手足口病

病原体検査マニュアル

令和 5 年 1 月

目　　次

1. 疾患の概説 …… 3

2. 検査に関する一般的注意 …… 3

2-1 検査材料の採取
2-2 検査材料の輸送
2-3 作業上の注意
2-4 検査の進め方
2-5 検査の判定

3. 検査方法 …… 6

3-1 細胞培養によるウイルス分離
3-2 中和法によるウイルス同定
3-3 中和抗体価の測定
3-4 RT-PCR 法 による遺伝子検出と塩基配列の解析
3-4-2-2-1 VP1 部分領域を用いた解析法 1 (One-step RT-PCR 法による増幅)
3-4-2-2-2 VP1 部分領域を用いた解析法 2 (CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定 （US Patent 7, 714, 122B2, May11, 2010）)
3-4-2-2-2-原法
3-4-2-2-2-変法
3-4-2-2-3 VP4-VP2 部分領域を用いた解析法
3-4-2-2-4 カプシド全領域を用いた解析法 (One-step Entire-Capsid-Coding-Region Amplification (ECRA) 法によるエンテロウイルス同定)

4. 引用文献 …… 31

5. 検査依頼先 …… 32

6. 執筆者 …… 32

1. 疾患の概説

手足口病 (hand, foot and mouth disease)は、口唇粘膜及び四肢末端に現れる水疱性丘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 [1]。病原微生物検出情報によると、日本の手足口病患者から多く分離されているエンテロウイルスは、コクサッキーウイルス A16 (CVA16)、エンテロウイルス 71 (EV-A71)及びコクサッキーウイルス A10 (CVA10)が全体の約 90%を占めていたが、2010 年以降、手足口病症例からのコクサッキーウイルス A6 (CVA6)の分離・検出頻度が増加している [2]。流行する血清型及び流行の程度は年ごとに異なるが、時として大規模な手足口病の流行が認められる。手足口病は、水疱疹・発熱を主徴とし、無菌性髄膜炎等の症状を伴うことがあるが、一般に予後は良好である。しかし、EV-A71 による手足口病流行時には、中枢神経合併症の発生頻度が高いとされている。これまでに、大規模な手足口病流行時に、重篤な中枢神経合併症を伴う重症例が多発したことがマレーシア、台湾、中国及びベトナム等の東アジア地域で報告されており、問題視されている [3]。日本においても、散発例ではあるが EV-A71 感染によると考えられる重症例が認められており、特に、EV-A71 による手足口病流行時には、中枢神経合併症の発生動向の監視が必要とされる。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及び飛沫感染であり、一般的な潜伏期間は 4～6 日程度とされている。抗ウイルス剤等、手足口病に対する積極的な予防治療法は今のところ存在しない。感染症法では、手足口病は 5 類感染症定点把握疾患に分類されており、指定届出機関 (小児科を標榜する病院又は診療所)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

2-1 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・咽頭拭い液及び水疱内容物等が挙げられる。髄膜炎を伴う手足口病の確定診断のためには、髄液からのウイルス分離は診断的価値が高いが、髄液からのウイルス分離率は一般には低く、糞便及び口腔・咽頭拭い液等の髄液以外の検体を採取しておくことが肝要である。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、BD ユニバーサル バイラルトランスポート（BD UVT）等の輸送培地中に入れておく。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採取し検査に供する。直ち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及び発症後 2 週間以上経過した回復期の血清を採取する。

2-2 検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結と融解の繰り返しは、ウイルス力価を低下させるので

避けなければならない。-20℃以下での保管・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、照合可能な識別番号等を容器に記載し、発病日、検体採取日及び検体種別等必要事項を明記し送付する。送付先には、予め検体数及び搬入予定等を連絡しておく。病原体等の輸送・運搬に際しては、適切な梱包及び輸送方法等に留意する[4]。

2-3　作業上の注意

糞便、血液及び髄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。

2-4　検査の進め方

エンテロウイルスの検査法には、ウイルス分離・中和法、RT-PCR 法による遺伝子検出と塩基配列の解析、血清学的診断法がある。各々の検査法の性質を以下に述べる。

【ウイルス分離法】

培養細胞や乳のみマウスが必要であるが、ウイルス株を得ることができる方法である。得られたウイルス株は、後述の中和法もしくは RT-PCR 法により血清型を同定する。エンテロウイルス感染症の確定診断では、基本的には糞便及び口腔・咽頭拭い液等適切な臨床検体からのウイルス分離・同定を行う。手足口病の主要な起因ウイルスである EV-A71、CVA6、及び CVA16 の場合、一般的には細胞培養によるウイルス分離が可能である。手足口病の場合、ウイルスにより培養細胞に対する感受性は異なり、ウイルス分離に時間のかかる場合も多い。ウイルス分離に用いられる培養細胞の種類は、実験室により異なるが、実際に使用されている培養細胞は、RD-18S、RD-A（ヒト胎児横紋筋肉腫細胞）、Vero（アフリカミドリザル腎臓細胞）及び MRC-5 (胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞)等であり、このうち数種類を組み合わせて使用するとウイルス分離の確率を上げることが可能となる[5]。乳のみマウスによる分離も行われている (手技はヘルパンギーナ検査マニュアルを参照)。

【中和法】

ウイルス株の血清型を同定する方法である。分離されたウイルス株と、エンテロウイルス血清型特異的中和抗血清を用いて血清型を同定する。EV-A71 及び多くの A 群コクサッキーウイルス (CVA)に対する抗血清は、一般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、CVA16、EV-A71、CVA6 及び CVA10 等に対する単味抗血清による同定を試みる。エンテロウイルスは、伝播の過程で次第に抗原性が変化し、既存の抗血清で中

和されにくい難中和株が出現する。この場合、難中和株に対する抗血清を新たに調製し標準株に対する交叉中和活性を確認すると同定可能になる場合がある。

【RT-PCR 法 による遺伝子検出と塩基配列の解析】

検体中のウイルス遺伝子を検出し、シークエンスにより得られた塩基配列およびアミノ酸配列の情報から血清型を同定する方法である。RT-PCR 法は、試薬やキットが必要であるが、高感度かつ簡便な方法である。現在のところ、エンテロウイルス遺伝子検査は世界的に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。感度が高く型別が簡便に行えることから、VP4-VP2 部分領域のアミノ酸配列を用いた解析法が広く用いられている。

【血清学的診断法】

ウイルス分離が出来なかった場合や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に、エンテロウイルス感染の間接的な証明として行なわれる方法である。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、検査結果の評価には注意が必要である。

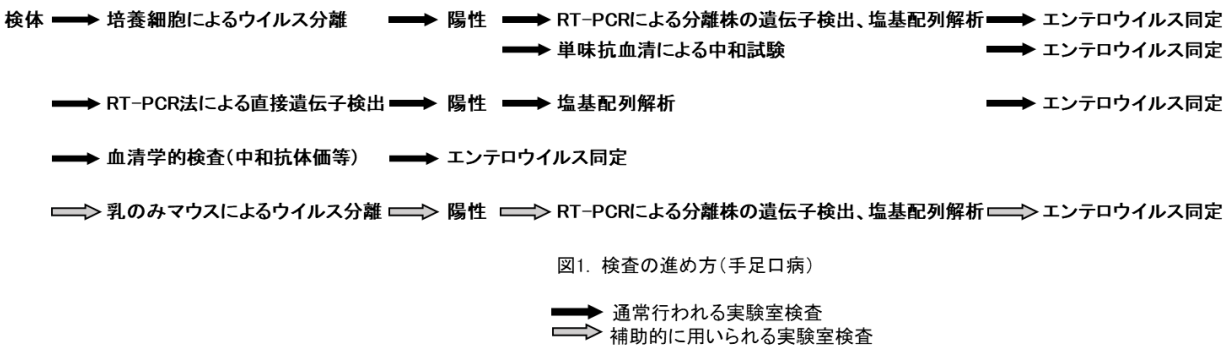


図1. 検査の進め方(手足口病)

通常行われる実験室検査
補助的に用いられる実験室検査

2-5　検査の判定

臨床検体 (口腔・咽頭拭い液、水疱内容物及び脳脊髄液（以下、髄液と表記）等)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や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 法による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べきである。

3.　検査方法

3-1　細胞培養によるウイルス分離

手足口病の主要な病原ウイルスは、CVA16、EV-A71、CVA6 及び CVA10 である。これらのエンテロウイルス分離に用いられている細胞は、各々の試験研究機関によって異なるが、一般的には RD-18S、RD-A、Vero 及び MRC-5 等の細胞が用いられる[5]。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。使用する細胞は、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。MRC-5 細胞についても、凍結保存すれば比較的容易に同じ継代数の細胞の使用が可能である。細胞培養に用いる器具・試薬等も、実験室や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。マウスを用いた分離法は、ヘルパンギーナ検査マニュアルを参照。一般に、CVA の分離率は、培養細胞よりマウスの方が高い[6]。

3-1-1　試薬

イーグル MEM (日水製薬, Cat.No.63-5753-58)等、BD ユニバーサル バイラルトランスポート(BD UVT) (BD,　220220)、ウシ血清由来ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, Cat.No.A-7906)、Sodium Bicarbonate 7.5% solution (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 25080094)、Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (PS) (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.15140-148 等)、ゲンタマイシン (10 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.15710-064 等)、アンホテリシン B (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 15290018 等)、牛胎児血清(FBS)、Trypsin (2.5%) (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.15090-046 等)、PBS(Mg, Ca (－))、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-Glutamine (200mM) (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.25030-149 等)を用意する。

3-1-2　溶液の調整

増殖培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FBS を 50 ml (終濃度約

10%)、7.5%$NaHCO_3$ 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容器全体を軽く撹拌する。

維持培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FBS を 10ml、7.5%$NaHCO_3$ 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撹拌する。

3-1-3 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33～37℃)、24 穴プラスチックプレート (あるいは細胞培養用チューブ)、75cm^2 細胞培養用プラスチックボトル、遠沈管 (50ml、15ml)、マイクロピペット (P1000 および P200)、フィルターチップ (1000µl, 200µl)、ストックチューブ (2ml)、メスピペット（25ml, 10ml）等

3-1-4 操作

3-1-4-1 検体の前処理

1. 口腔・咽頭ぬぐい液は、綿棒でぬぐい液を遠心管に確実に移す。冷却遠心機で 10,000G、4℃で 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 0.45µm 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等でとり、検体処理液 4ml が入った遠心管に入れてガラス棒でよく撹拌する。通常 10～20%の糞便乳剤とする。冷却遠心機で 10,000G、4℃で 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。細菌の混入あるいは細胞毒性が認められる場合は、クロロホルム処理も有効である。

3-1-4-2 接種と観察

1. 24 穴の培養プレートある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用いる場合は、特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こともある。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 100µl 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 が出現した検体については、3 回の凍結融解後、その培養液 100µl 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。新しい細胞にその培養液を 100µl 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 時間吸着を行った後、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 0.45µm フィルターで濾過し、ろ液を用いて接種からやり直す。

3-2　中和法によるウイルス同定

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。手足口病の主要な起因ウイルスである CVA16、EV-A71、CVA6 及び CVA10 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、20 単位に希釈して使用する事が出来るが、100 単位を必要とする場合もある (高力価での中和が必要な場合は、RT-PCR 法とシークエンスを用いた解析を用いた方が正確である)。同定する検体は、予めウイルス力価を測定し、概ね 100$TCID_{50}$/well である事を確認し同定を行う。同定が上手くいかない場合は、クロロホルムで処理した検体を用いると上手くいく場合もある。中和法は、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ法で行っても構わない。

3-2-1　試薬・細胞

CVA16、EV-A71、CVA6 及び CVA10 に対する抗血清を用意する（左記の抗血清は国立感染症研究所より配布可能）。血清及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。

3-2-2　機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット (P1000 および P200)、フィルターチップ (1000µl、200µl)、ウイルス希釈用試験管 (キャップ付き)

3-2-3　操作

まきこみ法

1. 抗血清を 50µl/well 加える。
2. 希釈した分離ウイルス (100 $TCID_{50}$/50µl)50µl 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（中和反応）。

4. 中和反応の間に細胞をトリプシン消化し、1～2 ×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 100µl ずつ中和反応の終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。

3-2-4　判定

1. 全てのウイルスコントロールに CPE が出現するまで（最長 7 日間まで）倒立顕微鏡で 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。それでも全てのウェルに 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 回行い、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、更に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が考えられるので、ウイルスの希釈倍率を低くするか、あるいはもう 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. Breakthrough (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見えるが、日数が経つと CPE が出現する現象)が起きる場合は、ウイルスをクロロホルムで処理するか、口径 0.45µm の非ニトロセルロースフィルターでろ過すると中和が上手くいく場合がある。
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、塩基配列の解析等他の手段を用いて同定する。

3-3　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 (髄液)中の抗エンテロウイルス抗体

の測定が行なわれている。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。

3-3-1　試薬・細胞

RD-18S、RD-A 及び Vero 等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 (TCID50/50µl)を測定しておく。

3-3-2　機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット (P1000 および P200)、フィルターチップ (1000µl、200µl)、ウイルス希釈用試験管 (キャップ付き)

3-3-3　操作

3-3-3-1　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℃で 30 分間非働化する。
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 50µl ずつ、滅菌チップ (以下チップ)で滴下、分注しておく。
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 50µl を分注する。
4. 攻撃ウイルスの型ごとに血清の 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。

3-3-3-2　中和

1. 細胞コントロール列には、100µl/well の維持培養液を加える。
2. 100 $TCID_{50}$/50µl のウイルス液を細胞コントロール列及び 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 $TCID_{50}$ (許容範囲 32～320 $TCID_{50}$ /50µl)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℃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 (1～2×10^5個/ml)を 100µl ずつ加え 35～37℃で培養する。
6. 接種後 1 週間、CPE の出現の有無を観察する。

3-3-4 判定

ウイルス対照の成績が、32～320 $TCID_{50}$/50µl から外れている時は、再検査を行う。表 1 に示したように、抗体価は接種ウイルスの CPE 出現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。

表 1　　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
	-	-	-	-	＋	＋	＋	＋	

3-4 RT-PCR 法 による遺伝子検出と塩基配列の解析

エンテロウイルスの同定は、ウイルス分離及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及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。解析方法及び解析領域は、いまのところ標準化されていないが、VP1 部分領域及び VP4-VP2 部分領域を用いた解析法が主に報告されている (表 2)。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る。

どの手法を適応するか

臨床検体は、その時限りの採取であるが故、得られる検体量は限られており、研究を見据えたエンテロウイルスの解析には、細胞あるいは乳のみマウスによる分離を行い、高力価の分離ウイルスを得ることが有用である。分離ウイルスは、中和試験及び遺伝子検査等様々な検討に応用可能である。咽頭ぬぐい液等臨床材料 (検体)から直接遺伝子検査により検出・同定する場合は、検出系の感度の違いを考慮した上で結果を解釈すべきである。なお、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い。

VP4-VP2 部分領域を対象とした PCR 系は、VP1 領域の PCR に比べて各血清型に対して良好に増幅する。しかし、塩基配列及びアミノ酸配列ともによく保存されている領域でもあり、相同性が高いため、塩基配列解析による型別が困難な場合が多い (特に HEV-B 種)。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て確認することが必要となる。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 (標準株に対して塩基配列で 75%以上、アミノ酸で 88%以上一致する場合は同一血清型)がある [7]。しかし、VP4-VP2 領域については、このような基準は存在しない。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の作成が可能である。

なお、PCR 反応に使用する試薬は、多数販売されているので各施設で検討の上、試薬を選定しても問題ないが、特に VP1 領域の一部を含む方法や CODEHOP 法では、増幅しづらい試薬もあるため選択は慎重に行う必要がある。

3-4-1 準備するもの 試薬と実験器具

共通するもの

マイクロピペット (10, 20, 200, 1000µl)、滅菌微量遠心チューブ (0.2, 0.5, 1.5ml)、マイクロ遠心機、RNase-free 滅菌蒸留水 (DW, 例：ニッポンジーン、Cat. No. 312-90103)

RNA 抽出

96-100%エタノール、RNA 抽出キット(例：QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No.52904))

RT 反応

PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio，Cat. No. RR037A) 等

PCR 反応

プライマー (表 2)、AccessQuick RT-PCR system (Promega, Cat. No. A1702) 等、EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio，Cat. No. RR300A) 等、サーマルサイクラー

電気泳動

電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、ローディングバッファー、1×TAE バッファー、エチジウムブロマイド（等のインターカレーター）

PCR 産物の精製

QIAquick PCR purification kit (QIAGEN，Cat. No. 28104) 等、 96-100%エタノール、フナコシゲルチップ (フナコシ, Cat. No. DR-50-II) 等 、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Cat. No. 28704) 等

シークエンス

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific，Cat. No. 4337457) 等使用機器に適合するもの、Auto Seq G-50 (Cytiva，Cat. No. 27-5340-01) 等、遺伝子増幅用プライマー (図 2 及び表 2)

3-4-2　操作

3-4-2-1 RNA 抽出

ウイルス RNA の抽出は、それぞれの施設で一般に用いている方法で良いが、ここでは QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いる方法を示す。

QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN，Cat. No.52904)による RNA の抽出

使用前に以下の試薬調整を行う。

・培養上清あるいは臨床検体を室温 (15-25 ℃)に戻す。

・Buffer AW1 (QIAGEN，Cat. No.52904)に 96-100%エタノールを 25ml 加える。

・Buffer AW2 (QIAGEN，Cat. No.52904)に 96-100%エタノールを 30ml 加える。

・Buffer AVL/Carrier RNA をサンプル数にあわせて調整する。

以下の操作は全て室温 (15-25 ℃)で行う。

1. 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560µl を入れる。
2. 検体 140µl を①に入れる。充分混合するため 15 秒間ボルテックスミキサーにて攪拌混和後、

室温に 10 分間静置する。チューブをスピンダウンする。

3. エタノール(96-100%) 560µl をチューブに加え、ボルテックスミキサーにて混和後、チューブをスピンダウンする。液が混濁した時には再度 9,000×g (10,000rpm)で 5 分間遠心する。
4. 3.の液 630µl を QIAamp スピンカラムに注入し、蓋を閉め 6,000×g (8,000rpm)で 1 分間遠心する。QIAamp スピンカラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの③の液 630µl を入れ同様に遠心し全ての液が濾過されるまで行う。ろ液の入っているチューブは捨てる。
5. QIAamp スピンカラムを開け Buffer AW1 を 500µl 入れる。
6. 蓋を閉め 6,000×g (8,000rpm)で 1 分間遠心する。QIAamp スピンカラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
7. QIAamp スピンカラムに Buffer AW2 を 500µl 加え、20,000×g (14,000rpm)で 3 分間遠心する。
8. QIAamp スピンカラムを新しい蓋つき 1.5ml チューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピンカラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60µl を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後 6,000×g (8,000rpm)で 1 分間遠心する。
9. この ろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は-80℃での保存が望ましい。

3-4-2-2 RT-PCR 法

エンテロウイルスの血清型により、反応性の良いもの、良くないものがあるが、ここでは手足口病患者からよく分離される HEV-A 種 (EV-A71、CVA16 他、A 群コクサッキーウイルスの大部分の型)のケースを想定し紹介する。以下に **3-4-2-2-1 ~ 3-4-2-2-4** の 4 方法を示す。

3-4-2-2-1　VP1 部分領域を用いた解析法 1 (One-step RT-PCR 法による増幅)

ウイルス分離株の場合では、VP1 領域を標的とした PCR 法により血清型別を行う事も可能である。その場合には、cDNA 合成を行わず、本法のように one-step RT-PCR 法により増幅を行う事が可能である。

3-4-2-2-1-1 One-step RT-PCR 法

1. 反応液を次のとおり作成する。

RT-PCR 反応液 (AccessQuick RT-PCR system を用いる場合)

試薬	容量(μl)
AccessQuick Master Mix, 2×	25
187 (sense-primer, 10μM)	2
188 (sense-primer, 10μM)	2
189 (sense-primer, 10μM)	2
011 (antisense-primer, 10μM)	4
AMV reverse transcriptase (5U/μl)	1
DW	11
Total	47

2. 抽出した RNA 溶液 3μl と反応液 47μl を PCR 用チューブ (0.2ml)に加え混合する (終容量 50μl)。
3. 次の条件で RT-PCR 反応を行う。

48℃	45min	
94℃	2min	
94℃	10sec	×35 サイクル
50℃	10sec	
65℃	1min	
65℃	5min	
4℃	∞	

3-4-2-2-1-2 ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

反応後 PCR 産物 (約 300-400bp)を 1-2%アガロースゲル電気泳動で確認する。

3-4-2-2-2　VP1 部分領域を用いた解析法 2 (CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定（US Patent 7, 714, 122B2, May11, 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[8]。 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[9]。

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シークエ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。ただし、EV-D68 等において感度が低い場合があること、イノシンを含むプライマーのため 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のある酵素を使用すると感度が著しく低下することに留意が必要である。

以下では、Nix らの論文 [8] の条件を記した原法および改変した変法を記載する。変法では cDNA 合成で用いるプライマーがランダムヘキサマーに簡略化され(1つの検体についてエンテロウイルス以外の検査を同時に行う場合に対応するため)、近年汎用されているキットに変更されている。変法の検出感度は原法よりも若干低い場合がある。そのため、試薬にかかるコストや手技に問題がない場合には、原法で差し支えない。

3-4-2-2-2-原法

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。

3-4-2-2-2-原法-1 逆転写・PCR 試薬 (KIT)の準備

1. dNTP Set (100 mM) (ThermoFisher Scientific, 10297018)
   20 mM dNTP (5 mM each)溶液を作製する。各 KIT に混合する 。

試薬	容量 (μl)
100 mM dGTP	5
100 mM dATP	5
100 mM dTTP	5
100 mM dCTP	5
DW	80
Total	100

2. SuperScript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, 18064022)に添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 cDNA (RT) KIT を作製する。

試薬	容量 (µl)
5×RT Buffer	110
20mM dNTP (5mM each)	27.5
AN32,33,34,35 cocktail (10 µM each)	27.5
Total	165

3. Taq DNA Polymerase (Roche, 11 146 165 001、100 U)に添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 PCR 1 KIT を作製する。

試薬	容量 (µl)
PCR Reaction Buffer with $MgCl_2$, 10 × conc	137.5
Primer SO222 (10µM)	137.5
Primer SO224 (10µM)	137.5
20mM dNTP (5mM each)	13.75
DW	646.25
Total	1072.5

4. FastStart™ Taq DNA ポリメラーゼ、5 U/µl (Roche、12032902001)に添付のバッファーを用いて、 Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT を作製する。

試薬	容量 (µl)
PCR Reaction Buffer with $MgCl_2$, 10 × conc	137.5
Primer AN88 (10µM)	110
Primer AN89 (10µM)	110
20mM dNTP (5mM each)	13.75
DW	701.25
Total	1072.5

5. RNase Inhibitor (Promega、N2111)

3-4-2-2-2-原法-2 RNA 抽出

3-4-2-1 と同じ (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)。

3-4-2-2-2-原法-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 (エコーウイルス等から抽出したもの)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。

試薬	容量(µl)
Enterovirus VP1 cDNA (RT) kit	3
0.1 M DTT	1
RNase Inhibitor	0.5
SuperScript II	0.5
Total	5

2. 抽出した RNA5µl とマスタープール 5µl を 0.2ml PCR 用チューブに加え混合する。
3. 下記の条件にて反応 (約 1.5 時間)。

22℃	10min
42℃	60min
95℃	5min
4℃	∞

3-4-2-2-2-原法-4 1st PCR

1. 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製する。

試薬	容量(µl)
Enterovirus VP1 PCR 1 KIT	30
DW + Taq	10
Total	40

注）DW 261.3µl と Taq 13.7µl を混合したもの (275µl)

反応に用いた残りの DW + Taq は-20℃で 6 カ月保存可能。反応ごとに DW9.5µl と Taq0.5µl 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 40µl 加え混合。
3. 次の条件で PCR 反応を行う (約 2 時間)。

95℃	30sec	× 40 サイクル
42℃	30sec	
42℃→60℃*	Ramp 0.4℃/sec	
60℃	45sec	
4℃	∞	

*Ramp 0.4˚C/sec (機器により設定可能の場合、42℃から 60℃への加温スピードを 0.4˚C/sec にすると検出感度が向上する。設定不能の場合は省略可。)

3-4-2-2-2-原法-5 2nd PCR

1. 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

試薬	容量(μl)
Enterovirus VP1 PCR 2 KIT	39
DW+FS Taq	10
Total	40

注）DW 261.3μl と FS Taq 13.7μl を混合したもの (275μl)

反応に用いた残りの DW+FS Taq は-20℃で 6 カ月保存可能。反応ごとに DW 9.5μl と FS Taq 0.5μl を加えてもよい。

2. 1st PCR の反応物 1μl と上記マスタープール 49μl を、新しい 0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。
3. 次の条件で PCR 反応を行う (約 1.5 時間)。

95℃	6min	
95℃	30sec	× 40 サイクル
60℃	20sec	
72℃	15sec	
4℃	∞	

3-4-2-2-2-原法-6 電気泳動

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

3-4-2-2-2-原法-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（1st PCR; 約 760bp、2nd PCR; 約 370bp (Poliovirus Sabin 1 VP1 (Accession No. AY082688)の場合、124～498 の 375bp 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、シークエンス反応に用いる。シークエンス反応は、「**3-4-2-3 PCR 産物の塩基配列解析**」を参照。

注）2nd PCR 産物を AN88、AN89 プライマーにてシークエンスする場合、DNA 濃度が高すぎると反応を阻害する場合があるので適宜 DNA 量を調整する。

3-4-2-2-2-変法

3-4-2-2-2-変法-1 cDNA 合成

cDNA 合成 (RT 反応)には多くの試薬が販売されている。それぞれの施設が適切と判断した方法を用いて良い。

1. 次のとおり RT 反応液を作成する。

RT 反応液 (PrimeScript™ RT reagent Kit を用いる場合)

試薬	容量 (μl)
抽出 RNA	10
5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	4
Random 6mers (100μM)	4
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1
DW	1
Total	20

2. 反応は 37°C で 15 分間、85°C で 5 秒間行い、4°C で保存する。長期保存する場合は、-20°C 以下で保存することが望ましい。

3-4-2-2-2-変法-2 1st PCR (CODEHOP VP1 RT- semi-nested PCR) 反応

1. 次のとおり反応液を作成する。

1st PCR 反応液

試薬	容量 (μl)
EmeraldAmp PCR Master Mix	25
Primer SO224 (50μM)	0.6
Primer SO222 (50μM)	0.6
DW	13.8
Total	40

2. 合成した cDNA 溶液 10μl と反応液 40μl を PCR 用チューブ(0.2ml)に加え混合する(終容量 50μl)。
3. 次の条件で PCR 反応を行う。

95°C	5min	
95°C	30sec	× 35 サイクル
42°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

3-4-2-2-2-変法-3　2nd PCR (CODEHOP VP1 RT- semi-nested PCR)反応

1. 次のとおり反応液を作成する。

2nd PCR 反応液

試薬	容量 (μl)
EmeraldAmp PCR Master Mix	25
Primer AN89 (50μM)	0.75
Primer AN88 (50μM)	0.75
DW	21
Total	47.5

2. 1st PCR 産物 2.5μl と反応液 47.5μl を PCR 用チューブ (0.2ml)に加え混合する (終容量 50μl)。
3. 次の条件で PCR 反応を行う。

95℃	5min	
95℃	30sec	× 35 サイクル
60℃	30sec	
72℃	30sec	
72℃	5min	
4℃	∞	

3-4-2-2-2-変法-4　ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

反応終了後、PCR 産物を 1-2%アガロースゲル電気泳動で確認する。目的とするバンドのサイズは上述のとおり。

3-4-2-2-3　VP4-VP2 部分領域を用いた解析法

VP4-VP2 領域をターゲットとした RT-PCR 反応系を記す。上述の **3-4-2-2-2-変法-1** で合成した cDNA を用いて、semi-nested RT-PCR 反応を行う。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できるが、ライノウイルスとの重複感染や反応系によってはエキストラバンドが多数検出されることがあるため、結果の取扱いには留意すること。エキストラバンドが多い場合は、ゲルからの切り出しにより増幅産物を精製(フナコシゲルチップ、QIAquick Gel Extraction Kit 等を使用)することが有効な場合がある。遺伝子検査による同定に関して、VP4-VP2 領域については判定基準が存在しないことから、型別には注意が必要である。

3-4-2-2-3-1 1st PCR (VP4-VP2-semi-nested RT-PCR)

1. 次のとおり反応液を作成する。

1st PCR 反応液

試薬	容量 (µl)
EmeraldAmp PCR Master Mix	25
EVP2 (50µM)	0.5
OL68-1 (50µM)	0.5
DW	21
Total	47

2. 合成した cDNA 溶液 3µl と反応液 47µl を PCR 用チューブ (0.2ml)に加え混合する (終容量 50µl)。
3. 次の条件で PCR 反応を行う。

95℃	5min	
95℃	30sec	× 40 サイクル
55℃	30sec	
72℃	45sec	
72℃	5min	
4℃	∞	

3-4-2-2-3-2 2nd PCR (VP4-VP2-semi-nested RT-PCR)

1. 次のとおり反応液を作成する。

2nd PCR 反応液 (VP4-VP2-semi-nested RT-PCR)

試薬	容量 (µl)
EmeraldAmp PCR Master Mix	25
EVP4 (50µM)	0.5
OL68-1 (50µM)	0.5
DW	23
Total	49

2. 1st PCR 産物 1µl と反応液 49µl を PCR 用チューブ (0.2 ml) に加え混合する (終容量 50µl)。
3. 下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

95℃	5min	
95℃	30sec	×35 サイクル
55℃	30sec	
72℃	45sec	
72℃	5min	
4℃	∞	

3-4-2-2-3-3 ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

反応終了後、PCR 産物を 1-2%アガロースゲル電気泳動で確認する。

目的とするバンドのサイズは次のとおり。

VP4-VP2-semi-nested RT-PCR

1st PCR 約 750 bp、2nd PCR　約 650bp

サイズはエンテロウイルスの型によって差異がみられる。ライノウイルスでは、約 100bp 程度小さいフラグメントサイズで陽性となる。

3-4-2-2-4　カプシド全領域を用いた解析法　(One-step Entire-Capsid-Coding-Region Amplification (ECRA) 法によるエンテロウイルス同定) [10-12]

エンテロウイルスのカプシド全領域を解析する方法である。簡便かつ感度と特異性が高いため、一般のエンテロウイルスの VP1 領域の解析に有用である。この方法ではエンテロウイルスのゲノム中で保存された配列である Cre 領域を標的としたプライマーを用いる。ただし、EV-D68 の Cre 配列と Cre プライマーにはミスマッチが多く（6 nt のミスマッチ）、EV-D68 の検出には適していない。また、ライノウイルスはエンテロウイルス属の中でも異なる Cre 配列を有しているため、ライノウイルスには本方法が適用できないことに留意が必要である。

3-4-2-2-4-1　One-step RT-PCR 法

1. 反応液を次のとおり作成する。

   RT-PCR 反応液 (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase を用いる場合)

試薬	容量(μl)
2× Reaction Mix	12.5
SS III Platinum Taq Mix	1
Cre (reverse primer, 10μM)	1
DW	4.5
Total	19

2. 抽出した RNA 溶液 5μl と反応液 19μl を PCR 用チューブ (0.2ml)に加え混合する (終容量 24μl)。
3. 50℃　30min　RT 反応を行う。
4. 5’NTR (forward primer, 10μM)を 1μlPCR 用チューブ (0.2ml)に加え混合する (終容量 25μl)。
5. 次の条件で PCR 反応を行う。

94℃	2min	
94℃	15sec	×42 サイクル
55℃	30sec	
68℃	30sec	
68℃	5min	
10℃	∞	

3-4-2-2-4-2　ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

反応後 PCR 産物 (約 3.9kbp)を 1%アガロースゲル電気泳動で確認する。

◎ PCR 法に関する注意点

1　分離株の場合、EVP2 および OL68-1 を使用した single PCR での検出が可能である。

2　VP1 領域の増幅では、187+188+189 と 011 を用いる反応系を紹介した。なお、VP1 領域の増幅の原法（文献 13）では、まず 012+011 および 040+011 のプライマーセットを使用し、これらで増幅されない分離株については、187+222、188+222、189+222 のプライマーセットを使用する。プライマー名は原著に従ったが、222（文献 13）と SO222（文献 8）の塩基配列は同一である。

3　HEV-A 群の場合は 188-011 又は 189-011 で増幅可能な場合が多い。

表 2

(表 2-1) VP1 領域のプライマー (感度が低いため、分離株向き)

Primer	Sequence(5'-3')	Gene	Position*	Specificity	Ref.
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	2A	3408-3389	All EV	13
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	VP1	2612-2631	HEV-B	
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	VP1	2612-2630	HEV-C, D	
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	VP1	2612-2631	HEV-A, C	

* Poliovirus-V1-Mahoney (V01149)

(表 2-2) 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**	GTYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	8
AN33**	GAYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	
AN34**	CCRTCRTA	VP1	3111-3104	All EV	
AN35**	RCTYTGCCA	VP1	3009-3002	All EV	
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	VP3	1977-1996	All EV	
SO222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627	All EV	
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	VP1	2977-2951	All EV	

* Poliovirus-V1-Mahoney (V01149)

**原法ではこれらのプライマーを用いる。変法では用いない。

(表 2-3) VP4-VP2-semi-nested RT-PCR 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.
EVP2	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	5'NTR	444-468	All EV	[14]
EVP4	CTACTTTGGGTGTCCGTGTT	5'NTR	541-560	All EV	[15]
OL68-1	GGTAAYTTCCACCACCANCC	VP2	1178-1197	All EV	[16]

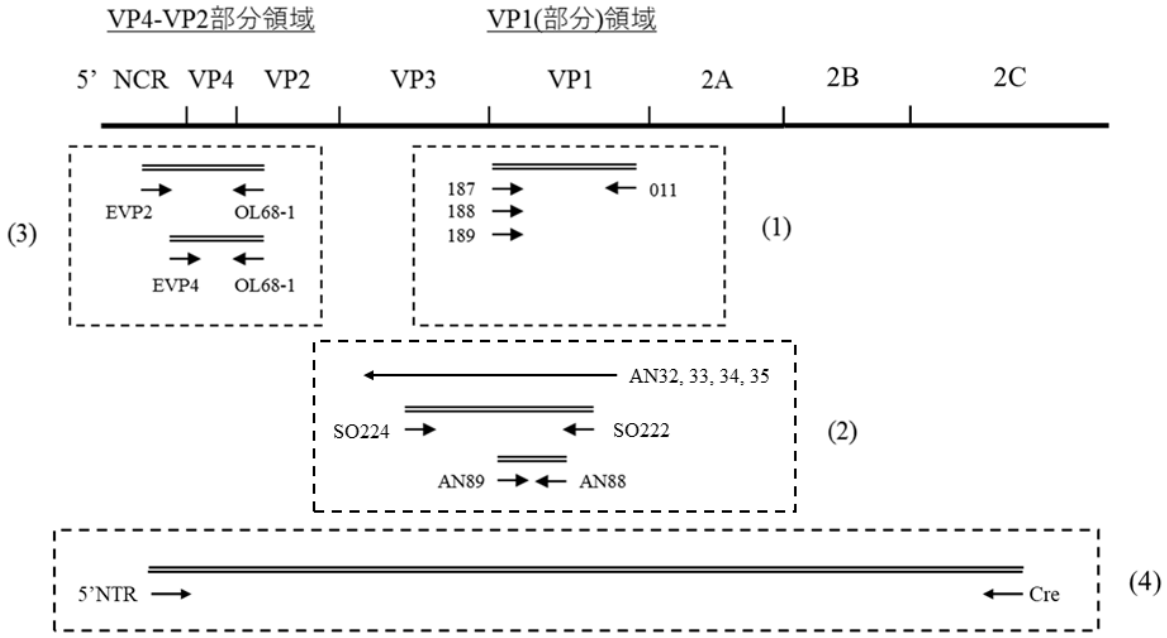
* Poliovirus-V1-Mahoney (V01149)

(表 2-4) カプシド全領域 RT-PCR 領域のプライマー (分離株、臨床検体)

Primer	Sequence (5'-3')	Gene	Position*	Specificity	Ref.
5'NTR	TGGCGGAACCGACTACTTTGGGTG	5'NTR	529-552	All EV	10
Cre	TCAATACGGTGTTTGCTCTTGAACTG	P2C	4460-4485	All EV	

* Poliovirus-V1-Mahoney (V01149)

図 2



エンテロウイルスRT-PCRに用いられるプライマーと増幅部位

3-4-2-3　PCR 産物の塩基配列解析

3-4-2-3-1　PCR 産物の精製

電気泳動で目的とする PCR 産物が確認されたら PCR 産物の精製を行う。目的とするサイズの単一バンドが認められた場合は、市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit 等) 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、QIAquick Gel Extraction Kit 等)。手技は各種キット付属マニュアルを参照する。精製した PCR 産物の濃度は、分光光度計等による測定又は電気泳動を行い、既知濃度の DNA サイズマーカーと比較しておよその濃度を予測しサイクルシークエンス反応に用いる。

また、ExoSAP-IT Express 等の PCR クリーンアップ試薬 (PCR 産物の精製をせず、プライマーを分解・除去する)も、使用が簡便であり、またその後のシーケンス反応も感度がよいため有用である。

3-4-2-3-2　dideoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル

サイクルシークエンス反応に用いるプライマーは表 2 を参照。

反応組成

試薬	容量 (μl)
BigDye Terminator v3.1	4
5× Sequencing Buffer	2
Primer (3.2pmol センス/アンチセンスプライマー)	2
DW	X
精製 PCR 産物	Y
Total	20

（注）187.188.189-011 プライマーで PCR 産物が見られた場合のシークエンス用プライマーは、HEV-B 種が想定される場合、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 2 の Specificity の項を参照)。

反応条件

96℃	1min	
96℃	10sec	× 25 サイクル
50℃	5sec	
60℃	4min	
4℃	∞	

3-4-2-3-3　蛍光ラベル産物の精製

Auto Seq G-50 等市販の精製キットを用いると簡便である (操作方法は各マニュアルを参考のこと)。

3-4-2-4　シークエンサーへのアプライ

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。数が多く途中で蒸発する可能性があるような場合は、Hi-Di ホルムアミドを添加しておくとよい。

3-4-2-5　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エアを用いて確認する。確認には MEGA 等の市販のフリーのソフトウエアを用いることができる。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 等 (欠失、挿入位置の総称) を確認し修正する。

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。標準株の VP1 領域を含む配列の登録番号の

一覧を表 3 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[17]。

(注 1) BLAST 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推奨する。

(注 2) 塩基配列解析用ソフトウエアから BLAST 等の Web サービス (NCBI 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ためには、例として、国立遺伝学研究所の提供する getentry (http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html)にアクセッション番号を入力し FASTA 形式で情報を得るとよい。

3-4-2-6　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解析は、地域内外の株の比較やクラスタリング目的で行う。
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 MEGA 等のソフトウエア上で行う[18]。
3. 分子系統樹は、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。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。この操作をアラインメントと呼ぶ。日本で開発され継続的にアップデートされているフリーソフトウェアである MEGA (https://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/)を使用すると便利である。
4. 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 や欠失、挿入位置を確認し修正を行う。
5. 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エアを用いて行う。
6. 配列間の遺伝距離を求めた後、近隣結合法 (NJ)等によりソフトウエア上で作成する。
7. 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い。

8. 系統樹の信頼性の評価に用いる手法の一つがブートストラップ確率であり、9 割が一つの目安とされている。

表 3

HEV-A

Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.
CA2	Fleetwood	L28146
CA3	Olson	AF081294
CA4	High Point	AF081295
CA5	Swartz	AF081296
CA6	Gdula	AF081297
CA7	AB-IV	AF081298
CA8	Donovan	AF081299
CA10	Kowalik	AF081300
CA12	Texas-12	AF081302
CA14	G-14	AF081304
CA16	G-10	U05876
EV71	BrCr	U22521
EV76	10226	AY697458
EV89	10359	AY697459
EV90	10399	AY697460
EV91	10406	AY697461

HEV-C

Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.
CA1	Tompkins	AF081293
CA11	Belgium-1	AF081301
CA13	Flores	AF081303
CA17	G-12	AF081306
CA19	8663	AF081308
CA20	IH-35	AF081309
CA21	Kuykendall	AF546702
CA22	Chulman	AF081310
CA24	Joseph	AF081311
PV1	Brunhilde	AY560657
PV2	Lansing	AY082680
PV3	Leon	K01392
EV96	10358	NA

HEV-D

Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.
EV68	Fermon	AF081348
EV70	J670/71	D00820

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

HEV-B

Serotype	Prototype strain	GenBank acc no.
CA9	Griggs	D00627
CB1	Conn-5	M16560
CB2	Ohio-1	AF081312
CB3	Nancy	M16572
CB4	JVB.Benschoten	D00149
CB5	Faulkner	AF114383
CB6	Schmitt	AF081313
E1	Farouk	AF081314
E2	Cornelis	AF081315
E3	Morrisey	AF081316
E4	Pesacek	AF081317
E4	Shropshire	AF081319
E5	Noyce	AF081320
E6	D'Amori	AF081321
E7	Wallace	AF081324
E9	Hill	X84981
E11	Gregory	X80059
E12	Travis	X79047
E13	Del Carmen	AF081327
E14	Tow	AF081328
E15	CH96-51	AF081329
E16	Harrington	X89545
E17	CHHE-29	AF081330
E18	Metcalf	AF081331
E19	Burke	AF081332
E20	JV-1	AF081333
E21	Farina	AF081334
E24	DeCamp	AF081335
E25	JV-4	AF081336
E26	Coronel	AF081337
E27	Bacon	AF081338
E29	JV-10	AF081339
E30	Bastianni	AF081340
E31	Caldwell	AF081344
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

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, 141-155 (1995).
2 国立感染症研究所. 手足口病患者から分離・検出されたウイルス、2018～2022 年, <https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data37j.pdf>
3 国立感染症研究所感染症疫学センター. 手足口病とは, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/441-hfmd.html> (
4 国立感染症研究所. WHO マニュアル・輸送関連, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/byougen-kanri/8411-who-yuso.html>
5 Mizuta, K. et al. Longitudinal Epidemiology of Viral Infectious Diseases Combining Virus Isolation, Antigenic Analysis, and Phylogenetic Analysis as Well as Seroepidemiology in Yamagata, Japan, between 1999 and 2018. Jpn J Infect Dis **72**, 211-223, doi:10.7883/yoken.JJID.2018.500 (2019).
6 Konno, M. et al. Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 19962009 using mouse, RD-18S, and Vero cells. Jpn J Infect Dis **64**, 167-168 (2011).
7 Oberste, M. S. et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol **37**, 1288-1293, doi:10.1128/JCM.37.5.1288-1293.1999 (1999).
8 Nix, W. A., Oberste, M. S. & Pallansch, M. A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. J Clin Microbiol **44**, 2698-2704, doi:10.1128/JCM.00542-06 (2006).
9 Rose, T. M. et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. Nucleic Acids Res **26**, 1628-1635, doi:10.1093/nar/26.7.1628 (1998).
10 Arita, M. et al. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. J Clin Microbiol **53**, 73-78, doi:10.1128/JCM.02384-14 (2015).
11 Shaw, A. G. et al. Rapid and Sensitive Direct Detection and Identification of Poliovirus from Stool and Environmental Surveillance Samples by Use of Nanopore Sequencing. J Clin Microbiol **58**, doi:10.1128/JCM.00920-20 (2020).
12 北川和寛. OneStep RT-PCR 方法によるエンテロウイルス遺伝子増幅方法の検討. 福島衛生研究所年報 **No.35**, 31-35 (2017).
13 Oberste, M. S. et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. J Clin Microbiol **38**, 1170-1174, doi:10.1128/JCM.38.3.1170-1174.2000 (2000).
14 Rotbart, H. A. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clin Microbiol **28**, 438-442, doi:10.1128/jcm.28.3.438-442.1990 (1990).
15 Ishiko, H. et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. J Infect Dis **185**, 744-754, doi:10.1086/339298 (2002).
16 Olive, D. M. et al. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. J Gen Virol **71 (Pt 9)**, 2141-2147, doi:10.1099/0022-1317-71-9-2141 (1990).
17 Kroneman, A. et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. J Clin Virol **51**, 121-125, doi:10.1016/j.jcv.2011.03.006 (2011).
18 Barry, G. H. Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual. Sinauer Associated Inc. (2011).

5.検査依頼先

エンテロウイルスの分離同定は、ほとんど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及びエンテロウイルス標準株の分与については、国立感染症研究所ウイルス第二部に相談のこと。ポリオウイルスが分離された場合の型内鑑別 (ワクチン株か否かの判別)については、国立感染症研究所ウイルス第二部で対応可能である。

〒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　　有田　峰太郎
TEL:042-561-0771, FAX:042-561-4729, E-mail: minetaro@niid.go.jp

6.執筆者

北川和寛（福島県衛生研究所）
佐野貴子（神奈川県衛生研究所）
皆川洋子　伊藤雅（愛知県衛生研究所）
中田恵子（大阪府立公衆衛生研究所）
河瀬曜　山下育孝　四宮博人（愛媛県立衛生環境研究所）
芦塚由紀　小林孝行　濱崎光宏（福岡県保健環境研究所）
水田克巳（山形県衛生研究所）
篠田大輔　塚越博之　猿木信裕（群馬県衛生環境研究所）
小室慶子（茨城県衛生研究所）
蕪木康郎（さいたま市健康科学研究センター）
長島真美（東京都健康安全研究センター）
岡本玲子　調恒明（山口県環境保健センター）
上野（菊池）みなみ　喜多村晃一　西村順裕　有田峰太郎（国立感染症研究所ウイルス第二部）
藤本嗣人（国立感染症研究所真菌部）

謝辞

本マニュアルの一部は感染症実用化研究事業　新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究（21fk0108084j0003）」および「多分野連携による新興・再興エンテロウイルス感染症に対する検査・診断・治療・予防法開発に向けた研究（22fk0108627j0001, 22fk0108627h1301, 22fk0108627j0701）」の補助金を受けて作成された。