

SSCP 解析によるエンテロウイルス型別同定の試み

斎藤 博之 原田誠三郎 佐藤 宏康

多くの血清型があり、同定に時間のかかるエンテロウイルスの検査法として SSCP 解析を導入した。本法の位置付けは中和試験の手間を大幅に軽減することにより、中和試験そのものと置き換わるものではない。多くの分離株を SSCP パターンによってグループ分けし、代表株のみを中和することにより負担が軽減された。さらに、SSCP 解析の際に対照株を同時に電気泳動し、パターン照合による同定を併用することにより、検査効率率は7倍になった。本法は他県から分与された新鮮分離株も直ちに対照株として使うことができ、病原体サーベイランスの迅速化に貢献するものと考えられた。

キーワード：エンテロウイルス、血清型別、RT-PCR、SSCP

I. はじめに

夏季に流行するエンテロウイルスは、冬季のインフルエンザウイルスと並んで地方衛生研究所で検出される主要な病原ウイルスとなっている。エンテロウイルスは分離こそ比較的容易であるものの、70種類近い血清型があるため中和試験による最終同定に至るには1ヶ月程度の期間がかかっている。また、乳飲みマウスによって分離されるタイプのエンテロウイルスの同定は、中和試験にもマウスを使用するため培養細胞で分離されるウイルスよりもさらに検査にかかる負担が大きくなる。

これまでに、制限酵素切断などの遺伝子解析手法を用いて簡便に型別同定を行おうとする試みはいくつかなされてきたが、型が多いのに加えて遺伝子の変異が激しいため検査法としては定着しなかった。本研究では型別同定の基本はあくまでも中和試験におき、その手間を大幅に軽減する手段として遺伝子解析を用いている。

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism: 一本鎖高次構造多型) は癌細胞の検査において、遺伝子の突然変異を検出するために開発された電気泳動法で、一塩基の違いであっても鋭敏にパターンが変化するという特徴を持っている¹⁾。これはパターンが一致すれば100%同じ遺伝子配列であることを意味している。この手法の感染症分野への応用例としてはムンプスウイルスのワクチン副反応検査が知られているが²⁾、他のウイルスに用いられた例は報告されていない。本研究ではエンテロウイルスの同定を支援する方法として SSCP 解析を導入し、検査効率を大幅に向上させることができたので報告する。

II. 材料と方法

検査材料として1999年に乳飲みマウスで分離されたエ

ンテロウイルス63株を用いた。これらは SSCP 解析の運用の都合で2回(初回29株、2回目34株)に分けて検討を行った。

感染マウスの抽出液から Catrimox-14 RNA 抽出キット(宝酒造)を用いてRNAを抽出し、それを鋳型として RT-PCR によってエンテロウイルスの遺伝子を増幅した。PCRに用いたプライマーはエンテロウイルス共通で5'ノンコーディング領域の配列を用いた³⁾。なお、プライマーはあらかじめ合成時に5'末端をビオチンでラベルしたものをを用いた。増幅後のPCR産物はアガロースゲル電気泳動でバンドを確認した後、SSCP Loading Buffer (95%ホルムアミド-0.25% ブロムフェノールブルー-0.25% キシレンシアノール)で100倍に希釈し SSCP 解析に使用した。

SSCP 解析に必須の恒温式電気泳動装置は「ジェノケンサー SSCP AE-6160型」(ATTO)を用いた。ゲル組成は8%アクリルアミド-5%グリセロール-×1 TBE (トリス108 g、硼酸55 g、 $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 9.3 gを水1リットルに溶かしたものを×10 TBEとする)で作成した。SSCP Loading Bufferで希釈したPCR産物を95℃で3分加熱してDNAを一本鎖とし、氷中で急冷して直ちにゲルにアプライした。電気泳動条件は45 W定電力で、ゲル温度は24℃を維持した。4時間後にゲルを取り外し、電気泳動パターンの検出は「Imaging high 化学発光検出キット」(東洋紡)を用いて行った。

III. 結果と考察

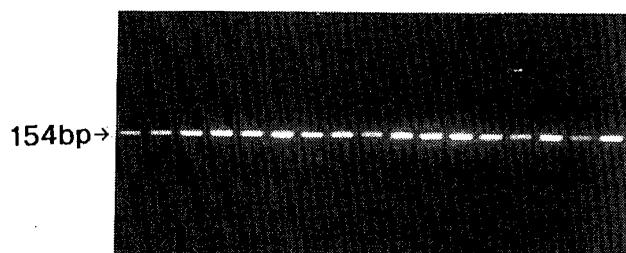
本法は鋭敏な SSCP 解析と中和試験を組み合わせた形で検査を進めていくため、検査手技に加えてその運用方法が重要となってくる。以下に順を追って説明する。

エンテロウイルスがいくつか分離された段階で

表1 分離株の型別成績（初回）

グループ	株数	中和試験
I	12	コクサッキーウイルスA群2型
II	3	コクサッキーウイルスA群2型
III	4	コクサッキーウイルスA群4型
IV	1	コクサッキーウイルスA群4型
V	1	コクサッキーウイルスA群4型
VI	3	コクサッキーウイルスA群6型
VII	5	コクサッキーウイルスA群10型

図1 共通プライマーによるエンテロウイルス遺伝子の増幅



RT-PCR を行い SSCP 解析用の PCR 産物を作成し、アガロース電気泳動で確認したものが図1である。本報告では初回の検査として29株を行ったが、ここではそのうちの17検体分の写真を示した。エンテロウイルス共通プライマーによる PCR では全ての検体で154bp のバンドが認められるが、通常のアガロースゲル電気泳動では遺伝子配列が反映されないため型別は不明である（エンテロウイルスであることは証明される）。同じ PCR 産物29検体分を SSCP 解析用のゲルで電気泳動すると図2（上段）のようになり、遺伝子配列によって異なるパターンが出現する。ここではパターンによってグループ分けすると7グループとなるが、それをわかりやすいように並べ替えた写真が図2（下段）である。これらを便宜上グループⅠ～Ⅶと呼ぶことにする。同じ SSCP パターンを示す遺伝子は100%配列が一致しているため、各グループに分類された PCR 産物の配列は同一であると考えられる。従って、各グループから代表株を1株ずつ抜き出して中和試験を行えば、7株の中和試験で29株を同定できることになる。各グループ内での代表株の選定は原理的には任意でよいが、当所では毎年最初に分離された株を用いることで統一している。それぞれのグループ代表株の中和試験結果を表1に示した。これによるとコクサッキーウイルスA群2型と同定されたものが2グループ、コクサッキーウイルスA群4型と同定されたものが3グループあり、同じ血清型でも複数の SSCP パターンを示す株が存在していることがわかる。このことは同一年度であっても遺伝子の変異が進行しつつあることを示唆し

図2 分離株の SSCP 解析とグループ分け（初回）

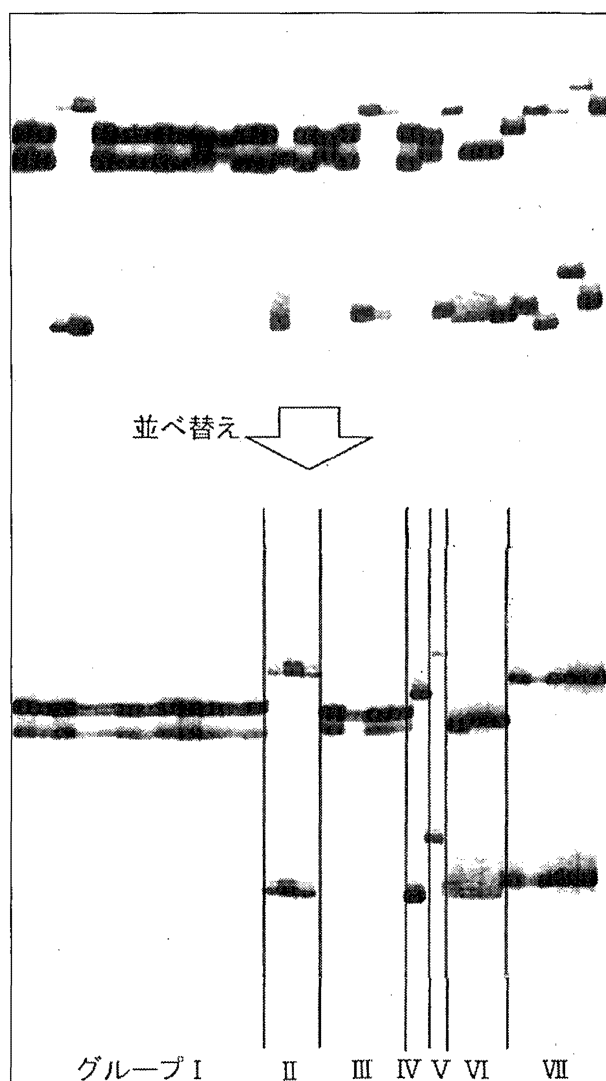


図3 分離株の SSCP 解析（2回目）



ており、むしろ変異を追跡することでより詳しいサーベイランス情報が得られることが期待できる。

次に SSCP 解析を行うときは、初回に同定された PCR 産物を被験株の両側に同時にアプライして対照とする。図3に2回目の SSCP 解析の結果を示す。ゲル中央に2回目に検査した34株、両端に初回に同定された7グループの PCR 産物をアプライした。同じ対照を両側に配置するのは、定木を当てることによって、中央に位

図4 エンテロウイルス検査における SSCP 解析の運用手順

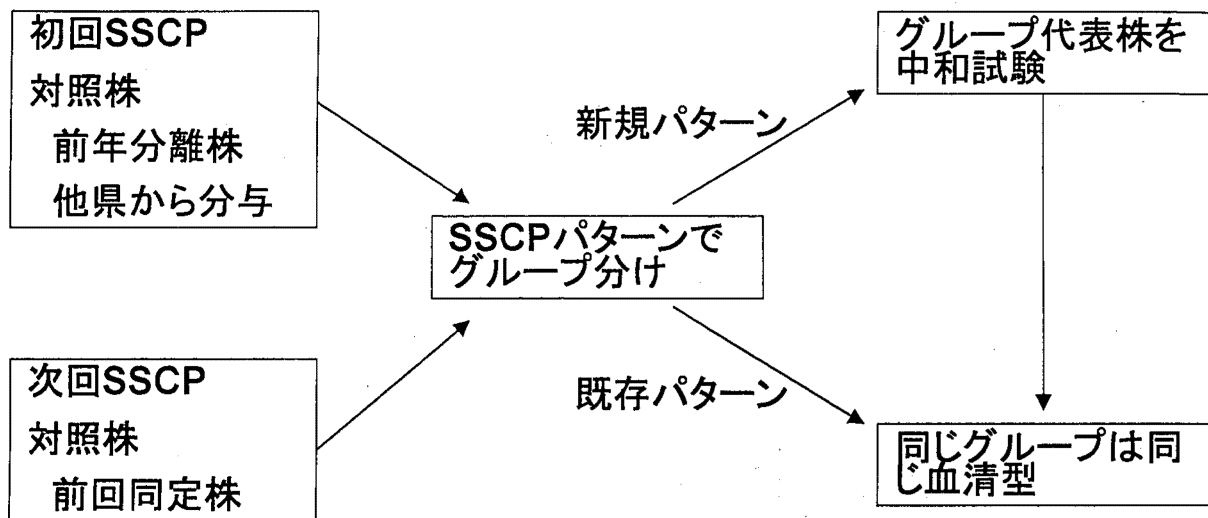


表2 分離株の型式成績（2回目）

グループ	株数	中和試験
I	1	コクサッキーウイルスA群2型
II	5	コクサッキーウイルスA群2型
III	0	コクサッキーウイルスA群4型
IV	3	コクサッキーウイルスA群4型
V	1	コクサッキーウイルスA群4型
VI	3	コクサッキーウイルスA群6型
VII	12	コクサッキーウイルスA群10型
VIII	6	コクサッキーウイルスA群4型
IX	3	コクサッキーウイルスA群5型

置する被験株のパターン照合を容易にするためである。この段階のパターン照合によって、初回同定グループと同一のパターンを示す株は直ちに型別同定ができることになる。図3からは34株中25株がパターン照合によって同定できたのでその結果を表2にまとめた。また、図3では初回同定株の7パターンに当てはまらない株が9株あるが、この場合はあらためてグループ分けをして代表株を1株抜き出して中和試験を行うことになる。この9株はSSCPパターンによって2つのグループに分けられ（便宜上グループVIIIとIX）、代表株の中和試験の結果はコクサッキーウイルスA群4型と同5型であった（表2）。

3回目のSSCP解析を行う場合は初回に同定された7グループに加えて2回目に同定された2グループも対照に加えることでさらにパターン照合確率を上げることができる。一連の検査手順を図4に示した。初回のSSCP解析では対照株を加えなくてもよいが、前年度の株や他県から分与された最新の分離株を用いることもできる。パターン照合で同定できればそれだけ検査の負担が軽く

なり、パターンに一致しなければグループ分けをして最小限度の中和試験で済むことになる。

IV. まとめ

本研究では63株の型別同定を行うのに9株の中和試験を行うだけで済んだ。これは検査効率が7倍になったことを示しており、病原体サーベイランス事業の迅速化に貢献するものであると認められる。本報告ではマウスで分離されたエンテロウイルスを扱ったが、培養細胞で分離されたエンテロウイルスでも同様の成績が得られている。さらに、PCRプライマーを変更すればアデノウイルスの型別にも応用できる。

これまでは他県から新鮮分離株を分与されたとしても、抗血清を作成しなければ検査には使えなかったが、本法を用いることにより直ちに対照株として使うことが出来るようになった。本法による同定試験を円滑に進めるためには地方衛生研究所相互の情報交換と株分与体制の整備がより重要になってこよう。

VI. 文 献

- 1) Orita, M. et al. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Prot. Natl. Acad. Sci. USA., 1989; 86: 2766-2770.
- 2) Katayama, K. et al. Differentiation of mumps vaccine strains from wild viruses by single-strand conformation polymorphism of the P gene. Vaccine, 1993; 11: 621-623.
- 3) Rotbart, H. A. Enzymatic RNA Amplification of the Enterovirus. J. Clin. Microbiol., 1990; 28: 438-442.