

26. 大阪府におけるアデノウイルス臨床分離株の分子疫学研究

○廣井 聡（大阪府立公衆衛生研究所）

【研究目的】

アデノウイルスは咽頭炎、角結膜炎、胃腸炎などさまざまな疾患の原因となり、すべての型は A 種から G 種のいずれかに分類される (1)。近年、アデノウイルス遺伝子の解析が進んだことによりリコンビネーションや変異による新しい型のアデノウイルスの出現が確認され、塩基配列解析による型別が血清型別に代わり主流となりつつある。その結果、アデノウイルスはこれまで知られていた血清型 1 型から 51 型に加えて新型である 52-54 型が ICTV（国際ウイルス分類委員会）により正式な型として認められ、さらに新型の候補（55-68 型）も報告されている (2,3)。

国立感染症研究所感染症疫学センター (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-idsc.html>) によると、小児科定点から毎年数万人の咽頭結膜熱患者が報告され、感染症発生動向調査における国内のアデノウイルスのサーベイランスで検出報告されているのは B 種および C 種が中心である (4)。大阪府でも呼吸器疾患および咽頭結膜熱患者の検体から B 種および C 種を中心としたアデノウイルスが検出され、血清型別を行ってきた。本研究では、呼吸器由来の臨床検体から分離され保存されているアデノウイルスを分子疫学的に解析することにより、大阪府内で検出されるアデノウイルスの種および型や流行の特徴を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1. ウイルス株

2008 年から 2012 年の 5 年間に大阪府の感染症発生動向調査事業（病原体サーベイランス）で、呼吸器由来の検体から当所で分離され保管されているアデノウイルス株および 2012 年の研究期間中に臨床検体から培養細胞を用いて分離したアデノウイルス株、計 76 株を対象とした。

2. 塩基配列の決定および解析

すべての分離株について自動核酸抽出装置 Magstration System 12GC（Precision System Science）を用いて核酸抽出を行った (5)。アデノウイルスの抗原決定領域であるヘキソン遺伝子の可変領域 loop1 を標的とする PCR（Polymerase Chain Reaction）は puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads（GE Healthcare）および Madish らのプライマーを用いた (6)。増幅産物は Freeze 'N Squeez DNA ゲル抽出スピнкаラム（Bio-Rad）で精製後、ABI 3130 genetic analyzer（Applied Biosystems）により各領域の両鎖の塩基配列を決定した。得られた各株

loop1 の塩基配列は BLAST 解析 (National Center for Biotechnology Information) により種および型を決定した。

さらに C 種および D 種の分離株については、ペントンベース遺伝子の RGD 領域およびファイバー遺伝子全長の PCR を既報および当所で作成したプライマーを用いて行った (7,8)。増幅産物の精製後、loop1 と同様の方法で塩基配列を決定し BLAST 解析を行った。得られた塩基配列は、MEGA5 ソフトウェア (9) を用いて型ごとにペントンベース、ヘキソン loop1 およびファイバー領域の系統解析を行った。系統樹は CLUSTAL W (DNA Data Bank of Japan) を用いて近隣結合法により作成した。

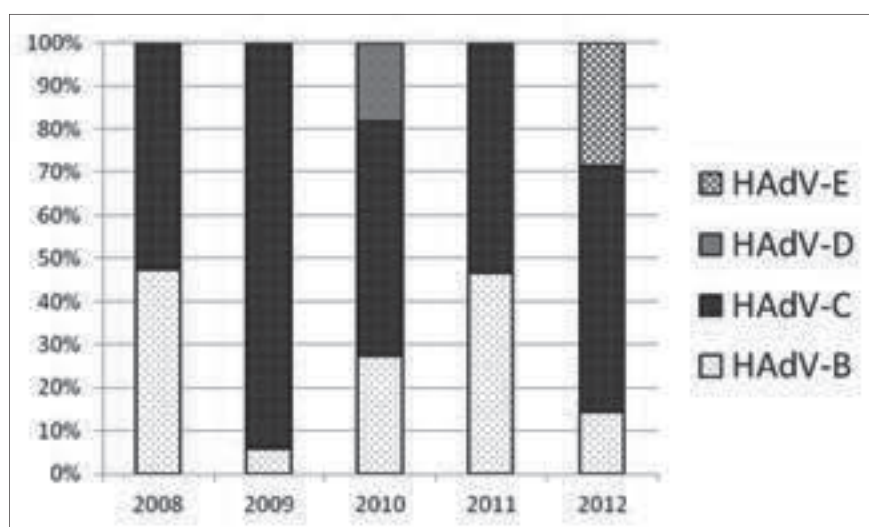


図 1. 大阪府で分離されたアデノウイルスの年別分布

【結果】

塩基配列解析の結果、2008 年から 2012 年の 5 年間に分離されたアデノウイルス分離株 76 株中、C 種 (48 株) が最も多く検出され、次いで B 種 (22 株)、E 種 (4 株)、D 種 (2 株) の順に検出された。B 種および C 種のアデノウイルスはすべての年で検出され、C 種はいずれの年も最も高い頻度で検出されているが、その割合は一定ではなく、年によっては B 種の割合が低下していた (図 1)。D 種は 2010 年に検出されているが、それ以前および以降は検出されていない。E 種は 2011 年まで全く検出されなかったが、2012 年に 4 株検出された。

型の内訳は、分離株数が多い順に C 種 2 型が 31 株 (39.5%)、B 種 3 型が 21 株 (27.6%)、C 種 1 型が 9 株 (11.8%)、C 種 5 型が 8 株 (10.5%)、E 種 4 型が 4 株 (5.3%)、D 種 3 型が 2 株 (2.6%)、C 種 6 型が 1 株 (1.3%)、B 種 7 型が 1 株 (1.3%) であった (図 2)。B 種は 2008 年に検出された 7 型の 1 株を除いてすべて 3 型であった。C 種は 1、2、5、6 型が検出され、さらにペントンベース、ヘキソン loop1 およびファイバー領域の解析によるリコンビナントウイルスの検索を行ったが検出されなかった。C 種各型の塩基配列は、い

れの遺伝子領域も分離年に関わらず同型株間での相同性は非常に高かった。D種の2株は各遺伝子領域の塩基配列から、2008年に国内で流行性角結膜炎患者から分離され、新型のリコンビナントウイルスとして報告されている53型であることが判明した(10)。その2株(220277/Osaka/2010 および 220304/Osaka/2010)のペントンベース、ヘキソン loop1 およびファイバー領域の塩基配列は、過去に国内で検出されている53型と相同であった(図3)。

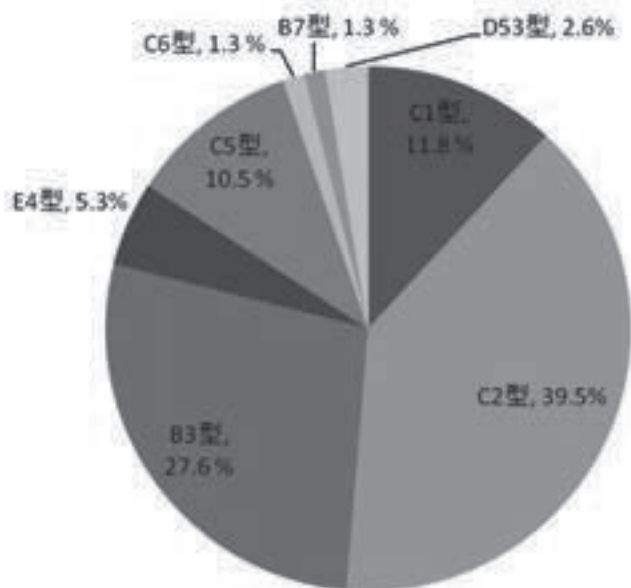


図2. 2008年から2012年に大阪府で分離されたアデノウイルスの型別割合

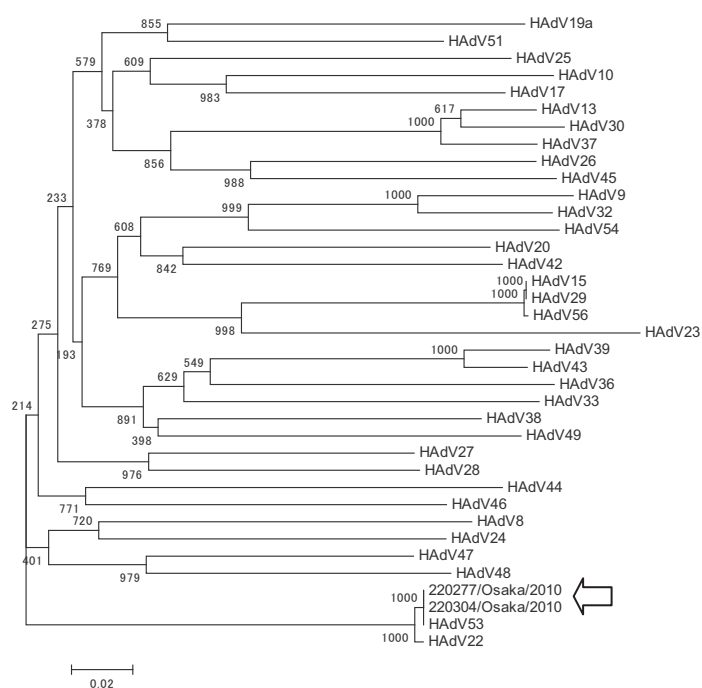


図3. D種分離株(矢印)のヘキソン loop1 領域の系統樹

【考察】

当所において2008年から2012年の5年間に呼吸器感染症由来の検体から分離されたアデノウイルスの分子疫学解析を行うことにより、その大阪府における流行状況が明らかとなった。主にB種およびC種アデノウイルスが検出され、特にC種2型とB種3型が流行の中心であることが確認された。さらに、2010年にD種53型が2株、2012年にE種4型が4株検出され、検出数は少ないながらB種やC種以外のアデノウイルスも稀に地域流行を起こしていると考えられる。

これまでアデノウイルスの型別は抗血清を用いた中和試験が中心に行われてきた。しかし、新型ウイルスの出現により世界的に遺伝子解析による型別が主流となっており、特にD種は新型が最も多く検出されている種であることからその型別には遺伝子解析が必須である。本研究でも遺伝子解析により、D種の分離株は新型アデノウイルスの1つである53型と判明した。D種の新型アデノウイルスは、日本国内では流行性角結膜炎の原因ウイルスとして感染の広がりが確認されているが(11)、本研究により呼吸器由来検体からも検出されることが確認された。また、本研究におけるC種の分離株の解析で新型は検出されなかったが、海外ではB種やC種の新型アデノウイルスによる感染が確認されている(12)。以上のことから、呼吸器由来の検体から分離されたアデノウイルスの型別や解析においてもリコンビナントウイルスである可能性が考えられる場合には、遺伝子を用いた型別が必要だと考えられる。

呼吸器感染症から分離されたアデノウイルスを解析した本研究により得られた結果は、アデノウイルス感染症の流行解析や型別方法の検討を行う上で有用である。新型アデノウイルスの出現により、その感染拡大や海外からの侵入を監視していく必要があり、今後も継続的なサーベイランスおよびウイルスの解析が重要である。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人 大同生命厚生事業団に感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Wold, W. S. M. and Horwitz, M. S. (2007). Adenoviruses. 2395–2436. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley, (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
2. Harrach, B., Benkő, M., Both, G., et al. (2011). Adenoviridae. 125-141. *In* A.M.Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz (ed.), *Virus taxonomy*, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Oxford, United Kingdom.
3. Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., et al. (2011). Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 11, 1208-1217.

4. Fujimoto, T., Hamamoto, I., Taniguchi, K., Chikahira, M. & Okabe, N. (2008). Molecular epidemiology of adenovirus type 3 detected from 1994 to 2006 in Hyogo Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61, 143-145
5. Hiroi, S., Koike, N., Nishimura, T., et al. (2011). Genetic Analysis of Human Adenovirus Type 54 detected in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 535-537.
6. Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., et al. (2005). Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J. Virol.*, 79, 15265-15276.
7. Xu, W., McDonough, M. C., Erdman, D. D. (2000). Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4114-4120.
8. Hiroi, S., Izumi, M., Takahashi, K., et al. (2011). Isolation and characterization of a novel recombinant human adenovirus species D. *J. Med. Microbiol.*, 61, 1097-1102.
9. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731-2739.
10. Aoki, K., Ishiko, H., Konno, T., et al. (2008). Epidemic keratoconjunctivitis due to the novel hexon-chimeric-intermediate 22,37/H8 human adenovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 3259-3269.
11. Ishiko, H. and Aoki, K. (2009). Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 2678-2679.
12. Walsh, M. P., Seto, J., Jones, M. S., Chodosh, J., Xu, W., & Seto, D. (2010). Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 48(3), 991-993.

【経費使途明細】

GE puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads×3	63,525 円
Freeze 'N Squeez DNA ゲル抽出スピンカラム×1	58,170 円
ABI BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit×1	118,650 円
ABI BigDye XTerminator×1	24,360 円
フィルターチップ (CLP Neptune)×5	31,815 円
細胞培養液 (Sigma MEM)×4	3,507 円
合計	300,027 円