

# ヘルパンギーナ 病原体検査マニュアル

## 目 次

1. 疾患の概説	3
2. 検査に関する一般的注意	4
検査材料の採取	
検査材料の輸送	
作業上の注意	
検査の進め方	
検査の判定	
3. 検査方法	7
(1) 細胞培養によるウイルス分離	
(2) 中和法によるウイルス同定 (細胞培養)	
(3) 乳のみマウスによるウイルス分離	
(4) 中和法によるウイルス同定 (乳のみマウス)	
(5) 補体結合反応によるウイルス同定	
(6) 中和抗体価の測定	
(7) RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析	
4. 引用文献	42
5. 検査依頼先	43
6. 執筆者	43

## 1. 疾患の概説

ヘルパンギーナ(herpangina)は、発熱と口腔粘膜にあらわれる小水疱性発疹を特徴とするエンテロウイルス感染症で、日本では毎年夏季を中心に流行する疾患であるが、秋～冬季にも発生が認められる。病原微生物検出情報によると、日本のヘルパンギーナ患者から多く分離されているエンテロウイルスは、順にコクサッキーA4 (CA4), CA10, CA6, CA2, CA5 で、ウイルス分離率では、この5種類のウイルスが全体の約80%をしめている。流行する血清型は、通常年ごとに異なる。ヘルパンギーナは、発疹・発熱を主徴とし、一般的に予後は良好であるが、まれに無菌性髄膜炎、急性心筋炎等の合併症を伴うことがある。他のエンテロウイルス感染症と同様に、主要な感染経路は経口飛沫感染であり、患者の年齢は4才以下が多い。ワクチン、抗ウイルス剤等、ヘルパンギーナに対する積極的な予防治療法は、いまのところ存在しない。感染症法では、ヘルパンギーナは5類感染症定点把握疾患に分類されており、指定届け出機関(小児科を含む病院又は診療所)から定期的に症例報告がなされている。

## 2. 検査に関する一般的注意

### 検査材料の採取

ウイルス分離のための検体として、糞便、口腔・咽頭拭い液、水疱内容物等が挙げられる。口腔・咽頭拭い液を採取した滅菌綿棒は、乾燥を避けるため、Veal Infusion Broth、細胞培養用培地等適切な保存液中に入れておく。臨床検体から直接ウイルス遺伝子検査を行う場合の検体採取は、ウイルス分離用の検体採取に準じて行う。検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早く検体を採取し、速やかに検査に供する。すぐに検査に供しない場合は、凍結保存する。血清学的検査のためには、発症後早期に採取した急性期血清と発症後2週間以上経過した回復期の血清を採取する。

### 検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。-20℃での保管・輸送が確保できなければ、0～8℃で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体送付書には検体番号、発病日、検体採取日、検体種別等、必要事項を明記したうえ送付する。検体容器には検体種別を明記すること。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。病原体等の輸送・運搬に際しては、輸送中の安全を確保し輸送業者に安心して運搬していただくため、適切な梱包および輸送方法等に留意する(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/biorisk-guidance/945-yuso2011.html>)。

### 作業上の注意

糞便、口腔・咽頭拭い液、血液等臨床検体の取り扱いは、バイオセーフティーに十分留意した上で行う。検体の処理、ウイルス分離及び同定の作業には、クラス2の安全キャビネットを使用する。ポリオウイルスあるいはポリオウイルスを含む可能性のある検体等を取扱う場合には、事前にポリオワクチンを接種する。

## 検査の進め方

エンテロウイルス感染症の確定診断は、基本的には、糞便、口腔・咽頭拭い液等適切な臨床検体からのウイルス分離同定により行う。しかし、ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA 群ウイルスの細胞培養によるウイルス分離率は、おおむね低い。ウイルス分離率を上げるため、乳のみマウスを用いたウイルス分離が行なわれる(17)。細胞培養により分離されたエンテロウイルスは、コクサッキーA ウイルス特異的中和抗血清により同定される。乳のみマウスにより分離されたウイルスは、乳のみマウスを用いた中和法、補体結合法(CF 法)等により同定されるが、検査の迅速化・簡便化のため、RT-PCR によるエンテロウイルス遺伝子の検出・解析も行なわれている。しかし今のところ、エンテロウイルス遺伝子検査は標準化されておらず、検査の目的により、適切な方法を使い分ける必要がある。

ウイルス分離が出来なかった場合、発症期にウイルス分離用の適切な検体が得られなかった場合、エンテロウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法が行なわれる。通常、急性期と回復期の血清を比較して4倍以上の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の解釈には注意が必要である。

## 検査の判定

臨床検体から、とくに口腔・咽頭拭い液、水疱内容物からウイルスが分離・検出された場合は起因ウイルスである可能性が高い。ウイルス分離を行うことが出来ない場合、あるいはウイルスが分離されなかった場合は、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いることが出来る。また、分離が困難なエンテロウイルスの同定法として、RT-PCR 等ウイルス遺伝子検査が有用な場合もある。エンテロウイルスはしばしば不顕性感染を起こすので、臨床経過や疫学的情報を総合的に判断して、ウイルス実験室診断結果の意義を慎重に解釈するべきである。

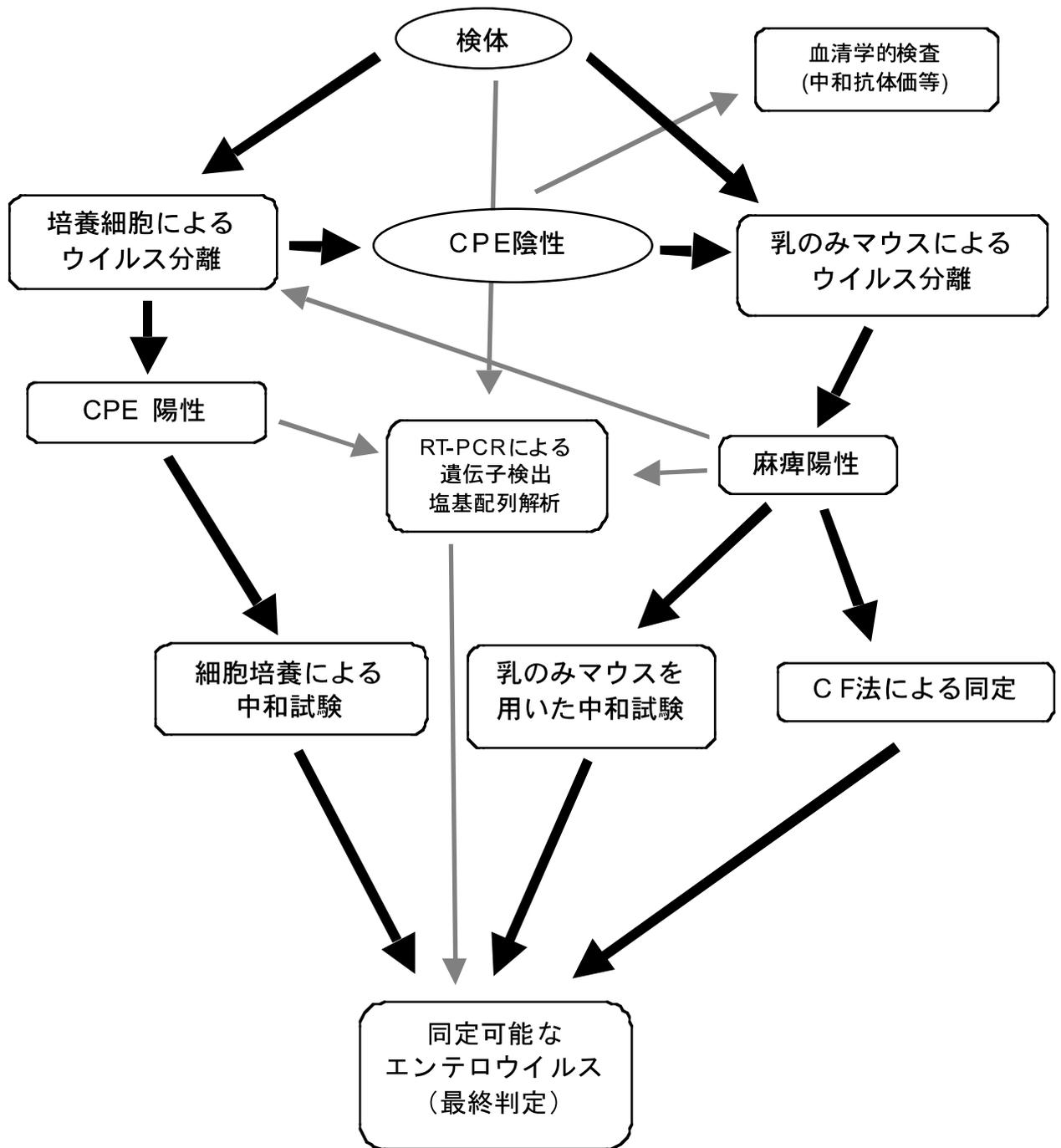


図 1. 検査の進め方 (ヘルパンギーナ)

 通常行なわれる実験室検査  
 補助的に用いられる実験室検査

### 3. 検査方法

#### (1) 細胞培養によるウイルス分離

ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスは、コクサッキーA群ウイルスであり、ウイルス分離培養には RD-18S, RD-A 細胞等が用いられるものの、乳のみマウスと比較すると分離率はやや低くなる。また、コクサッキーB群ウイルスやアデノウイルスによる場合も考えられるので HeLa 細胞と Vero 細胞などを併用する事が望ましい。細胞は、継代培養によるウイルス感受性の変化を極力抑制するために、凍結保存し、出来るだけ同じ継代数の細胞を使用するのが望ましい。通常、ウイルス分離には1週間以上を必要とし中和のための感染価を得るためには継代培養が必要となる。細胞培養に用いる器具・試薬等は、実験室及び使用する細胞により多少異なるが、以下によく用いられる試薬及び代表的な細胞培養用培地の調整法について述べる。

#### 試薬

Veal Infusion Broth 粉末 (DIFCO 0344-17-6)、牛アルブミン粉末 (SIGMA A-7906)、イーグル MEM、7.5%NaHCO<sub>3</sub>、ペニシリン・ストレプトマイシン (PS) 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No. 15140-148 等)、ゲンタマイシン溶液 (10mg/ml) (インビトロジェン Cat.No. 15710-064 等)、アンホテリシン B 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No. 15290-018 等)、牛胎児血清 (FCS)、2.5%トリプシン溶液 (インビトロジェン Cat.No. 15090-046 等)、PBS (Mg, Cl(-))、EDTA-2Na。なお、オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地を使用する際には、別途 L-グルタミン 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No. 25030-149 等) を用意する。

#### 溶液の調整

**7.5% NaHCO<sub>3</sub>** は、蒸留水に NaHCO<sub>3</sub> を 7.5% の割合で溶解させた後、0.45 μm フィルターを用いて加圧濾過することによって除菌する。除菌後、炭酸ガスが抜けないようにきつく蓋をして 4℃ に保存する。

**PS 溶液** はおよそ 1 週間に使用する量をチューブ或いはボトルに分注し、凍結保存する。

**増殖培地** の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 50 ml

(終濃度約 10%)、7.5%NaHCO<sub>3</sub>を 5ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら、培地を泡立てないように手で容器全体を軽く攪拌する。

**維持培地**の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 10ml (終濃度約 2%)、7.5%NaHCO<sub>3</sub>を 10ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら培地を泡立てないように手で同様に攪拌する。

**検体処理液** 500ml のオートクレーブ済 Veal Infusion Broth に PS 溶液 5ml、ゲンタマイシン溶液 1ml、アンホテリシン B 溶液 5ml 及び 10%牛アルブミン 2.5ml を加える。(10%牛アルブミンは粉末の牛アルブミンを蒸留水に 10%の割合で溶解し、0.45 μm フィルターで濾過滅菌しておく)。

## 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33~37℃)、24 穴プラスチックトレイ (或いは細胞培養用チューブ)、175cm<sup>2</sup> 細胞培養用プラスチックボトル (或いはガラス製 750ml ルー一瓶)、50ml、15ml 遠沈管、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μl)、ストックチューブ (2ml 用) 等

## 操作

### 1) 検体の前処理

- ① 口腔・咽頭拭い液は、綿が入っている場合にはガラス棒で綿をついて、拭い液を遠心管に確実に移す。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清を 0.45 μm フィルターで濾過する。
- ② 糞便検体は小指頭大をガラス棒でとり、検体処理液 4ml が入った遠心管に入れてガラス棒でよく攪拌する。通常 10~20%の糞便乳剤とする。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清をフィルターで濾過する。細菌の混入或いは細胞毒性がみとめられる場合は、クロロホルム処理も有効である。

### 2) 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレート或いは組織培養用チューブを使用する。24 穴の培養プレートをを用いる場合は、とくに検体間のクロスコンタミネーションに留意する。検

体接種時には、検体中の雑菌を抑えるために維持培地 500ml に更にゲンタマイシンを 1ml、アンホテリシン B を 5ml 追加した強化維持培地を使用する。接種用のチューブの増殖培地を捨て、強化維持培地 1ml と交換する。

- ② 検体 100～200  $\mu$  l を細胞に接種する。
- ③ 接種後は 3～4 日毎に維持培地を交換し、35～37℃で 2 週間細胞変性効果 (CPE) の出現を観察する。
- ④ CPE が出現した細胞については 3 回の凍結融解後、その培養液 100  $\mu$  l を新しい細胞に接種して 2 週間 CPE の確認を行う。採取した検体は必ず 3 回凍結融解 (同上) を繰り返す。
- ⑤ 接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、検体中の成分による非特異的細胞毒性の可能性が高い。その場合、新しい細胞にその培養液を 100  $\mu$  l 接種し観察を続ける。または、検体接種時に接種液により 1 時間吸着を行い細胞を洗浄し維持培養液を加えることにより細胞毒性の影響を低下させることが出来る。
- ⑥ 途中で雑菌が増殖してきた場合には、元の検体を 0.45  $\mu$  m フィルターでろ過した後、再度分離操作を行なう。

## (2) 中和法によるウイルス同定（細胞培養）

培養細胞によるウイルス分離後、中和試験によるウイルスの同定検査を行う。使用する細胞は原則的にはCPEが確認された細胞を使用する。ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーAウイルスに対する抗血清は、通常のエンテロウイルス同定用プール血清には含まれていないので、それぞれに対する単味抗血清を用意する。同定に用いる抗血清は、主としてコクサッキーAウイルスの1～6型、8、10及び22型を20単位に希釈して使用する。同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定し概ね100 TCID<sub>50</sub>/wellである事を確認し同定を行う。同定がうまくいかない場合クロホルムで処理した検体を用いるとうまくいく場合もある。中和法は、トランスファープレートを用いる方法、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ法、いずれの方法で行っても構わない。

### 試薬・細胞

コクサッキーAウイルスの1～6型、8、10及び22型に対する抗血清。血清およびウイルス希釈には維持培地、細胞浮游液の調整には増殖培地を使用する。同定に使用する細胞はウイルスを分離した細胞を使用するのが原則である。

### 機材

炭酸ガス培養装置、96穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(200 $\mu$ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

### 操作

#### 1) トランスファープレートを用いる方法

- ① 細胞は同定試験をする1-2日前に凍結から戻し、必要量を組織培養用プレートに播いておく。
- ② 希釈したウイルス液をトランスファープレート（ダイナテック社 Cat.No001-010-5850）に25 $\mu$ lずつ分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ25 $\mu$ lずつ等量混合、ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と

同じもの、更に 10 倍、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。

- ③ マイクロプレート用ミキサーで混和後、37℃で 2 時間反応させる。
- ④ あらかじめ作製しておいた細胞のプレートを新しい維持培地に交換し、反応が  
終わったトランスファープレートを細胞のプレートに重ね、各ウェルの検体を細胞  
プレートに移行する。
- ⑤ 37℃、5%炭酸ガス培養器で培養し、1 週間観察する。

## 2) まきこみ法

- ① 抗血清を 50  $\mu$  l/well 加える。
- ② 希釈した分離ウイルス(100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$  l)50  $\mu$  l を入れ、マイクロプレート用  
ミキサーで混和する。
- ③ 35~37℃で 2 時間反応する。
- ④ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、1~2  $\times 10^5$  個/ ml の細胞浮游液をプ  
レート 1 枚につき 10ml 用意する。
- ⑤ 細胞を 100  $\mu$  l ずつ中和反応の終わったプレートに加える。
- ⑥ 35~37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

## 3) 判定

- ① 倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、CPE の出現パターンにより、血清型を判定  
する。
- ② 血清型決定はウイルスコントロールに CPE が出現し、かつ抗血清と反応させた  
ウェルのうち 1 つだけが CPE 陰性であった場合のみ判定できる。
- ③ 反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 1,000 倍希釈のウイルスコント  
ロールまで CPE が出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液  
を 10 倍以上希釈して再度中和試験を行う。
- ④ 反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 100 倍希釈のウイルスコントロ  
ールまで CPE が出現し、1,000 倍希釈のウイルスコントロールが陰性であった  
場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合または 2  
種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他  
の抗血清を用いて同定試験を行う。それでもなお全てのウェルに CPE が出現す

る場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイルスのクローニングを2回行う、クローン化サンプルを用いて改めて同定試験を行う。

- ⑤ CPE の出現が遅く、しかも反応させたウェルの2つ以上が抑制され、かつ等倍のウイルスコントロールのみ CPE が出現した場合には、ウイルス力価が低すぎることを考えられるのでウイルスの希釈倍率を低くするか、或いはもう1代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。
- ⑥ break through (標準株抗血清で中和されにくい“プライム”変異株や凝集塊のあるウイルスでは不完全な中和反応が起こり、一見中和されているようにみえるが、日数がたつと CPE が出現する現象) が起きる場合は、ウイルスをバートル®XF (三井デュポンフロロケミカル) 或いはクロロホルムで処理するか、口径 0.45  $\mu$ m の非ニトロセルロースフィルターでろ過すると中和がうまく行く場合がある。
- ⑦ 反応させたウェルの全てに CPE が出現し、かつ10倍のウイルスコントロールで CPE が出現しない場合には、中和試験では同定できないので、遺伝子解析等の他の手段を用いて同定する。

### (3) 乳のみマウスによるウイルス分離

ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA ウイルスは、細胞培養によるウイルス分離率が低い場合が多く、ウイルス分離率を上げるため乳のみマウスによるウイルス分離法が用いられている。出産直前の妊娠マウスを入手し、臨床検体を生後 48～78 時間のマウスに接種し、麻痺の出現によりウイルス分離を確認する。マウスの系統による感受性の違いはない。

#### 器具及び試薬

飼育箱、ホモジナイザー、クロロホルム、PBS(-)、ショ糖、ツベルクリン用注射器。

#### 操作

- ① 接種検体の 25  $\mu$ l を乳のみマウスの皮下に注射する。マウスを扱う時は必ずゴム手袋を着用し、親マウスを別の場所に移動させる。子マウスの数は 10 匹前後であるので 1 検体あたり 2 匹を使用し、必ず未接種の個体を 1 腹に複数設ける。
- ② 接種したマウスはガスバーナーで熱したピンセットで尾、耳、四肢の先端を焼いてマークする。
- ③ 注射後毎日親マウスを別の場所に移動させ子マウスの麻痺の有無を観察する。麻痺の有無がはっきりしない時は胃の白い部分の大小を参考にする。
- ④ 元気がなくなり乳を飲まなくなると間もなく麻痺が出現するので、アルコール消毒した後頭部切断（あるいは頸動脈切断）による放血をおこない、内臓を除去し四肢及び皮膚を剥ぎとり凍結保存する。
- ⑤ 保存された胴体を PBS(-)にて 20%乳剤にする（あらかじめ-20℃に冷却した滅菌済み乳鉢と乳棒を用いる）。10,000g、20 分間遠心分離した上清に等量のクロロホルムを加え、1,300g（中心からの距離 13cm の遠心機なら 3,000 rpm）10 分間遠心し、上清に等量の 50%ショ糖液を加え-70℃で保存する。

#### (4) 中和法によるウイルス同定 (乳のみマウス)

分離ウイルスが細胞培養で増殖しない場合、コクサッキーA群ウイルスに対する中和抗血清を用いて中和反応を行い、乳のみマウスに接種することにより同定を行う。これらの手技には大量の乳のみマウスを用いる必要がある。それを避けるために保存マウス乳剤を RD-18S 細胞に接種すればかなりの確率で CPE が観察できるので、中和反応を細胞培養で行うことが可能である。CPE が観察されない場合には乳のみマウスを用いて中和を行うが、CF 法による同定及び RT-PCR によるエンテロウイルス遺伝子の検出・塩基配列の解析によるウイルス同定も可能である(後述)。中和法に用いる抗血清は、主としてコクサッキーA群ウイルスの 1~6 型、8、10 及び 22 型を (1 型及び 22 型は、我が国ではまれであるので、日常検査から除いても良い) 20 単位に希釈して使用する。

#### 操作

- ① 同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定し、おおむね 100ID<sub>50</sub>/tube であることを確認する。
- ② 希釈したウイルス液を反応管に 25  $\mu$  l/tube 分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ 25  $\mu$  l/tube 等量混合、37°C で 2 時間反応させる。
- ③ ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と同じもの、更に 10 倍、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。
- ④ 反応液を 20  $\mu$  l ずつ 2 匹の乳のみマウスの皮下に接種し、1 週間観察する。
- ⑤ 血清型決定はウイルスコントロールに麻痺が出現し、かつ抗血清と反応させたマウスのうち 1 つだけが麻痺を起こさない場合のみ判定できる。
- ⑥ 接種したマウス全てに麻痺が出現し、かつ 1,000 倍希釈のウイルスコントロールまで麻痺が出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液を 10 倍以上希釈して再度中和試験を行う。
- ⑦ ウイルス力価が正しく接種マウス全てが麻痺を発症した場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合と 2 種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他の抗血清を用いて同定試験を行うが、細胞培養の結果が参考になる。
- ⑧ それでも決定できない場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイル

スのクローニングを 2 回行う、クローン化したサンプルを用いて改めて同定試験を行う。

- ⑨ ウイルス力価が低すぎる場合はもう 1 代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。

## (5) 補体結合反応 (CF 法) によるウイルス同定

乳のみマウスを用いた中和試験は、多数のマウスを使用するため、多くの手間及び労力を要する。CF 法は、乳のみマウスによる中和の代替法として用いられている同定法であり、同定用免疫腹水パネルを用いることにより多くのコクサッキーA 群ウイルスが同定可能である。

### 器具

マイクロプレート (U 型、リジットタイプ)、ダイリ्यूター (25 $\mu$ l 用又はマルチチャンネルピペット)、ドロツパー (25 $\mu$ l 用、50 $\mu$ l 用)、プレートシール用フィルム、マイクロプレート用ミキサー、マイクロプレート用遠心機、恒温槽

### 試薬

#### 1) 保存液

- ① 1M MgCl<sub>2</sub> : MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 20.3g を精製水に加えて 100ml とする。密栓して室温保存。
- ② 0.3M CaCl<sub>2</sub> : CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 4.4g を精製水に加えて 100ml とする。密栓して室温保存。
- ③ 5 倍 VBS: NaCl 8.5g、バルビタール 5.75g、バルビタールナトリウム 3.75g、窒化ナトリウム 2.0g、1M MgCl<sub>2</sub> 5.0ml、0.3M CaCl<sub>2</sub> 5.0ml に精製水を加え 2,000ml とする。
- ④ 1%ゼラチン : ゼラチン 1.0g に精製水 100ml を加え、115°C 10 分高压蒸気滅菌し、小試験管に分注して 4°C で保存。

#### 2) F 用希釈液

5 倍 VBS 40ml、1%ゼラチン 2.0ml に精製水 160ml を加える。

#### 3) ヒツジ赤血球

#### 4) モルモット補体

#### 5) 正常マウス抗原

#### 6) 同定用免疫腹水

\*CF-KIT (デンカ生研、420015) を用いると便利である。キット中には、CF 用希釈液、感作ヒツジ赤血球、モルモット補体が付属されており、特別に試薬を調整する必要がない。

## CF キットを使う際の準備

### 1) 補体 ( $5\text{CH}_{50}/50\ \mu\text{l}$ )

あらかじめ冷蔵しておいた希釈液をモルモット補体に所定の量（瓶に表示）を加えて溶解する。すぐに使用しないときは冷蔵庫に保存する。（時間が経つと補体力価が低下するため、溶解後 1、2 日で使用するようになる。）

### 2) 0.85%感作赤血球浮遊液

8.5%感作ヒツジ赤血球を良く振り均等にした後、希釈液で 10 倍量とし、0.85%感作赤血球浮遊液を調整し、冷蔵庫で保存する。（時間が経つと溶血するので、希釈後 1、2 日で使用するようになる。）

## 操作

		抗原希釈															
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	10	11	12				
免疫腹水		1	2	3	4	5	6	7	8	9	免疫 腹水 コン トロー ル	正常 マウス 抗原			溶 血 度 標 準		
A	CA2																4
B	CA3																3
C	CA4																2
D	CA5																1
E	CA6																0
F	CA8																
G	CA10																
H	補体対照																
		$5\text{CH}_{50}$	$3.75\text{CH}_{50}$	$2.5\text{CH}_{50}$	$1.25\text{CH}_{50}$	$5\text{CH}_{50}$	$3.75\text{CH}_{50}$	$2.5\text{CH}_{50}$	$1.25\text{CH}_{50}$	$5\text{CH}_{50}$	$3.75\text{CH}_{50}$	$2.5\text{CH}_{50}$	$1.25\text{CH}_{50}$				
		抗原				正常マウス抗原				希釈液							

図 2. プレートレイアウトの例

- ① マイクロプレートに希釈液（VBS）を A-1～G-10 及び H-9～H-12 にドロップパーで  $25\ \mu\text{l}$  入れる。
- ② 抗原（分離株）を第 1 列（図 2 では A-1～G1）及び抗原補体対照（図 2 では H-1～H-4）に  $25\ \mu\text{l}$  ずつマイクロピペットで加え、A～G についてはダイリューターもしくはマルチチャンネルピペットで 2 倍段階希釈する（1:2～1:512）。
- ③ 正常マウス抗原を 11 列（図 2 では、A～G まで）及び正常マウス抗原補体対照（図 2 では、H-5～H-8）に  $25\ \mu\text{l}$  ずつ入れる。

- ④ CF 用抗血清又は同定用免疫腹水を 4 単位になるように VBS で希釈し、対応する穴 (図 2 では、A~G 行のそれぞれ 1 列~11 列まで) に  $25\mu\text{l}$  入れる。通常、ヘルパンギーナの同定の際は、コクサッキー A 2、3、4、5、6、8、10 型の免疫腹水を用いる。
- ⑤ 氷冷した希釈補体 ( $5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$ )  $50\mu\text{l}$  をドロPPERで対応する穴 (図 2 では、A-1~G-11) に入れる。
- ⑥ 同時に補体対照を置く (図 2 では、H-1~H-12)。表 1 で示した希釈液及び補体を入れる。
- ⑦ プレートミキサーで攪拌後、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩置く。ここで、溶血度標準作成のための 1:2 希釈感作赤血球を  $600\mu\text{l}$  調整する。そのうち  $300\mu\text{l}$  を 1.5ml の滅菌したチューブに移し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 晩置き、完全に溶血させる。

表 1 補体対照群における希釈補体の加え方

	$5\text{CH}_{50}$	$3.75\text{CH}_{50}$	$2.5\text{CH}_{50}$	$1.25\text{CH}_{50}$
希釈液 ( $\mu\text{l}$ )	25		25	50
$5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$ ( $\mu\text{l}$ )	50			
$2.5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}^*$ ( $\mu\text{l}$ )		75	50	25

\*  $2.5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$  は  $5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$  を 2 倍希釈して得る。

- ⑧ 0.85%感作赤血球  $50\mu\text{l}$  をドロPPERで対応する穴に入れる。
- ⑨ 溶血度標準を表 2 に従って調整する (12 列)。
- ⑩ プレートをシールし、よく振ってから  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽に沈め、60 分間置く。

表 2 溶血度標準の作り方

	溶血度 (%)				
	0	25	50	75	100
判定	4	3	2	1	0
0.85%希釈感作赤血球 (溶血) ( $\mu\text{l}$ )		25	50	75	100
0.85%希釈感作赤血球 (不溶血) ( $\mu\text{l}$ )	100	75	50	25	
希釈液 ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50

- ⑪ プレートをプレート遠心機で低速遠心 ( $1,000\text{rpm}\times 3$  分) した後、判定する。判定は、溶血度標準を参考に完全溶血 0 から全く溶血が見られない 4 までの 5 段階に分け、3 と 4 を陽性とする。抗原に抗補体作用が無いこと (完全溶血)、免疫腹水、正常マウス抗原が完全溶血していること及び表 3 を参考に補体二

次定量結果が適正であることを確認する。

表3 補対照群における溶血度の許容範囲

	$5CH_{50}$	$3.75CH_{50}$	$2.5CH_{50}$	$1.25CH_{50}$
抗原対照	0	0	1~2	2~3
正常マウス抗原対照	0	0	1~2	2~3
希釈液対照	0	0	1~2	2~3

## (6) 中和抗体価の測定

エンテロウイルス感染症の間接的診断法として、血清中の抗エンテロウイルス抗体の測定が行われている。通常、急性期と回復期の血清を比較して4倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。エンテロウイルスの血清学的診断に最もよく利用されるのは中和法であり、マイクロプレートを用いた微量法により血清中の中和抗体価を測定する。中和試験に使用するウイルスは標準株を用いるが、適切な臨床分離株を併用するとより正確な抗体価が測定できる場合がある。

### 試薬・細胞

RD-18S など使用するウイルスに感受性のある細胞を使用する。血清希釈には維持培養液、細胞浮游液の調整には増殖培養液を使用する。抗体価測定に使用するウイルス株は、基本的には標準株を用いるが、分離株を併用する場合もある。あらかじめストックウイルスの感染価(TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l)を測定しておく。

### 機材

炭酸ガス培養装置、96穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(200  $\mu$ l、1000  $\mu$ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(200  $\mu$ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

## 操作

### 1) 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈（血清 0.1ml に希釈液 0.3ml）し、56°C30 分間非働化する。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>						

図3. 中和抗体測定試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

- ② 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3~10 列目の各穴に、維持培養液を 50  $\mu$  l ずつ、滅菌チップ（以下チップ）で滴下、分注しておく（図 3）。
- ③ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50  $\mu$  l を分注する。
- ④ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。

## 2) 中和

- ① 細胞コントロール列には 100  $\mu$  l/well の維持培養液を加える。
- ② 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$  l のウイルス液を細胞コントロール列および Back-titration 以外の well に加える。
- ③ Back-titration を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100 TCID<sub>50</sub> (許容範囲 32~320 TCID<sub>50</sub> /50  $\mu$  l) で行われたことを確認する。
- ④ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35~37°C で 3 時間中和する。
- ⑤ 中和を終えたマイクロプレートに、別に準備した細胞浮遊液 (1~2  $\times$  10<sup>5</sup> 個/ml) を 100  $\mu$  l ずつ加え 35~37°C で培養する。
- ⑥ 接種後 1 週間、CPE の出現の有無を観察する。

## 3) 判定

- ① Back-titration の成績が 32~320 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$  l からはずれているときは再検査を行う。表 4 に示したように、抗体価は接種ウイルスを CPE の出現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。

表 4 中和抗体価の判定例

	血清希釈倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

## (7) RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

エンテロウイルス同定は基本的には、ウイルス分離および中和抗血清を用いた中和法により行なわれるが、エンテロウイルスの血清型は数多く存在し、難中和性の分離株も存在することから抗血清を用いた従来の分離同定法では、多大な労力および検査時間が必要とされる。そのため汎エンテロプライマーを用いて、RT-PCR 法によりウイルスゲノムを増幅、塩基配列を決定し標準株との配列比較によりウイルスを同定する方法が多数報告されている。解析方法および解析領域はいまのところ標準化されていないが、VP1 部分領域、VP4-VP2 部分領域を用いた解析結果が、おもに報告されている(図 3)。VP1 領域を用いた解析では、中和法により同定された血清型と対応した型別ができ、従来報告されていない新型エンテロウイルスの同定もできるとされている。

### どの手法を適応するか

- 臨床検体は一度きりの採取であるが故、細胞或いは乳のみマウスによる分離を行い、高力価のウイルスを得ることにより、中和試験および遺伝子検査も様々な検討可能であることを留意。
- ぬぐい液など臨床材料から直接遺伝子検査により検出・同定する場合、RT-snPCR 系の検出感度、ウイルス RNA 抽出キット間の違いを考慮したうえで結果を解釈すべきである。またウイルスが混合感染している場合は同定不能になるケースが多く、結果的にウイルス分離が必要になる場合がある。
- VP4-VP2 部分領域を対象とした PCR 系は各血清型に対して良好に増幅する。しかし塩基配列、アミノ酸配列とも、よく保存されている領域でもあり、塩基配列解析による同定が困難な場合が多い(特に HEV-B 群)。この場合、中和法を行うか、主要な抗原が含まれている VP1 領域の塩基配列を調べる必要がある。
- 遺伝子検査による同定に関して VP1 領域については判定基準(標準株に対して 75%以上一致する場合は同一血清型)があるが、VP4-VP2 についてはこうした基準は存在せず、中和法或いは VP1 領域の解析を併用する等、注意深い結果の解釈が必要である。
- 他の株と比較するために系統解析を行うならば、VP1 領域をできる限り長く(700-800bp 以上)用いると、より信頼性の高い系統樹作成が可能である。

## 準備するもの

### 試薬と実験器具

#### 共通するもの

0.2ml PCR用チューブ, 1.5ml チューブ, フィルター付きピペットチップ(1000, 200, 20, 10 $\mu$ l)、マイクロピペット、滅菌精製水 (DW/Milli-Q 水など)、微量高速冷却遠心器、恒温水槽或いはブロックヒーター、ミキサー

#### RNA 抽出用

RNA 抽出法は従来の SDS フェノール抽出法のほか、市販のキット各種(キアゲン: QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ: High Pure Viral RNA kit など) が利用可能である。

#### [SDS フェノール抽出法の場合]

ProtenaseK(20mg/ml)、10%SDS、3M 酢酸ナトリウム、1mM DTT、RNase inhibitor、TE saturated phenol、クロロホルム、エタノール

#### [QIAamp Viral RNA Mini kit(cat 52904)の場合]

キットのほかにエタノールが必要

#### RT-PCR、及び電気泳動用

各種 RT-PCR キット、sense,antisense プライマー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液

#### 直接塩基配列決定 (dideoxy terminator 法による)

プライマー (3.2pmol/ $\mu$ l、シーケンス用センス及びアンチセンス)、BigDye Terminator (ABI)、Centri-sep スピンカラム(ABI401762)

## 1. RNA 抽出

### 操作

#### 1) ウイルス

培養細胞に検体を接種後 CPE が 80-100%現われたものをハーベストする。凍結融解後遠心 (12,000rpm、約 5 分) し、上清をウイルス浮遊液とする。

#### 2) RNA 抽出

市販 RNA 抽出キット、或いは SDS-フェノール抽出法を用いてウイルス RNA を抽出する。RT-PCR 反応のために RNA 抽出時から既知のウイルスを陽性コントロールとして入れておく。

#### [フェノールクロロホルム抽出法]

- ① Proteinase K (20mg/ml) 4 $\mu$ l とウイルス浮遊液 400 $\mu$ l を混和。37 $^{\circ}$ C、15 分間反応させる。
- ② 10%SDS 12 $\mu$ l を①に加える。
- ③ 37 $^{\circ}$ C 15min 加熱し更に 50 $^{\circ}$ C 30 分間反応させる。
- ④ フェノールクロロホルム混合液 (1 : 1) 400 $\mu$ l を加え、3 分間攪拌後 12,000rpm にて 5 分間遠心する。
- ⑤ 上層の水溶性部分を探り、3M 酢酸ナトリウム 40 $\mu$ l とエタノール 1ml と混和する。
- ⑥ -20 $^{\circ}$ C で 1 晩放置。或いは -80 $^{\circ}$ C で 30-60 分間放置。
- ⑦ 12,000rpm 10 分間遠心。
- ⑧ 上清を捨て 70%エタノールを 1ml 加える。
- ⑨ 12,000rpm 5 分間遠心。
- ⑩ 上清を捨て、99.5%エタノールを 1ml 加える
- ⑪ 12,000rpm 5 分間遠心。
- ⑫ 上清を捨て管底に残った沈渣を自然乾燥する。
- ⑬ RNase inhibitor(2.5-5 U/ $\mu$ l)含む 1 mM DTT 16  $\mu$ l を加え沈渣を溶解する。
- ⑭ -80 $^{\circ}$ C にて保存。

[抽出キットを用いる場合：キアゲン QIAamp Viral RNA Mini kit(cat 52904)、ロッシュ High Pure Viral RNA Kit (1858882) 等]  
添付マニュアルを参照のこと。

## 2. RT-PCR によるウイルスゲノム増幅

### 2-1. RT-PCR (one tube RT-PCR) によるウイルスゲノム増幅 (ウイルス分離株の場合)

エンテロウイルス検出に用いられる PCR 用プライマーを別表 3 にまとめた。エンテロウイルスの血清型により、反応性の良いもの、よくないものがあるが、ここではヘルパンギーナ患者からよく分離される HEV-A グループ(EV71、CA16 他、コクサッキー-A 群)のケースを想定し紹介する。

#### 操作

1) one tube RT-PCR 法 (AccessQuick RT-PCR system (Promega: cat A1702) を用いた場合)

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作成(検体+陽性/陰性コントロール+α を作成)。

#### 反応組成 (1 検体当たり)

AccessQuick Master Mix, 2X	25 μl
187 (sense-primer, 10pmol/μl)	2 μl
188 (sense-primer, 10pmol/μl)	2 μl
189 (sense-primer, 10pmol/μl)	2 μl
011 (antisense-primer(10pmol/μl)	4 μl
AMV reverse transcriptase (5U/μl)	1 μl
DW	11 μl

② 抽出した RNA 溶液 3μl とマスタープール 47μl を PCR 用チューブ (0.2 ml) に加え混合 (最終容量 50μl)。

③ 下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

#### 反応条件

48°C	45 min	
94°C	2 min	
94°C	10 sec	x 35 cycle
50°C	10 sec	
65°C	1 min	

65 °C            5 min

4°C                ∞

## 2) ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

反応終了後 PCR 産物(約 700-800bp)を 1-2%アガロースゲル電気泳動で確認する。

注 1) フェノールクロロホルム法で RNA 抽出を行った場合サンプル量は 0.5-1.5 $\mu$ l にする。併せて DW 量を変更する。

注 2) 5'UTR-VP2 領域を増幅する際、分離株を使用するなら EVP4,OL68-1 各 10pmol/ $\mu$ l、2  $\mu$ l ずつ使用し DW 量を調整して反応を行う。臨床検体からの直接検出を行う場合は 1st に MD91(EVP2) と OL68-1、2<sup>nd</sup> に EVP4 と OL68-1 を用いて RT-snPCR を実施する。

注 3) ここでは、187+188+189 と 011 を用いる反応系を紹介したが、187+188+188 と 222(あるいは 012.040-011)プライマーセットを使用するのが原法である。

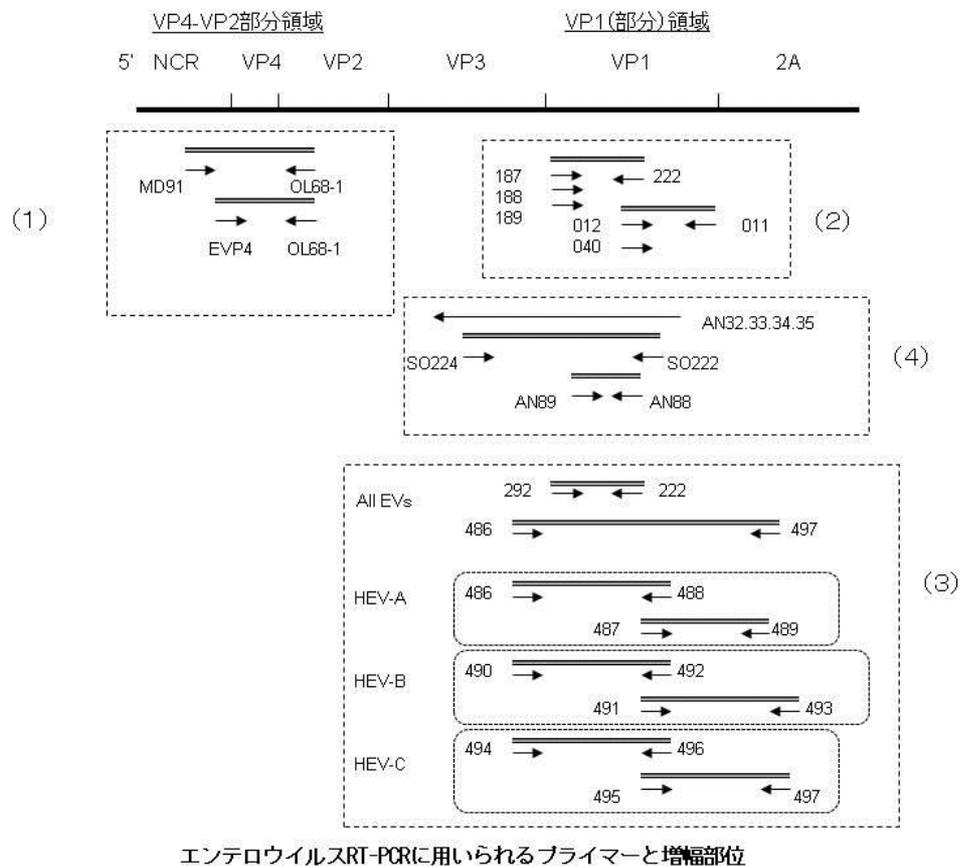
注 4) HEV-A 群の場合は 188-011 或いは 189-011 で増幅可能な場合が多い。

注 5) 292-222 プライマーセットを用いる場合、アニーリング温度を 42°Cにする。それでも増幅が弱い場合、486-497 プライマーセット、型特異的なプライマーセット、CODEHOP-snPCR 法( (2-2) で紹介)を試みる (表 3)

### 3)増幅領域とプライマー配列情報

よく用いられる増幅領域を図 3 に示した。配列情報は別表 3 に示す。

図 3



1)-4)の領域に対応するプライマー配列および文献は表 3 にまとめた。

表 3

## (1) 5'UTR-VP2領域の汎用プライマー(分離株、臨床検体)

Primer	sequence(5'-3')	Gene	Position*	specificity	ref
MD91(EVP2)	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	5' NTR	444-468	All EV	①
EVP4	<b>CTACTTTGGGTGTCGGTGT</b>	5' NTR	541-560	All EV	②
OL68-1	GGTAAYTTCCACCACCANCC	VP2	1178-1197	All EV	③

\*Sabin 1(AY184219)

①Rotbart HA., JCM 1990 28(3):438-442, ②.Ishiko H., JID 2002;185:744-754. ③Olive DM, et.al., J Gen Virol 1990;71:2141-7.

赤字の個所修正 (2018年2月)

## (2) VP1領域のプライマー(分離株向き)

Primer	sequence(5'-3')	Gene	Position*	specificity	ref
011	GCICIGAYTGITGICRAA	2A	3408-3389	All EV	④
012	ATGTAYGTICICIGGIGG	VP1	2951-2970	HEV-B	
040	ATGTAYRTICIMCIGGIGC	VP1	2951-2970	HEV-A,C	
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	VP1	2612-2631	HEV-B	
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	VP1	2612-2630	HEV-C,D	
189	CARGCIGIGARACIGGNGC	VP1	2612-2631	HEV-A,C	
222	CICIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	

\*PV1-Mahoney (J02281).

④Oberste MS., et.al., JCM, 2000 :38; 1170-1174

## (3) VP1領域の汎用プライマーと特異的プライマー(分離株向き)

Primer	sequence(5'-3')	Gene	Position*	specificity	ref
292	MIGCIGYIGARACNGG	VP1	2612-2627	All EV	⑤
222	CICIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	
486	TGGTAICARACIAAITWYGTIGTNCC	VP3	2297-2322	HEV-A	
487	ATGTWYGYICICIGGICNCC	VP1	2894-2916	HEV-A	
488	GTIGGRTAICCITCITARAACCAYTG	VP1	3063-3038	HEV-A	
489	AYIGCICISWITGYTGNC	2A	3348-3329	HEV-A	
490	TGIGTYITGYRTICITGGAT	VP3	2226-2248	HEV-B	
491	ATGTAYRTICICIGGNGG	VP1	2883-2902	HEV-B	
492	GGRTTIGTIGWYTGCCA	VP1	2953-2934	HEV-B	
493	TCNACIANICIGGICCYTC	2A	3641-3622	HEV-B	
494	GAYGAYWSITTIACIGAIGGNGG	VP3	2306-2328	HEV-C	
495	ATGTAYRTICICIGGICNCC	VP1	2951-2973	HEV-C	
496	CCRTCITARAARTGISIRTANGC	VP1	3111-3089	HEV-C	
497	GCITTTITGRTGICCRANCC	2A	3408-3386	HEV-C	

\*292, 222, 425, 482 and 494-497= PV1-Mahoney(J02281)

423, 480 and 486-489= CVA2-Fleetwood; 424, 481 and 490-493= E1-Farouk

426 and 483 = EV70-J670/71.

⑤Oberste, MS., et.al., JGV.2006.,87, 119-128

## (4) CODEHOP-snPCRによるVP1領域増幅プライマー(分離株、臨床検体)

Primer	sequence(5'-3')	Gene	Position*	specificity	ref
AN32	GYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	⑥
AN33	GAYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	
AN34	CCRTCRTA	VP1	3111-3104	All EV	
AN35	RCTYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	VP3	1977-1996	All EV	
222	CICIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627	All EV	
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACA	VP1	2977-2951	All EV	

\*PV1 Mahoney(J02281);

⑥Nix.WA., et.al., JCM 2006.44(8):2698-6704

#### 4)PCR 産物の塩基配列解析

##### 操作

##### ① PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動にて確認できたなら、PCR 産物の精製を行う。目的とするサイズの単一のバンド(187/188/189 と 011 の場合、約 800bp)が認められた場合は市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit,QIAGEN など) を用いると簡便である。バンドが複数見られた場合はゲルから目的とするバンドを切り出し精製する。(フナコシゲルチップ DR-50-II、QIAquick Gel Extraction Kit,QIAGEN, Cat.2870 など)。手技については各種キット付属マニュアルを参照のこと。精製した PCR 産物の濃度は分光光度計による測定、或いは電気泳動を行い既知濃度の DNA サイズマーカーと比較しておおよその濃度を予測しサイクルシーケンス反応に用いる。

② dideoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル (ABI3130 を用いた場合)。サイクルシーケンス反応に用いるプライマーは表 3 を参照。

##### 反応組成 (1 検体あたり)

BigDye Terminator	2 $\mu$ l
5X Sequencing Buffer	1 $\mu$ l
Primer (3.2pmol センス、アンチセンスプライマー)	1 $\mu$ l
DW	X $\mu$ l
精製 PCR 産物	Y $\mu$ l

全量 20  $\mu$ l

注)187.188.189-011 プライマーで PCR 産物が見られた場合のシーケンス用プライマーは、HEV-B 群が想定される場合、センス側に 187、アンチセンス側に 011 を用いると良好な結果が得られることが多い。HEV-A の場合は 189 と 011 を用いる。表 3 の特異性の項を参照。

##### 反応条件 (ABI GeneAmp 9700,9600,2400 の場合)

96°C	1 min	x 25 cycle
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	$\infty$	

### ③ 蛍光ラベル産物の精製

エタノール沈殿法のほか CentriSep など市販の精製キットを用いると簡便である。市販キットを用いる場合は各マニュアルを参考のこと。

### ④ シーケンサーへのアプライ(ABI シーケンサーの場合)

精製した蛍光ラベル産物を機器マニュアルに基づき、プレートに移し替える。途中で蒸発する可能性があるような多量のサンプルの場合は、Hi-Di ホルムアミドを添加しておくといよい。

## 5) 塩基配列による同定法

- センス側、アンチセンス側の塩基配列をソフトウェアを用いて修正する。修正にはフリーの MEGA, BioEdit の他、Sequencher 等の市販のソフトウェアを用いる。
- 塩基配列決定後、エンテロウイルスの場合、ある型の標準株との相同性が VP1 領域で塩基 75%(アミノ酸 88%) 以上の場合該当する型と同定する。アミノ酸配列に翻訳し、標準株のアミノ酸配列と比較すると、より明確に同定が可能である。標準株に関する登録番号の一覧を別表 4 に示す
- オランダ National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) が提供する遺伝子配列による型別分類ウェブサービス <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool#/> は VP1 領域をもとに血清型分類を行うもので、操作は容易である (13)。

(注 1) BLAST による検索で上位に現れたエンテロウイルス型により同定するのは、登録されている配列が必ずしも正しい血清型を示していない場合もあるため、避けるべきである。BLAST 検索で上位にヒットする血清型は参考にとどめ、標準株の配列と比較することを勧める。

(注 2) 塩基配列解析用ソフトウェアから BLAST などの Web サービス (NCBI サイトへ直接リンクしている) に接続可能なものが多い。

(注 3) 標準株の登録番号より塩基配列を得るには、例えば、国立遺伝学研究所の提供する、getentry (<http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) にアクセス (acc) 番号を入力し FASTA 形式で情報を得るとよい。

表 4

HEV-A			HEV-B		
Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.	Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.
CA2	Fleetwood	L28146	CA9	Griggs	D00627
CA3	Olson	AF081294	CB1	Conn-5	M16560
CA4	High Point	AF081295	CB2	Ohio-1	AF081312
CA5	Swartz	AF081296	CB3	Nancy	M16572
CA6	Gdula	AF081297	CB4	JVB.Benschoten	D00149
CA7	AB-IV	AF081298	CB5	Faulkner	AF114383
CA8	Donovan	AF081299	CB6	Schmitt	AF081313
CA10	Kowalik	AF081300	E1	Farouk	AF081314
CA12	Texas-12	AF081302	E2	Cornelis	AF081315
CA14	G-14	AF081304	E3	Morrissey	AF081316
CA16	G-10	U05876	E4	Pesacek	AF081317
EV71	BrCr	U22521	E4	Shropshire	AF081319
EV76	10226	AY697458	E5	Noyce	AF081320
EV89	10359	AY697459	E6	D'Amori	AF081321
EV90	10399	AY697460	E7	Wallace	AF081324
EV91	10406	AY697461	E9	Hill	X84981
HEV-C			E11	Gregory	X80059
Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.	E12	Travis	X79047
CA1	Tompkins	AF081293	E13	Del Carmen	AF081327
CA11	Belgium-1	AF081301	E14	Tow	AF081328
CA13	Flores	AF081303	E15	CH96-51	AF081329
CA17	G-12	AF081306	E16	Harrington	X89545
CA19	8663	AF081308	E17	CHHE-29	AF081330
CA20	IH-35	AF081309	E18	Metcalf	AF081331
CA21	Kuykendall	AF546702	E19	Burke	AF081332
CA22	Chulman	AF081310	E20	JV-1	AF081333
CA24	Joseph	AF081311	E21	Farina	AF081334
PV1	Brunhilde	AY560657	E24	DeCamp	AF081335
PV2	Lansing	AY082680	E25	JV-4	AF081336
PV3	Leon	KD1392	E26	Coronel	AF081337
EV96	10358	NA	E27	Bacon	AF081338
HEV-D			E29	JV-10	AF081339
Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.	E30	Bastianni	AF081340
EV68	Fermon	AF081348	E31	Caldwell	AF081344
EV70	J670/71	D00820	E32	PR-10	AF081345
			E33	Toluca-3	AF081346
			EV69	Toluca-1	AF081349
			EV73	CA55-1988	AF241359
			EV74	10213	AY556057
			EV75	10362	AY556070
			EV77	CF496-99	AJ493062
			EV78	W137-126/99	AY208120
			EV79	10384	AY843297
			EV80	10387	AY843298
			EV81	10389	AY843299
			EV82	10390	AY843300
			EV83	10392	AY843301
			EV84	10603	DQ902712
			EV85	10353	AY843303
			EV86	10354	AY843304
			EV87	10396	AY843305
			EV88	10398	AY843306
			EV97	10355	AY843307
			EV100	10500	DQ902713
			EV101	10361	AY843308

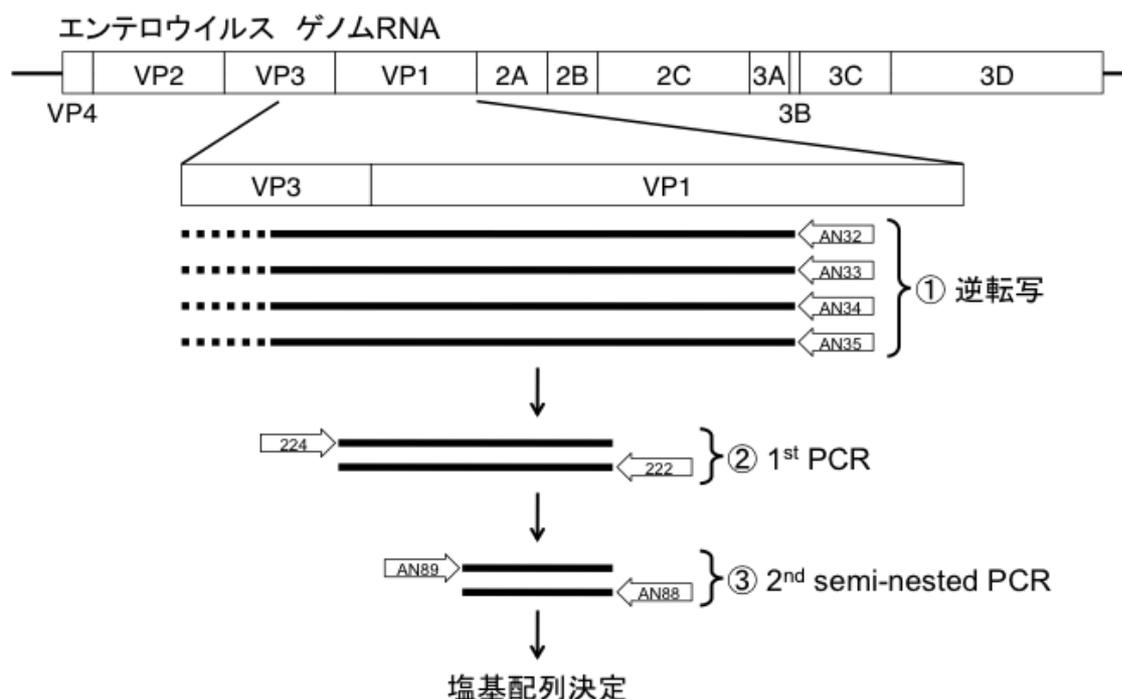
最新情報は以下のサイトを参照  
<http://www.picornastudygroup.com/>

## 6) 分子系統樹作成

- 1) 編集の終わった塩基配列を用いた分子系統樹作成について概略を説明する。  
作成目的としては通常、地域内外の株の比較やクラスタリング目的で行うこと場合を想定。
- 2) 配列数が少なければ一連の作業は手作業で可能だが、多くのデータを扱う場合は通常、MEGA, BioEdit などのソフトウェア上で行う。
- 3) 分子系統樹作成は得られた塩基配列と GenBank 等から得られた塩基配列の比較により作成する。
- 4) まず得られた塩基配列と比較対象とする配列をゲノム上の同じ場所で比較する必要がある。この操作をアライメントと呼び、ClustalW 等のソフトウェアを用いて行う(MEGA, BioEdit には実装されている)。
- 5) 同一血清型のアライメントは比較的容易だが、異なる血清型と比較する場合は、血清型により領域長に違いがあるため、アライメント後注意深く目視することにより GAP (欠失、挿入位置の総称)を確認し、修正を行う。
- 6) アライメント後、塩基配列間(ペアワイズ)の 1 サイトあたりの塩基置換数(遺伝距離と呼び kimura-2 parameter 法等で推定)を求める。このステップはソフトウェアを用いて行う。
- 7) 各配列間の遺伝距離を求めた後、近隣結合法 (NJ) 等によりソフトウェア上で作成する。
- 8) 塩基配列間の遺伝距離には誤差が含まれており、配列が短くなるほど誤差が大きくなるため、系統樹を作成すると分岐順番の信頼性が下がる。そのため可能な限り長い塩基配列 (600-800bp) を用いて作成した系統樹の方が信頼性が高まる。
- 9) 系統樹の信頼性の評価に用いる手法の一つがブーツトラップ確率であり、9割が一つの目安とされている。
- 10) 遺伝子解析ソフトのうち MEGA は開発者の一人田村博士がウェブ上で使用法を解説しているので参考されたい(解説は日本語)。  
<http://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/>

## 2-2.CODEHOP PCRによるエンテロウイルス同定 (US Patent 7,714,122B2, May 11,2010)

Nix らにより、エンテロウイルスのキャプシド蛋白質 VP1 コード領域ゲノムを高感度に増幅する方法 (CODEHOP VP1 RT-snPCR) が発表された (11)。CODEHOP(consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer)とは、関連した遺伝子を増幅するための、効率的な混合塩基プライマー設計法である(12)。図に示すように、CODEHOP VP1 RT-snPCR は、①逆転写(RT、4種類のプライマーを混合して使用する)、②1<sup>st</sup> PCR、③2<sup>nd</sup> semi-nested PCR (プライマー222とAN88は、同じ領域に結合する)の3ステップからなる。増幅産物を電気泳動にて確認できれば、精製後シーケンス反応を行い、塩基配列を解析する。①②③の反応時間は、それぞれ



2時間ほどである。

CODEHOP VP1 RT-snPCR は、①多様性が高く血清型との関連性の高いVP1領域を増幅するため、塩基配列からの型同定が容易である、②semi-nested RT-PCRであるため検出感度が高い (検出限界は数コピー)、③ライノウイルスの検出も可能、といった長所を兼ね備えている。留意すべき点として、①クロスコンタミネーション、②二種類以上のエンテロウイルスが混在するサンプルからは、遺伝子型同定不能である、③逆転写に加えPCRを2回行うので高価である、④シーケンス後、得られる

配列は比較的短く（5'側 VP1 部分領域：372bp）詳細な分子系統解析には不向きである、等が挙げられるが、高感度な遺伝子同定法として利用価値の高い方法である。

本法ではまず、バッファー（逆転写酵素、PCR 酵素にそれぞれ付属）・プライマー・dNTP・DW を混合し、"KIT"とよぶ混合液を 3 種類作製する（一度に 10 ml 程度作り、適宜分注して-30°C に長期保存可能）。検体解析時は、KIT とウイルス RNA、酵素等を混合し、反応を開始する。（文中のカタログナンバー等は 2010 年前後のカタログ）

### 準備するもの

#### 1) 逆転写・PCR 試薬（KIT の準備）

① dNTP Set, 100 mM Solutions (GE ヘルスケア, 28-4065-51, 4 x 25 umol, 他のサイズもあり)

20 mM dNTP (5 mM each) 溶液を作製する(各 KIT に混合する)。

100 mM dGTP 5 µl

100 mM dATP 5 µl

100 mM dTTP 5 µl

100 mM dCTP 5 µl

DW 80 µl

Total 100 µl

② SuperScript II RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-014, 10000 U (50 µl), 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 cDNA (RT) KIT を作製する。

5X RT Buffer 110.0 µl

20 mM dNTP (5 mM each) 27.5 µl

AN32,33,34,35 cocktail (10 uM each) 27.5 µl

③ Taq DNA Polymerase (Roche, 1 146 165, 100 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 PCR 1 KIT を作製する。

10x PCR +Mg buffer (11 271 318 001) 137.5 µl

10 uM Primer SO224 137.5 µl

10 uM Primer SO222 137.5 µl

20 mM dNTP (5 mM each) 13.75 µl

DW

646.25  $\mu$ l

④ FastStart Taq Polymerase (Roche, 2 158 264, 50 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、 Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT を作製する。

PCR buf. 10x +MgCl <sub>2</sub> (12 161 567 001)	137.5 $\mu$ l
10 uM Primer AN89	110.0 $\mu$ l
10 uM Primer AN88	110.0 $\mu$ l
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 $\mu$ l
DW	701.25 $\mu$ l

⑤ RNase Inhibitor (Promega, N2111, 2500 U, 他のサイズもあり)

## 操作

### 1) ウイルス

咽頭ぬぐい液、CSF、便乳剤等の臨床検体を直接 RNA 抽出に用いることも可能である。

### 2) RNA 抽出 ((3-4-1 と同じ))

### 3) cDNA 合成

抽出した RNA の代わりに、陰性対照として DW、陽性対照として必ず増幅される RNA (ポリオウイルス RNA 等) を用い、サンプルと並行して反応を行う。

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 cDNA (RT) kit	3 $\mu$ l
0.1 M DTT	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor	0.5 $\mu$ l
SuperScript II	0.5 $\mu$ l

② 抽出した RNA 5  $\mu$ l とマスタープール 5  $\mu$ l を、0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件にて反応 (約 1.5 時間)。

22°C 10 min

42°C 60 min

95°C 5 min

#### 4) 1<sup>st</sup> PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 PCR 1 KIT                    30  $\mu$ l

DW+Taq    10  $\mu$ l

注) DW 261.3 $\mu$ l と Taq 13.7  $\mu$ l を混合したもの (275 $\mu$ l)

反応に用いた残りの DW+Taq は-20°Cで 6 カ月保存可能。反応ごとに DW9.5 $\mu$ l と Taq0.5 $\mu$ l を加えてもよい。

② cDNA 合成反応を終了したチューブに、上記マスタープールを 40  $\mu$ l 加え混合。

以下の温度で、40 サイクル反応(約 2 時間)。

95°C 30 sec

42°C 30 sec

Ramp 0.4°C/sec (1<sup>st</sup> PCR では 42°C から 60°C へ加温する際に、Ramp をおこなったステップを加えた方が、検出感度が向上する。)

60°C 45 sec

#### 5) 2<sup>nd</sup> PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT                    39  $\mu$ l

DW+FS Taq    10  $\mu$ l

注) DW 261.3 $\mu$ l と FS Taq 13.7  $\mu$ l を混合したもの (275 $\mu$ l)

反応に用いた残りの DW+Taq は-20°Cで 6 カ月保存可能。反応ごとに DW9.5 $\mu$ l と FS Taq0.5 $\mu$ l を加えてもよい。

② 1<sup>st</sup> PCR の反応物 1  $\mu$ l と上記マスタープール 49  $\mu$ l を、新しい 0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件で反応(約 1.5 時間)。

95°C 6 min

以下のサイクルを 40 回

95°C 30 sec

60°C 20 sec

72°C 15 sec

#### 6) 電気泳動

反応終了後、1<sup>st</sup> および 2<sup>nd</sup> PCR 反応物を、3 µl/lane でアガロースゲル電気泳動し、増幅を確認する。

#### 7) PCR 産物の精製

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的とするサイズの単一のバンド (1<sup>st</sup> PCR; 約 760 bp、2<sup>nd</sup> PCR; 約 370 bp (Poliovirus Sabin 1 VP1 (Accession No. AY082688) の場合、124~498 の 375 bp に相当) が認められた場合、PCR 反応液から PCR 産物の精製を行い、シーケンス反応に用いる。

#### 8) シーケンス反応

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

BigDye Terminator	2 µl
5X Sequencing Buffer	1 µl
Primer (3.2pmol AN88 或いは AN89)	1 µl
DW	X µl
精製 PCR 産物	Y µl
全量	20 µl

② 下記の条件で反応(約 2.5 時間)。

96 °C 1 min

以下のサイクルを 25 回

96 °C 10 sec

50 °C 5 sec

60 °C 4 min

#### 9) シーケンス反応物の精製およびシーケンサーによる塩基配列解析

(1) の 4) を参照のこと。

注) 2<sup>nd</sup> PCR 産物を AN88,AN89 プライマーにてシーケンスする場合、DNA 濃度が高すぎると反応を阻害する場合がある。PCR 精製産物を電気泳動し、既知濃度の分子量マーカーと比較し濃度を推定、適宜 DNA 量を調整する。

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製・50  $\mu$ l DW で溶出した DNA 溶液を 10~20 倍に希釈し、4  $\mu$ l をシーケンス反応に用いる。

10) 塩基配列による同定法

(1) の 5) を参照のこと。

### (参考) CODEHOP 法の変法

逆転写反応

反応組成(1 検体あたり)

5xSSIII Buffer	3.0 $\mu$ l
AN32.33.34.35 mix primer (1 $\mu$ M)	4.0 $\mu$ l
10mM dNTPs	1.0 $\mu$ l
100mM DTT	1.0 $\mu$ l
RNase inhibitor(33U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
SSIII RT(200U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Sample RNA	5.0 $\mu$ l

反応条件

55°C 45min

70°C 15min

on ice

1<sup>st</sup> PCR

反応組成(1 検体あたり)

EmeraldAmp PCR Master Mix(タカラバイオ)	12.5 $\mu$ l
Distilled water	4.5 $\mu$ l
224 (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l

222 (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
cDNA	5.0 $\mu$ l

反応条件

95°C	5min.	
95°C	30sec	35 cycle
42°C	30sec	
72°C	45sec	
72°C	5min.	
4°C	$\infty$	

2<sup>nd</sup> PCR

反応組成(1 検体あたり)

EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l
Distilled water	4.5 $\mu$ l
AN89 (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
AN88 (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
1 <sup>st</sup> PCR	1.0 $\mu$ l

反応条件

95°C	5min.	
95°C	30sec	35 cycle
60°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	5min.	
4°C	$\infty$	

#### 4. 引用文献

- 1) 浦野 隆、エンテロウイルス感染症、臨床とウイルス、23 : 141 - 155、1995
- 2) 萩原昭夫、ポリオ、エンテロウイルス感染症、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、臨床とウイルス、23 : 156 - 163、1995
- 3) 清水博之、非ポリオウイルス感染症の実験室診断、日本臨床、57 : 336 - 339、1999
- 4) 米山徹夫、ポリオウイルス感染症の診断、日本臨床、57 : 331 - 335、1999
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. J. Virol. 73 : 1941-1948, 1999
- 6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J. Clin. Microbiol. 37 : 1288-1293, 1999
- 7) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 38 : 1170-1174, 2000
- 8) Li ・Gaur 著 (舘野義男・山崎由紀子訳) 『分子の進化』 (1994年, 廣川書店)
- 9) 根井正利著 (五條堀孝・斎藤成也訳) 『分子進化遺伝学』 (1990年, 培風館)
- 10) Phylip、MEGA など分子系統解析ソフトを集めたリンク集  
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>
- 11) Nix W.A. et al. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(8)2698-704
- 12) Rose T.M. et al. Nucleic Acids Res. 1998, 26(7)1628-35
- 13) Kroneman A, et.al., An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. J Clin Virol. 2011 Jun;51(2):121-5
- 14) Ishiko H, et al., Journal of Infectious Diseases 2002;185:744- 754
- 15) Oberste M S, et al. J Clin Virology. 2003 26, 375-377
- 16) Barry G.Hall, Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual. 2011. Sinauer Associates Inc. (MEGA の解説書)
- 17) 近野真由美他 14年間 (1996~2009年) におけるコクサッキーA群ウイルスの乳のみマウス、RD-18S および Vero 細胞による分離状況—京都市. IASR Vol. 32 p. 20-21: 2011年1月号

## 5. 検査依頼先

エンテロウイルスの分離同定については、全ての地方衛生研究所で対応可能である。エンテロウイルス単味抗血清、エンテロウイルス標準株及び CF 試験用免疫腹水パネルの分与については、国立感染症研究所ウイルス第二部に相談のこと。

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1

国立感染症研究所ウイルス第二部

清水博之

TEL: 042-561-0771、FAX: 042-561-4729、E-mail: hshimizu@nih.go.jp

## 6. 執筆者

清水博之、西村順裕、吉田 弘 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

板持雅恵 (富山県衛生研究所)

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

石橋哲也 (福岡県保健環境研究所)