

非ポリオエンテロウイルスの検査法

令和3年度 希少感染症診断技術研修会
急性弛緩性麻痺およびエンテロウイルス感染症

2022年2月17日（木曜日）14：00～14：20
ZOOM

国立感染症研究所 藤本 嗣人
Fujimoto Tsuguto₁

非ポリオエンテロウイルスと急性弛緩性麻痺 (AFP : Acute Flaccid Paralysis)

- AFPは急性に四肢の弛緩性運動麻痺を呈する疾患の総称。
- 非ポリオエンテロウイルスもAFPを起こすことがある。
- エンテロウイルス71 (EV-A71) やエンテロウイルスD68 (EV-D68) がその代表。
- 感染しても不顕性感染や軽症 (軽い風邪) の方が多いことが、病因学的な非ポリオエンテロウイルスの解釈を困難にしている。

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属の ヒトに病原性がある7つの種

エンテロウイルス属の7種

Enterovirus A (EV-A)

B (EV-B)

C (EV-C)

D (EV-D)

Rhinovirus A (RV-A)

B (RV-B)

C

- ・ 100を超える型を含む
- ・ ポリオウイルスはEV-Cに属する
- ・ EV-A71は脳炎を起こすことがあり、中国等ではワクチン開発・使用されている。

コクサッキーA, B, エコー, エンテロウイルス

エンテロウイルス68以前の型

コクサッキーウイルスA (CA)

- 生後数日のマウスに弛緩性まひ
- 手足口病やヘルパンギーナとの関連強い

コクサッキーウイルスB (CB)

- 生後数日のマウスに硬直性まひ
- 無菌性髄膜炎や新生児の劇症感染症と関連することがある

エコーウイルス (Echo)

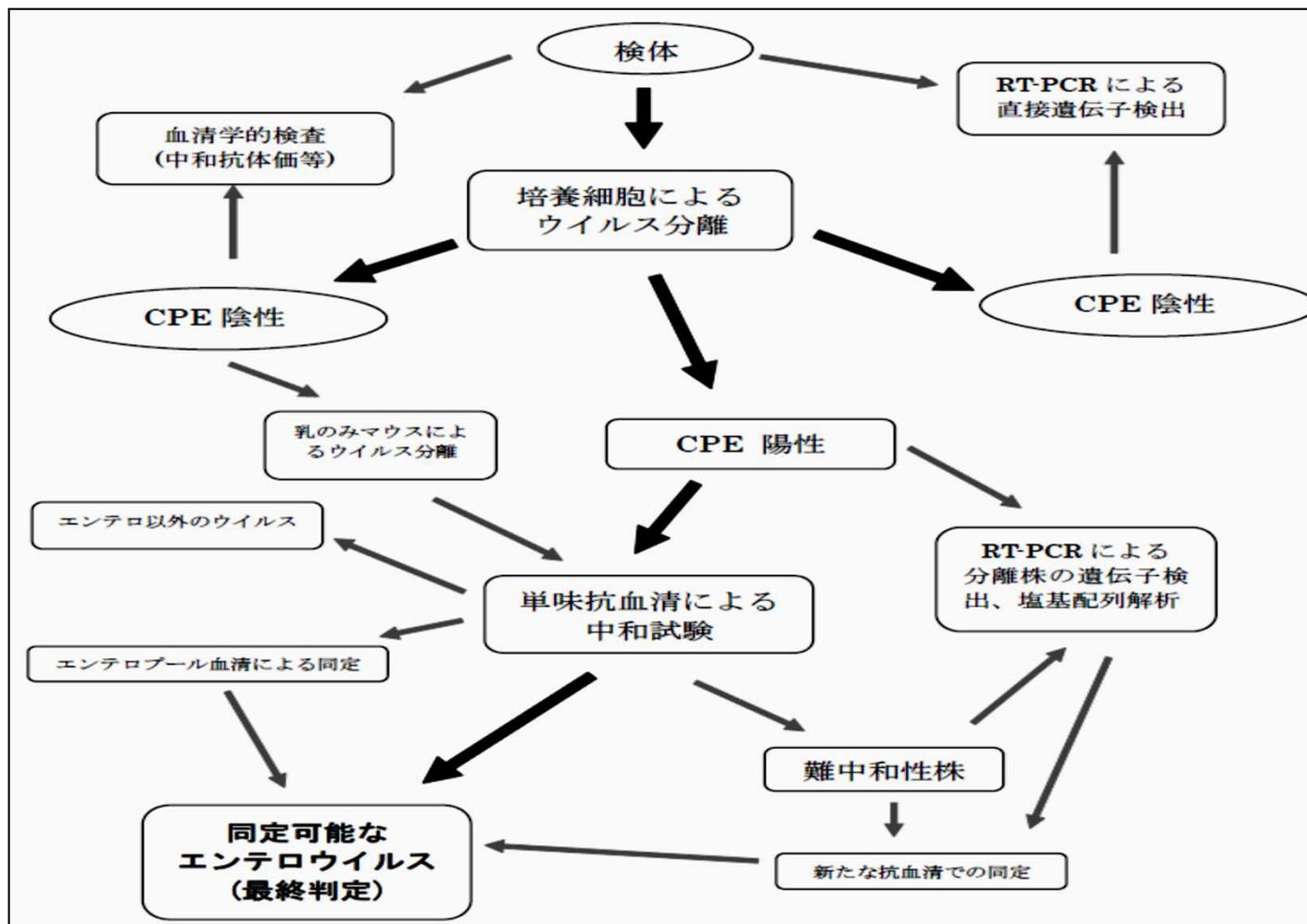
- 生後数日のマウスに注射しても無症状
- ヒトで6, 7, 9, 11, 25, 30型などは無菌性髄膜炎と関連

エンテロウイルス68(EV-D68)以降

- エンテロウイルスに型番をつけることシステムとなった(EV-XX)
- ヒトライノウイルス87およびエンテロウイルス68は、ライノウイルスおよびエンテロウイルスの特徴を有する
- Echo9とCA23が血清学的に同じ型

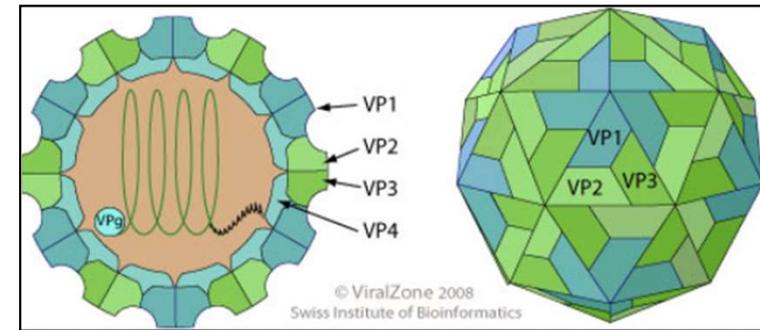
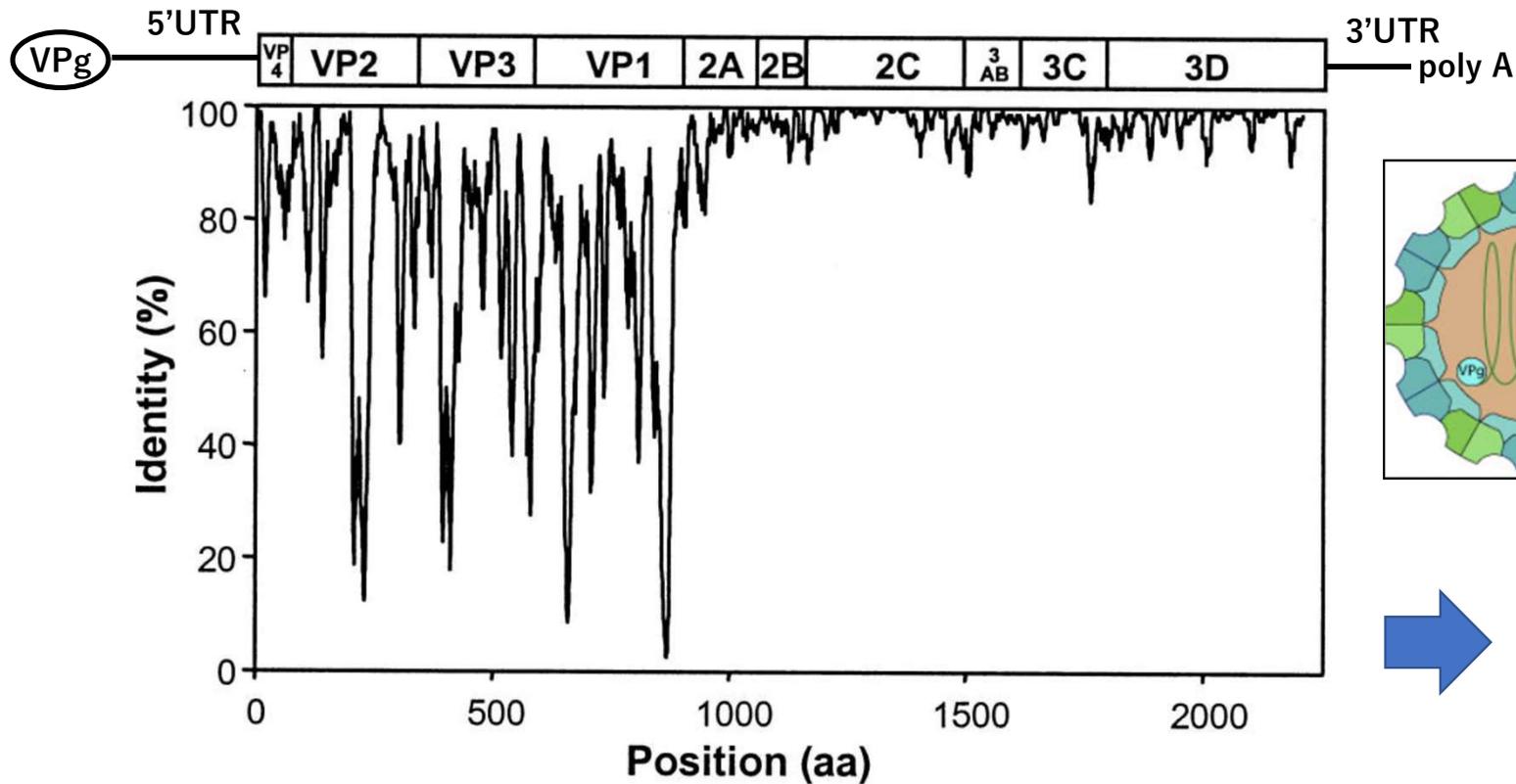
CV-A6 と EV-A71の“A”
意味が異なります

手足口病・検査の進め方(病原体検査マニュアル)



手足口病を引き起こす
CV-A6
CV-A16
エンテロウイルスA71
は、いずれも **EV-A**

エンテロウイルス構造 (模式図)



表面構造蛋白のは多様

(Oberste, Maher et al. 2004)

エンテロウイルスの主な検査法の変遷

ウイルス分離・中和反応による型別

5'-非翻訳領域によるPCR検出

VP4-VP2領域PCR検出・型別

VP1領域PCR検出・型別

利点

- 分離株を得る
- 感染性の証明

- 汎用
- リアルタイムPCRに適用可

- 感度が高い
- RV鑑別的検出 (EVとサイズ差)

- 型別の基準明確
- 国際的な標準法

欠点

- 時間がかかる
- 型、遺伝子型により細胞感受性が多様。

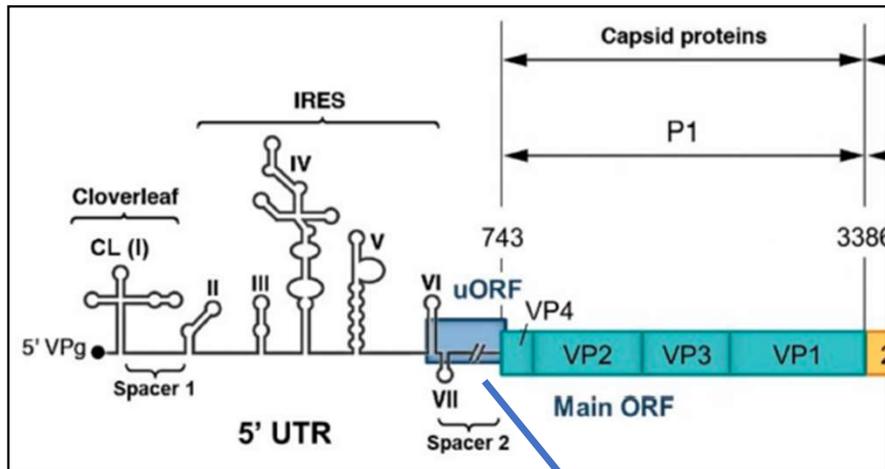
- 型別できない

- Enterovirus B, Cで型別できないことあり。

- VP1領域は変異多
- PCR感度が低下する可能性に留意

5'非翻訳領域

5'UTRの長さは約740ヌクレオチドで、**高度に保存された7つのステムループドメイン** (I~VII) を含み、2つの機能ユニットを形成。



(Muslin, Kain et al. 2019)

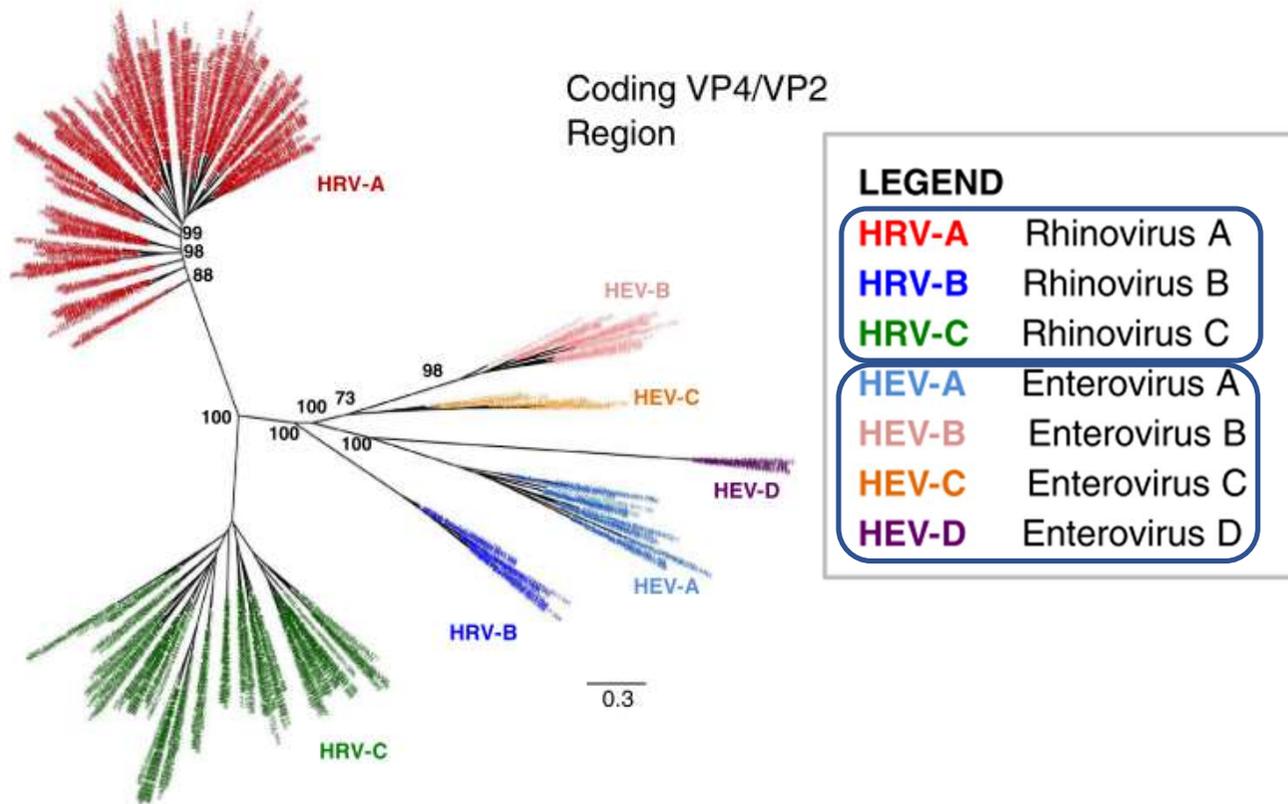
2019年に新たなORF発見された
(Lulla, Dinan et al. 2019)

市販されているエンテロウイルス検出検査系は、5'非翻訳領域を使用

⇒ エンテロウイルスとライノウイルスを鑑別できない。

(ライノウイルスを検出できる)

VP4/VP2領域の系統樹



(Garcia, Espejo et al. 2013)

エンテロウイルス属を構成する15種のうち、7種にはヒトのウイルスが含まれている。

エンテロウイルスA~D
(EV-A~D) と
ライノウイルスA~C (RV-A~C)

(Perera, Shimizu et al. 2010)

エンテロウイルス検査実施状況(近畿地区、2015)

地研数	14	府県&政令指定都市	10
HEV検査			10
遺伝子検査	方法	リアルタイムPCR	1
		コンベンショナルPCR	10
	増幅領域	VP1	6
		VP4-2	7
		VP1 + VP4-2	5
	シーケンス解析	片側	6
		両側	4
細胞分離			10
	分離後の同定	中和	7
		PCR + Seq	7
乳のみマウス			2
	分離後の同定	PCR + Seq	2

(近平, 藤本 et al. 2015)

VP4-VP2領域と型別

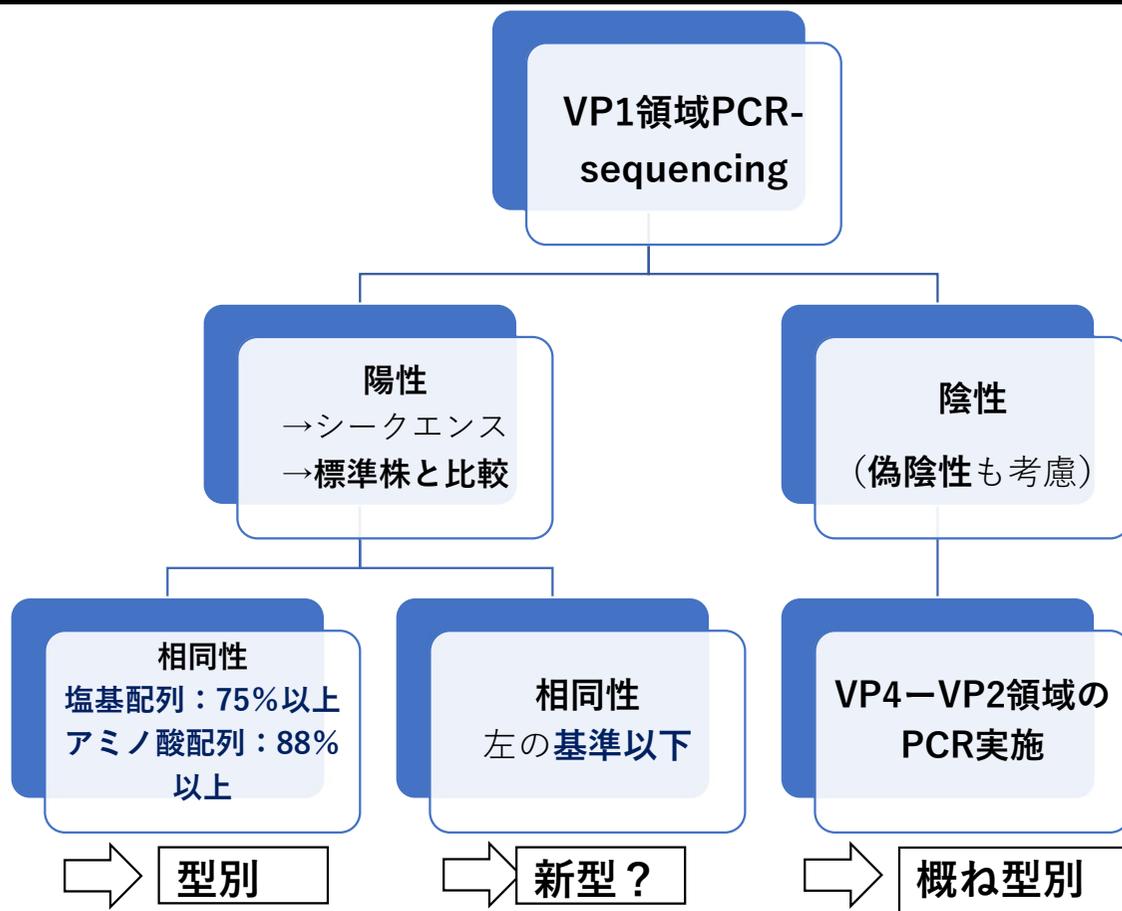
- VP4, VP2, VP1の各遺伝子領域のヒトエンテロウイルスのタイピングにおける有用性で評価.
- Enterovirus Aでは, 3つの遺伝子領域 (VP4, VP2, VP1) すべてにおいて **100%の一致が確認された。**
- Enterovirus BおよびCウイルスでは, VP4ではなく, **VP2とVP1の領域のみが, これらのウイルスのタイピングにおいて100%の一致**



- **VP4-VP2領域を使用したRT-PCRはこれまで多用されてきた。(病原体検査マニュアル)**
- ◎ **VP4領域のみでなくVP2領域も含めて解析する (アミノ酸に翻訳した相同性)**
- ⇒ エンテロウイルス、ライノウイルスの高感度検出・型別
- ◎ 高感度検出・型別を実施：陽性で型別
- ⇒ **VP1領域の配列で確認が望ましい**

(Perera, Shimizu et al. 2010)

VP1領域の配列によるPCR検査法の一例



明確なカットオフ値が設定されている

(Brown, Maher et al. 2009)

Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1

(Kroneman, Vennema et al. 2011)

オランダ:国立衛生環境研究所

CODEHOP VP1 RT-snPCR法

- 標準的なPCRプライマーは、既知のほとんどのヒトエンテロウイルスの血清型について、**VP1の3'末側の半分約450bp**を増幅する。
- 未知の血清型は、既知のヒトエンテロウイルスの**血清型のプロトタイプ株のVP1配列配列**と比較することで、推測する。
- 相同性のある株の**ヌクレオチド配列は互いに75%以上**一致していた（**88%以上のアミノ酸の同一性**）。

(Nix, Oberste et al. 2006)

VP1領域による検査の問題点：変異株への対応

2014年のEV-D68検出用にEV-D68
特定的リアルタイムPCRが開発され
ていた。

Wylie TN et al. **Development and Evaluation of an
Enterovirus D68 Real-Time Reverse Transcriptase
PCR Assay.** J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8): 2641-7.
doi: 10.1128/JCM.00923-15.



2014年の米国におけるAFM 多発時
に開発された検査法

(Wylie, Wylie et al. 2015)

2018年のEV-D68について：

CODEHOP法：

感度14% (3/22)

CDCが提案する別のPCR法：

感度50% (11/22)

**Ikuseらは2018年のEV-D68で、左
の方法で感度が非常に低いことを報告**

(Ikuse, Aizawa et al. 2021)(2報)

現状と課題

現状と課題

5'-非翻訳領域を用いたPCR法

- PCRキット市販されている
- RV/EV陽性として結果が出る
 - ライノウイルスとの鑑別できず
 - 型別できない

VP1領域を用いたPCR法

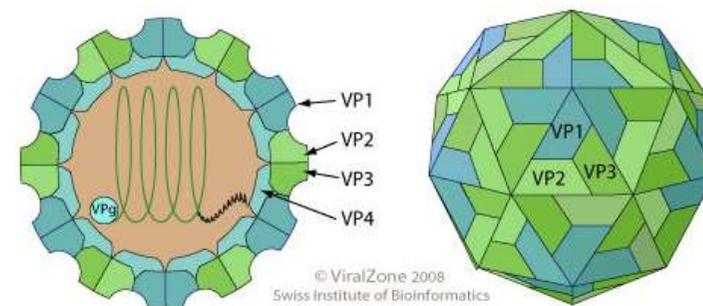
- 配列決定により型別可能
- 変異が多く偽陰性になりやすい
 - VP1領域を含むロングPCRは感度不十分

VP4-VP2領域を用いたPCR法

- PCRの検出感度が高い
- VP4領域配列を用いてきた
 - VP4に加えてVP2（部分配列）を用いて感度高い型別法確立の可能性

研究の予定（ゴール）

- 3種類の方法を比較(感度・型別結果)
- VP4-VP2領域方の改良・標準化
- 酵素等、試薬の最適化、キット化



まとめ

1. **非ポリオエンテロウイルスのうち、EV-A71やEV-D68はAFPと関連。**
2. **VP1領域の塩基配列決定によりエンテロウイルス型別が可能であるが、感度が悪いことがある。**
3. **VP4-VP2領域を用いた検出・型別法はEV・RVに感度が高く有用。**
4. **5'非翻訳領域を用いたPCR検査法はEV/RV検出法としてキット化されている（両者の区別できない）。**
5. **ダイレクトRT-PCRで検出・型別 ⇒ 迅速だが分離株が得られない。**
6. **効率的な検査に工夫が必要 ⇒ そのための研究を継続している。**