

RT-PCR によるエンテロウイルスの検出

菊地正幸 池田高明 土屋英保 大川一美 藤田晃三

要 旨

2003年6月から2003年10月までに採取された咽頭ぬぐい液等149検体について、培養細胞によるウイルス分離とともに、5'非翻訳領域とVP2領域に設計されたプライマーを用いたRT-PCR法によるエンテロウイルス(EV)遺伝子の検出、VP4領域の塩基配列解析による相同性検索および分離株間の多様性について検討した。

149検体中56検体からEVが分離され、RT-PCR法では分離された56検体を含む74検体からEV遺伝子が検出された。54検体について塩基配列を決定してBLAST検索を実施したところ、エコーウイルス6型を除きGenBankに登録されている分離株と91.8%以上の相同性を示した。各血清型の分離株間の相同性はコクサッキーウイルスA10型(CA10)を除き99.0%以上とほぼ同じウイルスと考えられた。CA10については2つのグループに分類されるウイルスが流行していたと思われる。

ウイルス分離により血清型が同定された検体すべてについてEV遺伝子が検出されたことから、今回使用したプライマーはEVのスクリーニングに有効であると考えられる。また、塩基配列の解析から一部の血清型を除き同定可能であり、ウイルス検査の迅速性を高める上で有用と考えられる。

1. 緒 言

ピコルナウイルス科に属するヒトに感染するエンテロウイルス(EV)は、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、心筋炎、急性出血性結膜炎、上下気道炎、急性灰白髄炎等の多様な疾患を引き起こす、A群コクサッキーウイルス(CA)、B群コクサッキーウイルス(CB)、エコーウイルス(E)、EV68~71、ポリオウイルス(Polio)の一群のウイルスで構成されており、64種類の血清型が知られている¹⁾。

手足口病やヘルパンギーナは毎年夏季に小児および乳幼児を中心に流行する感染症であり、その起因ウイルスは、EV71、CA16および他のCA等のEVである。また、その他のEVも含め無菌性髄膜炎を引き起こすこともある。近年、手足口病の流行に伴う小児の死亡や脳炎等の重症例が報告され²⁻⁵⁾、流

行状況の監視や患者からの迅速なウイルス検出および同定が望まれている。

ウイルス検査は、従来から咽頭ぬぐい液等を検査材料として、培養細胞を用いたウイルス分離および型特異抗血清を用いた中和試験によって行われている。しかしながら、このような検査法には、EVの血清型が多く存在すること、また標準株に対する抗血清では同定できない難中和性の分離株も存在することから多大な労力および検査時間が必要とされる。また、培養細胞により分離できない場合が多々ある。

このような問題を解決するために、分子生物学的手法を用いたウイルス遺伝子の検出およびその塩基配列の相同性検索・系統解析による同定が試みられている⁶⁻¹¹⁾。

そこで本研究は、ウイルス検査における早期検出および検査の効率化等の有用性を検討することを目的として、咽頭ぬぐい液等の検体から RT-PCR 法による EV の遺伝子検出および同定を行い、培養法の結果と比較検討した。

2. 方法

2-1 材料

2003年6月から2003年10月までの間に当所に搬入された、感染症発生動向調査病原体定点である市内医療機関（小児科 10定点、内科 4定点）を受診した患者から採取された142検体（咽頭ぬぐい液139検体、鼻汁1検体、髄液2検体）および無菌性髄膜炎と診断された患者から採取された髄液7検体の合計149検体を検査材料とした。

2-2 ウイルス分離

検査材料をKB、RD-18S、RD-A、およびVero細胞に接種し、36℃で培養した。細胞変性効果（cytopathogenic effect : CPE）を確認後、国立感染症研究所分与の抗血清およびデンカ生研製エンテロウイルス抗血清を使用して中和法により同定した。

アデノウイルス（Ad）はKB細胞でCPEを確認した後、国立感染症研究所分与の抗血清およびデンカ生研製アデノウイルス抗血清を使用した中和法により血清型別を行った。

単純ヘルペスウイルス（HSV）はRD-18S細胞でCPEを確認後、ヘルペス（1・2）FA試薬「生研」（デンカ生研）による蛍光抗体法により型別した。

2-2 RNA抽出

検査材料140μlからQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて、添付説明書に従いRNAを抽出した。

2-3 RT-PCR法

RT-PCR 法には QIAGEN OneStep RT-PCR Kit（QIAGEN）を用いて、50℃30分、95℃15分の反応後、94℃30秒、55℃30秒、72℃1分のサイクルを35サイクル行う1ステップのRT-PCR反応を行った。2nd

PCR反応はEx Taq（TaKaRa）を用いて94℃30秒、55℃30秒、72℃1分の条件を30サイクル行った。プライマーは、RT-PCR反応には、5′非翻訳領域（5′NTR）からVP2領域に設定されたEVP2とOL68-1、2nd PCR 反応には5′NTRからVP2領域の約650bpを増幅するEVP4とOL68-1をそれぞれ使用した。2%アガロースゲル電気泳動によりEV特異バンドを確認した。

2-4 塩基配列の決定

目的とするPCR産物が得られた検体について、アガロースゲル電気泳動を行い目的のバンドを切り出し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）によりサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）により塩基配列を決定した。得られた塩基配列はDNA Data Bank of Japan（DDBJ）のウェブサイト（<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>）においてBLAST検索を行った。系統樹解析は、GenBankに登録されている標準株および分離株のデータと合わせて配列情報解析ソフトDNASIS Pro 2.2（日立ソフトウェアエンジニアリング）を用いて近隣結合法により行った。系統解析の検定は、1000回のブートストラップ法により行った。

3. 結果

3-1 ウイルス分離

ウイルス分離の結果を表1に示す。149検体中69検体からウイルスが分離された。内訳はEVが56株（81.2%）、Adが12株（17.4%）、HSVが1株（1.4%）であった。EVの中では、E6（23株）およびE30（16株）が多く分離された。分離されたEVはEP95プール血清、デンカ生研製プール血清あるいは単味抗血清にて中和された。

3-2 RT-PCRによる検出

149検体中74検体からRT-PCRによりEVの特異バンドが検出された。EVが分離同定された56検体についてはすべて検出された。RT-PCRにより検出

された残りの18検体からはEVは分離されなかった（表2）。

表1 ウイルス分離成績

ウイルス	分離数
CA 4	2
CA 10	8
CB 4	2
CB 5	1
E 6	23
E 11	1
E 30	16
EV 71	1
Polio 1	2
小計	56
Ad 1	1
Ad 2	5
Ad 3	5
Ad 7	1
HSV 1	1
合計	69

表2 ウイルス分離とRT-PCRの結果

	PCR 陽性	PCR 陰性	計
EV 分離陽性	56	0	56
EV 分離陰性	18	75	93
計	74	75	149

3-3 相同性検索

EV 特異バンドが検出された74検体のうち54検体（EVが分離された40検体および分離されなかった14検体）についてPCR産物のダイレクトシーケンシングにより塩基配列決定し、VP4領域（207bp）について相同性検索を行った（表3）。

中和試験によりE30と同定された12検体について塩基配列を決定して比較したところ、11検体は100%一致し、1検体については1塩基のみ違いがあり、無菌性髄膜炎の発症の有無による差異はみられなかった。BLAST検索では、日本で分離されたE30（M214/98/Tokyo）と96.1～96.6%、標準株（Bastianni株、Accession No. AB061483）とは85.0～85.5%の相同性を示した。

CA10と同定された8検体については、各検体間の相同性が98.6～100%を示す6検体と99.5%の相同性を示す2検体の2グループに分かれた。全体としては87.9～100%の相同性を示した。相同性検索を実施したところ、前者のグループは2003年に日本で分離されたCA10（P-2211/CA10/Kanagawa/2003）と97.1～97.6%、後者が同様に2003年に分離されたCA10（P-2267/CA10/Kanagawa/2003）と99.5%の相同性を示した。標準株（Kowalik株、Accession No. AB061450）とは、前者が75.8～77.8%後者が73.4～74.4%の相同性であった。

E6と同定された14検体については、13検体は100%一致し、1検体は1塩基のみ異なっていた。BLAST検索では、トルコで分離されたE12（Balikesir/T91/98）と84.1%と最も高い相同性を示し、次いで日本で分離されたE6（Chiba/93、Accession No. AB061506）と83.6%の相同性を示した。E6標準株（D'Amori株、Accession No. AB061470）とは82.6%の相同性を有していた。

2検体から分離されたCB4は99.0%の相同性を有しており、GenBank登録株との比較では、フランスで下水から分離されたCB4（isolate 11）と93.7%の相同性を示した。CB4標準株（JVB株、Accession No. X05690）とは82.1%の相同性であった。

CA4、CB5、E11およびEV71が分離された各1検体については、CA4（P-2372/CA4/Kanagawa/2003）と100%およびCA4標準株（High Point株、Accession No. AF117695）と86.0%の相同性、CB5（Istanbul/T92/98）と91.8%およびCB5標準株（Faulkner株、Accession No. AB061464）と80.7%の相同性、E11（Jena 799/2002）と92.8%およびE11標準株（Gregory株、Accession No. X80059）と79.7%の相同性、EV71（shzh03-58）と97.6%およびEV71標準株（BrCr株、Accession No. U22521）と83.6%の相同性を各々示した。

表3 VP4 領域(207bp)の相同性検索の結果

検体 No.	検体 ^a	臨床診断名	中和試験	相同性の最も高い GenBank 登録株	相同性	Accession No.
20034176	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034181	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034183	TS	急性上気道炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034189	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034190	TS	急性上気道炎	CA10	CA10(P-2267/CA10/Kanagawa/2003)	99.5%	AB162743
20034192	TS	急性上気道炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034201	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034209	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034210	TS	急性上気道炎	CB5	CB5(Istanbul/T92/98)	91.8%	AB114146
20034213	TS	急性上気道炎	- ^b	CA12(P-2200/CA12/Kanagawa/2003)	98.6%	AB126210
20034214	TS	手足口病	-	CA16(P-1757A/CA16/Kanagawa/2002)	100.0%	AB094784
20034215	TS	ヘルパンギーナ	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.6%	AB126206
20034217	CSF	胃腸炎	-	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034224	TS	手足口病	-	CA16(P-1757A/CA16/Kanagawa/2002)	99.5%	AB094784
20034226	TS	手足口病	-	CA16(P-1757A/CA16/Kanagawa/2002)	100.0%	AB094784
20034231	TS	胃腸炎	-	CA16(P-1757A/CA16/Kanagawa/2002)	100.0%	AB094784
20034234	TS	急性上気道炎	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.1%	AB126206
20034235	TS	急性上気道炎	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.1%	AB126206
20034245	TS	ヘルパンギーナ	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.1%	AB126206
20034246	TS	急性上気道炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034248	TS	ヘルパンギーナ	-	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.6%	AB126206
20034249	TS	手足口病	-	CA16(P-1757A/CA16/Kanagawa/2002)	100.0%	AB094784
20034251	TS	ヘルパンギーナ	-	CA12(P-2200/CA12/Kanagawa/2003)	100.0%	AB126210
20034252	TS	手足口病	EV71	EV71(SHZH03-58)	97.6%	AY895135
20034264	TS	急性上気道炎	E11	E11(Jena799/2002)	92.8%	DQ092796
20034267	TS	ヘルパンギーナ	-	CA12(P-2200/CA12/Kanagawa/2003)	99.0%	AB126210
20034268	TS	ヘルパンギーナ	CA10	CA10(P-2267/CA10/Kanagawa/2003)	99.5%	AB162743
20034271	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034272	TS	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034284	TS	不明	-	EV71(1M/AUS/12/00)	97.1%	AY126014
20034285	TS	急性上気道炎	-	CA2(P-1248/CA2/Kanagawa/2001)	98.6%	AB094688
20034287	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034288	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034289	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.5%	AB114145
20034291	TS	咽頭結膜熱	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034295	TS	不明	CA4	CA4(P-2372/CA4/Kanagawa/2003)	98.6%	AB162740
20034297	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034298	TS	急性上気道炎	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.6%	AB126206
20034300	TS	急性上気道炎	-	CA12(P-2200/CA12/Kanagawa/2003)	100.0%	AB126210
20034304	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034312	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034314	TS	ヘルパンギーナ	CA10	CA10(P-2211/CA10/Kanagawa/2003)	97.1%	AB126206
20034315	TS	インフルエンザ	-	CA10(P-2267/CA10/Kanagawa/2003)	100.0%	AB162743
20034319	TS	不明	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034326	TS	急性上気道炎	CB4	CB4(isolate 11)	93.7%	AF160086
20034327	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034333	TS	急性上気道炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845
20034370	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034371	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034375	TS	急性上気道炎	CB4	CB4(isolate 11)	93.7%	AF160086
20034376	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
20034377	TS	急性上気道炎	E6	E12(Balikesir/T91/98)	84.1%	AB114145
2003CS1	CSF	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.1%	AB058845
2003CS7	CSF	無菌性髄膜炎	E30	E30(M214/98/Tokyo)	96.6%	AB058845

^aTS: 咽頭ぬぐい液、CSF: 髄液. ^b- : ウイルス分離陰性.

ウイルス分離陰性で RT-PCR 法により EV 遺伝子が検出された 14 検体について同様に相同性検索を行った結果、5 検体は CA16 (P-1757A/CA16/Kanagawa/2002) と 99.5 ~ 100%、4 検体は CA12 (P-2200/CA12/Kanagawa/2003) と 98.6 ~ 100% の相同性を示した。残りの 5 検体の内訳は、中和試験で CA10 と同定された検体と同一の塩基配列であった 2 検体 (CA10 (P-2211/CA10/Kanagawa/2003) と 97.1%、CA10 (P-2267/CA10/Kanagawa/2003) と 100% の相同性を示した各 1 検体)、E6 が分離された検体と同一の塩基配列であった 1 検体、CA2 (P-1248/CA2/Kanagawa/2001) と 98.6% の相同性を示した 1 検体

および EV71 (1M/AUS/12/00) と 97.1% の相同性を示した 1 検体であった。

3-3 系統樹解析

現在、標準株および複数の分離株の VP4 領域 (207bp) の塩基配列が GenBank に登録されている CA10 について、登録データ (表 4) と今回決定した塩基配列を用いて系統樹解析を行った (図 1)。

CA10 が分離された 8 検体および RT-PCR でのみ検出された 2 検体の計 10 検体は 2 つのクラスターに分かれた。

表 4 系統樹解析に用いた CA10 株

GenBank 登録株	Accession No.
Mie/90	AB053291
Kowalik	AB061450
Aichi/306/92	AB061502
V-16469/CA10/Kanagawa/1999	AB094769
P-700/CA10/Kanagawa/2000	AB094770
Sivas/T52/K01	AB114142
P-2206/CA10/Kanagawa/2003	AB126205
P-2211/CA10/Kanagawa/2003	AB126206
P-2257/CA10/Kanagawa/2003	AB126207
P-2233/CA10/Kanagawa/2003	AB162741
P-2252/CA10/Kanagawa/2003	AB162742
P-2267/CA10/Kanagawa/2003	AB162743
P-2283/CA10/Kanagawa/2003	AB162744
P-2297/CA10/Kanagawa/2003	AB162745
HC77csf/CA10/Kanagawa/2003	AB162746
Aichi/421/92	AB167759

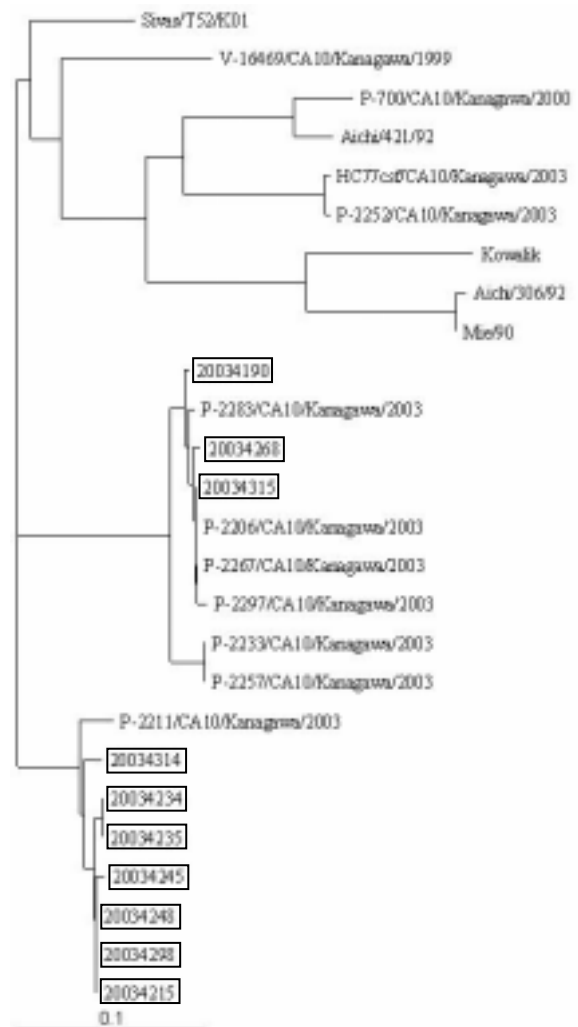


図 1 CA10 の VP4 領域 (207bp) を用いた系統樹解析

4. 考 察

札幌市における感染症発生動向調査病原体検査¹²⁾では、2003年4月から9月に急性上気道炎やヘルパンギーナと診断された患者からCA10が12株分離された。同時期の2003年4月から10月に急性上気道炎や無菌性髄膜炎患者の検体からは18株のE30が分離された。7月から11月にはE6が多く分離され合計30株が分離された。その他のEVは各々1~2株のみ分離されており、2003年のEVの流行は上記3種類のウイルスが主流であった。手足口病の患者からはEV71が1株のみ分離されたが、RT-PCR法および遺伝子解析では、EV71が1検体、CA16が4検体から検出され、札幌市における2003年の手足口病の主な原因ウイルスはCA16であったと考えられる。

中和試験により血清型が同定された検体について、VP4領域の塩基配列を決定して相同性(BLAST)検索を実施したところ、一部を除いてGenBankに登録されている同じ血清型の分離株と最も高い相同性を示した。

E6については、今回検出された他のEVと比較して高い相同性を示す株が登録されておらず、血清型の異なるE12分離株が最も高い相同性(84.1~84.5%)を示した。E6としては、1993年に千葉県で分離された株と83.6~84.1%の相同性を示した。E6のVP4領域の登録株が少ないために相同性検索により同定することは困難であり、中和試験により血清型が決定された分離株についてより多くの塩基配列の情報が必要と考えられる。

E30について、今回VP4領域の塩基配列を決定した12検体のうち8検体が無菌性髄膜炎と診断された患者から採取された検体であったが、他の急性上気道炎患者の検体から検出されたE30と塩基配列の差異は無く、同一の遺伝子型であった。遺伝子型と病原性の関連は明らかにされておらず、今後の研究が期待される。

本市において、2003年にヘルパンギーナ患者から最も多く分離されたのはCA10であり、全国的にもCA10が最も多かった¹³⁾。VP4領域の塩基配列が登録されている分離株には、2003年に神奈川県で分離された株が多く、これらも含め系統樹を作成したところ、大きく3つのクラスターに分類された。今回検出されたCA10は2003年分離株からなる2つのクラスターに分類され、異なる遺伝子型のCA10が混在していたと考えられるが、症状等の差異は認められなかった。

EVの遺伝子解析に用いられるのは主にVP1領域あるいはVP4領域であり、各々プライマーが設計されている。EVの構造タンパクであるVP4は、ウイルス粒子の内部に存在しているタンパク質であり、VP1はウイルス粒子表面に存在している。VP1は血清型を反映するウイルスの抗原性に関わる部分を含むため^{14,15)}、遺伝子解析による血清型の同定にはVP1領域の方が適しているといわれている¹⁶⁾。しかしながら、すべての血清型のVP1領域を増幅し得るプライマーの設定は困難であり、複数のプライマーの併用が必要とされる。今回使用した5' NTRとVP2領域に設計されたプライマー(EVP2、EVP4/OL68-1)は全標準株について目的とするバンドの増幅が確認されている⁷⁾。本研究においても、ウイルス分離により血清型が同定されたEV陽性検体すべてについて目的のバンドが検出された。このことから、これらのプライマーはEVのスクリーニングに適していると思われる。しかしながら、VP4領域における遺伝子解析では血清型分類が困難である場合もあり¹⁷⁾、より精度の高い同定にはVP1領域を対象とした遺伝子解析との併用が必要とされるかもしれない。

ウイルス検査による病原体検査の"gold standard"は分離培養であるが、ウイルス分離には時間がかかるため、遺伝子解析によるウイルス同定は迅速性を高める手段として有用で

ある。実際に、2001年に日本ではほとんど分離されていなかったE13が分離された際には通常使用している抗EVプール血清では同定されず、遺伝子解析によりE13と高い相同性を示したことを踏まえ、単味抗血清を用いた中和試験により同定されている¹⁸⁾。

本研究においてRT-PCR法でのみ検出されたCA16およびCA12などのCAの多くは培養細胞に対する感受性が低く、ウイルス分離には乳のみマウスを用いる検査が必要とされるが、多大な設備や労力を伴うものである。このことから遺伝子解析によるEVの同定法は非常に有効であり、検査法の標準化が望まれる。

5. 結語

2003年6月から2003年10月までに採取された咽頭ぬぐい液等149検体について、RT-PCR法によるEV遺伝子の検出、VP4領域の塩基配列の解析による相同性検索を実施した結果、EVが分離された56検体を含む74検体からEV遺伝子が検出され、今回使用した5' NTRとVP2領域に設計されたプライマー(EVP2、EVP4、OL68-1)はEVのスクリーニングに有効であると考えられた。EV特異バンドが検出された54検体について塩基配列を決定して相同性検索を実施したところ、E6を除く各血清型においてGenBankに登録されている分離株と高い相同性を示した。RT-PCR法によるEV遺伝子検査はウイルス検査の迅速性を高める有用な方法として期待される。

6. 文献

- 1) van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L. et al (ed) : Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 657-678, Academic Press, Inc., San Diego, 2000.
- 2) Lum, L. C. S., Wong, K. T., Lam, S. K. et

al : Fatal Enterovirus 71 Encephalomyelitis. J. Pediatr., 133, 795-798, 1998.

- 3) Ho, M., Chen, E.-R., Hsu, K.-H. et al : An Epidemic of Enterovirus 71 Infection in Taiwan. N. Engl. J. Med., 341, 929-935, 1999.
- 4) 塩見正司, 外川正生, 山崎謙治 他 : エンテロウイルス71型感染が原因で急死したと考えられた3症例 - 大阪市. 病原微生物検出情報(月報), 19, No.3(No.217), 55, 1998.
- 5) 藤本嗣人, 近平正嗣, 増田邦義 他 : エンテロウイルス71型による脳炎死亡例を含む手足口病の流行 - 兵庫県. 病原微生物検出情報(月報), 22, No.6(No.256), 144, 2001.
- 6) 石古博昭, 島田康司, 輿那覇麻理 他 : 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. 臨床とウイルス, 17, 283-293, 1999.
- 7) 石古博昭 : 手足口病を引き起こす2つのエンテロウイルスの遺伝子系統解析と迅速同定. モダンメディア, 45, 287-297, 1999.
- 8) Ishiko, H., Shimada, Y., Yonaha, M. et al : Molecular Diagnosis of Human Enteroviruses by Phylogeny-Based Classification Using the VP4 Sequence. J. Infect. Dis., 185, 744-754, 2002.
- 9) Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R. et al : Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. J. Clin. Microbiol., 37, 1288-1293, 1999.
- 10) Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R. et al : Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. J. Clin. Microbiol., 38, 1170-1174, 2000.
- 11) Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F. et al : Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. J. Gen. Virol., 82, 79-91, 2001.

- 12) 札幌市衛生研究所年報, 31, 7-10, 2004.
- 13) <特集>ヘルパンギーナ 2005年7月現在. 病原微生物検出情報(月報), 26, No.9(No.307), 235-236, 2005.
- 14) Rossman, M. G., Arnold, A., Erickson, J. W. et al : Structure of a Human Common Cold Virus and Functional Relationship to other Picornaviruses. *Nature*, 317, 145-153, 1985.
- 15) Mateu, M. G. : Antibody Recognition of Picornaviruses and Escape from Neutralization : a structural view. *Virus Res.*, 38, 1-24, 1995.
- 16) Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R. et al : Molecular Evolution of the Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J. Virology*, 73, 1941-1948, 1999.
- 17) 若月紀代子, 岩切章, 高尾信一 他 : エンテロウイルスの遺伝子解析に関する諸問題. 病原微生物検出情報(月報), 26, No.9(No.307), 237-238, 2005.
- 18) 菅野正彦, 慶野昌明, 平澤恭子 他 : 髄膜炎患者からのエコーウイルス13型の分離 - 福島県. 病原微生物検出情報(月報), 22, No.12 (No.262), 317-318, 2001.

Detection of Enteroviruses by RT-PCR

Masayuki Kikuchi, Takaaki Ikeda, Hideyasu Tsuchiya, Kazumi Okawa and Kozo Fujita

Throat swab and cerebrospinal fluid specimens from patients with aseptic meningitis, hand, foot and mouth disease, herpangina and acute upper respiratory infection were examined for the detection of enteroviruses (EV) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the primers to amplify the base sequence of the 5' nontranslated region (5'NTR) and the VP2 region as a part of Sapporo Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases from June 2003 to October 2003.

EV were isolated from 56 of the 149 samples in cell culture and typed by neutralization test. EV genes were detected in 74 specimens including all of culture-positive specimens. For 54 of 74 PCR-positive specimens, the complete VP4 nucleotide sequences were determined and compared with EV sequences published in GenBank. Except for echovirus type 6, VP4 sequences were at least 91.8% identical to one of the sequences of isolated viruses with the corresponding serotypes. The phylogenetic analysis indicated that coxsackievirus A10 strains isolated in Sapporo were classified into two genomic groups.

These results suggest that the detection of EV by RT-PCR using the primers for 5'NTR and VP2 region can be used as a screening tool and the VP4 nucleotide sequence may be helpful for the rapid identification of EV.