

45. 流入水を用いた福岡県におけるアデノウイルスの分布状況の把握に関する研究

○吉富 秀亮 (福岡県保健環境研究所)

【研究目的】

アデノウイルスは A 種から G 種に分類され、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、肺炎及び感染性胃腸炎など様々な疾患を引き起こす^{1,2)}。2008 年以降、アデノウイルスの同定は血清型別に代わり、抗原性を決定する遺伝子領域の塩基配列解析による遺伝子型別が主流になったことにより、52 型以降の新型アデノウイルスが報告されている³⁾。福岡県においても感染症発生動向調査の一環としてアデノウイルスの分離を行い、血清型別と臨床病型別の集計解析を行ってきた。しかし、最近のアデノウイルス診断キットの普及により臨床材料の地方衛生研究所への搬入が減少し、分離株が得られない状況にある。また、感染症発生動向調査では対象疾患が限定されていることなどから、新型アデノウイルスを含むアデノウイルスの分布状況の全体像は十分に把握されていない。

一方、終末処理場で採取した流入水は顕性感染、不顕性感染を問わずウイルスを検出できる。流入水中のウイルス分布は市中の感染症流行を反映していると考えられており、諸外国では感染症の発生動向調査の基礎資料とされる⁴⁾。しかし、日本では流入水を対象としたアデノウイルスの調査例はほとんどなく、感染症発生動向との関連は明らかにされていない。福岡県においては終末処理場で採取した流入水の調査を 2010 年以降実施し、アデノウイルスの分離を行ってきた。そこで、本研究ではアデノウイルスの流行実態を明らかにすることを目的に、流入水から分離したアデノウイルスの解析を行い、感染症発生動向との関連を考察した。

【材料と方法】

1. 流入水からのアデノウイルス分離

検体は 2014 年 4 月から 2015 年 3 月までの期間において毎月 1 回、2 箇所終末処理場で採取された流入水合計 24 検体を用いた。流入水中ウイルスの濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」に準拠した。すなわち、流入水 1L を良く混和し、4℃で 3000rpm、30 分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、PH3.5 に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10mL の 3%ビーフエキストラクト存在下で誘出し、これをウイルス濃縮液とした。

A549 細胞は 5%ウシ胎児血清(Invtrogen,USA)存在下 Dulbecco's MEM (Sigma-Aldrich) 培地で培養した。96 ウェルプレートに A549 細胞を 0.1mL 播種後、濃縮液 10 μ L を 8 ウェルずつ接種し、37℃で培養した。接種から 10 日後、盲継代しさらに 10 日間観察し、細胞変性効果が見られたウェルの培養上清を分取した。さらに、Heim らの報告⁵⁾を参考に

表 1 に示すプライマー及びプローブを用い、TaqMan Universal PCR Master Mix (Life technologies)、及び Stratagene MX3005P リアルタイム PCR システム (Agilent Tehnologies) を用いて培養上清からアデノウイルス遺伝子の検出を行い、分離を確認した。

2. アデノウイルス分離株の塩基配列の決定及び遺伝子型分類

アデノウイルスの 3 つの抗原決定領域であるペントンベース遺伝子の RGD loop 領域、ヘキソン遺伝子の loop1 領域、及びファイバー遺伝子の Knob 領域について、Matsushima らの報告⁶⁾を参考にアデノウイルス分離株の塩基配列を決定した。得られた塩基配列は MEGA5 ソフトウェアを用いて、それぞれの遺伝子領域について参照株とともに系統解析を行い、近隣接合法または最尤法により系統樹を作成することにより、種及び遺伝子型を分類した。

【結果】

今回の調査において、流入水から分離されたアデノウイルスは合計 49 株であった。種別では C 種が最も多く 21 株、次いで A 種が 14 株、B2 種が 8 株、B1 種が 4 株、D 種が 2 株であった (図 1)。

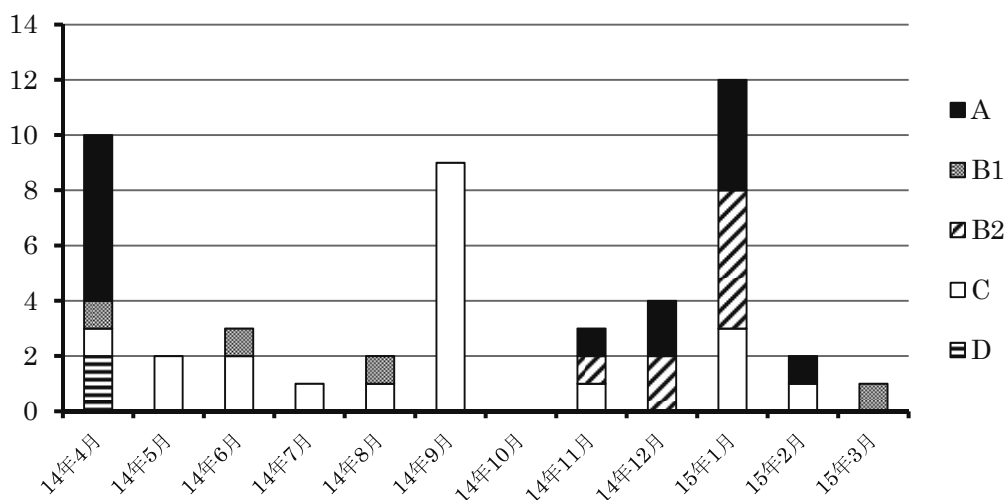


図 1. 流入水から分離されたアデノウイルスの種別・月別推移

抗原決定領域の遺伝子解析により、得られた分離株 49 株のうち 45 株は遺伝子型を分類できた。その内訳は、A 種 31 型 (P31/H31/F31) が最も多く 14 株 (28.6%)、次いで C 種 2 型 (P1/H2/F2) が 12 株 (24.5%)、C 種 5 型 (P1/H5/H5) が 5 株 (10.2%)、B1 種 3 型 (P3/H3/F3)、B2 種 11 型 (P11/H11/F7)、及び C 種 1 型 (P1/H1/F1) がそれぞれ 4 株 (8.2%)、そして、D 種 56 型 (P9/H15/F8) が 2 株 (4.1%) であった (図 2)。

49 株のうち 4 株は系統解析の結果、この分離株のペントンベース遺伝子及びファイバー遺伝子は 11 型に、ヘキソン遺伝子は 34 型に類似していたことから P11/H34/F7 に分類された (図 3)。この遺伝子の組み合わせは既報⁶⁾では分類できないことから B2 種 11 型類似株とした。この 4 株は同じ終末処理場から 2014 年 12 月及び 2015 年 1 月にそれぞれ 2 株

ずつ分離された。また、この分離株は 2010 年に韓国において検出された IC763 株（アクセッション番号：KF906413）と類似し、相同性はペントンベース遺伝子が 99.7%、ヘキソン遺伝子が 100%、ファイバー遺伝子が 99.8%であった。

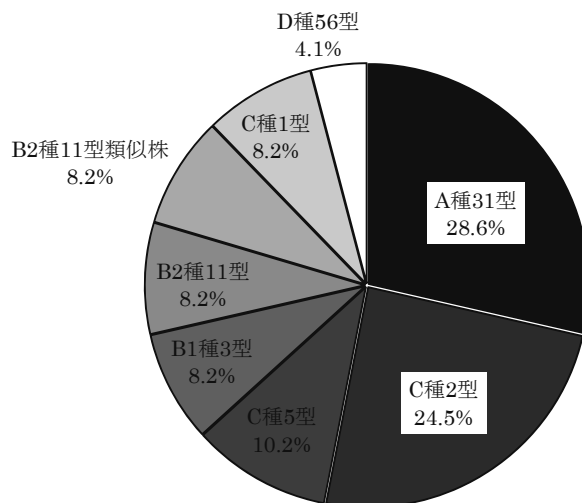


図 2. 流入水から分離されたアデノウイルスの遺伝子型別割合

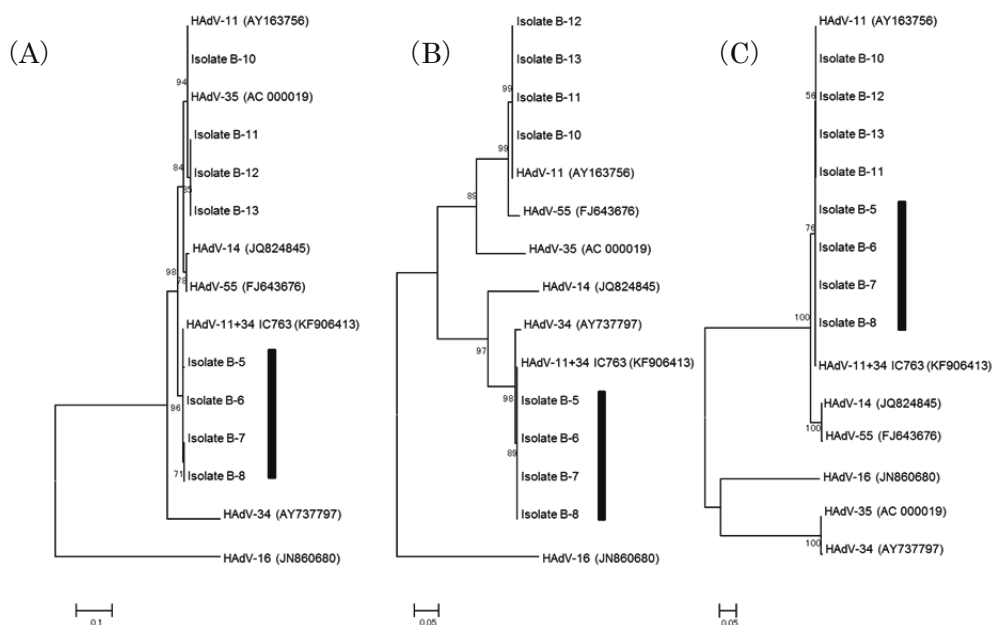


図 3. B2 種アデノウイルス分離株の系統解析結果（最尤法）

(A : ペントンベース遺伝子 285bp、B : ヘキソン遺伝子 573bp、C : ファイバー遺伝子 576bp)
P11/H34/F7 分離株は横に黒バーで示した。

【考察】

本研究により、流入水中に存在するアデノウイルスについて年間を通して消長を明らか

にすることができた。流入水からは A 種、B1 種、B2 種、C 種及び D 種アデノウイルスが分離され、特に A 種 31 型、C 種 2 型及び B1 種 11 型が今回の調査期間における主流株であったことが示唆された。さらに、C 種 5 型、B1 種 3 型、C 種 1 型及び D 種 56 型も数は少ないが検出されたことから、散発的に流行しているアデノウイルスが存在することが明らかになった。

流入水調査の結果と国立感染症研究所の集計する病原微生物検出情報 (IASR) ⁷⁾及び福岡県域の感染症発生動向調査 ⁸⁾の結果を比較すると、C 種 2 型がすべての調査において主な検出株であったことから、流入水調査は C 種の流行を発生動向調査と同様に調査可能であると考えられる。一方、C 種 2 型に次いで多く分離された A 種 31 型及び B1 種 11 型は、IASR においてそれぞれ 15 件及び 3 件しか報告されていない。また、D 種 56 型は 2011 年に流行性角結膜炎検体から検出されているが ⁹⁾、それ以降の県内の発生動向調査では検出されていない。これらのことから、流入水調査は臨床検体として十分な検体数が収集されていない、または、不顕性感染を引き起こしているアデノウイルスを対象とした調査が可能であることが示唆された。しかし、臨床検体からの検出数が多い F 種 41 型が流入水調査で分離されなかった点については、検出方法による検出感度として細胞の分離能を含めて今後の検討課題としたい。

アデノウイルスの型別は抗原性を決定する遺伝子領域の塩基配列解析による遺伝子型別が主流になり、Matsushima らの報告 ⁶⁾によると現在、67 種のアデノウイルスが存在する。本研究においても遺伝子型別をすべての分離株について行った結果、49 株中 45 株は分類可能であった。また、残る 4 株は 67 種の遺伝子型に分類されない B2 種 11 型に類似した P11/H34/F7 であった。このアデノウイルスは 2 ヶ月間に 1 つの終末処理場からのみ分離されたことから、短期的かつ地域的な流行があったことが考えられる。感染症発生動向調査では検出されていないため、不顕性感染であった可能性もありどのような臨床症状を呈するかは明らかではない。また、BLAST 検索により最も相同性が高かった IC763 株は、韓国において 2010 年に咽頭ぬぐい液から分離されたアデノウイルス 11 型と 34 型の遺伝子組み替え体として GenBank に登録されているが、臨床症状は明らかではない。今回分離された P11/H34/F7 は世界では 2 番目の報告であり、日本国内では初の報告である。今後、P11/H34/F7 がどのような臨床症状を引き起こすのかを明らかにするためにサーベイランスを継続して実施したい。

流入水から分離されたアデノウイルスの解析は日本国内ではほとんど報告がなく、本研究による成果は国内のアデノウイルス感染症の流行を捉える上で有用である。また、本研究で用いた遺伝子型別法は、世界的にほとんど報告のない新型アデノウイルスを検出し、これら新型アデノウイルスの海外からの侵入を監視する方法として有用であることが示されたことから、今後も継続して流入水調査を行うことが重要である。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深

謝致します。

【参考文献】

- 1) Wold, W.S.M.; Horwitz, M.S. Adenoviruses. In Field's Virology, 5th Edition; Knipe D.M., Howley P.M., Eds.; Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. 2007; 2395-2436.
- 2) Wadell, G. 1984. Molecular epidemiology of adenoviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110: 191–220.
- 3) Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3963–9.
- 4) WHO. (2011). Guidelines for drinking water quality (Vol. 4). Geneva: World Health Organization.
- 5) Heim, A., C. Ebnet, G. Harste, and P. Pring-Akerblom. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. J. Med. Virol. 2003; 70:228-239.
- 6) Matsushima Y1, Nakajima E, Ishikawa M, Kano A, Komane A, Fujimoto T, Hanaoka N, Okabe N, Shimizu H. Construction of new primer sets for corresponding to genetic evolution of human adenoviruses in major capsid genes through frequent recombination. Jpn J Infect Dis. 2014; 67(6):495-502.
- 7) 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 URL : <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>
- 8) 福岡県結核・感染症発生動向調査事業資料集 平成 26 年 (2014 年)
- 9) 吉富ら, 眼疾患、角結膜炎の患者からのアデノウイルス 56 型の検出—福岡県, IASR. 2011, 32, 148

【経費使途明細】

使途明細	金額
謝金 (@7,800×7日分)	54,600 円
旅費 福岡市 (贈呈式)、岡山市(日本臨床ウイルス学会)	35,830 円
消耗品費 (試薬 : DNA 合成他) (器材 : ローハ インテ ィング フィルターチップ ・ サンプ リング チューブ マキシマムリカバリー他)	214,601 円
合計	305,031 円