

結膜擦過検体における PCR 法によるアデノウイルス検出

布目博子 菊地正幸 吉田靖宏* 大木忠士
佐藤勇次 藤田晃三

要 旨

アデノウイルスの早期検出を目的として、PCR 法の有用性について検討した。

今回用いた、ヘキソン蛋白をコードする遺伝子 161 塩基対を増幅させるように設定したプライマーは、アデノウイルスに特異性が高く、分離培養法でアデノウイルスが分離された検体（結膜擦過物）はすべて直接行った PCR 法でも陽性であり、高い相関性を示した。

1. 緒 言

アデノウイルスは、ウイルス性結膜炎を起こす原因ウイルスとして知られており、札幌市における感染症サーベイランス眼科検体からも、毎年多数分離されている。

我が国における主要な結膜炎起因の血清型は、3,4,7,8,11,19,37 型であるが、アデノウイルス検出同定のための標準法である分離培養 - 中和同定法では、特に 8 型で細胞変性効果 (cytopathogenic effect:CPE) がおこりにくく、同定まで数週間を要する。札幌市では従来、アデノウイルス分離を目的として、8 代まで培養細胞による継代を行ってきたが、検査の効率化をはかるため、アデノウイルスの早期検出を目的とした PCR 法の有用性について検討したので報告する。

2. 材料および方法

2-1 材料

1995 ~ 1996 年度に感染症サーベイランス眼科検査定点である 5 医療機関を受診した結膜炎患者から採取した結膜擦過物 316 検体を対象とした。検体は、綿棒で擦過後、抗生物質加 Veal Infusion Broth:DIIFCO 2ml に浮遊させた後、-20 で保存した。

また、PCR 法に用いるプライマーのアデノウイルスに対する特異性を確認するため、11 種の血清型 (1 ~ 8,11,19,37 型) のアデノウイルス標準株および広島市衛生研究所から分与された 22 型臨床分離株、他にウイルス性の結膜炎の主要な起因ウイルスとされているエンテロウイルス 70、コクサッキーウイルス A24 変異株、単純ヘルペスウイルス 1 型も用いた。

2-2 ウイルス分離

アデノウイルスの分離培養には、KB 細胞、HeLa 細胞を用いた。CPE を確認後、中和法により血清型別を行った。8 代までの継代培養で CPE の認められなかったものを、分離培養陰性とした。

2-3 DNA 調整

結膜擦過物については、約 2ml の試料を 2000rpm 20 分間遠心した上清から 200 μ l を用い、4 で 14000rpm、40 分間遠心分離した沈殿物に、95 μ l の緩衝液 (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 0.5% Tween20) と、10mg/ml の ProteinaseK を 5 μ l 加えて 55 で 1 時間反応させた。その後、95 で 10 分間加熱して DNA テンプレートを調整した。

アデノウイルス標準株および臨床分離株は、KB

* 札幌市保健所

細胞に接種し、80%以上の CPE を確認した後、培養液の上清 200 μ l を用いて、結膜擦過物と同様に処理をし、DNA テンプレートを調整した。エンテロウイルス 70、コクサッキーウイルス A24 変異株、単純ヘルペスウイルス 1 型は、それぞれ RD-18S 細胞、KB 細胞、HeLa 細胞に接種し、同様に調製した。

2-4 PCR 法

プライマーは、ヘキソン蛋白をコードする遺伝子 161 塩基対を増幅させるように設定したものを使用した(表 1)¹⁾²⁾。

PCR は、検体から調整した DNA テンプレート 5 μ l を用い、0.2mlPCR チューブに滅菌蒸留水、10 倍濃度の Reaction Buffer, dNTPs, プライマー、Taq DNA polymerase を加え、全量 50 μ l となるように混合し、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000 を用いて、94 45 秒、61 20 秒、74 45 秒を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。

PCR 反応後、反応液 5 μ l を 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含有した 4% アガロースゲル (Nusieve 3:1 agarose) で電気泳動し、161 塩基対のバンドの有無を紫外線照射下で観察した。

表 1 PCR に使用したプライマーの塩基配列

増幅部位	増幅サイズ	名称	プライマーの塩基配列
Hexon	161bps	Primer-2	5'-TAC-GCC-AAC-TCC-GCC-CAC-GCG-CT-3'
		Primer-1	5'-GCC-GAG-AAG-GGC-GTG-CGC-AGG-TA-3'

3. 結果

11 種の血清型 (1~8,11,19,37 型) のアデノウイルス標準株および 22 型臨床分離株については、全ての血清型で 161 塩基対のバンドが確認された。アデノウイルス以外のウイルスの結果は陰性だった。

臨床検体から直接おこなった PCR の結果では、95 年度 113 検体、96 年度 203 検体の合わせて 316 検体中 143 検体 (45.3%) で陽性だった。一方分離

培養法では、316 検体中 135 検体 (42.7%) が陽性で、すべて PCR 法でも陽性であった(表 2、表 3)。

分離培養法でアデノウイルスが分離された検体の中で、最も CPE が確認されるまで日数を要した血清型は 8 型で、8 継代を要した 8 検体の 1 つで最長 56 日を要した(表 4)。

PCR 法で陰性だった検体はすべて、分離培養法でも陰性だった。

表 2 95 年度分検査結果

PCR 法	細胞培養法	
	+	-
+	60	2
-	0	51

表 3 96 年度分検査結果

PCR 法	細胞培養法	
	+	-
+	75	4
-	0	124

表4 アデノウイルス分離に要した細胞継代数

血清型	継代数							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3	2	5	1		1			
4		4	8	3	2	1		
7		6	5		1			
8		3	5	9	11	5	4	8
19		2	6	6	2			
37		2	6	37	20	9	2	
NT			1				1	3

NT : non-typable

4. 考 察

今回用いたプライマーは、アデノウイルスに対して高い特異性があり、PCR法の感度は高く分離培養法と高い相関性を示した。

結膜擦過物は尿や便検体と異なり、PCRを阻害する物質が少ないことから、今回のように比較的簡単なDNA調整法でも充分PCRが可能であり、DNA調整に要する時間は2時間弱であった。さらに分離培養法では、中和法まで含めると、結果が出るまでに最低2~3週間を要し、迅速性に欠けるのに対して、PCR法では判定に要する時間は1日程度と、短時間でウイルス-DNAを検出することができた。

また、CPEを確認するまでに7~8代の継代を必要とした場合でも、検体(結膜擦過物調製液)から直接行ったPCRの結果は陽性であり、PCR法陰性で細胞培養法陽性の検体は無いことから、継代数の点から検査の効率化をはかることが可能である。

今回の反応系では、アデノウイルスの血清型別はできないため、分離培養法は並行する必要があるが、PCR法によるアデノウイルスの早期検出は、簡便

かつ迅速な病因診断という観点からも有用と考えられる。

5. 結 語

アデノウイルスの早期検出を目的としたPCR法の有用性について検討した。

ヘキソン蛋白をコードする遺伝子161塩基対を増幅させるように設定したプライマーを使用したところ、分離培養法で陽性だった検体については、検出までに要した日数、継代数にかかわらずPCR法で陽性であり、高い相関性を示した。DNA調整からPCR産物の確認までに要する時間は1日程度であり、簡便かつ迅速にアデノウイルスを検出する上で有用である。

6. 文 献

- 1)野田 衛 他 : 臨床とウイルス 23(増刊号),225-230,1995
- 2)Hierholzer JC : J.Clin.Microbiol.31,1886-1891,1993.

Studies on Detection of Adenovirus from Eye Swabs Using the Polymerase Chain Reaction Method

Hiroko Nunome, Masayuki Kikuchi, Yasuhiro Yoshida^{*},
Tadashi Ooki, Yuji Sato and Kozo Fujita

The applicability of the polymerase chain reaction (PCR) method , using primers to amplify 161bps DNA fragment of the hexon-coding region , in detection of Adenovirus from eye swabs was studied. In a survey of specimens (direct extracts from eye swabs) tested by the PCR ,all positive specimens by cell culture were also positive by this method . These results show that the PCR method is useful in terms of rapidity in detection of Adenovirus from eye swabs.

^{*} Public Health Office of Sapporo City