

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第二部
主任研究者 清水博之

分担研究者

(1)国立感染症研究所 ウイルス第二部 清水博之
(2) (株) 三菱化学ピーシーエル 石古博昭

要旨

遺伝子解析によるエンテロウイルス同定の標準化のため、日本の臨床分離株を用いて分子系統解析を行った。VP4 領域を増幅する汎エンテロウイルスプライマーを用いた RT-PCR および塩基配列解析により、多くのエンテロウイルスの同定が可能であった。

1. 研究目的

ヒトエンテロウイルスは、大きく、ポリオ、コクサッキーA 群、コクサッキーB 群、エコーウイルスとそれ以外のエンテロウイルスに分けられ、各々は、さらに多くの血清型に分類される。エンテロウイルスは従来、各血清型特異的な中和抗血清を用いて同定されており、近年の遺伝子解析をもとにして再分類した知見も含めると、少なくとも 65 種類の血清型が報告されている(表 1)。ヒトエンテロウイルスは、死亡例を含む重篤な中枢神経疾患から不顕性感染にいたる、きわめて多様な疾患の起因ウイルスとして臨床的に重要である。日本では、ポリオ、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの各疾患は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(いわゆる感染症新法)により届け出の義務がある疾患あるいは発生動向調査が必要な疾患とされているが、これらの疾患の多くはエンテロウイルスを主要な起因ウイルスとしており、ウイルス学的実験室診断が必要とされる。とくに、無菌性髄膜炎、手足口病等の非ポリオエンテロウイルス感染症は、しばしば小児を中心とした大規模な流行を引き起こし、起因ウイルスの迅速かつ正確な同定が要求される。エンテロウイルス感染症の起因ウイルスの同定は、通常病巣あるいは他の臨床検体からのウイルス分離及び特異抗血清を用いた中和法により行なわれるが、細胞培養によるウイルス分離・同定は操作が煩雑で時間がかかる場合が多く、また型別困難なウイルスの出現や、細胞培養で分離困難なウイルスの存在などの問題点がある。

これらの問題点を解決するために、従来のウイルス分離・同定に替わる方法として遺伝子解析によるエンテロウイルス同定の試みが、近年多く報告されている。しかし、これまでのところ、遺伝子解析によるエンテロウイルス同定は、解析する遺伝子領域あるいは解析方法が研究者ごとに異なり、標準化されていない。また、報告されている方法のうち、どの方法が日本で分離されている臨床分離株の同定に適した方法であるかについての実証的なデータは示されていない。本研究は、多数の臨床検体を処理しうる簡便、迅速かつ正確な遺伝子解析によるエンテロウイルス同定法の開発を目的とし、実際の臨床分離ウイルスを用いて解析法の標準化についての検討を行う。また、従来行われてきた中和法による同定と遺伝子解析による同定の異同についても比較する。報告者らは、これまでにヒトエンテロウイルス標準株の VP4 塩基配列のデータベースを構築し、分離株の塩基配列を標準株のデータ

ベースともに遺伝子系統解析を行ない、分離ウイルスの型同定を試みてきた。しかし、一般的にエンテロウイルスなどの RNA ウイルスは遺伝子進化速度が極めて速い。そのため、たとえ同一年度に分離されたウイルスでも地域や流行が異なれば遺伝学的に異なるウイルスである場合が認められる。また標準株は数十年前に海外で分離されたウイルスのため、現在日本で流行しているウイルスと系統が異なる可能性がある。そこで、日本の分離株を精度良く同定するために、ここ数年間の流行で分離されたウイルスの遺伝子の解析を行ない、これら分離株のデータベースを蓄積することによって、より精度の高い系統解析を行なえるよう標準化することを第一の目的とする。今年度は、おもに近年日本で分離されたエンテロウイルス臨床分離株について遺伝子解析を試みた。

表 1 血清型および遺伝子型によるエンテロウイルスの分類

従来のヒトエンテロウイルスの分類		エンテロウイルス遺伝子型と血清型の関係	
ウイルス	血清型	遺伝子型	血清型
ポリオウイルス	1~3	cluster A	CA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 CA12, 14, 16, EV71
コクサッキーA群ウイルス	1~22, 24	cluster B	EV1~33 (8, 10, 22, 23, 28を除く) CB1~6, CA9, EV69, 73?
コクサッキーB群ウイルス	1~6		
エコーウイルス	1~7, 9, 11~21, 24~27, 29~33	cluster C	P1~3 CA1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24
		cluster D	EV68, 70
エンテロウイルス	68~71, 73?		

2. 研究方法

1) ウイルス分離同定および塩基配列の解析

おもに日本で得られた、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ等様々な疾患に由来する臨床検体(糞便、髄液、咽頭拭い液等)から、細胞培養によりウイルス分離を行なった。分離したエンテロウイルスはエンテロウイルス血清型特異的中和抗血清で同定した。エンテロウイルス標準株の多くは、ATCC から購入した。

SDS-フェノール抽出法あるいは市販 RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出し、抽出 RNA を鋳型に RT-PCR 法により cDNA を増幅し塩基配列を決定した。エンテロウイルス標準株の塩基配列の一部は、GenBank より入手した。分子系統解析は近隣結合法により行い、ブートストラップ確率(%)を算出することにより、得られた系統関係を統計学的に検証した。分子系統解析には、商用ソフト (Genetyx Win/Mac など) あるいは www 上のサービス (DDBJ ClustalW など) を利用した。

2) 近年の日本の臨床分離株の VP4 領域の遺伝子解析

愛知、秋田、愛媛の各衛生研究所から分与された 15 血清型、233 分離株を用いた。エンテロウイルス遺伝子の一部を RT-PCR で増幅後、増幅 DNA に含まれる VP4 塩基配列を解読した。解読した分離株の VP4 塩基配列は、すでに構築した 66 標準株の VP4 塩基配列のデータベースとともに遺伝子系統解析を行い、型同定を試みた。収集した分離株と年代は以下の通りである。

愛知の分離株 44 株

CV-A2 (1988~1999 年) 8 株、CV-A5 (1985~1995 年) 7 株、CV-A8 (1985~1999 年) 4 株、E-11 (1985~2000 年) 10 株、E-12 (1991~1997 年) 3 株、E-16 (1985~1993 年) 5 株、E-25 (1994~2000 年) 7 株

秋田の分離株 47 株 (全て 2001 年)

CV-A2 2 株、CV-A4 15 株、CV-A5 9 株、CV-A16 12 株、CV-B5 7 株、CV-B3 1 株、E-6 1 株

愛媛の分離株 142 株

CV-B1 (1978~2000 年) 20 株、CV-B2 (1976~1999 年) 31 株、CV-B3 (1961~2000 年) 40 株、CV-B4 (1975~1999 年) 18 株、CV-B5 (1985~2000 年) 33 株

3) エンテロウイルス 71 の遺伝子型の解析

日本を含む西太平洋地域で発生した重症例を含む手足口病流行時に採取された、死亡例、手足口病患者および接触者由来の検体(糞便、髄液、咽頭拭い液等)から、細胞培養によりウイルス分離を行なった。分離した EV71 は特異的中和抗血清で同定後、ゲノム RNA を鋳型に RT-PCR 法により cDNA を増幅し塩基配列を決定した。異なる遺伝子領域を用いた分子系統解析により、遺伝子型別に違いが認められるかを検討するために、5'-NCR および VP4/VP2 領域を含む領域及び VP1 全域を含む領域を増幅した。他の地域の EV71 の塩基配列は GenBank に登録された塩基配列を用いたが、特にアメリカの EV71 の VP1 配列の多くは Brown らの、近年のオーストラリア、マレーシア、シンガポール等の EV71 の VP1 配列の多くは MacMinn らの報告をもとにして解析を行なった。分子系統解析は、近隣結合法を用いて行い、系統樹の信頼度はブートストラップ解析により検定した。

3. 研究成果

1) 近年の日本の臨床分離株の VP4 領域の遺伝子解析

VP4 塩基配列に基づく遺伝子系統解析の結果、愛知 44 株のうち 15 株 (CV-A2 8 株、CV-A5 6 株、CV-A8 1 株) はヒトエンテロウイルス A 標準株とブートストラップ値 70%以上の確率で単一クラスターを形成し、それぞれの血清型に同定された。また、23 株 (CV-A8 1 株、E-11 10 株、E-12 3 株、E-16 2 株、E-25 7 株) は、独自に設定した国内標準株とブートストラップ値 70%以上の確率で単一クラスターを形成し、それぞれの血清型に同定された。中和結果と相違の見られた株は、CV-A5 の 1 株、CV-A8 の 2 株と E-16 の 3 株であった。秋田 47 株のうち 41 株は CV-A2 (2 株)、CV-A4 (15 株)、CV-A5 (3 株)、CV-A16 (12 株)、CV-B5 (7 株)、CV-B3 (1 株)、E-6 様 (1 株) に同定された。CV-A5 の 6 株は CV-A12 (4 株) と CV-A16 (2 株) に同定された。愛媛 142 株はそれぞれ、CV-B1 の 20 株はブートストラップ値 70%以上の確率で標準株と異なる 4 つのクラスターを形成、CV-B2 の 31 株はブートストラップ値 70%未満で標準株と

は異なる 1 つのクラスターを形成、CV-B3 の 40 株はブートストラップ値 70%以上で標準株と異なる 5 つのクラスターを形成、CV-B4 の 18 株はブートストラップ値 70%未満で標準株を含む 1 つのクラスターを形成した。CB-5 の 33 株はブートストラップ値 70%以上の確率で標準株と異なる 4 つのクラスターを形成した。

2) エンテロウイルス 71 の遺伝子型の解析

日本および世界各地で分離された EV71 の分子系統解析を、5'-NTR の一部(617bp)、VP4/VP2 の一部(420bp)および VP1 全域(891bp) の塩基配列をもとに行なった。図 1 に示したように、5'-NTR と VP4/VP2 を用いた分子系統樹における genotype は、ほとんど一致しており、プロトタイプの BrCr を除く EV71 は、大きく 2 種類の genotype (A 及び B)に分けられた。VP1 を用いた系統樹における 2 種類の genogroup (B および C、Brown らによる)は、5'-NTR あるいは VP4/VP2 による分子系統樹と、ほぼ対応する grouping を示した。これらの結果から、5'-NTR、VP4/VP2 および VP1、どの領域の塩基配列を用いても、EV71 の 2 種類の genotype の判別には問題がないことが示唆された。また、いずれの領域の塩基配列を用いて分子系統解析を行った場合でも、コクサッキーA16 等、他のエンテロウイルスと EV71 は異なるクラスターを形成し、EV71 と他のエンテロウイルスを判別することは可能であった。

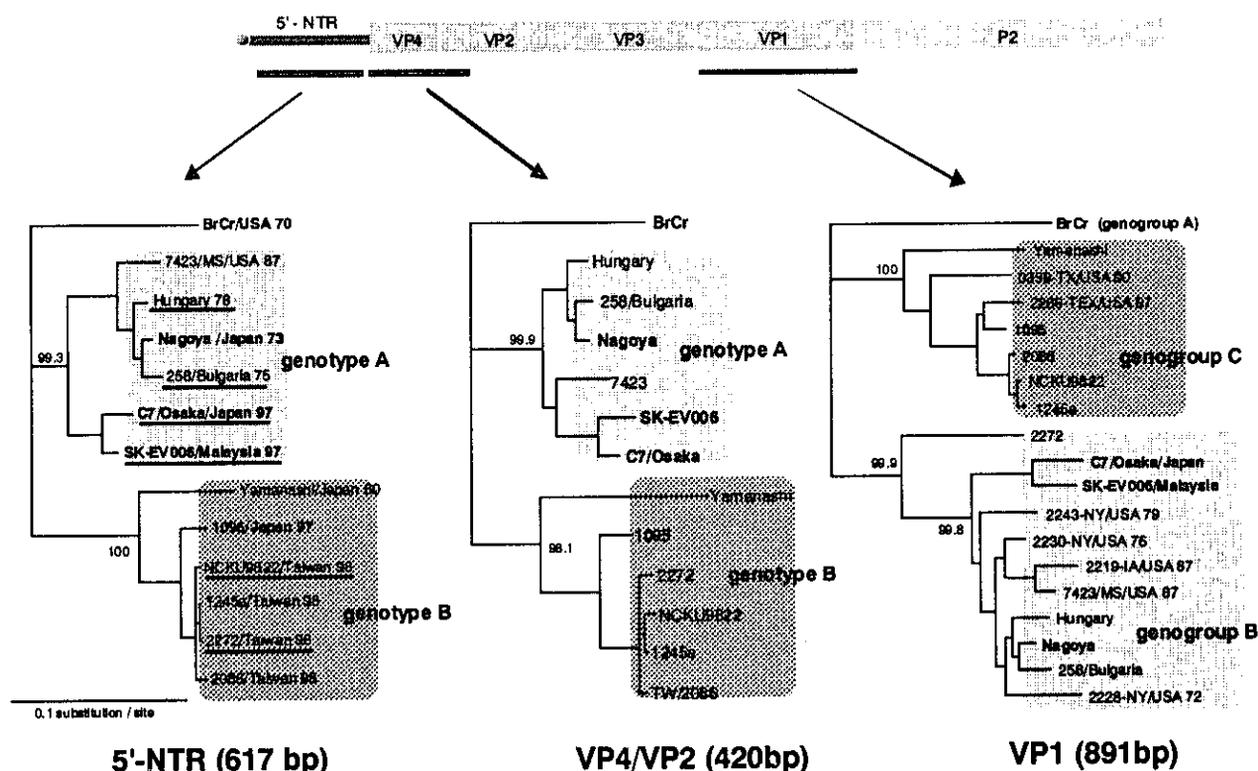


図 1 異なる遺伝子領域を用いたエンテロウイルス 71 の分子系統解析

4. 考 察

エンテロウイルスの同定は従来、培養細胞あるいは乳のみマウスを用いてウイルスを分離した後、特異的中和抗血清パネルまたは単味抗血清を用いた中和法によりウイルス同定を行ってきた。しかし、細胞培養によるウイルス分離同定は一般的に時間がかかる場合が多く、また、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ため抗血清を用いた従来の分離同定法では、多大な労力が必要とされる。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した後塩基配列を決定し、分子系統解析、相同性解析を行うことにより、ウイルス同定を行う方法が近年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、5'-NTR, VP4 領域、VP1 全領域、VP1 部分領域を用いた解析結果が報告されている。とくに VP1 全領域を用いた分子系統解析によると、ほとんどのエンテロウイルス標準株・分離株で、血清型とよく対応した遺伝子型別が出来ると報告されているが、すべてのエンテロウイルス分離株の VP1 領域全域を、まんべんなく増幅し塩基配列を決めることが出来る汎エンテロウイルスプライマーの設定は難しいとされている。そのため、VP4 領域あるいは VP1 部分領域を増幅するための汎エンテロウイルスプライマーを用いた解析もこころみられている。今回、報告者らは、実際日本で近年分離されているエンテロウイルス臨床分離株を用いて VP4 領域の遺伝子解析によるウイルス同定の有用性を検討した。

3 カ所の地方衛生研究所で分離されたエンテロウイルス臨床分離株について、VP4 遺伝子解析を行ったところ、CV-A2, CV-A4, CV-A16, E-11, E-12, E-25 等、ほとんどの臨床分離株については中和法による同定と遺伝子解析の結果が一致した。また、VP4 遺伝子解析で、標準株と単一のクラスターを形成しなかった CV-A5, CV-A8, E-16, CV-B1~CV-B5 の分離株については、今後 VP1 遺伝子を解析して遺伝子解析によるウイルス同定の標準化をこころみる予定である。また、手足口病の主要な起因ウイルスであり、近年東アジア地域で中枢神経合併症例を伴う手足口病の大規模な流行を引き起こしている EV71 についても、日本の臨床分離株を中心に分子系統解析を試みた。5'-NTR, VP4 領域、VP1 全領域等を用いた EV71 の分子系統解析の報告がなされているが、我々の解析では、どの領域を用いても、ほぼ同様の遺伝子型別が可能であった。また、手足口病の他の起因ウイルスである他のコクサッキーA ウイルスと EV71 は、遺伝子型別により同定可能であった。VP4 領域の増幅する汎エンテロプライマーは、効率よくほぼすべてのウイルス分離株に適応しているため、有用性は高いと考えられた。今後、臨床上重要な他のエンテロウイルスについても検討し、エンテロウイルス遺伝子データベースを構築する予定である。

5. ま と め

3 地域で日本のエンテロウイルス臨床分離株を収集し、VP4 遺伝子解析による分子系統解析を行った。また、臨床上重要なエンテロウイルス 71 分離株については、VP4 遺伝子解析による分子系統解析と他の領域の遺伝子解析について比較した。VP4 遺伝子解析による分子系統解析は 1 セットの RT-PCR によって全血清型のエンテロウイルスの遺伝子を増幅でき、VP4 の塩基配列を解読することによって分子疫学的解析が可能である。今後、さらに多くの国内外の分離株を解析してデータベースを構築し、VP4 遺伝子系統解析による同定の精度を高め、エンテロウイルス同定法の標準化していく予定である。

6. 研究発表

1. Ishiko, H., Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, and N. Takeda. 2002. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J Inf Dis*. In Press.
2. Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, Andre J, Blackman E, Freeman CJ, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H,

- Yoneyama T, Miyamura T, van Der Avoort H, Oberste MS, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, de Quadros C (2002) Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola Associated with Circulating Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus. *Science*, In Press
3. Nagata, N., Shimizu, H., Ami, Y., Tano Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Miyamura, T., Sata, T., and Iwasaki, T. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys *J Med Virol*, In Press)
 4. Chu PY, Lin KH, Hwang KP, Chou LC, Wang CF, Shih SR, Wang JR, Shimada Y, Ishiko H (2001) Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan. *Arch Virol* 146: 589-600.
 5. Hosoya M, Sato M, Honzumi K, Katayose M, Kawasaki Y, Sakuma H, Kato K, Shimada Y, Ishiko H, Suzuki H (2001) Association of nonpolio enteroviral infection in the central nervous system of children with febrile seizures. *Pediatrics* 107: E12.
 6. Inaba H, Hori H, Ito M, Kuze M, Ishiko H, Asmar BI, Komada Y (2001) Polio vaccine virus-associated meningoencephalitis in an infant with transient hypogammaglobulinemia. *Scand J Infect Dis* 33: 630-1.
 7. Lin KH, Chern CL, Chu PY, Chang CH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N (2001) Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol* 64: 269-74.
 8. Yoneyama T, Yoshida H, Shimizu H, Yoshii K, Nagata N, Kew O, Miyamura T (2001) Neurovirulence of Sabin 1-derived polioviruses isolated from an immunodeficient patient with prolonged viral excretion. *Dev Biol (Basel)* 105: 93-8.
 9. Yoneyama T, Yoshida H, Yoshii K, Shimizu H, Miyamura T (2001) Necessity of two-stool sample test for sensitive detection of poliovirus. *Jpn J Infect Dis* 54: 250-1.

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社