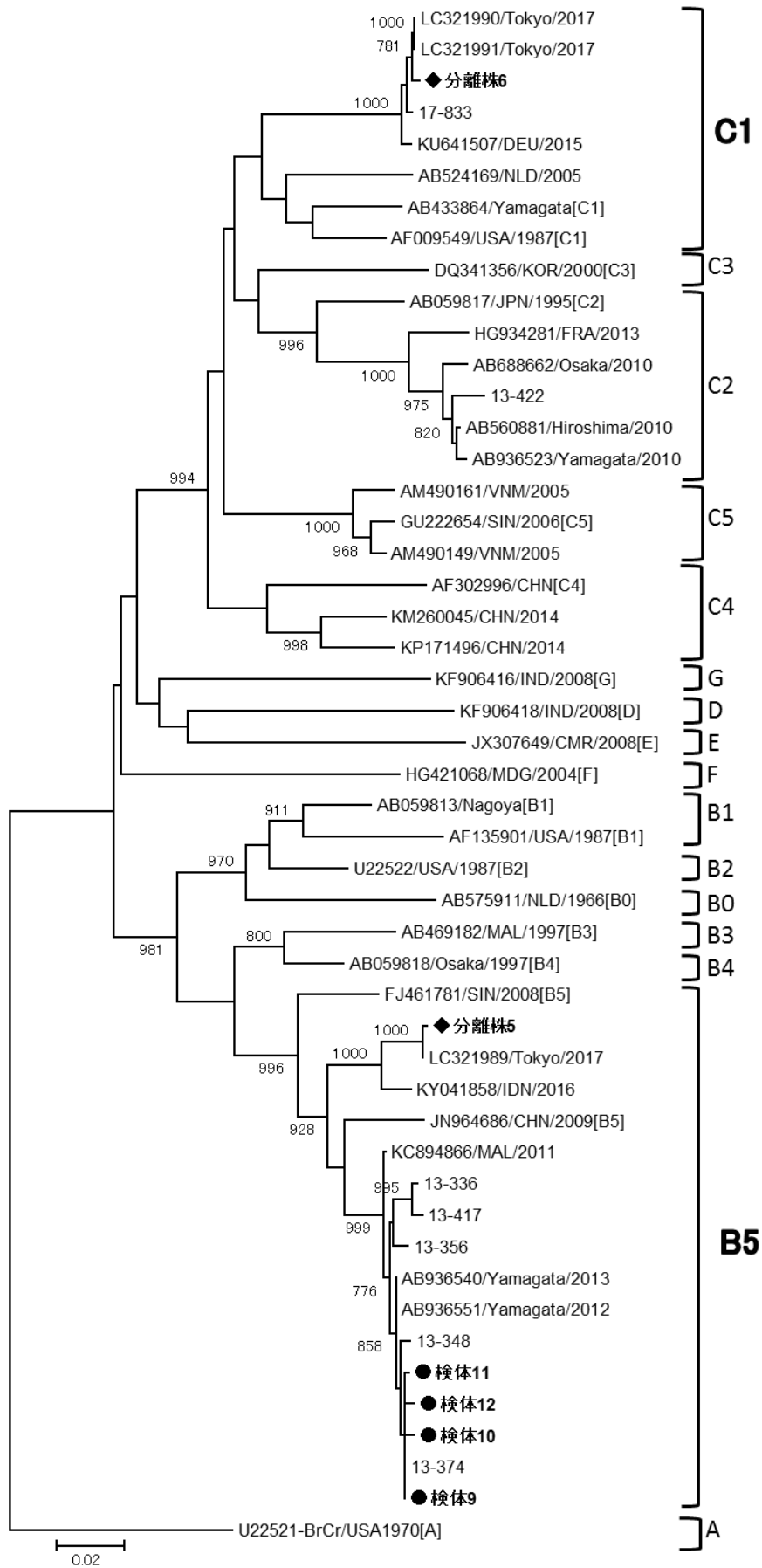


図3 EV-A71型VP1領域729塩基を用いた分子系統樹(近隣結合法)

◆: 本研究で解析した分離株 ●: 本研究で解析した臨床検体

埼玉県検出株: 採取年—検体番号, 参照株: 登録番号/採取地/採取年 []内に subgenotype を示した