

夏かぜ様疾患患者より分離された コクサッキー A 4 型と A 8 型ウイルスの重複感染事例について

近野真由美¹, 梅垣康弘¹, 宇野典子¹, 山崎謙治², 山中義雄¹, 唐牛良明¹

Co-infection isolates of Cocksackievirus type A4 and A8 from a summer flu patient

Mayumi KONNO, Yasuhiro UMEGAKI, Noriko UNO, Kenji YAMAZAKI,
Yoshio YAMANAKA, Yoshiaki KAROJI

Abstract : Two virus strains were simultaneously isolated from nasopharyngeal swab of a 2-year-old female patient with summer flu. We confirmed this finding with two step procedures. The virus strain isolated in suckling mice(ddY) inoculation became positive both to Cocksackievirus A type4(CA4) and type8(CA8), however, the second-passaged strain, became positive only to CA8 by the complement fixation test(CF). On the other hand, the virus strain isolated by the culture cell line was identified as CA4, both by the virus neutralization test and the DNA sequencing of the viral gene. From these results, we concluded that the patient was co-infected with CA4 and CA8.

Key words : コクサッキー A 4 型 Cocksackievirus type A4, コクサッキー A 8 型 Cocksackievirus type A8 , 重複感染 co-infection

I はじめに

2002年9月30日, 京都市感染症サーベイランス事業の定点病院で, 2歳女児の夏かぜ様疾患患者から発病日の咽頭ぬぐい液が採取, 搬入された。臨床症状としては発熱38.8℃で上気道炎症状があった。

この咽頭ぬぐい液から2つの型のウイルスが分離, 同定されたので報告する。

II 方法

1. 検体処理

咽頭ぬぐい液に3 mlの5% BPAを加え懸濁後, フィルターを通し検液とした。

2. ウイルス検査

FL, RD-18S, Vero, MDCKの4種の培養細胞及びddY系は乳マウスに接種し, ウイルス検査を行った。

3. 補体結合反応試験 (CF)

発症は乳マウスのトルソーをPBS 5 mlでガラスホモジナイザーを用いて20%乳剤とし, 凍結融解1回後遠心分離した。上清3 mlに同量の25%カオリン液を加え, 時々混和し, 20分間吸着させ, 遠心分離後, 上清をフィルターに通したものを検液とし, コクサッキー A 群 (CA 1~6型, 8型, 10型, 16型: 国立感染症研究所より分与, 12型: 島

根県保健環境科学研究所より分与) に対する抗血清を用いて行った。

4. 遺伝子検査

VP 1領域の解析法 (Oberste et al., CDC, USAの方法を改変)¹⁾を用いた。

1) ウイルス液

細胞に検体を接種後 CPE が80-100%現われたものをハーベストした。

凍結融解後遠心 (3,000rpm, 10分) し, 上清をウイルス浮遊液とした。

2) RNA抽出

RNA抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出した。

3) RT-PCR (one tube RT-PCR)

CDCが開発した汎エンテロプライマー (上流: 012, 040, 下流: 011)を用い, 下記のとおり RT-PCRを行った。

(1) 下記の反応組成に基づきマスターテーブル

【Access RT-PCR system (Promega: cat A1250)】を作製。

反応組成 (1検体当たり)

AMV/Tfl buffer	10 μ l
10mM dNTP	1 μ l
Sense-Primer (10 pmol/ μ l)	
012	2 μ l
040	2 μ l
Antisense-Primer (10 pmol/ μ l)	
011	4 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
AMV reverse transcriptase (5U/ μ l)	1 μ l
Tfl DNA polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
DW	24 μ l

1 京都市衛生公害研究所 微生物部門

2 大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス部

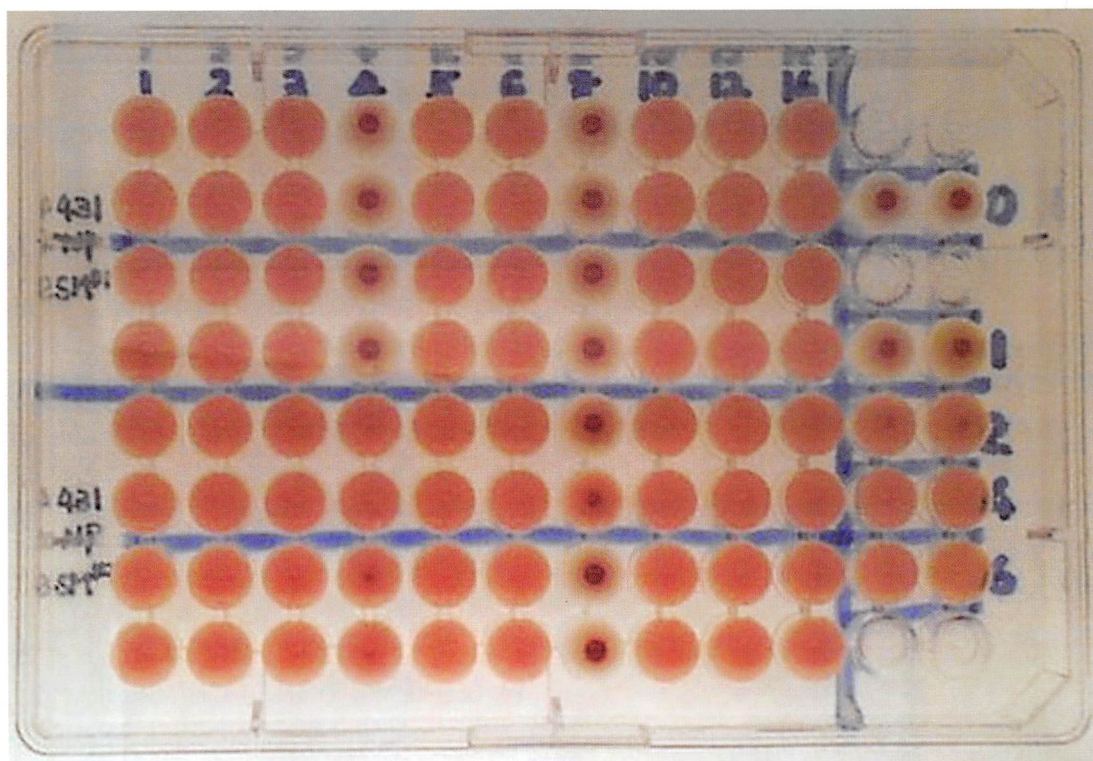


図1 CF結果
(上段：初代マウス結果 下段：2代目マウス結果)

(2) 抽出した RNA 溶液 $3 \mu\text{l}$ とマスターテーブル $47 \mu\text{l}$ を PCR 用チューブに加え混合した (最終容量 $50 \mu\text{l}$)。

(3) 下記の条件にて RT-PCR 反応を行った。

反応条件	48°C	45 min	
	94°C	2 min	
	94°C	10 sec	} ×35 cycle
	50°C	10 sec	
	65°C	1 min	
	65°C	5 min	
	4°C	∞	

(4) 反応終了後 PCR 産物 (457bp) を電気泳動で確認した。

4) プライマー

012 ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG

040 ATG TAY RTI CCI MCI GGI GC

011 GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA

M:A/C R:A/G W:A/T Y:C/T I:deoxyinosine

5) PCR産物の塩基配列解析

(1) PCR産物の精製

PCR 産物を電気泳動にて確認、PCR 産物の精製を行った。

(2) DyeDeoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル (ABI 310を使用)

反応組成 (1 検体当たり)

BigDye	8 μl
Primer(3. 2pmol)	1 μl
DW	9 μl
Template(30-90 ng)	2 μl

反応条件	96°C	45 min	
	96°C	10 sec	
	50°C	5 sec	} ×25 cycle
	60°C	4 min	
	4°C	∞	

(3) 蛍光ラベル産物の精製

(4) シーケンサーへのアプライ (ABI 310 シーケンサー)
乾燥した沈渣を用いるシーケンサーに基づいた loading buffer (TSR) に溶解してシーケンサーへアプライした。

(5) 塩基配列の解析

読みとった塩基配列を BLAST search でホモロジー検索を行った。

III 結果

培養細胞では RD-18Sのみ細胞変性効果 (CPE) が観察され、ウイルスが分離できた。

ほ乳マウスでも、3日目では弛緩性麻痺を全発症し、ウイルスを分離することができた。

CF試験の結果 CA 4 型, CA 8 型が陽性となり(図1),

どちらの型か確定できなかったので、RD-18S ウイルス液とほ乳マウスウイルス液について遺伝子検査を行った。また、2代目のマウスに継代した。

PCR の結果、RD-18S ウイルス液で得られた増幅産物のシーケンスは CA 4 型 (1734-099 strain AF290899) と塩基配列で95%、アミノ酸配列で98%の相同性があり、CA 4 型と同定された。ほ乳マウスウイルス液で得られた増幅産物のシーケンスは波形が混合しており解析することはできなかった。

2代目ほ乳マウスは、2日目で弛緩性麻痺を全発症し、CF 試験を行ったところ CA 8 型と同定できた (図1)。

シーケンスの結果と比較するために、RD-18S ウイルス液を用い、中和をコクサッキー A 群 (CA 1～8 型, 10 型, 16 型) に対する抗血清を用いて行ったところ、CA 4 型と同定できた。

IV 考察

RD-18S ウイルス液ではシーケンスと中和の結果で、どちらも CA 4 型となり結果は一致した。一方、ほ乳マウスの CF では、初代の検体で CA 4 型、CA 8 型の両方が陽性となり、2代目の検体で CA 8 型と同定された。PCR では増幅産物を得ることができたが、シーケンスでは解析できなかったことから、CA 4 型と CA 8 型の混合と考えた。したがって、今回の事例はコクサッキー A 4 型と A 8 型ウイルスの重複感染例と判断した。

従来の検査では CF で同定できれば、中和を行うことはなかったが、今回のようにウイルスの型によっては、細胞培養と動物培養とで増殖効率が異なることがあると推定されるので、重複感染が疑われるような場合は、中和等も行う必要があると思われる。

V 参考文献

- 1) Oberste MS, et al., J. Clin. Microbiol, 37 : 1288-1293, 1999