
原 著

RT-PCR 法によるエンテロウイルス及び ライノウイルスの検出系

新潟大学医学部ウイルス学教室（主任：濱田忠彌教授）

（株）エスアールエル遺伝子染色体解析センター

川 俣 治

Detection of Enteroviruses and Rhinoviruses Using the Reverse
Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method

Osamu KAWAMATA

Department of Virology, Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Chuya HAMADA)

Center for Molecular Biology and Cytogenetics, SRL, Inc.

In order to detect enterovirus and rhinovirus sequences as separately for the virus genera by single test of RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), two sets of the primers were prepared covering the 5'-NTR (nontranslated region) to the VP4 in the virus genome for amplification. The sequences selected for detection included a deletion of ca. 120 b (bases) stretch in the rhinovirus genome so as to get the products separate in the electrophoretic mobilities for each virus groups. The first set of the primers consisted of P3 (5'-GGCCCTGAATGCGGCTAAT-3') and P5 (3'-GTTCTGGGATCATTTAA-GTG-5') and the second was of P4 (5'-ACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3') and P5; the P3 and P4 (for a closer site to the P5 compared to the P3 site) were complementary to the sequences in the 5'-NTR of 95~100 % homology and P5 being in the VP4 region complementary to the sequence of 60~90% homology through the two virus groups, each. By considering the relatively low homology in the counterpart site, the P5 primer was employed for initiation of the reverse transcription at a low temperature of 37°C for promoting the primer annealing to the template RNA. When applied to the prototype strains, the

Reprint requests to: Osamu KAWAMATA,
Center for Molecular Biology and
Cytogenetics, SRL, Inc. 5-6-50
Sinmachi, Hino City, Tokyo,
191, JAPAN.

別刷請求先: 〒191 東京都日野市新町5-6-50
（株）エスアールエル遺伝子染色体解析センター
川 俣 治

P3-P5 primers gave a single band equivalent to 460 b DNA for the enteroviruses (43/44 serotypes) and that of 340 b DNA for the rhinoviruses (8/8 serotypes), thus enabling to easily discriminate the two virus groups on the separate mobilities of the products. Similarly, the products by the P4-P5 primers were of 340 b and 220 b DNAs for enteroviruses (43/44 serotypes) and rhinoviruses (8/8 serotypes), respectively, again being of easy discrimination of the virus groups. Of these experiments, authenticity of the products was confirmed by base sequence analysis with selected product samples from the experimental groups. The primers prepared were also compared for the efficiencies of virus detection in the clinical specimens with the tissue culture method for virus isolation. Positive ratios resulted were 65/96 by the RT-PCR and 54/96 by the tissue culture method. The primers thus proved effective for rapid and discriminative detection of enteroviruses and rhinoviruses to the laboratory diagnosis.

Key words: Enteroviruses, Rhinoviruses, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), RNA detection

エンテロウイルス, ライノウイルス, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), RNA 検出

緒 言

ヒト・エンテロウイルスはポリオウイルス (3血清型), エコーウイルス (30血清型), コクサッキーウイルス (A群23血清型, B群6血清型)並びに固有エンテロウイルス (4血清型)より成り, ポリオ, 無菌性髄膜炎, 心筋炎, ヘルパンギーナ, 急性出血性結膜炎などを起こす. またライノウイルスには113血清型以上が知られ, 冬季, 普通感冒 (鼻風邪) を起こす¹⁾. これらエンテロ, ライノ両属ウイルス感染症の実験室診断は通常, 患者検体 (糞便, 含嗽水/咽頭擦過物, 血液, 髄液, 結膜擦過物)からのウイルス分離, 並びに患者組血清 (急性期/回復期)における抗体価有意上昇検知によって行われる. しかし, ウイルス分離には分離ウイルス型別同定を含め最低1週間, また組血清による抗体価有意上昇検知には最低2週間を要する. 両属ウイルス感染症の実験室早期診断にはより迅速なウイルス検出法の開発が望まれる.

このことに関連, 最近開発された Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法²⁾³⁾は, RNA 逆転写増幅法として迅速であり, また特異性, 及び感度に優れ, ウイルス病の実験室早期診断に利用できる可能性がある.

1990年, Rotbert は単一プライマーセットを用いた同法により, 血清型を通じ塩基配列相同性の高い5'-NTR (nontranslated region) 内特定領域を増幅対象として

エンテロウイルス11血清型 RNA を検知, この可能性を示唆した⁴⁾. 以降, エンテロウイルス RNA 検知を目的とする RT-PCR 法に関しては感度改良, 一般化の試みなど多くの報告がある⁵⁾⁻²⁶⁾. また同様の試みはライノウイルスについてもみられ, この場合, 5'-NTR はエンテロ, ライノ両属ウイルスを通じて高い塩基配列相同性を示すことから, 同領域を対象とする単一プライマーセットにより両ウイルス属を併せ検知することも可能と報告されている. しかし, これまでの報告では, 得られる産物は両属ウイルスを通じ常に類似の塩基長を示し⁵⁾¹⁶⁾²⁵⁾, 産物分子サイズによっては血清型, 亜属識別は無論, ウイルスの属別判定も困難であった.

本研究ではこの点の改良を図り, 共通プライマーセットを用いた RT-PCR によるエンテロ, ライノ両属ウイルスの属別検知を試みた. ライノウイルス 5'-NTR3' 末端領域にはエンテロウイルスのそれに較べ約120塩基長の欠落がある (Fig. 1). ウイルス遺伝子増幅対象領域として当該欠落区間を含む 5'-NTR から VP4 領域に及ぶ区域を設定, 両属ウイルスの間で産物サイズに差を生じるように工夫したことによる. この場合, VP4 領域内プライマー対応塩基配列相同性は両ウイルス属の間で60~90%台に止まるが, 当該プライマーを逆転写のそれに用い, また逆転写反応温度を比較的低温の37℃とすることで所期の目的を達することができた. 得られた結果を関連知見と併せ記載, 考察する.

材料及び方法

ウイルス材料

エンテロウイルス標準株、並びにライノウイルス分離株はエスアールエル社で保存のものを用いた。また非特異対象ウイルスはA型肝炎ウイルスなど7種を用いた。同じく同社保存のものである。これらを **Table 1** に掲げる。ウイルス材料は常法に従い細胞培養により増殖、その一定感染価標品 (10^4 – 10^6 TCID₅₀/ml) を実験に供した。ウイルス検知用臨床材料 (髄液、咽頭拭い液、糞便、及び血清) は–80℃凍結保存のそれを用いた。材料別件数は髄液46件、咽頭拭い液38件、糞便8件、並びに血清4件である。

RNA 抽出

検体からの RNA 抽出は acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) 法²⁷⁾ に基づく RNA 抽出キット (Isogen, ニッポンジーン社) によった。基本手順はグアニジンチオシアネート変性, フェノール/クロロホルム抽出, 次いでイソプロパノール沈澱である。各種ウイルス標準株、並びに分離株からの RNA 抽出は感染細胞培養上清 0.1 ml を出発材料とした。糞便は PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2) 中10%磨砕試料 3,000 回転10分遠心上清, 咽頭拭い液は擦過綿棒の 1 ml Hank's BSS (balanced salt solution) 浸漬試料, 各 0.1 ml をそれぞれ RNA 出発材料とした。

プライマー設定

実験使用プライマー、並びにプライマー位置をポリオウイルス1型 (Mahoney 株) 遺伝子に対比, **Fig. 1** に掲げる。逆転写プライマー-20塩基配列 (Reverse primer, P5; 3'-GTTCTGGGATCATTTAAGTG-5', ウイルス nt 884-903 対応) はエンテロ, ライノ両属ウイルス VP4 領域内高度相同 (60~100%), 且つ GC 含量40~60%配列対応を条件として設定した。当プライマーはまた逆転写後の PCR プライマーでもある。5'-NTR 対応プライマー-20塩基配列2種 (forward primer, P3; 5'-GGCCCCTGAATGCGGCTAAT-3', ウイルス nt 449-468 対応, 並びに forward primer, P4; 5'-ACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3', ウイルス nt 543-562 対応) も両属ウイルス 5'-NTR 内高度相同 (95~100%), 且つ GC 含量40~60%配列対応を条件として設定した。それぞれのプライマーセットによる RT-PCR は産物として P3-P5 によるときエンテロウイルス/約 460, ライノウイルス/約 340, また P4-P5 によるときエンテロウイルス/約 340, ライノウイルス/約 220, 各塩基

Table. 1 (a) Experimental Use

Genus/ Subgenus	Serotype	Genus/ Subgenus	Serotype
Poliovirus	1	Coxsackivirus group A	
	2		2
	3		3
Echovirus	1	group B	4
	2		5
	3		6
	4		7
	5		9
	7		10
	9		16
	11		24
	12		
	13		1
	14		2
	15		3
	16		4
	17		5
	18		6
	19	Enterovirus	70
	21		71
	22		
	24		
	25		
	29		
	30		
	31		

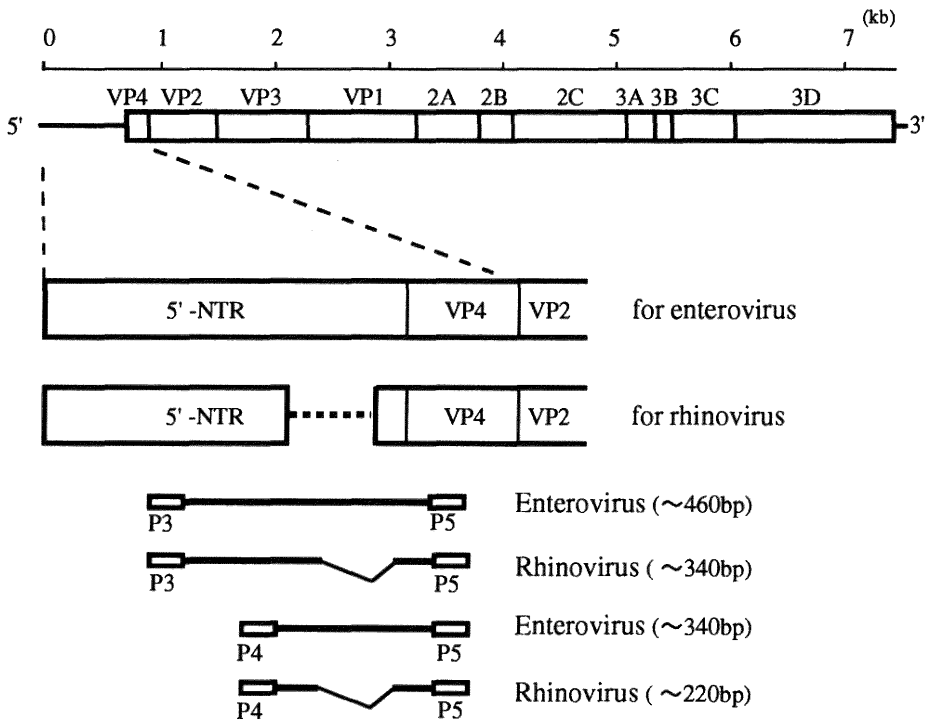
Table. 1 (b) Control Use

Virus species
Hepatitis A virus
Hepatitis B virus
Hepatitis C virus
Cytomegaravirus
Herpes simplex virus type 1
Varicella-zoster virus

長 DNA を予想した。5'-NTR 対応プライマー設定を2種としたのは増幅範囲差によるウイルス検知効率を比較するためである。

RT-PCR 法

方法論基本は Hart ら³⁾ によった。この場合, 対象ウイルス属を通じ逆転写プライマー対応塩基配列相同性が60~90%に止まることから反応温度設定を逆転写反応温度範囲中, 比較的低温37℃とした。プライマー/ウイルス RNA・アニーリング効率を高めるためである。具体的手順は RNA 分画 10 µl を RT 反応液 10 µl (終濃度; 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM Dithiothreitol, 3 mM MgCl₂, 1 U/µl RNase inhibitor, 0.5 mM 各 dNTP, 1 U/µl M-MLV (moloney-murine



P3: 5' GGCCCTGAATGCGGCTAAT 3' (Forward primer)
 P4: 5' ACTTTGGGTGTCCGTGTTTC 3' (Forward primer)
 P5: 3' GTTCTGGGATCATTAAAGTG 5' (Reverse primer)

Fig. 1 Diagrammatic representation of picornavirus genome and RT-PCR products.
 5'-NTR: 5' nontranslated region; VP4 to 3D: subgenomic regions according to functional moieties. Rhinovirus genus has a spotted deletion of 120 nucleotides at the 3'-side of 5'-NTR.

leukemia virus) 逆転写酵素, 並びに 500 nM 逆転写プライマー) に添加, 37℃, 60分 (逆転写反応), 次いで反応液全量を PCR 反応液 50 μ l (終濃度; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01 %ゼラチン, 1.25 U Taq DNA ポリメラーゼ, 0.2 mM 各 dNTP, 並びに 200 nM 各プライマー) と混合, PCR に処した. PCR は変性94℃/1分, アニーリング55℃/1分, 伸長72℃/1分, を単位サイクルとする40サイクルによった.

RT-PCR 産物検出, 確認

RT-PCR 最終反応液 10 μ l を 3 %アガロースゲルにより泳動 (7 V/cm, 40分, ミュービッド, コスモバイ

オ社), 泳動後ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (0.5 μ g/ml) により染色, 紫外線照射 (254 nm, 6 mW/cm², トランスイルミネーター TM-40, フナコシ社) による産物可視バンド泳動度を分子量マーカーのそれと比較, 所期の産物であることを確認した.

塩基配列決定

RT-PCR 最終反応液より産物をエタノール沈澱法により回収, ダイデオキシ法²⁸⁾ によりサイクルシーケンス反応²⁹⁾ に処し, Sephadex G50 quick spin column (Boehringer Mannheim 社, USA) により余剰標識物を除去, 最終試料につき塩基配列を 373 A DNA Sequencer (パーキンエルマー社, USA) により決定した.

競合 RNA

競合反応による RT-PCR 特異性確認、並びに試料 RNA 定量を目的として調製した。調製手順を Fig. 2 に模式図として掲げる。ポリオウイルス 1 型標準株 RNA を増幅対象とし (nt 449-903), プライマーとして 2 種セット, ① 増幅対象領域中 nt 449-768 を直接増幅対象とし, 5' 側プライマー-5' 端に *Hind*III site, 3' 側プライマー-3' 端に *Bam*HI site を付加したもの, ② 増幅対象領域中 nt 669-903 を直接増幅対象とし, 5' 側プライマー-5' 端に *Bam*HI site, 3' 側プライマー-3' 端に *Eco*RI site を付加したものを準備, それぞれにより RT-PCR 産物を得た。図示の如く, 両プライマーセットによる産物は共に nt 669-768, 100 塩基配列を保有する。以降, 両産物を *Bam*HI site により連結, pCRII 発現ベクターを介し RNA に転写, 競合 RNA とした。調製原理に従い競合 RNA は nt 669-768, 100 塩基配列を順列重複保有する。当該配列重複保有は競合試験に際し, 競合 RNA に基づく RT-PCR 産物と被検試料に基づくそれを分子サイズ差 (100 塩基配列) により識別するためである。

競合 RT-PCR

具体手順は Gilliland ら³⁰⁾に従った。吸光度 (A_{260}) により 10^3 分子相当競合 RNA 標品を調製, 10 倍階段希釈被検試料に添加, 前出方法論により RT-PCR を実施, 産物泳動シグナル強度を競合 RNA によるものと被検試料 RNA によるもので比較, 両者同等強度を与える被検試料希釈度において競合 RNA, 被検試料 RNA, 同等濃度で存在するものとし, これに基づき原被検試料 RNA 量を算出した。

結 果

1. 共通プライマーによるエンテロ, ライノ両属ウイルス識別検出

培養細胞増殖エンテロ, ライノ両属ウイルス株 10^3 - 10^5 TCID₅₀ 含有試料より RNA 分画を調製, RT-PCR に供した。プライマーセット P3-P5 による結果を Fig. 3 (a) に掲げる。増幅産物は 1 種を除く被検エンテロウイルス 43 種全てにつき単一サイズ, 同等強度, 約 460 塩基長 DNA 相当バンドとして検知された。シグナル陽性エンテロウイルスはポリオウイルス 1~3 型 (polio 1~3), エコーウイルス 1~5, 7, 9, 11~19, 21, 24, 25, 29~31, 各型 (Echo 1~5, 7, 9, 11~19, 21, 24, 25, 29~31), A 群コクサッキーウイルス 2~7, 9, 10, 16, 24 各型 (Coxsackie A2~7, 9, 10,

16, 24), B 群コクサッキーウイルス 1~6, 各型 (Coxsackie B 1~6), 並びに固有エンテロウイルス 70 及び 71 型 (Enterovirus 70, 71) であった。唯一の例外としてエコーウイルス 22 型では増幅シグナルは検知できなかった。一方ライノウイルスによるときは増幅シグナルは約 340 塩基長 DNA 相当バンド, エンテロウイルスによるものとは明確に泳動度を異にするそれとして検知された。当属に関しては増幅シグナルは被検ライノウイルス全型につき検知され, 泳動度, 並びに強度は各ウイルスメンバーを通じ一定, 且つほぼ同等であった。また本実験では検出系特異性確認の一環として A 型肝炎ウイルス, B 型肝炎ウイルス, C 型肝炎ウイルス, サイトメガロウイルス, 単純ヘルペスウイルス 1 型, 及び水痘帯状疱疹ウイルスを実験条件にて調製, RT-PCR に供し非特異対象としたがこれらに関しては増幅シグナルを全く検知しなかった。

プライマーセット P4-P5 による結果を Fig. 3 (b) に掲げる。先の実験と同一条件により, プライマーセット P3-P5 によるものと検知効率を比較するため実施した実験である。当プライマーセットによるときはエンテロウイルス検知シグナルは約 340 塩基長 DNA 相当バンド, またライノウイルスのそれは泳動度を異にする約 220 塩基長 DNA 相当バンドとして検知された。しかし, シグナル陽性ウイルス種, 並びにシグナル強度に関しては前出プライマーセットによる結果との間に差は認められず, 同等の知見を与えた。

2. 増幅産物の確認

プライマーセット P3-P5, P4-P5, それぞれが対応ウイルス RNA 配列そのものを増幅することを産物の塩基配列解析により確認した。産物塩基配列を同定したウイルス種はプライマーセット P3-P5 によるもの, P4-P5 によるもの, 共にポリオウイルス 3 血清型 (1~3 型), エコーウイルス 15 血清型 (1~5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 24, 及び 25 型), A 群コクサッキーウイルス 8 血清型 (2~6, 9, 10, 及び 16 型), B 群コクサッキーウイルス 5 血清型 (1~5 型), 固有エンテロウイルス 2 血清型 (70 及び 71 型), 並びにライノウイルス 1 血清型 (1 型) である。これらの内, ポリオウイルス 3 血清型 (1~3 型), A 群コクサッキーウイルス 1 血清型 (21 型), B 群コクサッキーウイルス 4 血清型 (1, 3~5 型), 固有エンテロウイルス 1 血清型 (70 型), 並びにライノウイルス 1 血清型 (1 型) に関しては結果をデータベース登録の標準配列 (GenBank) と比較, 両者基本一致を確認した。その内, プライマーセット P3-

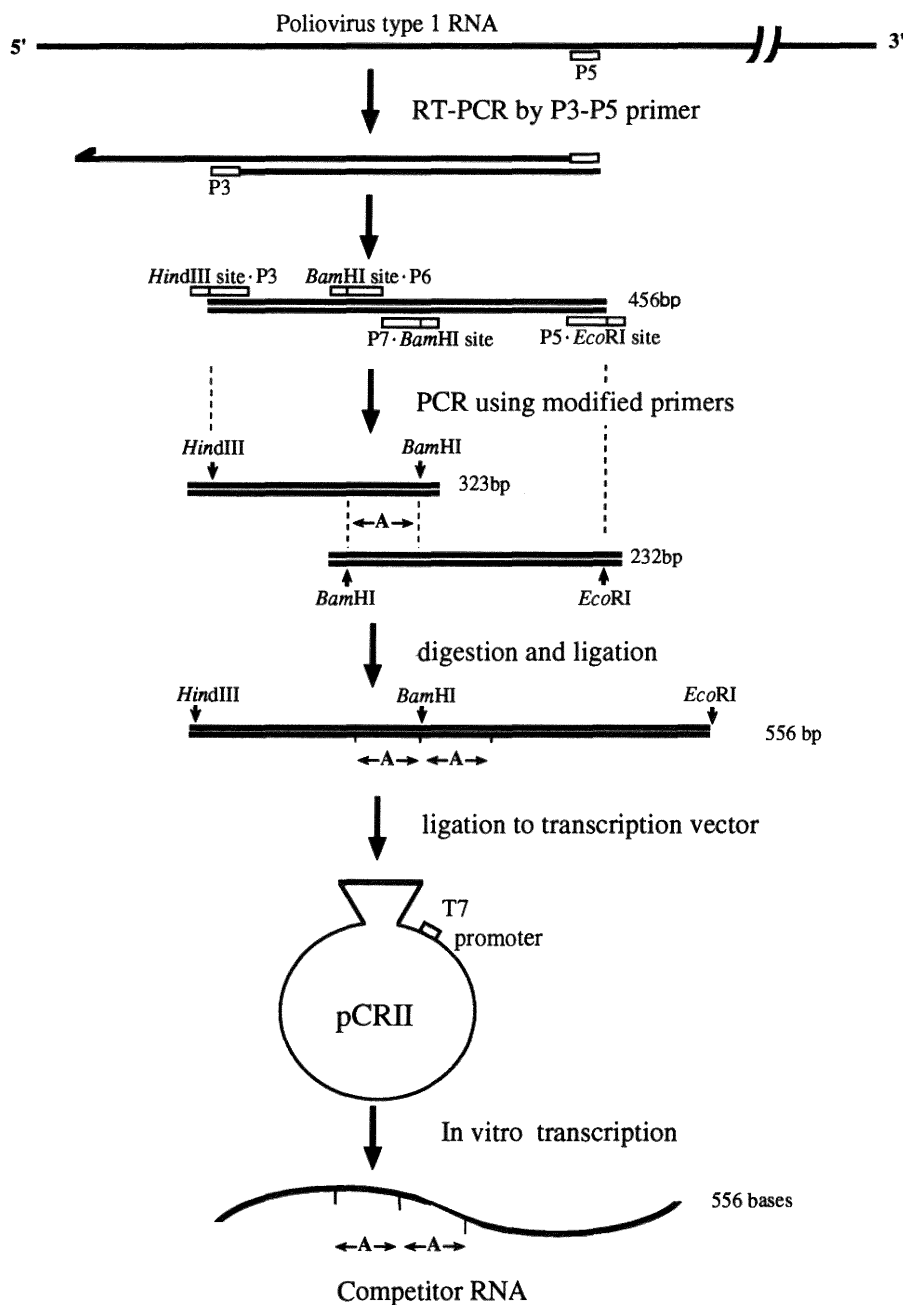


Fig. 2 Preparation of competitor RNA with 100 bases duplex.

HindIII site·P3 : forward primer (5'-GTACAAGCTTGGCCCTGAATG-CGGCTAAT-3') ; BamHI site·P6 : forward primer (5'-TCAGGATCC-AAAACTCTGTATCAAATGGG-3') ; P7·BamHI site : reverse primer (3'-GTCCAAAGTAGTGTCTTTACCTAGGA-5') ; P5·EcoRI site : reverse primer (3'-GTTCTGGGATCATTTAAGTGCTTAAGT-5') ;

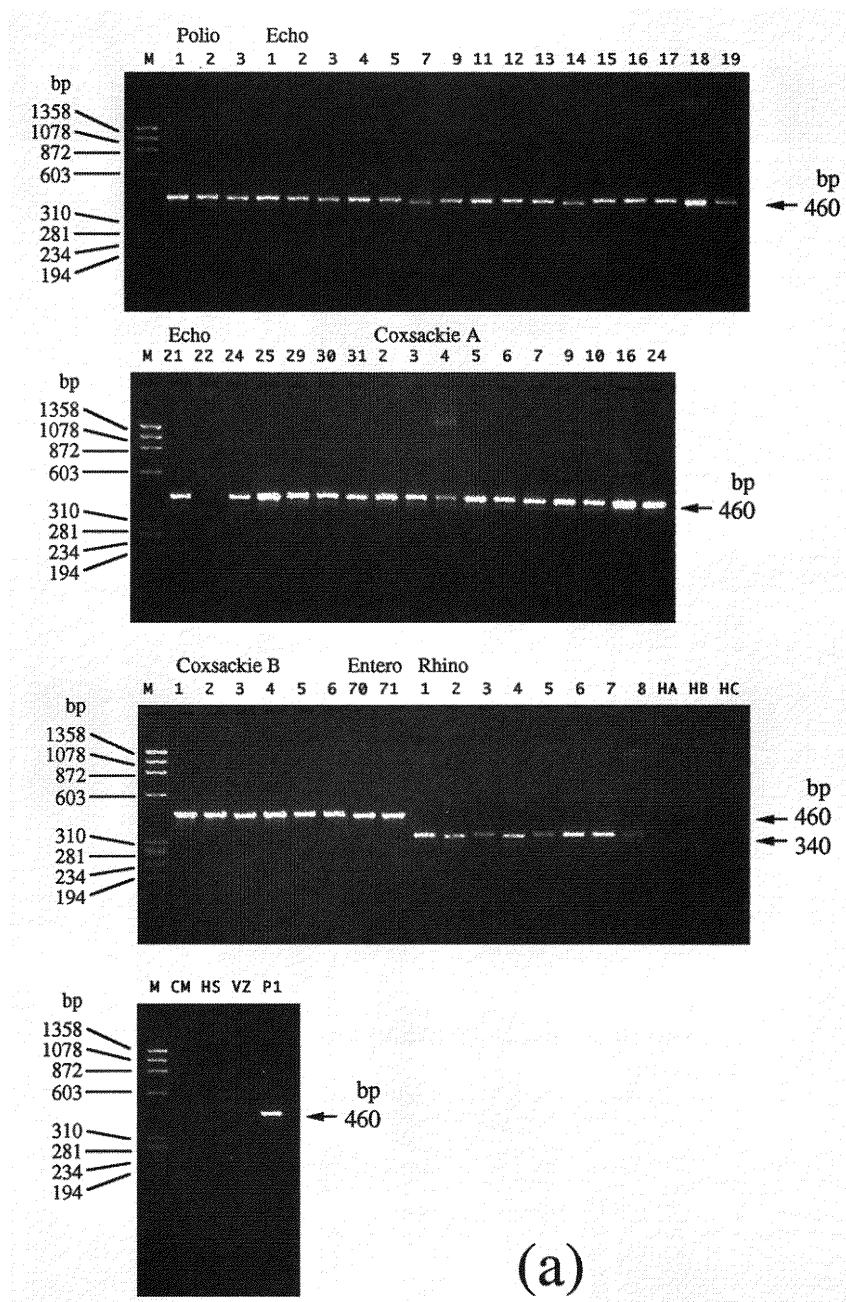
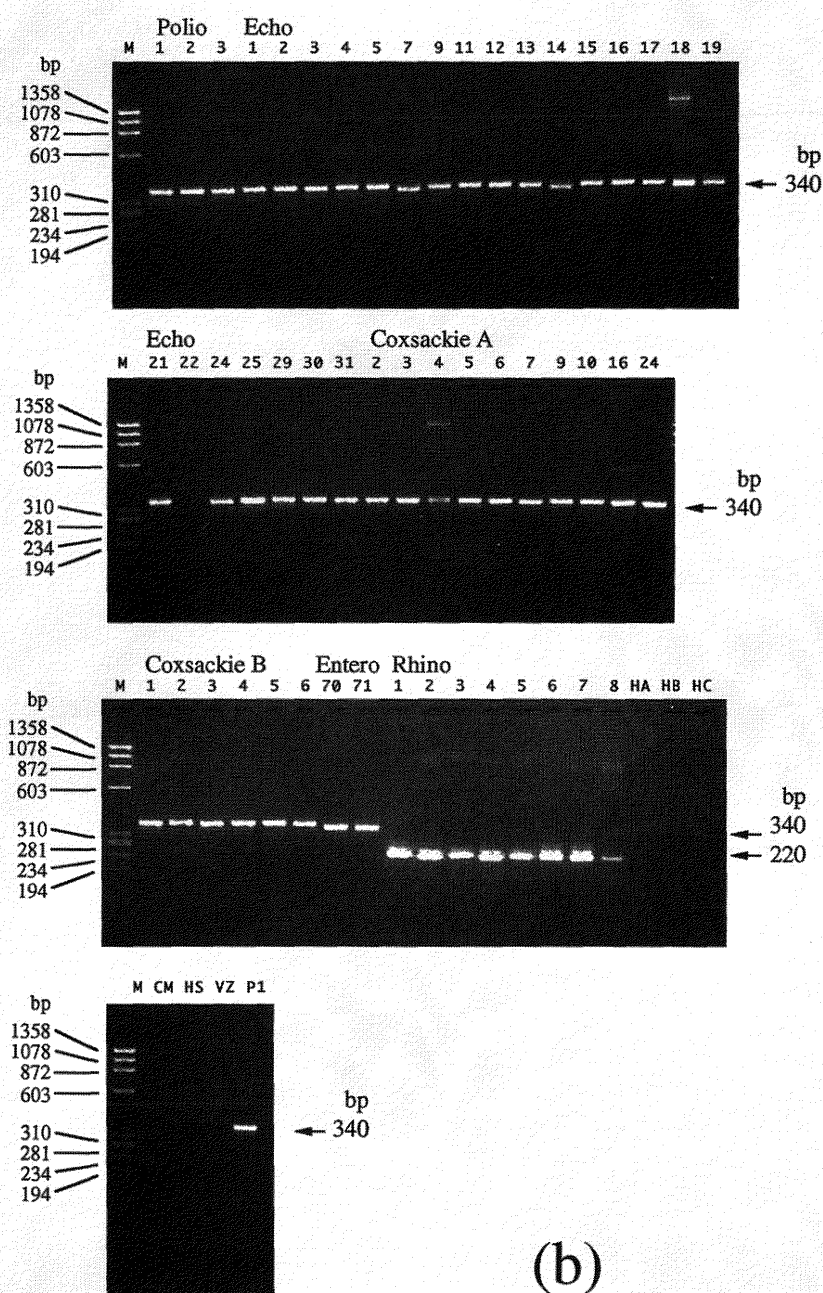


Fig. 3 RT-PCR products following amplification of RNA derived from standard (enteroviruses) and clinically isolated (rhinoviruses) strains using P3-P5 (a) or P4-P5 (b) primers.

M: molecular size marker (ϕ X174/*Hae*III digest.), Polio: poliovirus; Echo: echovirus; Coxsackie A: coxsackievirus group A; Coxsackie B: coxsackievirus group B; Entero: enterovirus; Rhino: rhinovirus; and the following numerals indicate the serotypes of respective virus groups. CM: Cytomegarovirus; HS: Herpes simplex virus type 1; VZ: Varicella-zoster virus; HA: Hepatitis A virus; HB: Hepatitis B virus; HC: Hepatitis C virus; and P1: Poliovirus type 1.



法論は特異性に優れると同時に感度においても従来のウイルス分離法に劣ってはならない。臨床検体96件を対象とし、RT-PCR 法によるウイルス検知効率、通常培養細胞によるウイルス分離効率を比較した (Table 2)。脳脊髄液 (CSF) を対象とするとき、RT-PCR による検知効率 33/46 (71.7 %)、細胞培養による分離効率 28/46 (60.9 %)、以下同様に咽頭拭い液 (Swabs) : RT-PCR 27/38 (71.1 %) ; 細胞培養 24/38 (63.2 %)、糞便 (Stools) : RT-PCR 3/8 (37.5 %) ; 細胞培養 2/8 (25.0 %)、血清 (Sera) : RT-PCR 2/4 (50.0 %) ; 細胞培養 0/4 (0.0 %)、であった。また、RT-PCR 法陽性結果は常に細

当研究の目的は迅速実験室診断の一環として共通プライマーセットによる臨床検体エンテロウイルス、並びにライノウイルス属別検知条件を提供することにある。方

Fig. 4 Nucleotide sequences of RT-PCR products for poliovirus type 1 (POL1-P) and human rhinovirus type 1 (HRV-P). POL1-P and HRV-P sequences are aligned with that in the data base (GenBank) for the respective viruses, poliovirus type 1 (POL1) and human rhinovirus type 1 (HRV1).
*: insertion, deletion or replacement.

Table. 2 Efficiencies of virus detection/isolation by RT-PCR and cell culture methods

Materials	Total number	Cell culture positive	RT-PCR positive
CSF	46	28	33
Swabs	38	24	27*
Stools	8	2	3
Sera	4	0	2
Total	96	54	65

CSF : cerebrospinal fluid. Swabs : throat swabs.

* : consisting of 23 enteroviruses and 4 rhinoviruses. Two methods were done independently with coded aliquots. The RT-PCR results were totally identical with that by the cell culture method, in addition to its proper detection.

胞培養法ウイルス分離陽性検体のそれを含み、加えて前者のみによる陽性検体を与えた。当 RT-PCR ウイルス検知感度は実験条件による限り細胞培養によるウイルス分離効率を凌駕する。加えて、咽頭拭い液を対象としたものでは検知検体27件中、エンテロウイルス23件、ライノウイルス4件を検知、臨床検体を対象とするときも両属ウイルス識別検知を確認した。

4. 競合 RT-PCR 法によるウイルス RNA の定量

RT-PCR 法はその原理が特定 RNA 塩基配列増幅検知にある。これに適当な基準試料系を組み合わせるとき、被検試料 RNA を定量検知できる。P3-P5 プライマーセット対応 RNA (但し、内部配列 100 塩基長余剰保有) 1,000 箇分子を基準競合 RNA 試料とし、競合 RT-PCR

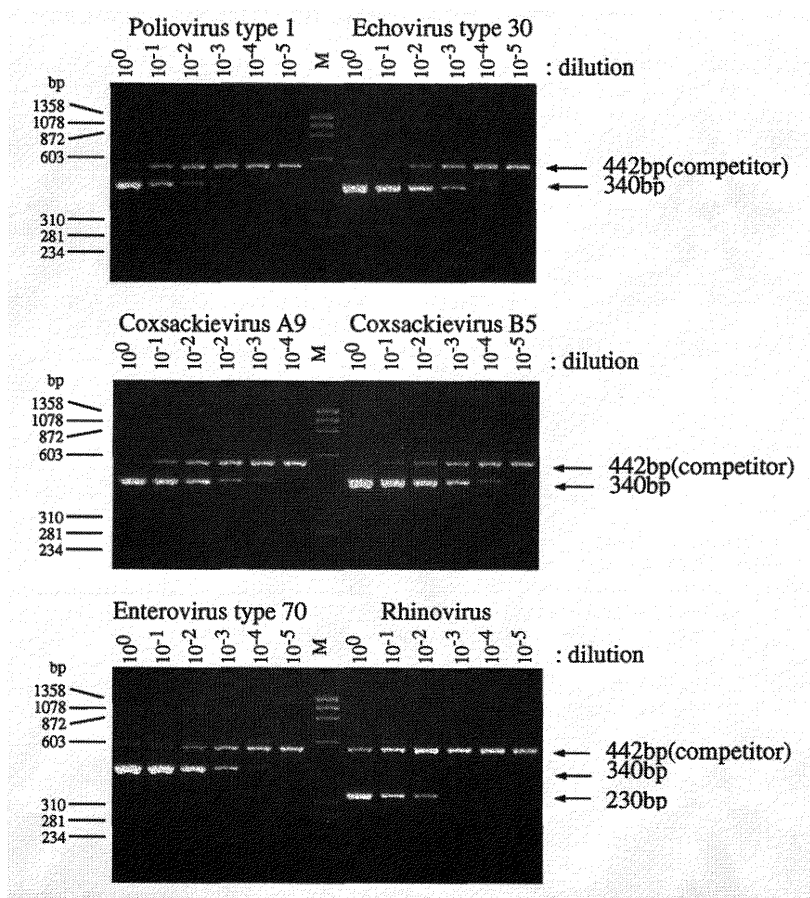


Fig. 5 Quantitative assay of enterovirus and rhinovirus RNAs by competitive RT-PCR method. Virus specimens were subjected to 10-fold dilution for the competitive RT-PCR assay. M : molecular size marker (ϕ X174/*Hae*III digest.)

により臨床検体ウイルス RNA の定量検知を試みた (Fig. 5). ポリオウイルス 1 型 (Polio type 1) 分離陽性検体 (糞便) によると、競合 RNA による産物、被検試料 RNA による産物、それぞれのシグナル強度が同等となる被検試料希釈度は 10^{-1} であった. 逆算して当該試料原液はポリオウイルス RNA 10^4 筒を含むものと推定した. 以下同様にエコーウイルス 30 型 (Echo 30, CSF)/シグナル強度同等希釈度 10^{-3} /原試料ウイルス RNA 10^6 筒; A 群コクサッキーウイルス 9 型 (Coxsackie A9, CSF)/シグナル強度同等希釈度 10^{-2} /原試料ウイルス RNA 10^5 筒; B 群コクサッキーウイルス 5 型 (Coxsackie B5, CSF)/シグナル強度同等希釈度 10^{-3} /原試料ウイルス RNA 10^6 筒; エンテロウイルス 70 型 (Enterovirus 70, 咽頭拭い液)/シグナル強度同等希釈度 10^{-3} /原試料ウイルス RNA 10^6 筒; ライノウイルス 1 型 (Rhino, 咽頭拭い液)/シグナル強度同等希釈度 10^{-1} /原試料ウイルス RNA 10^4 筒, と推定した.

考 察

エンテロ, ライノ両ウイルス共通, 単一プライマーセット P3-P5, または P4-P5 使用 RT-PCR により, 両属ウイルス RNA を産物分子サイズ差により識別検知することができた. ライノウイルス遺伝子 RNA がエンテロウイルスのそれに比べ 5'-NTR 3' 側において約 120 塩基長欠落することを利用, 当欠落区域を増幅対象領域に含めたことによる. この目的のため 5' 側プライマー P3, 並びに P4 は 5'-NTR 内, 但し当該欠落領域より 5' 側, 両属ウイルスを通じ高度相関率 95% 以上対応 20 塩基配列とした. また, 3' 側逆転写プライマー P5 は VP4 領域内, 両属ウイルスを通じ相対的高度相同 20 塩基配列対応とし (Fig. 1), 加えて逆転写反応温度を比較的低温 37°C に設定, 反応開始時, プライマー/RNA・アニーリングを容易とした. 逆転写プライマー対応塩基配列が両属ウイルスを通じ高度相同とは言え, 相関率 60% 台に止まるものがあることによる.

プライマーセット P3-P5 によると, エンテロウイルス 43 種 RNA は全て約 460 塩基長 DNA 相当単一バンドシグナル, またライノウイルス 8 種のそれは例外なく約 340 塩基長 DNA 相当単一バンドシグナルとして検知された. 同様にプライマーセット P4-P5 によると, エンテロウイルス 43 種 RNA は全て約 340 塩基長 DNA 相当単一バンドシグナル, またライノウイルス 8 種のそれは例外なく約 220 塩基長 DNA 相当単一バンドシグナルを与えた. それぞれのプライマーセットによ

る増幅産物塩基長は当初の理論予想値によく一致する (Fig. 1, 3). 両プライマーセットによると, 非特異対照 6 種ウイルス (A 型肝炎ウイルス, B 型肝炎ウイルス, C 型肝炎ウイルス, サイトメガロウイルス, 単純ヘルペスウイルス 1 型, 及び水痘帯状疱疹ウイルス) は全く増幅シグナルを与えなかった. さらに, 増幅産物特異性確認のためポリオウイルス 3 血清型, A 群コクサッキーウイルス 1 血清型, B 群コクサッキーウイルス 4 血清型, 固有エンテロウイルス 1 血清型, 並びにライノウイルス 1 血清型につき塩基配列解析を実施, それぞれの産物が標的配列自体を転写増幅したものであることを確認した (Fig. 4). 先述の如く, 逆転写プライマー対応配列相関率はエンテロ, ライノ両属ウイルスを通じ 60% 台に止まるものもあり, この値は反応系信頼度に不安を抱かせる. しかし, ここに述べた諸知見はこの不安を打ち消し, 実験条件において当検出系が対応ウイルス配列を特異的に増幅検知することを示すものであった. 全てのメンバーについて検索したわけではないが, 設定したプライマーセット, P3-P5, P4-P5, 並びに実験条件により, 一部の例外を除き (後述), エンテロ, ライノ両属全ウイルス種 RNA を特異的に検出できるものと考え. 因みに, P3-P5, P4-P5 両プライマーセットの比較ではウイルス検知効率に明確な差は認められなかった. 等モル数の産物が同一泳動条件下に存在するとき, シグナル強度は分子サイズに比例, 増強する. 直接の感度比較は未検であるが, ここに述べた意味合いにおいて理論感度はプライマーセット P3-P5 によるものが P4-P5 のそれに勝るものと解する.

RT-PCR 法の基本原理は特定 RNA 配列の定性検知にあるが, その感度を利用, 定量検知も可能である. 2 種の技法, 希釈定量法と競合定量法が報告されている³¹⁾³²⁾. 本研究では競合定量法により, プライマーセット P3-P5 対応 RNA 分子 (但し内部 100 塩基配列順列重複保有) 10^3 筒を基準競合標品とし, 臨床試料 6 件を検索, Fig. 4 の結果を得た. この場合, 検体 RNA シグナル視認可試料最高希釈度は当検出系の感度を示す. これを同図より読み取るとき, それぞれの検体対応感度は, ポリオウイルス 1 型 (Polio type 1, 糞便)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-3} /当該希釈含有 RNA 分子数, つまり検知感度: 10^1 , 以下同様にエコーウイルス 30 型 (Echo 30, CSF)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-4} /当該希釈含有 RNA 分子数: 10^2 , A 群コクサッキーウイルス 9 型 (Coxsackie A9, CSF)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-4} /当該希釈含有 RNA 分子数: 10^1 ,

B群コクサッキーウイルス5型 (Coxsackie B5, CSF)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-4} /当該希釈含有 RNA 分子数: 10^2 , エンテロウイルス70型 (Enterovirus 70, 咽頭拭い液)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-3} /当該希釈含有 RNA 分子数: 10^3 , 並びにライノウイルス1型 (Rhinovirus, 咽頭拭い液)/シグナル視認可試料最高希釈度: 10^{-2} /当該希釈含有 RNA 分子数: 10^2 , となる。競合 RT-PCR による試料 RNA 分子数を基準とするとき, 当 RT-PCR 法による検知感度はウイルス RNA 分子数にして $10^1 \sim 10^3$ 箇と推定される。

検索エンテロウイルス44種, ライノウイルス8種の内, 唯一の例外としてエコーウイルス22型は増幅シグナルを与えなかった。以前, エンテロウイルスに分類されていたA型肝炎ウイルスについても増幅シグナルを認めなかった。両ウイルス遺伝子基本構造はピコルナウイルスのそれであるが塩基配列類似性検索によると両ウイルスは他のエンテロウイルスメンバーとは懸隔配列³³⁾³⁴⁾を示す(データ略)。先述の通り今回の RT-PCR 法感度は RNA 分子数にして $10^1 \sim 10^3$ 箇と予想される。Fig. 3 実験のため調製したエコーウイルス22型, 並びにA型肝炎ウイルス量は TCID₅₀ 値, $10^3 \sim 10^4$, 粒子数にして $10^5 \sim 10^6$ 箇, RNA 回収率を10%としても RT-PCR 試料は RNA $10^4 \sim 10^5$ 箇を含む筈である。当該両ウイルス検知不能は感度によらず, 設定プライマー・標的塩基配列懸隔によるものと解される。未検エンテロウイルス, ライノウイルスを含め, 本方法論現場適用に際し, 留意を要する点である。

当 RT-PCR 法の目的は臨床検体におけるエンテロ, ライノ両ウイルス属迅速検知にある。臨床検体96件を対象とし, プライマーセット P3-P5 により当法によるウイルス検知効率, 従来の細胞培養法によるウイルス分離効率を比較した。結果記載の通り, 脳脊髄液, 咽頭拭い液, 糞便, 並びに血清を通じ, RT-PCR 法によるウイルス検知が細胞培養によるウイルス分離法に勝ることを認めた。未検の組織試料, 水泡内容, 眼結膜擦過試料などに関しても事情は同じと解される。加えてエコーウイルスの一部, また一般にライノウイルスはその分離に特殊の培養細胞(前者/ヒト胎児細胞; 後者/ヒト胎児肺繊維芽細胞)を要し, 実験室診断を業務とする研究室, 機関においてもその分離は容易ではない。これに対し, 当 RT-PCR 法感度は, 一部の塩基配列懸隔ウイルス種を除けば, 両属ウイルスを通じウイルス種に拘るところがない。更に冒頭に述べた通り, 従来のウイルス分離法では結果判定に最低1週間を要するが, 当 RT-PCR 法によると試料調製から判定に到る連続操作により24

時間以内に結果を得ることができる。この点, 本方法論が細胞培養法に勝る最大の利点であることは言うまでもない。以上を総合勘案, 今回報告の RT-PCR 法は, 一部のウイルス種を除き, エンテロ, ライノ両属ウイルス迅速識別検知実験室診断法として十分一般化に耐えるものとする。

稿を終えるにあたりご校閲を賜りました濱田忠彌教授に深謝いたします。また臨床検体からのウイルス分離成績等についてご教示くださいましたエスアールエル社の池谷宏造氏, 引地一昌氏, 石井慶蔵前顧問に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) **Francki, R.I.B.:** Classification and nomenclature of viruses, Archives of Virology (Supplement 2). Springer-Verlag, 1991.
- 2) **Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.:** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350~1354, 1985.
- 3) **Hart, C., Schochetman, G., Spira, T., Lifson, A., Moore, J., Galphin, J., Sninsky, J. and Ou, C.Y.:** Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. Lancet, 2: 596~599, 1988.
- 4) **Rotbert, H.A.:** Enzymatic RNA amplification of the enterovirus. J. Clin. Microbiol., 28: 438~442, 1990.
- 5) **Hyypia, T., Auvinen, P. and Maaronen, M.:** Polymerase chain reaction for human picornaviruses. J. Gen. virol., 70: 3261~3268, 1989.
- 6) **Rotbert, H.A.:** Nucleic acid detection system for enterovirus. Clin. Microbiol. Review., 4: 156~168, 1991.
- 7) **Glimaker, M., Abebe, A., Johansson, B., Ehrnst, A., Olen, P. and Strannegard, O.:** Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in faecal samples from patients with aseptic meningitis. J. Med. Virol., 38: 54~61, 1992.
- 8) **Zoll, G.J., Melchers, W.J.G., Kopecka, H., Jambrose, G., Poel, H.J.A. and Galama,**

- J.M.D.:** General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 160~165, 1992.
- 9) **Grasso, M., Arbustini, E., Silini, E., Diegoli, M., Percivalle, E., Ratti, G., Bramerio, M., Gavazzi, A., Vigano, M. and Milanesi, G.:** Search for Coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am. J. Cardiol.*, **69**: 658~664, 1992.
- 10) **Muir, P., Nicholson, F., Fhetam, M., Neogi, S. and Banatvala, J.E.:** Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 31~38, 1993.
- 11) **Abraham, R., Chonmaitree, T., McCombs, J., Prabhakar, B., Verde, P.T.L. and Ogra, P.L.:** Rapid detection of poliovirus by reverse transcription and polymerase chain amplification: application for differentiation between poliovirus and nonpoliovirus enterovirus. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 395~399, 1993.
- 12) **Thoren, A., Robinson, A.J., Maguire, T. and Jenkins, R.:** Two-step PCR in the retrospective diagnosis of enteroviral viraemia. *Scand. J. Infect. Dis.*, **24**: 137~141, 1992.
- 13) **Severini, G.M., Mestroni, L., Falaschi, A., Camerini, F. and Giacca, M.:** Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological sample. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 1345~1349, 1993.
- 14) **Nicholson, F., Meetoo, G., Aiyar, S., Banatvala, J.E. and Muir, P.:** Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *J. Virol. Methods.*, **48**: 155~166, 1994.
- 15) **Clements, G.B., McGarry, F., Nairn, C. and Galbraith, D.N.:** Detection of enterovirus-specific RNA in serum: the relationship to chronic fatigue. *J. Med. Virol.*, **45**: 156~161, 1995.
- 16) **Kammerer, U., Kunkel, B. and Korn, K.:** Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 285~291, 1994.
- 17) **Leparc, I., Aymard, M. and Fuchs, F.:** Acute, chronic and persistent enterovirus and poliovirus infections: detection of viral genome by seminested PCR amplification in culture-negative samples. *Mol. Cell Probes*, **8**: 487~495, 1994.
- 18) **Thoren, A. and Widell, A.:** PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.*, **26**: 249~254, 1994.
- 19) **Swanink, C.M.A., Melchers, W.J.G., Meer, J.W.M., Vercoulen, J.H.M.M., Bleijenberg, G., Fennis, J.F.M. and Galama, J.M.D.:** Enterovirus and the chronic fatigue syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, **19**: 860~864, 1994.
- 20) **Chapman, N.M., Tracy, S., Gauntt, C.J. and Fortmueller, U.:** Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 843~850, 1990.
- 21) **Petitjean, J., Kopecka, H., Freymuth, F., Langalard, J.M., Scanu, P., Galateau, F., Bouhour, J.B., Ferriere, M., Charbonneau, P. and Komajda, M.:** Detection of Endomyocardial biopsy by molecular approach. *J. Med. Virol.*, **37**: 76~82, 1992.
- 22) **Rotbert, H.A., Sawyer, M.H., Fast, S., Lewinski, C., Murphy, N., Keyser, E.F., Spadaro, J., Kao, S.Y. and Loeffelholz, M.:** Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a calorimetric microwell detection assay. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 2590~2592, 1994.
- 23) **Egger, D., Pasamontes, L., Ostermayer, M. and Bienz, K.:** Reverse transcription multiples PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1442~1447, 1995.
- 24) **Halonen, P., Rocha, E., Hierholzer, J., Holloway, B., Hyypia, T., Hurskainen, P. and Pallansch, M.:** Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 648~653, 1995.
- 25) **Johnston, S.L., Sanderson, G., Pattemore, P.K., Smith, S., Bardin, P.G., Bruce, C.B., Lambden,**

- P.R., Tyrrell, D.A.J. and Holgate, S.T.:** Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 111~117, 1993.
- 26) **Olive, D.M., Al-Mufti, S., Al-Mulla, W., Khan, M.A., Pasca, A., Stanway, G. and Al-Nakib, W.:** Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J. Gen. virol.*, **71**: 2141~2147, 1990.
- 27) **Chomczynski, P. and Sacchi, N.:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156~159, 1987.
- 28) **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 29) **Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. and Brow, M.A.:** DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 9436~9440, 1988.
- 30) **Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. and Bunn, H.F.:** Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2725~2729, 1990.
- 31) **Siebert, P.D. and James, W.L.:** Competitive PCR. *Nature*, **359**: 557~558, 1992.
- 32) **Innis, M.A.:** PCR Protocols, Academic Press, Inc., 1990.
- 33) **Hyypia, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. and Stanway, G.:** A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8847~8851, 1992.
- 34) **Stanway, G., Kalkkinen, N., Roivainen, M., Ghazi, F., Khan, M., Smyth, M., Meurman, O. and Hyypia, T.:** Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J. Virol.*, **68**: 8232~8238, 1994.

(平成9年2月3日受付)