

感染症の原因となる RNA ウイルスの網羅的な検出方法の確立

【保健衛生室】

浅野 康子、白井 僚一、井田 正己^{*}、上田 豊

要旨

RNA ウイルスを網羅的に解析できるシステムである RDV 法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) の、当所への導入と実施技術の確立を試みた。上下気道炎や感染性胃腸炎等と診断され、かつ原因ウイルスが不明の 13 検体について RDV 法を実施した。その結果、1 検体から RS ウイルス、別の 1 検体からライノウイルスに相同性のある遺伝子配列が得られた。さらに、不明熱と嘔吐を主徴とする 1 検体から、ヒトパレコウイルス (HPeV) に相同性のある遺伝子配列が得られた。この検体について、PCR およびダイレクトシーケンスを実施したところ、パレコウイルス 3 型 (HPeV-3) であることが判明した。本ウイルスは県内で初検出であり、RDV 法の導入が、当所で想定されていなかったウイルスの同定につながったと考えられる。

1 はじめに

近年、ウイルスの同定検査に分子生物学的検査法が導入され、集団感染症検査や感染症発生動向調査事業等のウイルス検査の主流となってきている。ウイルスの分子生物学的検査には、個々のウイルスの遺伝子配列情報に応じて、それに対する特異的プライマーが必要である。そのため、これまで未検出であり、当所でプライマーを持たないウイルスの検出は出来ない。また、ウイルス、特に RNA ウイルスは常に変異を起こしており、既存のプライマーセットでは検出不可能となる事態も想定される。通常、未知の遺伝子配列の同定には遺伝子組み換えやクローニング技術が用いられるが、当所は遺伝子組み換え実施機関の要件を満たしていないため、遺伝子組み換え技術を用いた実験を行うことが出来ない。そこで、遺伝子組み換えを一切行わずに、未知の遺伝子配列を同定する方法が必要となってくる。

2007 年に、国立感染症研究所の水谷らは、RNA ウイルスを短時間で網羅的に検出し、同定することが可能なウイルス検出法である RDV 法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) を作成した [1, 2]。RDV 法は特別な機器を必要とせず、ウイルス分離後 2~3 日で RNA ウイルスを網羅的に解析できるシステムである。これまで、RDV 法を用いることにより、様々の新規ウイルスが検出・同定されている。

本研究では、不明ウイルスの検出や同定につなげるため、この RDV 法について、当所への導入と実施技術の確立を試みた。

2 材料と方法

1) 検査対象とウイルス培養

本研究では、2011 年 5 月から 2012 年 8 月までに、鳥取県感染症発生動向調査事業において上下気道炎 (呼吸器疾患)、感染性胃腸炎、不明熱、急性脳炎、流行性耳下腺炎と診断されて供出された検体のうち、14 検体を用いた。この 14 検体について、FL 細胞、RD 細胞および VERO 細胞に接種し、ウイルス増殖を試みたところ、そのうちの 5 検体で、VERO 細胞において細胞変性効果 (CPE) が観察され、5 検体中 1 検体では RD 細胞でも CPE が認められた。

2) RDV 法

RDV 法にはいくつかのバージョンがあり、目的により向き不向きがある。そのため、Watanabe らによってオリジナル法から修正され、2010 年に報告された RDV ver. 3.1 法について、開発者の水谷氏との打合せに基づき実施した [3]。概略は以下のとおりである。

- ① 検体の前処理: 検体のヌクレアーゼ処理を行った。
- ② RNA抽出: Agilent Total RNA isolation mini kit (Agilent Technology) を使用した。
- ③ 逆転写反応: Superscript III (Invitrogen) と RNase H を組み合わせることにより、2 本鎖 cDNA を合成した。
- ④ 一次 cDNA ライブラリー: Whole Genome Amplification kit (Sigma Aldrich) により、DNA のフラグメンテーションとアダプター付加を行った。次いで、Amplitaq Gold LD (Applied biosystem) を用いて増幅を行い、一次 cDNA ライブラリーを作成した。

^{*} 現食肉衛生検査所

⑤ Sau3AI および HpyCH4IVによる消化とアダプター付加をし、2次 cDNA ライブラリーを作成した。アダプター配列と ver3.1 の 64 通りのプライマー配列は引用文献の通りである。

⑥ ダイレクトシーケンス：電気泳動によりバンドを確認後、ゲルから切り出し、精製後、ダイレクトシーケンスを行った。

3)パレコウイルスの RT-PCR 法による検出およびシーケンスによる同定

ウイルス培養上清から、QIAamp viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて、ウイルス RNA の抽出を行った。抽出された RNA から、Superscript III (Invitrogen)を用いた逆転写反応により cDNA を作製した。PCR は Ito らの方法に順じ、特異的プライマーとして E23P1 (59-CCGYAGGTAACAAGWGACAT-39) および HPV-N1 (59-TAGGGGATACATARGTCRCGYT-39) を用いて行った [4]。PCR により検出された 810 bp のバンドを精製し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。次いで、得られた配列について DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST 検索を行い、ウイルス同定を行った。

3 結果

1) RDV 法の導入と不明検体への応用

RDV ver. 3.1 法を、エンテロウイルスにより RD 細胞で細胞障害が観察された検体について実施し、特異的プライマーによる PCR 法で得られた結果と同様に検出されることを確認した。次いで、咳など呼吸器症状や急性脳炎を示した 14 件の原因ウイルスが不明の検体について原因の探索を試みた。

このうち、不明熱と嘔吐を主徴とする 1 検体について、RD 細胞および VERO 細胞でエンテロウイルスに酷似した細胞障害が観察されたが、顕微鏡下ではあまり区別がつかなかった (図 1)。この検体について、エンテロウイルス VP4 領域を検出するオリジナル PCR 法を行ったところ陰性であったことから、RDV 法を実施した。RDV 法で得られた一次増幅産物および二次増幅産物を図 2 に示す。二次増幅産物中の 150bp 以上のシングルバンドを切り出して精製し、シーケンスを行った。その結果、図 2 の矢印で示すバンドを含む 9 つの増幅産物からパレコウイルスに相同性のある遺伝子配列が得られた。このうち 3 例の配列について、NCBI の Blast 検索の結果とともに図 3 に示す。

2)RS-A ウイルスの検出

また、発熱・咳等の呼吸器症状を主徴とする 1 検体

について細胞障害を調べたところ、VERO 細胞でムンプスウイルスに類似した細胞障害が観察された。そのため、ムンプスウイルス SH 遺伝子を検出する PCR 法を行ったところ陰性であったことから、RDV 法を実施した。その結果、RS (respiratory syncytial) ウイルスに相同性のある遺伝子配列が得られた (図 4)。

3)便検体の検討

ノロウイルス (2 検体)、ポリオウイルス (1 検体)、インフルエンザウイルス (1 検体) が検出された便検体について RDV 法を実施したところ、PCR 法でワクチン株ポリオ 1 型ウイルスが検出された 1 検体から、ライノウイルスに相同性のある遺伝子配列が得られた (図 5)。しかしポリオウイルスに相同性のある遺伝子配列は得られなかった。またその他の検体についても、ウイルスに相同性のある遺伝子配列は得られなかった。特にノロウイルスは、リアルタイム PCR 法によりコピー数の多いことが判明している検体を試料に用いたが、ウイルスの配列を得ることが出来なかった。

4 考察

鳥取県では、感染症発生動向調査事業において、ほぼ毎年 2,500 件以上の流行性ウイルス感染症の検体を検査している。平成 23 年度については、5 類感染症は 1,047 検体、1 類～5 類感染症以外の疾病については 1,643 検体、合計 2,690 検体の検査を行った [5]。そのうち、何らかの病原因子が検出されたのは 866 件であり、全検体の約 32%であった。それ以外の検体は病原因子が不明となっており、これらの不明検体を減らす方法が必要となっていた。本研究では、当所へ RDV 法を導入し、原因不明の検体について検討を行った。

このうち RDV 法でパレコウイルスが検出された検体については、特異的プライマーを用いた PCR 法を行い、遺伝子解析を行った。その結果、725bp について、2003 年 1 月に福岡市で分離同定されたパレコウイルス 3 型の株 (Accession No. : AB427216.1) と 97%の相同性があった (図 6)。したがって、この検体の原因ウイルスはパレコウイルス 3 型であると考えられる。パレコウイルスは、かつてエンテロウイルス属に分類されていたエコーウイルス 22 型およびエコーウイルス 23 型がパレコウイルス属として独立し、ヒトパレコウイルス 1 型 (HPeV-1) 及び 2 型 (HPeV-2) と改名されたもので、現在のところ 6 種類の血清型/遺伝子型が報告されている [6]。恐らく、近似の種であるパレコウイルスとエンテロウイルスとは、類似の性質を持つため、

細胞障害では判別は難しいのではないかと推察される。パレコウイルスの検出は鳥取県では初の検出であり、想定外の原因ウイルスであった。同時期には、山口県でもパレコウイルス3型が検出されたが、検出に至るまでの過程は、可能性の高い方から順を追って検討したことが報告されている [7]。鳥取県では、RDV 法を実施することが出来たため、比較的速く同定に至った。同様のケースとして、群馬県では RDV 法を用いることにより、サフォード・カルディオウイルスの検出に成功している [8]。このように、検査対象地域でこれまでに発生したことが無く、検査実施機関が想定して予め検査法を準備していないウイルスの検出には、本 RDV 法は絶大な威力を発揮することが分かった。

RS ウイルスが検出された検体については、国立感染症研究所による PCR 法を試みたところ、nested-PCR 法により 334bp の RS ウイルス A 型の増幅産物が検出された [9]。さらに、838bp の PCR 増幅産物についてダイレクトシーケンスを行った結果、752bp について 2010 年 2 月にアメリカ合衆国ウィスコンシン州ミルウォーキーで分離同定された株 (Accession No. : JF920054) と 99% の高い相同性があった。したがって、この検体の原因ウイルスは RS-A 型ウイルスであることが分かった。

RS ウイルスはパラミクソウイルス科ニューモウイルス属に属するウイルスである。一方、ムンプスウイルスもパラミクソウイルス科に属するウイルスである。科を同じくする両者の細胞障害性も類似しており、顕微鏡下での見分けは付きにくい。ムンプスウイルスは流行性耳下腺炎の原因ウイルスであり、県内では 2010 ~ 12 年にかけて流行している。この期間に VERO 細胞を用いて分離されたムンプスウイルス 44 件のうち、PCR 検査では陰性だった検体が 2 検体あった [10]。今回の結果から、この PCR 陰性検体の原因ウイルスが RS ウイルスである可能性が考えられる。

このように、咽頭ぬぐい液検体では良好な結果が得られた一方で、便検体からのウイルス検出は成功しなかった。本研究で用いた RDV 法は、夾雑物由来の DNA や RNA をヌクレアーゼ処理により除去するが、Miyoshi らは、ヌクレアーゼ処理を行わない RDV 法が、より感度良くノロウイルスを検出出来ると報告している [11]。このことは、エンベロープの有無によりヌクレアーゼ処理の効果が異なる可能性を示している。そこで Miyoshi らの方法に従い、便検体中の夾雑物をメンブレンフィルターろ過で除去し、ヌクレアーゼ処理を割愛したところ、ウイルスは検出されずに、高確率で

Ralstonia pickettii の遺伝子配列が検出された。この細菌は常在菌であるが、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通過する特性を持つ報告がある [12]。したがって、夾雑物の多い便検体を RDV 法で検討するためには、抗生物質で確実に細菌を失活させ、かつフィルターろ過をする必要があると考えられる。われわれが感染症発生動向調査事業において検体の前処理に使用している、ペニシリン 250U/ml およびストレプトマイシン $25 \mu\text{g/ml}$ の濃度は不十分であった可能性がある。RDV 法に用いる便検体には、グラム陰性、グラム陽性菌およびマイコプラズマに対する抗菌活性を持つゲンタマイシンやカナマイシンの使用が有効であることが示唆される。

5 参考文献

- 1) Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 13, No. 2, pp. 322-324, 2007
- 2) 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法 (RDV 法) の確立と応用. *ウイルス* 第 57 巻 第 2 号, pp. 217-226, 2007
- 3) Novel Betaherpesvirus in Bats. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 16, No. 6, pp. 986-988, 2010
- 4) Isolation and identification of a novel human Parechovirus. *Journal of General Virology* 85, pp. 391-398, 2004
- 5) 感染症発生動向調査事業におけるウイルス等検査. 鳥取県衛生環境研究所 所報 第 52 号 掲載
- 6) ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus : HPeV) 感染症. *モダンメディア* 53 巻 12 号, pp. 329-336, 2007
- 7) 生後 3 カ月以内の乳児における不明熱等患者からのパレコウイルス 3 型の検出—山口県. *IASR* Vol. 32, No. 10, pp. 293-294, 2011
- 8) Sequencing and Phylogenetic Analyses of Saffold Cardiovirus (SAFV) Genotype 3 Isolates from Children with Upper Respiratory Infection in Gunma, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* Vol. 63 (5), pp. 378-380, 2010
- 9) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル RS ウイルス
- 10) 鳥取県内で流行している流行性耳下腺炎 (おたふくかぜ) について. 鳥取県衛生環境研究所感染症情報センター 病原体検出状況 平成 24 年 4 月報告

<http://www.pref.tottori.lg.jp/secure/710758/mumps2012ver2.0.pdf>

- 11) Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens. *Journal of Virological Methods* Vol.179, pp.256–260, 2012
- 12) Method for qualifying microbial removal performance of 0.1 micron rated filters. Part IV: Retention of *hydrogenophaga pseudoflava* (ATCC 700892) and *Ralstonia pickettii* (ATCC 700591) by 0.2 and 0.22 micron rated filters. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* Vol. 56, No. 3, pp.150-171, 2002

6 謝辞

本研究を行うに当たり、御指導いただいた国立感染症研究所ウイルス第一室（現東京農工大学農学部）水谷哲也先生に厚くお礼申し上げます。また本研究の遂行にアドバイスいただいた、酪農学園大学獣医学部遠藤教授、鳥取大学農学部 浅野准教授に深謝いたします。

The establishment of a species-independent method for the detection of the RNA virus causing the infectious diseases

Yasuko ASANO, Ryoichi SHIRAI, Masami IDA, Yutaka UEDA

Abstract

The RDV method is a rapid method for the direct determination of viral RNA sequences without using the cDNA cloning procedure. We tried the establishment of this RDV system in Tottori prefecture to identify some unknown and/or newly viruses. We performed the RDV method for 14 unidentified samples that were diagnosed with respiratory diseases or infectious gastroenteritis (infectious diarrhea) and so on. As a result, we detected four nucleotide fragment sequences, coding RS (respiratory syncytial) virus and rhinovirus, respectively. Furthermore, we succeeded in detecting nucleotide fragment sequences of Human parechovirus (HPeV) from RD cells infected with the cerebrospinal fluid isolated from a patient of the fever of unknown origins. This sequence of parechovirus was

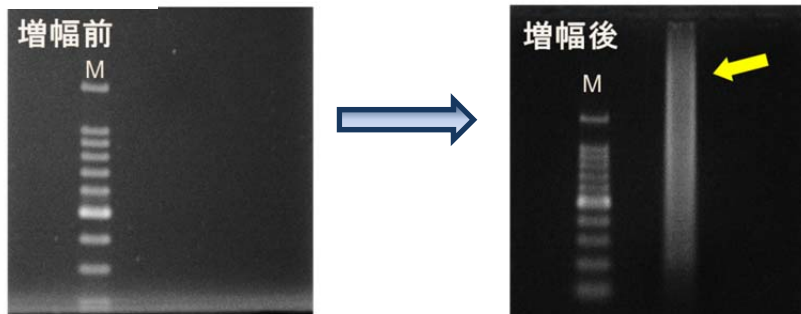
confirmed Human parechovirus type 3 (HPeV-3) by using RT-PCR and direct sequence method. HPeV-3 was the first detection in the Tottori prefecture. It was suggested that the introduction of the RDV method derived for the identification of HPeV-3 that we were not assumed.

図1 RD細胞で認められた細胞障害



図2 RDV法における電気泳動像

A 一次増幅産物



B 二次増幅産物

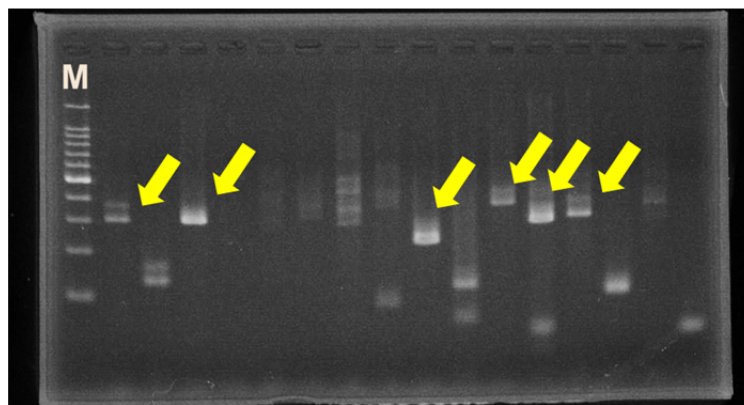


図3 不明検体におけるパレコウイルス検出状況

| 番号 | 年齢 | 性 | 臨床診断名 | 症状 | 材料 | GPE | RDV法 |
|----|-----|---|-------|-------|----|------------|---------|
| 6 | 1ヶ月 | | 不明熱 | 発熱、嘔吐 | 髄液 | RD VERO | パレコウイルス |

B1-6 GU946931.1 [Human parechovirus](#) isolate CSF-2273 polyprotein gene, partial cds Identities = 68/68 (100%)
 TGCTNAATTCATAACCAGTAATAGACTCGGACCATGTGGTCTTCAACGAGAGATGGTTAATTCATGGCGGTATGCCATCAGTTCGTAAGGGTATGCTCTCCGAA

B1-9 GQ183033.1 [Human parechovirus 3](#) isolate K8-94, complete genome Identities = 168/174 (97%)
 TTGCGTCAATTCATAACCAGTAATNTTCGGACAAANANGGCTTCAACGAGATCATGGTTAATTCATGGCGGTATGCCATCAGGATCCCTGGTTTCCTTTTAAATTTGAGTAATCACTATGGAGTCTATCAAGGATTTGGTCAATGTTGCTACTGGTCTATGGATACTCTTTCCTGTCCAATGTGGAAACTGAAGCTAATAATATAATTTCTGGTAATGAAGTTGGTGGGAGATAATAACCAAAGTGGCAGACGTTCTGTAAGGGTATGCTCTCCGA

B2-3 EU024637.1 [Human parechovirus 1](#) strain BNI-90/033D gene, partial cds Identities = 132/141 (94%)
 AAAGAATTGGCACTTCATGAATTAATGCACTAAACGATTATAACTATGAAATGGATTACTCCAGTATGATGGTTCCTTAGTTCAATGCTATTGTGGGAGGCTGTGGAAGTCTTGGCTTATTGTCATGATTACCTGATCGAAAACGATTAGATACCGTCGTAGTCTTAACAGTAAACTATGCCGACTACGTTCTGTAAGGGTATGCTCTCCGA

図 4 不明検体における RS ウイルス検出状況

| 番号 | 年齢 | 性 | 臨床診断名 | 症状 | 材料 | GPE | RDV 法 |
|----|----------|---|-------|--------------|--------|------|---------|
| 14 | 1 歳 4 ヶ月 | M | 咽頭炎 | 発熱、咽頭発赤、鼻汁、咳 | 咽頭ぬぐい液 | VERO | RS ウイルス |

B2-4 JX015495.1 **Human respiratory syncytial virus** isolate 08-042544, complete genome Identities = 177/188(94%)
 TTGCATCTTGATGATTGCAGTTGTTAGTGTACCTTTGTGGTTTCCGAGGCTGTGAATATGATAGCTGCAATTATAAGTGAGGTTGAGATTATCATTGC
 CAAAATAGATAATGTGATTTGCTGCTATAGATTTAAGATTAACCTGTCacTCAGCACgATGCATATGAATAaTAGcTGATTGAGAGTTTACCCaCTAGC
 TTCCTACTGTA

B1-9 JX069801.1 **Human respiratory syncytial virus** isolate 08-046972, complete genome Identities = 79/91 (87%), 23/23 (100%)
 CTGctTCAACAGAActcTatCTGtCGTACGACTTatCTaaTgaGTTTAGGtTgGCactaatGGatgGCTgATgACCCNTgTAgAAGAGAGGACACGCCGTgCgC
 CcGTgtCCAGGGTCCgACTGaTtGTATGCATGCGGaTTCAGGATCCTGCaTcACTTAcATATGATGTcACCACACCCTGGGAAATTAAGGCTTGCCAGTT
 CTAACATGaCTAAATCAAAAAATaTGGGAAcTAcGaAAAGCAAgATcTGAAGGAGCAACTGAAATGACaGAGGGTaAaGCCAccACCAATGGATTCTG
 TCGGTTcAGGtCGTG

図 5 ポリオウイルス1型感染検体におけるライノウイルス検出状況

| 番号 | 年齢 | 性 | 臨床診断名 | 症状 | 材料 | GPE | RDV 法 |
|----|------|---|--------|--------|----|------|---------|
| 12 | 7 ヶ月 | M | 感染性胃腸炎 | 下痢(白痢) | 便 | 臨床検体 | ライノウイルス |

B1-7 AY016377.1 **Human rhinovirus** sp. isolate 5700 polyprotein gene, partial cds Identities =26/26 (100%)
 GTCANCTGAATGANNGTTGTTCCACCAAACACACCCCAACACNCCTCAGACACGGNTCNTNNTATCGTGNCNTACTCTCCGA

図 6 パレコウイルス検出検体の特異的 PCR 法による同定結果

Forward : AB427216.1 Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0 region), partial cds, strain: Fuk2003-143 Identities = 707/725 (97%)

CTGGGGCCGCTCCTCTATCTAGGTGAGTTGGTTAAAAACGTCTAGTGGGCCAAACCCAGGGGGGATCCCTGGT
 TTCCTTTTTTAATTTGAGTAATCACTATGGAGTCTATCAAGGATTTGGTCAATGTTGCTACTGGTGTCTATGGATA
 CTCTTTCTTTGTCCAATGTGGAACTGAAGCTAATAATATAATTTCTGGTAATGAAGTTGGTGGGGAGATAAT
 AACCAAAGTGGCAGATGATGCTTCCAATTTACTTGGGCCAAACAGTTTTGCAACCACAGCTCAACCAGAGAAT
 AAAGATGTAGTGCAAGCTACAACCACTGTAACACCACAAACTTGACCCAACACCCGTCAGCTCCAATATCC
 CGTTCACACCAGATTTAGAAAATGTGGACAACTTTCATTCAATGGCTTATGATATAACTACTGGAGACAAAAA
 CCCCAGTAAGCTTATAAGACTGGACACAGCTTCATGGCAGACTAGTTATTCTAGGCAGTACAAAATAACCACT
 GTGGAGTTGCCAAATCTTTTTGGGATGATACTAGAAAACCCGCCTATGGCCAAGCCAAATATTTTGCTGCAGT
 AAGGTGTGGCTTTCAATTTTCACTCCAGGTTAATGTCAACCAAGGAACTGCAGGAAGTGCATTGGTGGTTTATG
 AACCTAAGCCAGTTATAGATTCAAGGCAATACTTGAATTGGTTCTTTAACTAATCTCCCCATGTGCTGATGAA
 CTGGNTGAACACCA

Reverse : AB427216.1 Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0 region), partial cds, strain: Fuk2003-143 Identities =704/725 (97%)

GTTCTAACCNNATTCATCAGCACCTGGGGGAGATTAGTTAAGAACCAAATTCCAAGTATTGCCTTGAATCTA
 TAACTGGCTTAGGTTCAAAACCACCAATGCACTTCTGCAGTTCCTTGGTTGACATTAACCTGGACTTGAAAA
 TGAAAGCCACACCTTACTGCAGCAAAATATTTGGCTTGGCCATAGGCGGGTTTTCTAGTATCATCCAAAAAG
 ATTTGGGCAACTCCACAGTGGTTATTTGTACTGCCTAGAATAACTAGTCTGCCATGAAGCTGTGCCAGTCTT
 ATAAGCTTACTGGGTTTTTGTCTCCAGTAGTTATATCATAAGCCATTGAATGAAAGTTGTCCACATTTCTAAA
 ATCTGGTGTGAACGGGATAGTTGGAGCTGACGGGTGTTGGGTCAAGTTTGTGGTGTTTACAGTGGTTGTAGCT
 TGCCTACTATCTTTATTCTCTGGTTGAGCTGTGGTTGCCAAACTGTTTGGCCCAAGTAAATTGGAAGCATCATC
 TGCCACTTTGGTTATTATCTCCCCACCAACTTCATTACCAGAAATTATATTATTAGCTTCAGTTTCCACATTGGA
 CAAGGAAAGAGTATCCATAGCACCAGTAGCAACATTGACCAAATCCTTGATAGACTCCATAGTGATTACTCAA
 ATTAATAAAGGAAACCAGGGAATCCCCCTGGGTTGGGCCCACTAGACGTTTTTTANCAACTCACCTAGATAG
 ANGTAGCTGGCCCCGA