

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、日本および東アジア地域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遺伝子解析による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、遺伝子解析をもとにして再分類した知見も含めると、65 種類以上の血清型が報告されている。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・同定は技術的な習熟を必要とし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ウイルス同定の試みが近年多く報告されている。しかし、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、どの方法が日本の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が不足している。本研究では、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。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は遺伝子進化速度が速いため、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場合が認められる。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目的とする。

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。汎エンテロウイルスプライマーを用いて、5'-NTR/VP4/VP2 領域を増幅し、分子系統解析には VP4 領域を用いた。必要に応じて、VP1 領域の解析も行った。ウイルス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、愛媛、東京、岐阜、福島、熊本等の地域で分離されたエンテロウイルスを用いた。コクサッキーA (CV-A), コクサッキーB (CV-B), エコーウイルスを含む 18 血清型、計約 270 株の臨床分離株を用いた。分離時期は、1970 年代から 2002 年までの分離株を用いたが、多くは 1990 年代後半から 2002 年にかけての分離株である。特に 2002 年には、これまで日本での流行がほとんど報告されていなかった Echo13 (E-13) による無菌性髄膜炎の大規模な流行が認められたため、いくつかの地域で分離された E-13 の分子系統解析を試みた。エンテロウイルス遺伝子の一部を RT-PCR で増幅後、VP4 塩基配列を解析した。解読した分離株の VP4 塩基配列は、すでに構築した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用いた遺伝子系統解析により型同定を試みた。

3) エンテロウイルス 71(EV71)の遺伝子型の解析

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、死亡例および手足口病患者由来の検体(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。日本での EV71 分離株の遺伝的多様性を解析するために、横浜市で 1980 年代から 2000 年にかけて、おもに手足口病患者から分離した EV71 の VP4 領域を解析した。分離ウイルス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、VP4 領域あるいは 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。

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、ブートストラップ値 70%以上の確率で標準株

と単一のクラスターを形成した場合を基準にすると、CV-A2、CV-A4、CV-A5、CV-A16、CV-B1、CV-B3、CV-B5、E-11、E-12、E-25 等、ほとんどの臨床分離株で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、2002 年になって多くの分離株が報告された E-13 においても、ブートストラップ値 70%以上の確率で標準株と単一のクラスターを形成し VP4 遺伝子による同定が可能であった。これまでの解析で中和結果と VP4 遺伝子型の相違が見られたウイルスとして、CV-A5、CV-A8、E16、CV-24v 等が認められているが、これらの分離株については、血清型の再確認や抗原性変異の解析を行っている。

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、VP4/VP2 および VP1 全域の塩基配列をもとに行なった。いずれの領域を用いても、分子系統樹における genotype は、ほとんど一致しており、標準株 BrCr を除く EV71 は、大きく 2 種類の genotype に分けられた。横浜市を中心とした日本の EV71 臨床分離株を用いた VP4 遺伝子解析により、これら 2 種類の genotype は、1980 年代から認められ、近年は異なる 2 種類の genotype のウイルスが同時に伝播していることが示された。これらの結果から、VP4 および VP1、どちら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 は明らかに異なるクラスターを形成することから、VP4 遺伝子解析による EV71 の同定は実用上問題がないことが示唆された。

3. 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、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 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 全領域、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こと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困難である。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が、試みられている。そこで今回、我々は、実際日本で近年分離されている臨床分離株を用いて VP4 領域の遺伝子解析によるエンテロウイルス同定の有用性を検討した。

日本各地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。これまで、ほとんどウイルス分離が報告されておらず、2002 年夏期に大規模な無菌性髄膜炎の流行を引き起こした E-13 も、VP4 遺伝子解析により同定可能であった。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、VP4 領域の遺伝子解析による同定と分子系統解析が可能であった。VP4 領域を増幅する汎エンテロプライマーは、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く、今後、临床上重要な他のエンテロウイルスについても検討することにより、エンテロウイルス VP4 遺伝子データベースを改良していく予定である。

4. まとめ

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、临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。これまでに構築された VP4 塩基配列データベースで、ほとんどのエンテロウイルスが同定可能であると考えられたが、国内外の分離株のデータを追加していくことにより、VP4 遺伝子系統解析による同定の精度を高めていくことが、今後重要である。

5. 研究発表

1. Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T. (2003) Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* 148; 253-263
2. 清水博之 (2003) 手足口病、総合臨床 増刊号 52,192-197
3. 清水博之 (2002) ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行、臨床とウイルス 30,329-335
4. Tano, Y., H. Shimizu, M. Shiomi, T. Nakano, and T. Miyamura (2002) Rapid Serological Diagnosis of Enterovirus 71 Infection by IgM ELISA. *Jpn J Infect Dis* 55:133-5
5. Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, Andre J, Blackman E, Freeman C.J, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, van Der Avoort H, Oberste M.S, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M. and de Quadros C. (2002) Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola Associated with Circulating Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus. *Science* 296; 356-359
6. Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y. (2002) Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol*; 6:207-
7. 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 by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 185:744.
8. Ishiko, H., R. Miura, Y. Shimada, A. Hayashi, H. Nakajima, S. Yamazaki, and N. Takeda. (2002) Human Rhinovirus 87 Identified as Human Enterovirus 68 by VP4-Based Molecular Diagnosis. *Intervirology* 45:136.
9. Hosoya, M., H. Ishiko, Y. Shimada, K. Honzumi, S. Suzuki, K. Kato, and H. Suzuki. (2002) Diagnosis of group A coxsackieviral infection using polymerase chain reaction. *Arch Dis Child* 87:316.
10. Hosoya, M., M. Sato, K. Honzumi, M. Katayose, H. Sakuma, H. Ishiko, Y. Shimada, K. Kato, and H. Suzuki. (2002) Application of polymerase chain reaction and subsequent phylogenetic analysis to the diagnosis of enteroviral infection in the central nervous system. *J Clin Virol* 25 Suppl:27.

6. 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