

5. 型別困難なアデノウイルスの遺伝学的解析による 実態把握

○塚越 博之（群馬県衛生環境研究所）

中野 剛志（群馬県衛生環境研究所）

【 目 的 】

アデノウイルス(AdV)は、主に流行性角結膜炎(EKC)を引き起こすウイルスとして知られている。AdVには、50種類以上の多くの型が存在することが知られているが、近年の遺伝子解析技術の向上から、さらに多くの型が存在すると考えられている。一方、AdVは、種および血清型によって引き起こす疾患の種類と重篤度が異なることが知られている。東南アジア・東アジアでは、7型による肺炎などの重症呼吸器感染症が流行しており、死亡例も見つかっている(Hai le et al., Emerg Infect Dis. 2016;22(4):687-90)。また、近年、新しい血清型として52~54型が認められている。病原微生物検出情報によると、2015、2016年には、EKCでは主に54型が多く検出されていることから、全国的な新型AdVの流行が確認されている(<http://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/gv/2016/data2016.41j.pdf>)。さらに、ウイルス遺伝子に新たな変異や組換えを持つAdVが55型以降の新型候補として日本を含む各国から複数報告されており、実際に56型や57型は国内でも検出されている。したがって、7型の日本への侵入の対策や新型と言われるAdVの流行状況を把握するためにも、正確な型別を行うことが公衆衛生上重要であると考えられる。

AdV検査では、ウイルスを分離し中和試験などの血清学的検査により血清型を決定することが一般的であった。しかし、近年、新型AdVと考えられる53型、54型や56型が原因と考えられる事例も増えていることから、従来から行っている検査法では、ウイルスの分離や同定が困難である症例も多い。群馬県においても、感染症発生動向調査事業によって、EKCなどの患者からウイルスを分離して型別を行うことで県内の流行状況の把握に努めている。平成28年度の調査では37株のAdVを分離したが、血清学的検査や単一領域(ヘキソン)における遺伝子検査では型別することができない難同定株が16株見つかっている。そのため、群馬県内で検出されているAdVの詳細な流行状況を把握することが困難な状況になりつつある。そこで、本研究では、群馬県で分離されている難同定AdVに対して、ヘキソン、ペントンベース、ファイバーなどの主要抗原部位における遺伝子解析を行うことによって、正確な型別を行い、新型や遺伝子組換えウイルスの存在を確認する事で群馬県におけるAdVの流行状況を明らかにしていくことを目的とする。

【 方 法 】

2012年4月～2017年3月、感染症発生動向調査事業において、県内の病原体定点で採取された検体から、A549細胞、HEp-2細胞、VeroE6細胞、RD細胞、MDCK細胞を用いてウイルスの分離培養を行った。分離されたAdVは、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルに準じて、中和試験あるいはPCR法（ヘキソン領域のDNAを増幅し塩基配列を決定後、BLASTによる解析）により型別した。ヘキソン領域の解析で型別ができなかったAdVは、ファイバー領域及びペントン領域の解析を加えて行うことにより、型別した。

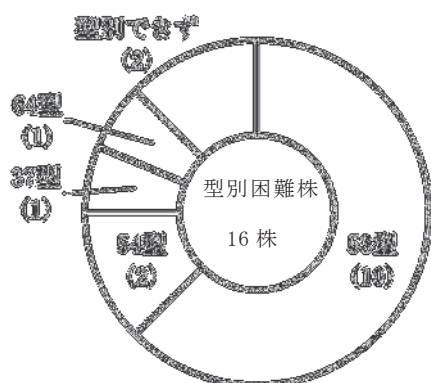
【結果】

過去5年間（2012年4月～2017年3月）に分離されたAdVは119株であった。2012年度は2型や3型が多く分離され、2012年以前と比べて大きな変化はなかったが、2013年度及び2014年度には52型以降のAdVが分離されるようになった。2015年度には54型が最も多く分離され、型を特定できない株も出現した。2016年度は分離された37株のうち、16株が中和試験およびヘキソン領域におけるPCR法では型別できなかった（表1）。

表1 2012年4月から2017年3月に検出されたAdV

年度	型																	計
	1	2	3	4	5	6	7	8	19	31	37	41	53	54	55	56	NT	
2012		3	3	2				2		1		1						12
2013			4				1	6			2						2	15
2014			19	2	1			1					1		1	1		26
2015		1	2	2		1		5			2	3		11		1	1	29
2016	1	7	1						1		2	1	1	5		2	16	37
計	1	11	29	6	1	1	1	14	1	1	6	5	2	16	1	6	17	119

そこで、中和試験およびヘキソン領域の解析では型別できなかった2016年度の16株について、ファイバー領域およびペントン領域の解析も行った結果、53型が10株、54型が2株、37型および64型がそれぞれ1株と型別することができた。一方、2株は依然として型別することが困難であった（図1）。



※括弧内は株数

図1 型別困難株の解析結果

【考察】

2015年度以降、多く検出される型が、2型や3型から、54型など中和試験では型別困難な株が増加してきている状況が明らかになった。中和試験やヘキソン領域の解析では、型別が困難なAdVに対しては、複数の領域の塩基配列を解析することで、型別が可能となる株もあることが確認された。さらに、AdVでは組換えが起こることも知られていることから、今後はヘキソン領域に加えてファイバー領域及びペントン領域も同時に解析する必要性が示唆された。また、型別ができなかった2株に関しては、フルゲノム解析などにより詳細な解析が必要である。

今後、新規遺伝子型AdVの出現や組換えウイルスの出現も想定できることから、地域の流行状況を正確に把握するために遺伝子解析を用いた型別を継続して実施する必要があると思われる。

【参考文献】

塚越博之, 高橋裕, 齋藤麻理子, 猿木信裕, 藤本嗣人. 地方衛生研究所におけるアデノウイルス検査の意義. 病原微生物検出情報. 2017;38(7):136-138.

【経費使途明細】

遺伝子解析試薬	92,304 円
ウイルス遺伝子増幅試薬	56,461 円
研究記録用事務	17,622 円
マイクロピペット用チップ	30,615 円
遺伝子精製試薬	49,646 円
ウイルス遺伝子抽出試薬	53,352 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円