

## エンテロウイルス検出用RT-PCRプライマーの検討

谷脇 妙・細見 卓司・戸梶 彰彦\*・千屋 誠造

### Evaluation of RT-(real time)PCR Primer Own Composition for Detection of Human Enterovirus

Tae TANIWAKI, Takushi HOSOMI, Akihiko TOKAJI\*, Chiya SEIZOU

**【要旨】** 2007年感染症発生動向調査で医療機関からヘルパンギーナ・手足口病と診断され、当所に送付されてきた咽頭ぬぐい液・便147検体について、独自に試作したエンテロウイルス検出用RT-PCRプライマー、リアルタイムPCR用プライマー・プローブを用いてウイルス検出を試みた。また従来から行っている細胞培養によるウイルス分離、哺乳マウスを使った方法と比較検討したところ、リアルタイムPCRでエンテロウイルスを高率で検出でき、RT-PCRプライマーはヘルパンギーナの主要原因ウイルス（コクサッキーAウイルス）検出で哺乳マウスを用いる方法と同等かそれ以上の検出感度があった。

Key words：エンテロウイルス、コクサッキーウイルスA群、コクサッキーウイルスB群、エコーウイルス、ポリオウイルス、RT-PCR、リアルタイムPCR  
Human Enterovirus, Coxsackievirus group A, Coxsackievirus group B, Echovirus, Poliovirus

## I はじめに

エンテロウイルスはピコルナウイルス科に属するRNAウイルスで、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、上下気道炎等の多様な疾患を引き起こすウイルスの総称である。血清型として、ポリオ1～3型、コクサッキーA群1～22型・24型、コクサッキーB群1～6型、エコー1～7型・9型・11～27型・29～31型、エンテロ68～71型の67種類が存在する。

特に手足口病やヘルパンギーナは、小児を中心として毎年夏期に流行する感染症である。

当所では、エンテロウイルスの同定を培養細胞を用いたウイルス分離と型特異抗血清を用いた中和試験及び、哺乳マウスを使った中和試験で行っている。

しかし、細胞に顕著に細胞変性効果（Cytopathogenic effect:CPE）を現さないものや、哺乳マウスを使うことで手技が煩雑で容易に判定できないものがある。そこでPCRで増幅したウイルスのc-DNAをDNA解析装置で解析し、既知のc-DNA情報と比較することでエンテロウイルスの同定を試みようと考えた。今回その

前段となるエンテロウイルスの特定部位を増幅するプライマーについて試作検討したので報告する。

## II 調査方法

### 1. 材料

2007年に感染症発生動向調査で機関定点病院から当所に搬入された咽頭ぬぐい液145検体、便2検体の合計147検体を検査材料とした。

### 2. ウイルス分離

検査材料を、Hela、Vero、LLCMK2、RD18s、FLPの5種類に接種し、36℃で培養した。

CPEを確認できたものについて、型特異抗血清を用いた中和試験及び哺乳マウスを使った中和試験により型を同定した。

### 3. RNA抽出及びcDNA合成

搬入された検査材料からQIAGEN社 viral RNA mini

\* 食肉衛生検査所

kitでRNA抽出し、逆転写酵素 (invitrogen社 SS II) を使って逆転写をしてcDNAを得た。

#### 4. プライマーの設計

インターネットでNCBI(National Center for Biotechnology Information)を通じてgene bankから42

種類の完全長のエンテロウイルスの塩基配列をダウンロードし(表1)、アライメントソフトclustal Xで比較分類し、汎エンテロウイルス、コクサッキーA群ウイルス、コクサッキーB群ウイルス、エコーウイルス群、ポリオウイルス群を検出するプライマーについて検討のうえ試作した。

表1. Gene bankからダウンロードしたエンテロウイルス

Coxsackie A2	AY421760	Echo 2	AY302545
Coxsackie A3	AY421761	Echo3	AY302553
Coxsackie A4	AY421762	Echo 4	AY302557
Coxsackie A5	AY421763	Echo 6	AY302558
Coxsackie A6	AY421764	Echo 7	AY302559
Coxsackie A7	AY421765	Echo 9	X92886
Coxsackie A8	AY421766	Echo 11	AJ577594
Coxsackie A9	D00627	Echo13	AY302539
Coxsackie A10	AY421767	Echo 14	AY302540
Coxsackie A11	AF499636	Echo 15	AY302541
Coxsackie A12	AY421768	Echo 16	AY302542
Coxsackie A13	AF499637	Echo 17	AY302543
Coxsackie A14	AY421769	Echo 19	AY302544
Coxsackie A15	AF499638	Echo 30	AJ295172
Coxsackie A16	U05876	Entero71	DQ381846
Coxsackie A17	AF499639	Polio 1	AY184219
Coxsackie A18	AF499640	Polio 2	AM040039
Coxsackie A20	AF499642	Polio 3	AY184221
Coxsackie A21	AF465515		
Coxsackie A24	D90457		
Coxsackie B1	M16560		
Coxsackie B3	U57056		
Coxsackie B4	X05690		
Coxsackie B5	X67706		

42種類の完全長のエンテロウイルスをclustal Xで比較したところ、相同性の高い部分は450~650塩基目あたりと4,650~4,690塩基あたりの2箇所だけであった。約1,000bpを1組のプライマーで検出できるようにするには、42種のウイルスを数種のグループに分ける必要があり、アライメントにより作成した系統樹で近縁のものごとにグループ分けした(図1)。

グループは、コクサッキーA群を中心とする「A1」、 「A2」、コクサッキーB群とコクサッキーA9、エコー群を中心とする「B1」「B2」、ポリオと「A1」、 「A2」に属していないコクサッキーAを「P+C」という5種に分けた。試作したプライマーは相同性の高い4,650~4,690塩基部分を中心にグループそれぞれを検出できるように試作した。(なお系統樹ではコクサッキーB群とエコー群が混ざっているが、コクサッ

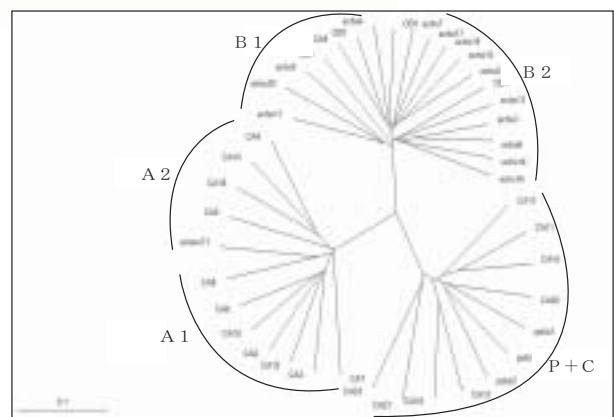


図1. アライメントにより作成した系統樹

キーB群とエコー群を識別する目的でプライマーグループは別にした(図2~9、表2)。



①

図2 B1-F①のプライマー



②

図3 A2-F②のプライマー

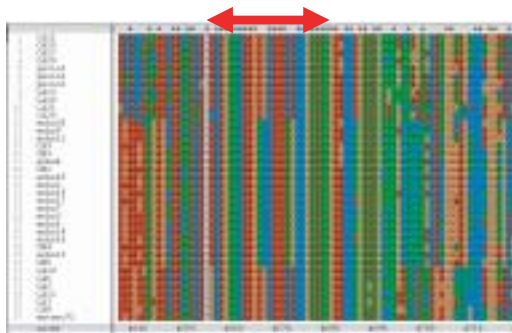


図4 ③④のプライマーの部位  
③と④は相補



⑤

図5 B2-R⑤のプライマー



⑥

図6 A1-R⑥のプライマー



⑦

図7 (P+C)-F⑦のプライマー



⑧

図8 (P+C)-R⑧のプライマー

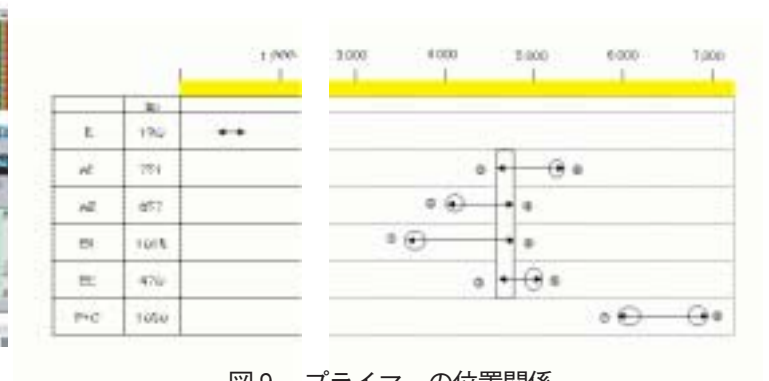


図9 プライマーの位置関係

表2 プライマーの塩基配列 (5' → 3')

プライマー	塩基配列 5'→3'
E-F	tcc tcc ggc ccc tga
E-R	acY gga tgg cca atc caa
① B1-F	gcg tgt ggg aRR att aYa aYa gag a
② A2-F	gtg tct gat tac atc aaR ggR ct
③ A1-F,B2-F	tca ata cgg YRt ttg SWc ttg aac tg
④ A2-R,B1-R	cag ttc aag WSc aaa YRc cgt att ga
⑤ B2-R	caN gtY ttV act gac atN ggc at
⑥ A1-R	gRa cct cYt cRc tRt caa cac tRg c
⑦ PC-F	ggg atg cat gtt ggH ggg aa
⑧ PC-R	tcY aaa tct atg ccc ttg tag gtt ttc ag

「E」はエンテロウイルス全般を検出できるように相同性の高い450～650区間の約200塩基長をPCRのターゲットにし、その内側の約100塩基長の部分をリアルタイムPCRに使用した (図10)。

5. RT-PCR

下記の条件でTaKaRa Thermal Cycler MPを使って増幅させた。その後1.3%アガロースゲルで電気泳動をし、サイバーゴールドで染色したものを紫外線照射でバンドを確認した。

25 μM primer (F) 1.0 μl  
 25 μM primer (R) 1.0 μl

2.0mM dNTP 5.0 μl  
 5unit/μl EX Taq 0.25 μl  
 10× EX Taq buffer 5.0 μl  
 Distilled Water 32.75 μl  
 c-DNA 5.0 μl

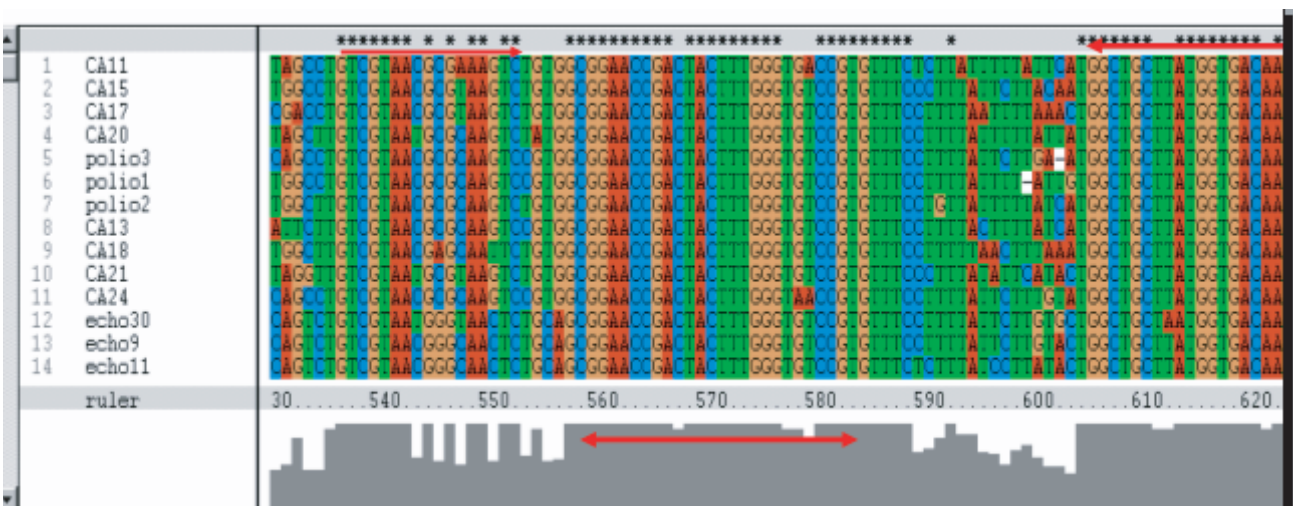
94℃ 10min  
 94℃ 15sec } ×40  
 51℃ 15sec  
 72℃ 60sec  
 72℃ 10min  
 4℃ ∞

6. リアルタイムPCR

ABI PRISM7000で行い、Ct40以内に増幅が確認できたものを陽性とした。

Taq Man Universal Mster Mix 12.5 μl  
 100 μM primer (F) 0.1 μl  
 100 μM primer (R) 0.1 μl  
 4 μM Taq Man Probe 1.43 μl  
 Distilled Water 8.37 μl  
 c-DNA 2.5 μl

50℃ 2min  
 95℃ 10min  
 95℃ 15sec } ×45  
 53℃ 60sec



プライマー (F) : gtc gta aYg SgY aag tc  
 プライマー (R) : acY gga tgg cca atc caa  
 プローブ : cgg aac cga cta ctt tgg gtg tcc gt

図10 リアルタイム PCRのプライマー、プローブに使用した部位 (矢印)

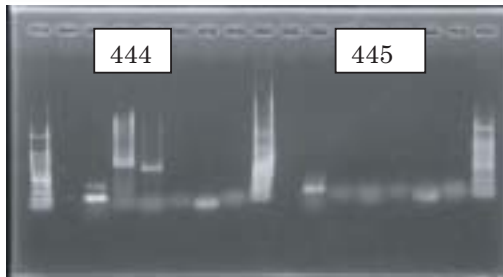
### Ⅲ 結 果

147検体中129検体が試作したリアルタイムPCR陽性であった。そのうち54検体が細胞培養、哺乳マウス接種による中和試験で確定できた。また、61検体が山崎ら<sup>1)</sup>が作成したコクサッキーウイルスA16とエンテロウイルス71の特異的プライマーを用いたPCRで確定できた。

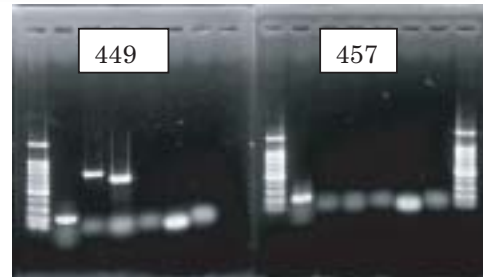
今回、試作したリアルタイムPCRが<sup>8)</sup>(+)、細胞培養CPE(-)、哺乳マウス接種(-)で診断名が手足口病及びヘルパンギーナの10検体を試作したプライマーを使ったPCRで分類したところ、「E」のプライマーではすべて陽性であったが、「A1」、「A2」には様々なパターンが見られた。また「B1」、「B2」、「P+C」が陽性のものは無かった(表3)。

表3 検体を哺乳マウス接種し変化が見られないものを試作したプライマーでウイルス検索した結果

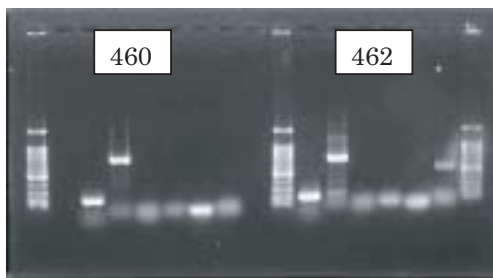
検体番号	診断名	哺乳マウス	Real time PCR	E	A1	A2	B1	B2	P+C	Vero細胞	LLc-Mk2細胞
444	手足口病	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
448	手足口病	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
449	手足口病	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
457	ヘルパンギーナ	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
460	手足口病	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
462	ヘルパンギーナ	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
469	手足口病	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
486	ヘルパンギーナ	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
495	ヘルパンギーナ	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
496	ヘルパンギーナ	-	+	?	+	+	-	-	-	-	-
464	咽頭結膜熱	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+



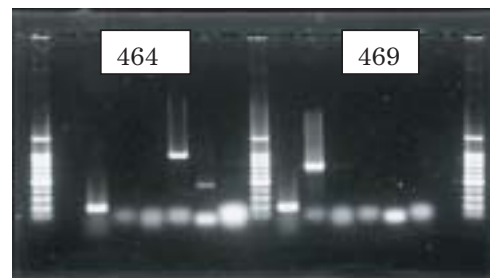
E A1 A2 B1 B2 P+C E A1 A2 B1 B2 P+C



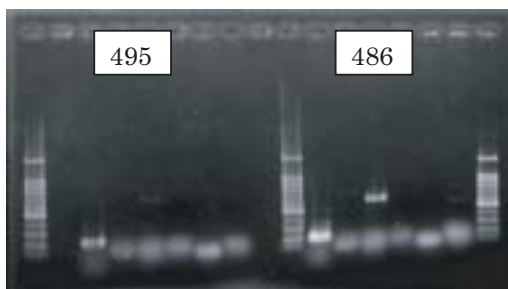
E A1 A2 B1 B2 P+C EA1 A2 B1 B2 P+C



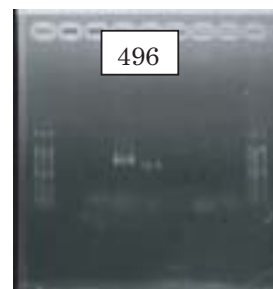
E A1 A2 B1 B2 P+C E A1 A2 B1 B2 P+C



EA1 A2 B1 B2 P+C E A1 A2 B1 B2 P+C



E A1 A2 B1 B2 P+C E A1 A2 B1 B2 P+C



E A1 A2 B1 B2 P+C

また診断名が咽頭結膜熱の検体でVero細胞と LLC-Mk 2細胞にCPE (+) でリアルタイムPCR (+) を示した1検体のPCRを行ったところ、「B 1」、「B 2」が陽性となった。

この「B 2」の増幅した塩基を高知県産業技術委員会所有のDNAシーケンサーで解析し、DDBJでBLAST検索したところ、421塩基中376塩基(89%)の相同性でEchovirus30 (AY948442) が1位に打ち出された。しかし、この検体を中国四国地区のエンテロウイルスリファレンスセンターである愛媛県衛生環境研究所に中和試験の精査依頼したところ、Coxsackievirus B2という結果を得た。

#### IV 考 察

まず、今回試作したリアルタイム PCR用プライマー・プローブセットを使用して、エンテロウイルスの疑いで送付されてきた147検体について検査したところ、129検体が陽性を示し、そのうち115検体が従来からのエンテロウイルスの検査法でウイルスが確認された(表4)。

表4 2007 手足口病、ヘルパンギーナで搬入された検体と検査結果

検査法				ウイルス名	結果	
リアルタイム PCR	RT-PCR	細胞培養	マウス接種		(+)	(-)
(-)						18
(+)	(+)			CA16 E71	57 4	
(+)		(+)		E71	2	
(+)			(+)	CA16 CA5 CA10 未確定	39 11 2 3	
(+)			(-)	未確定	11	
				計	129	18
				合計	147	

他のウイルスの検出実験を行っていないのでエンテロウイルス以外のウイルスまで検出している可能性は否定できないが、高感度であり、エンテロウイルスのスクリーニング検査の出発点としては有用と思われる。

特に、哺乳マウスによるウイルスの有無の確認より

感度がよく(表3)、リアルタイム PCR法導入により、ウイルス有無確認のための哺乳マウスの使用が省略できる。

次に、塩基配列解読によりウイルス同定を試みる目的で、まず、RT-PCR用のプライマーを試作した。高知県が所有するDNA解析装置の解読可能塩基数が850~900bpであるので、プライマーでの増幅塩基数を約1,000bpに設定した。

42種類の完全長エンテロウイルスで相同性の高い部分は450~650塩基目あたりと4650~4690塩基目あたりの2箇所だけで、約1,000bpを1組のプライマーで検出できるようにするには、グループ分けが必要であった。グループ分けをしても、グループ特有の塩基配列を持った部分にプライマーを設定するために、3,600~5,400塩基付近を増幅するプライマー設定になった(「C+P」は6,000~7,000)(図9)。この部位はVP1(血清型を決定するエピトープを構成する蛋白質をコードする<sup>2)</sup>)より下位にある。

Obersteらによると、VP1領域の一部の塩基配列解析による結果でも中和試験による血清型と異なる結果となる場合があったとの報告があるが<sup>3)</sup>、試作したプライマーで増幅した部分の塩基配列解析結果が中和試験による血清型と異なることが多いかもしれない。

今回の調査で塩基配列解析まで行ったものは1検体だけだが、塩基解析による結果(Echovirus30)と中和試験による結果(Coxsackievirus B2)が異なっていた。これについては、現在検討中である。

今後、コクサッキーA群の塩基配列解析を中心に検討を重ね、マウスを使わないエンテロウイルスの検査を目指したい。

#### 文 献

- 1) 山崎謙治:2000年大阪府で流行した手足口病の遺伝子診断および分子疫学的解析. 感染症学雑誌75 909-915. 2001
- 2) M. STEVEN OBERSTE: Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1, Journal of Clinical Microbiology, May 1999, p. 1288-1293
- 3) M. STEVEN OBERSTE: Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses, Journal of Clinical Microbiology, Mar 2000, p. 1170-1174