手足口病

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　……　8

（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
（３）中和抗体価の測定
（４）RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

4.引用文献　……　36

5.検査依頼先　……　37

6.執筆者　……　37

1.疾患の概説

手足口病(hand, foot and mouth disease)は、口唇粘膜および四肢末端にあらわ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。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、順にコクサッキーA16 (CA16), エンテロウイルス 71(EV71), コクサッキーA10(CA10)で、ウイルス分離率では、この 3 種類のウイルスが全体の約 90%をしめている。流行する血清型および流行の程度は年ごとに異なるが、とき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、EV71 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。近年、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、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。日本でも散発例ではあるが EV71 感染によると考えられる重症例が認められており、とくに EV71 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。ワクチン、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、いま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。髄膜炎をともな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、口腔・咽頭拭い液などの、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、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採取し検査に供する。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、血液、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、ウイルス分離および同定の作業には、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。手足口病の主要な起因ウイルスである EV71 および CA16 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, Vero, HEL 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。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)。ウイルス分離後は、エンテロウイルス血清型特異的中和抗血清を用いた中和法により血清型を同定する。EV71 および多くのコクサッキーA ウイルスに対する抗血清は、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、CA16, EV71, CA6,CA10 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しだいに抗原性が変化し、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あらたに調整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。

中和法による同定を補助する方法として、また検査の迅速化のため、ウイルス遺伝子検査も最近多くの実験室で利用されるようになってきている。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。

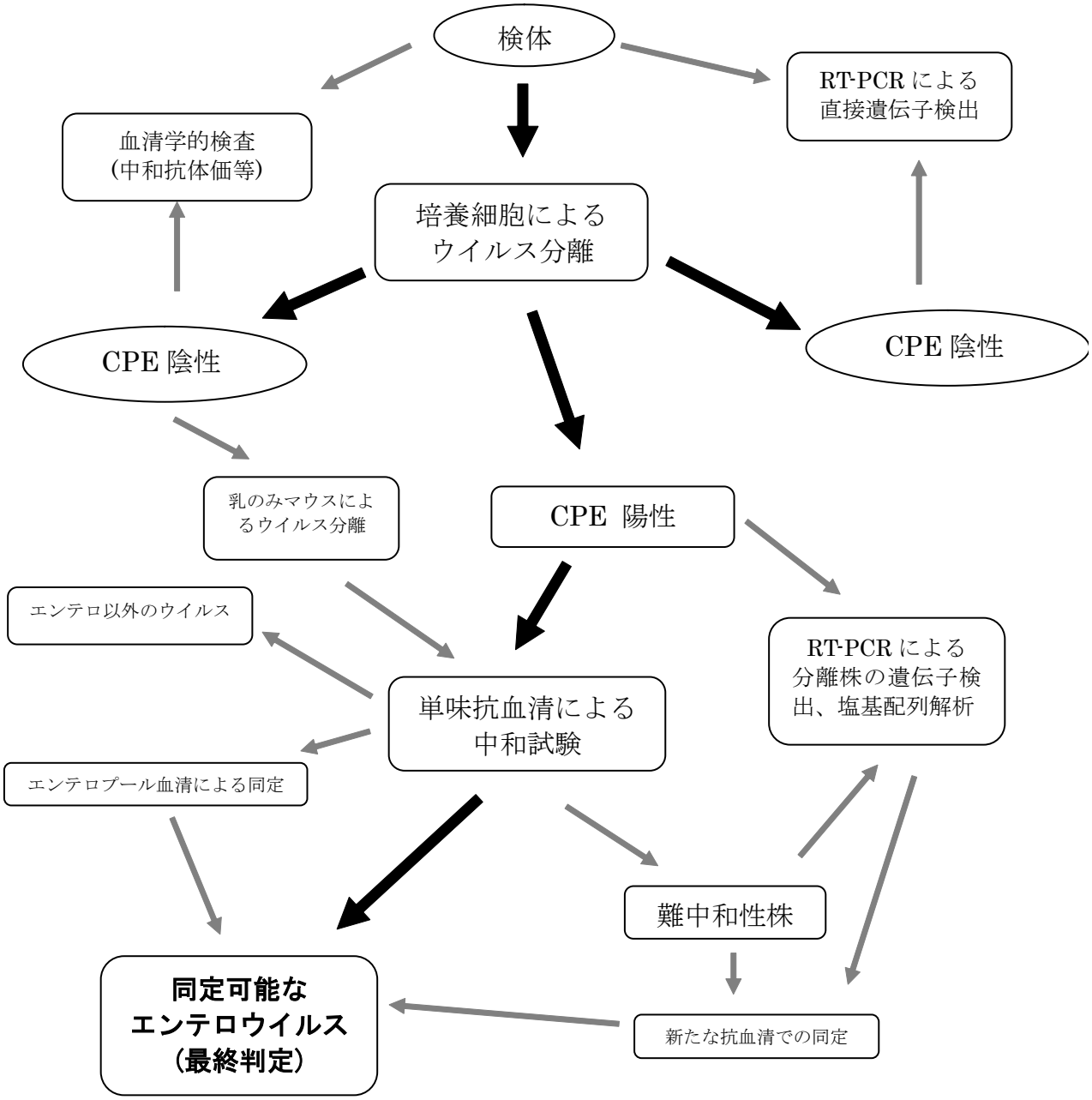


図 1.　検査の進め方 （手足口病）

通常行なわれる実験室検査

補助的に用いられる実験室検査

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、髄液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、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べきである。

3.検査方法

(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、CA16, EV71 および CA6,CA10 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,HEL（ヒト肺２倍体細胞)、Vero 等の細胞が用いられる。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。HEL 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、実験室およ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およ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。一般的に、CA 群の分離率は、培養細胞よりマウスの方が高い（17)。

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%$NaHCO_3$、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Ｂ100 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,Ca（－))、EDTA-2Na。なお、オートクレイ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% $NaHCO_3$は、蒸留水に $NaHCO_3$ を 7.5%の割合で溶解させた後、0.45μm 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ある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%$NaHCO_3$ を 5ml 添加する。オートクレイ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、FCS を 10ml、7.5%$NaHCO_3$ を 10ml 添加する。オートクレイ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。

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 および 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、0.45μm 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（あるいは細胞培養用チューブ)、175cm^2 細胞培養用プラスチックボトル(あるいはガラス製 750ml ルー瓶)、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（200μl)、ストックチューブ(2ml 用)、等

操作

1）検体の前処理

① 口腔・咽頭ぬぐい液は綿が入っている場合にはガラス棒で綿をついて、ぬぐ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 0.45μm 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 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。細菌の混入ある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 穴の培養プレートあるいは組織培養用ガラス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、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 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た後、最初からやり直す。

（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CA16, EV71, CA6, CA10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。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$TCID_{50}$/wellである事を確認し同定を行う。同定がうまくゆかない場合クロロホルムで処理した検体を用いるとうまくゆく場合もある。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

CA16, EV71,CA6, CA10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

炭酸ガス培養器、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（200μl、1000μl)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ（200μl)、ウイルス希釈用試験管（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 25μl づつ分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ25μl づつ等量混合、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 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。

③35～37℃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 ×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。

⑥35～37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

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。それでもなおかつ全てのウェルに 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、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 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、塩基配列の解析等他の手段を用いて同定する。

(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。

試薬・細胞

RD-18S, RD-A,Vero 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$_{50}$/50μl)を測定しておく。

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)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ（200μl、1000μl)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ（200μl)、ウイルス希釈用試験管（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℃30 分間非働化する。

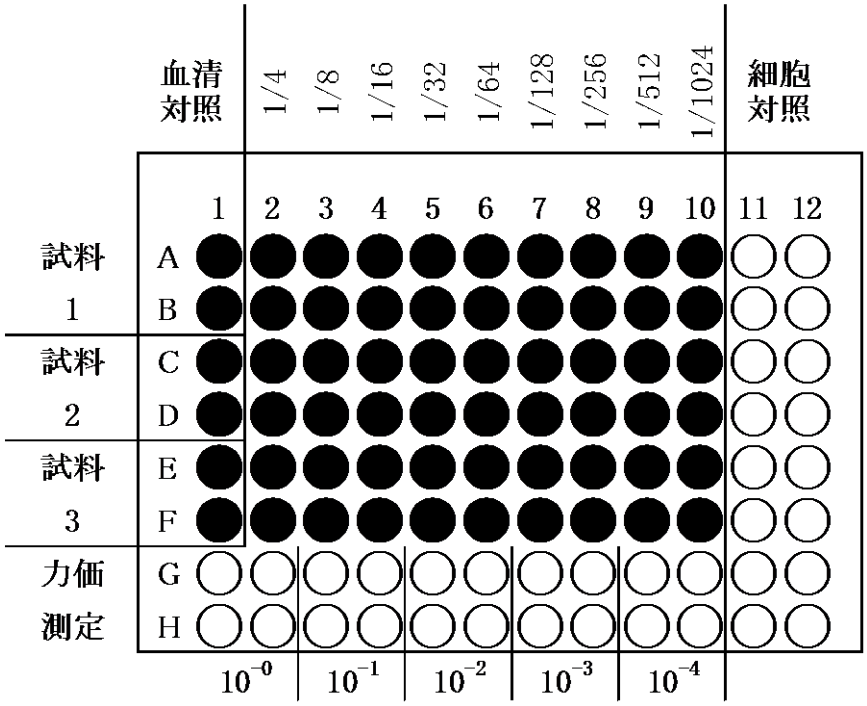


図2. 中和抗体測定試験のマイクロプレート 上におけるレイアウト

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 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。

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 $TCID_{50}$/50 μl 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 $TCID_{50}$（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) 判定

① ウイルス対照の成績が 32～320 $TCID_{50}$/50μl からはずれているときは再検査を行う。表 2 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 2　　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
	−	−	−	−	+	+	+	+	

(4) 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、高力価のウイルスが得ることにより、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, 10μl)、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/μl、シークエ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）4µl とウイルス浮遊液 400µl を混和。37℃、15 分間反応させる。
② 10％SDS　12µl を①に加える。
③ 37℃　15min 加熱し更に 50℃　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）400µl 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採り、3M　酢酸ナトリウム 40µl とエタノール 1ml と混和する。
⑥ -20℃で 1 晩放置。或いは-80℃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/µl)含む 1 mM DTT 16 µl を加え沈渣を溶解する。
⑭ -80℃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、ここでは手足口病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―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 検体当り）

AccessQuick Master Mix,2X	25 µl
187（sense-primer、10pmol/µl)	2 µl
188（sense-primer、10pmol/µl)	2µl
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℃	45	min	
94℃	2	min	
94℃	10	sec	x 35 cycle
50℃	10	sec	
65℃	1	min	

65 ℃　　5　min

4℃　　∞

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 7-800bp)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 0.5-1.5μl 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/μl、２μl づつ使用し 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、2nd 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。

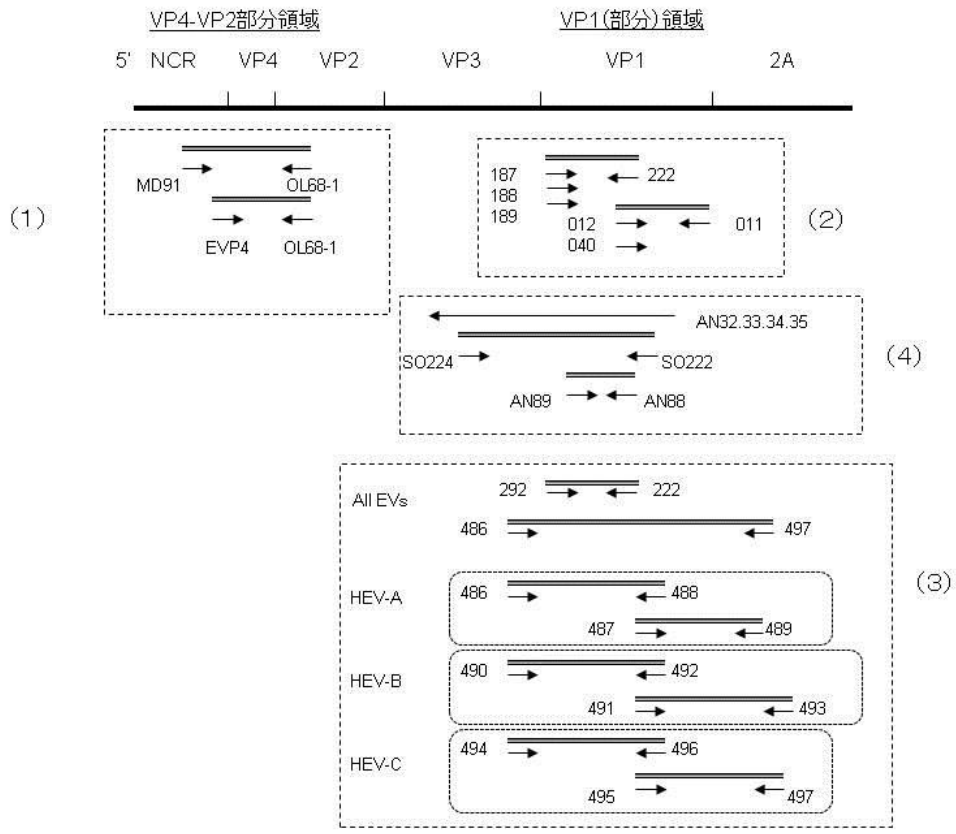
注４）HEV-A 群の場合は 188-011 或いは 189-011 で増幅可能な場合が多い。

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℃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）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



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

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	CTACTTTGGGTGTCGTGTT	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.

(2)VP1領域のプラーマー(分離株向き)

Primer	sequence(5'-3')	Gene	Position*	specificity	ref
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	2A	3408-3389	All EV	④
012	ATGTAYGTICCICCIGGIGG	VP1	2951-2970	HEV-B	
040	ATGTAYRTICCIMCIGGIGC	VP1	2951-2970	HEV-A,C	
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	VP1	2612-2631	HEV-B	
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	VP1	2612-2630	HEV-C,D	
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	VP1	2612-2631	HEV-A,C	
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	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	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	
486	TGGTAICARACIAAITWYGTIGTNCC	VP3	2297-2322	HEV-A	
487	ATGTWYGYICCICCIGGIGCNCC	VP1	2894-2916	HEV-A	
488	GTIGGRTAICCITCITARAACCAYTG	VP1	3063-3038	HEV-A	
489	AYIGCICCISWITGYTGNCC	2A	3348-3329	HEV-A	
490	TGIGTIYTITGYRTICCITGGAT	VP3	2226-2248	HEV-B	
491	ATGTAYRTICCICCIGGNGG	VP1	2883-2902	HEV-B	
492	GGRTTIGTIGWYTGCCA	VP1	2953-2934	HEV-B	
493	TCNACIANICCIGGICCYTC	2A	3641-3622	HEV-B	
494	GAYGAYWSITTIACIGAIGGNGG	VP3	2306-2328	HEV-C	
495	ATGTAYRTICCICCIGGIGCNCC	VP1	2951-2973	HEV-C	
496	CCRTCITARAARTGISIRTANGC	VP1	3111-3089	HEV-C	
497	GCITTITTITGRTGICCRAANCC	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	GTYTGCCA	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	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	All EV	
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627	All EV	
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	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クエンス反応に用いる。

② dideoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル（ABI3130 を用いた場合)。サイクルシークエ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 µl
5X Sequencing Buffer	1 µl
Primer（3.2pmol センス、アンチセンスプライマー）	1 µl
DW	X µl
精製 PCR 産物	Y µl
全量	20 µl

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 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℃	1 min	
96℃	10 sec	x 25 cycle
50℃	5 sec	
60℃	4 min	
4℃	∞	

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。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。

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エアを用いる。
- 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エアから 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）にアクセッション（acc）番号を入力し FASTA 形式で情報を得るとよい。

表４

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

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 などのソフトウエア上で行う。

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 等のソフトウエアを用いて行う(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エアを用いて行う。

７）各配列間の遺伝距離を求めた後、近隣結合法（NJ）等によりソフトウエア上で作成する。

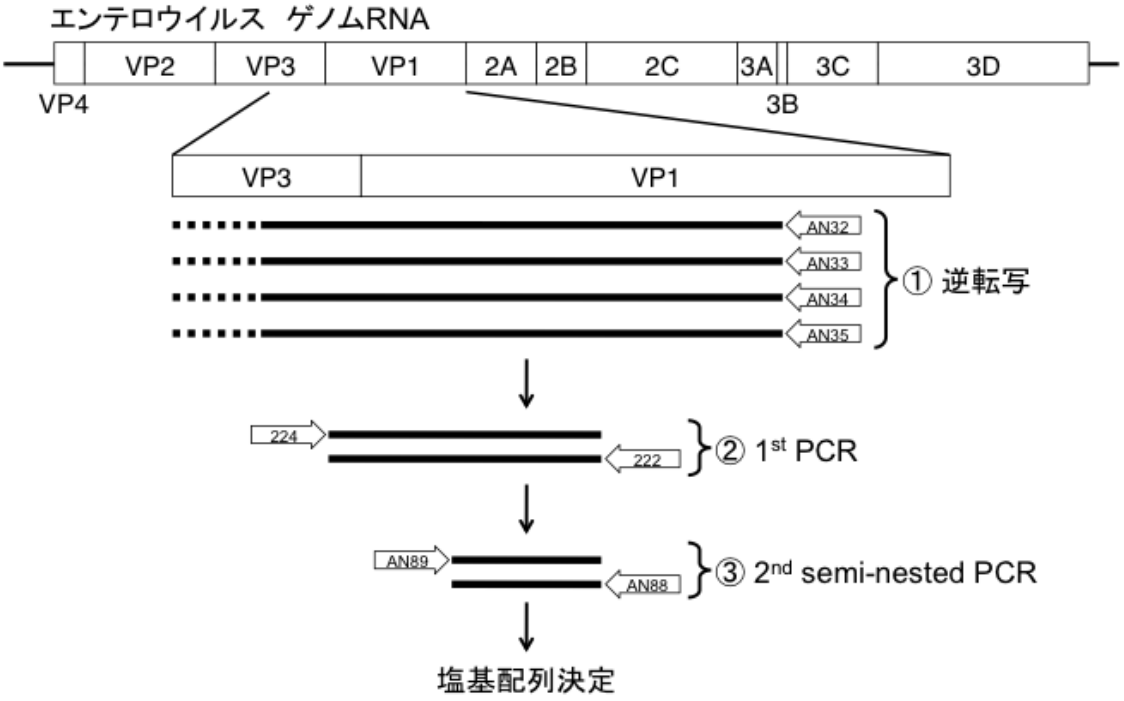
８）塩基配列間の遺伝距離には誤差が含まれており、配列が短くなるほど誤差が大きくなるため、系統樹を作成すると分岐順番の信頼性が下がる。そのため可能な限り長い塩基配列（600-800bp）を用いて作成した系統樹の方が信頼性が高まる。

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エ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)、②1st PCR、③2nd 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、精製後シークエンス反応を行い、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。

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$^-$ 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 µl

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 +MgCl2 (12 161 567 001)	137.5 µl
10 uM Primer AN89	110.0 µl
10 uM Primer AN88	110.0 µl
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 µl
DW	701.25µl

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 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
SuperScript II	0.5 µl

② 抽出した RNA 5 µl とマスタープール 5 µl 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) 1st 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 µl
DW+Taq	10 µl

注）DW 261.3µl と Taq 13.7 µl 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 40 µl 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 (1st 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) 2nd 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 µl
DW+FS Taq	10 µl

注）DW 261.3µl と FS Taq 13.7 µl 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 FS Taq0.5µl を加えてもよい。

② 1st PCR の反応物 1 µl と上記マスタープール 49 µl 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、1st および 2nd 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（1st PCR; 約 760 bp、2nd 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、シークエンス反応に用いる。

8) シークエンス反応

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) シークエンス反応物の精製およびシークエンサーによる塩基配列解析

（1)の４）を参照のこと。

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。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 µl DW で溶出した DNA 溶液を 10～20 倍に希釈し、4 µl をシークエンス反応に用いる。

9) 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)

5xSSⅢBuffer	3.0µl
AN32.33.34.35 mix primer （1µM)	4.0µl
10mM dNTPs	1.0µl
100mM DTT	1.0µl
RNase inhibitor(33U/µl)	0.5µl
SSⅢRT(200U/µl)	0.5µl
Sample RNA	5.0µl

反応条件

55℃　45min

70℃　15min

on ice

1st PCR

反応組成(1 検体あたり)

EmeraldAmp PCR Master Mix(タカラバイオ)	12.5µl
Distilled water	4.5µl
224 (10µM)	1.5µl

222 (10μM)	1.5μl
cDNA	5.0μl

反応条件

95℃	5min.	
95℃	30sec	35 cycle
42℃	30sec	
72℃	45sec	
72℃	5min.	
4℃	∞	

2nd PCR

反応組成(1 検体あたり)

EmeraldAmp PCR Master Mix	12.5μl
Distilled water	4.5μl
AN89 (10μM)	1.5μl
AN88 (10μM)	1.5μl
1st PCR	1.0μl

反応条件

95℃	5min.	
95℃	30sec	35 cycle
60℃	30sec	
72℃	30sec	
72℃	5min.	
4℃	∞	

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 ・Graur 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） Obserte 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およ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。

〒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

板持雅恵（富山県衛生研究所）
飯塚節子（島根県保健環境科学研究所
山下照夫　（愛知県衛生研究所）
中田恵子（大阪府立公衆衛生研究所）
石橋哲也　（福岡県保健環境研究所）
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）