

遺伝子学的手法を用いたエンテロウイルス等の 検出・同定法の開発

1 背景と目的

エンテロウイルス（EV）は、特に小児において種々の疾病の原因となり、時として重篤な症状を引き起こす重要な病原体であることから、EV 検査に対する県内の医療機関のニーズは極めて高い。（県内のウイルス検査の中核機関である保健環境センターに検査依頼のあった患者検体の約 7 割が EV 感染症の疑いがあるもの。）

一方、従来の検査法では、EV には多数の血清型が存在すること、中和試験では同定困難な難中和性の分離株が存在すること、培養細胞等では分離が難しい株が存在すること等の理由から、分離・同定が困難な場合があり、また分離・同定にまで至った場合でも、多大な労力と検査時間を必要とするなどの問題点があった。

このため、医療機関および行政機関のニーズに応えていくことを目的として、EV の迅速かつ高感度な検査法である遺伝子学的な手法を用いたウイルス検出・同定手法の確立を目指した。

2 研究成果の概要

(1) EV の迅速かつ高感度な検査法の確立

EV 遺伝子増幅のためのプライマー設計や増幅 EV 遺伝子の塩基配列決定、塩基配列を基にした EV 型別の同定を行うことにより、遺伝子学的な手法を用いたウイルスの検出・同定法を確立し、従来の方法では同定できなかった EV の同定が可能となった。

また、検査に要する時間も、従来の方法では短くても数週間要していたものが、短ければ数日～1 週間以内と大幅に短縮することが可能となった。

(2) EV 以外のウイルスへの応用

本手法を EV だけでなく、これまで広島県内では確認されていなかったライノウイルス（RV）にも応用することで RV の検出・同定も可能とした。

(3) EV 遺伝子塩基配列情報のデータベースへの登録

今回の研究過程で得られた EV の遺伝子塩基配列データを、世界的な DNA データバンクである DDBJ/EMBL/GenBank に登録・公開することで、他の研究者にもデータが利用できるようにした。

(4) ウイルス遺伝子塩基配列データの分子疫学への応用

分子疫学的解析に必要な DNA 解析ソフトである ClustalX および Mega2 を入手し、必要に応じてウイルスの分子疫学的解析を行なえる体制を整備した。また、それらを用いて一部の EV（Cox.A-10 型および EV71 型）について分子疫学的解析を行った。

3 研究期間 平成 14 年度～15 年度

4 実施機関 保健環境センター

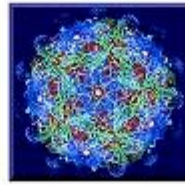
感染症サーベイランス



サーベイランスのイメージ

保健環境センターでは、「広島県感染症発生動向調査事業」に基づき、県内で発生した感染症の動向について常時監視するとともに、定点医療機関の協力により、患者から採取された起因病原体の究明を行っている。それらの結果は、個々の患者の診断・治療に利用されるだけでなく、疫学的解析にも役立っている。

エンテロウイルス感染症



エンテロウイルスのコンピューター3Dイメージ
www.guardian.co.ukより引用

エンテロウイルス（EV）感染症は、特に小児において無菌性髄膜炎や手足口病をはじめとする種々の疾病の原因ウイルスとなっている。感染症発生動向調査事業において各医療機関から依頼のある患者検体の約7割がEV感染症を疑う患者由来の検体であり、EV感染症に対する検査は非常に重要なウイルス検査の1つである。

従来のEV検査法



培養細胞や実験動物を使って患者の検体からウイルスを分離し、中和試験により分離ウイルスの型を同定する方法が一般的。

- ・培養細胞では分離が難しいウイルスの存在
- ・EVには70以上の血清型があり検査が複雑
- ・中和試験では同定出来ないウイルスがある

- ・同定不能の可能性
- ・検査に多くの時間と労力が必要

検査法開発の必要性

遺伝子学的手法を用いたウイルスの検出・同定とその応用

1. Virus RNA 抽出



検体や培養細胞上清からウイルスRNAを抽出

2. 特異的プライマー選定



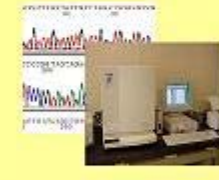
EVに特異的な配列をもつ遺伝子領域にプライマーを設計

3. 特異的遺伝子の増幅



抽出したウイルスRNAを鋳型として、RT-PCR法で遺伝子を増幅

4. 塩基配列の解析



増幅遺伝子の塩基配列をオートシーケンサを用いて解析

5. 相同性検索を利用したウイルス型の決定



ODJのBLASTを利用して対象ウイルスの遺伝子塩基配列の相同性検索を行うことで、ウイルス型別の同定が可能

6. 塩基配列情報のデータベースへの登録



解析した遺伝子塩基配列情報を、GenBankやEMBLに登録することで、世界中の研究者と相互にデータを共有することが出来る

7. 分子疫学的解析



解析ソフトを利用することで、分子系統樹解析のような疫学的な解析にも応用が可能

まとめ

今回の手法を利用することにより、従来と比較して、検査に要する時間の大幅な短縮が図られたばかりでなく、これまで検出できなかったウイルス型についても検出・同定が可能となった。今回確立した手法は、すでに感染症発生動向調査事業における検査にも導入されており、それにより本事業の充実と、医療機関における患者の診断・治療にも役立てられている。現在、EVだけでなく他のウイルス感染症への応用にも取り組んでいる。