

## 20. 大阪市における流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス検出と分子疫学解析

○平井 有紀 (大阪健康安全基盤研究所)

### 【研究目的】

流行性角結膜炎 (EKC) は主にアデノウイルス (AdV) の感染により引き起こされる伝播力の強い眼疾患である。EKC は、従来は AdV の 8、37、19/64 型が主な原因であった。しかし、近年 AdV は新型が多く出現し、従来の型以外が EKC を引き起こす場合がある。そこで、本研究では大阪市内の EKC 患者から検出される AdV を分子疫学的に解析し、種、型、流行の特徴を明らかにすることを目的とした。

### 【研究の必要性】

AdV は、エンベロープを持たない 2 本鎖 DNA ウィルスで、物理化学的な抵抗性が強いウィルスである。A～G 種の 7 種に分類され、特異的抗体を用いた中和反応の結果に基づき 51 の血清型が報告されている。AdV によって引き起こされる急性感染症には、呼吸器疾患、感染性胃腸炎などの消化器疾患、結膜炎などの眼疾患、尿道炎などの泌尿器疾患等の様々なものがある[1]。

AdV 感染症の 1 つに流行性角結膜炎 (EKC) がある。EKC は、8～14 日間の潜伏期間を経て、眼脂や流涙、眼瞼浮腫、濾胞形成、耳前リンパ節の腫脹などの症状を生じ、角膜に炎症が及ぶと透明度が低下し、混濁は数年に及ぶことがある[2]。

EKC を引き起こす AdV は主に B 種、D 種、E 種であり、B 種では 3 型が、E 種では 4 型が多く検出されており、D 種は従来 8 型、37 型、19/64 型が多く検出されていた。しかし、AdV はアミノ酸変異や遺伝子組換えによる新しい型が多く確認されており、従来の中和反応による血清型別が困難になっている。そのため、AdV の表面タンパク質である、中和抗原性に関与していると報告されている Penton base、中和反応の抗原性を規定しているとされる Hexon、HI 抗原性を規定しているほかに中和抗原性にも関与しているとされる Fiber の各領域の部分塩基配列や全ゲノム塩基配列による遺伝子型別が行われ、52 型以降はすべて遺伝型として報告されている[3]。

近年は EKC 患者から 53 型、54 型、56 型など新型の検出が増加しており、実際に 2015～2016 年は全国的に新型である 54 型の検出が多かった。また、すでに 2016 年の 4 カ月間の調査の結果で、大阪市内において新型である 54 型の流行を明らかにしている[4]。そのため 2016 年前後の EKC からの AdV 型別は、流行型解析に重要である。さらに、54 型を含む新型の AdV の疫学情報はまだ少ない。そのため、大阪市内における EKC の起因ウイルスを

検出し、流行している AdV を解析して種及び型、流行の特徴を明らかにし、正確な疫学情報を蓄積していく必要がある。

### 【研究計画】

#### [材料]

2009 年 4 月～2019 年 3 月の期間にサーベイランスに供与された臨床検体のうち、眼科定点医療機関で EKC、または結膜炎と診断された患者由来検体である 73 検体を対象として AdV の検出を試みた。

#### [方法]

臨床検体よりウイルス核酸を抽出し、リアルタイム PCR 法で AdV のスクリーニングを行った[5]。スクリーニングで陽性となった検体について国立感染症研究所のマニュアル[5]に基づいて、Penton base、Hexon、Fiber の各領域の部分塩基配列を PCR で増幅し、増幅領域に関してダイレクトシークエンス法により塩基配列の決定を行い、A～G 種の同定を行った。その後、PCR で各領域の全長の配列を増幅し[6-10]、増幅領域に関してダイレクトシークエンス法により各領域の全長塩基配列の決定を行い、得られた塩基配列を用いて MEGA X ソフトウェアにより Maximum likelihood method で Bootstrap は 1000 回で系統樹解析を行った。

### 【結果】

リアルタイム PCR 法でスクリーニングを行った結果、73 検体中 61 検体 (83.56%) が陽性となった。スクリーニングで陽性となった 61 検体中 59 検体 (96.72%) で各領域の全長塩基配列が決定できた。各年度の全塩基配列が決定できた陽性率は、2009 年度は 66.7% (2/3)、2010 年度は 100% (2/2)、2011 年度は供与なし、2012 年度は 66.7% (2/3)、2013 年度 66.7% (2/3)、2014 年度 100% (1/1)、2015 年度は 50% (1/2)、2016 年度は 90.6% (29/32)、2017 年度は、78.6% (11/14)、2018 年度は 69.2% (9・13) であり、2011 年度以外は少なくとも 1 検体以上から AdV が検出されていた(図 1)。各領域の全長塩基配列が決定できた 59 検体中 45 検体 (76.27%) が D 種、12 検体 (20.34%) が B 種、2 検体 (3.39%) が E 種となった。各領域の系統樹解析の結果(図 2)、最も多く検出された型は 54 型 (29 検体) で、次いで B 種型別不能 (11 検体)、37 型 (8 検体)、64 型 (4 検体)、85 型 (2 検体)、4 型 (2 検体)、53 型 (1 検体)、11 型 (1 検体)、D 種型別不能 (1 検体) (図 3) であった。

### 【考察と今後の課題】

EKC と診断された患者から検出された AdV を解析することにより、その間の大坂市内の流行状況が明らかとなった。解析の結果、大阪市内では同時期に複数の型が流行していたが、全塩基配列が決定できた検体の 76%以上が D 種であり、EKC の流行の中心は D 種であることが明らかとなった。その中でも、54 型が最も多く検出されており、2016 年度に検出が増

加した。しかし、2014 年度以前の検体からも検出されており、2017 年度以降も検出割合に変化はあるが 54 型の検出が続いている。54 型は全国的にも近年の EKC の主要な原因の 1 つであるが、大阪市内においても主要な原因の 1 つであった。37 型は 2009、2010、2016～2018 年度に検出されており、検出数は多くはないが流行の一端を担っている株であると考えられた。そして 2011～2015 年度は供与された検体数が少なかったため、検出されなかつた可能性がある。EKC の原因として、B 種も一定数検出されており、中でも多く検出されていたのは B 種型別不能であった。この検体は、B 種であるものの、3 領域の型の組み合わせでは型が決定しなかった。型で見ると、今回解析した検体の中では 54 型に次いで 2 番目に多く検出されており、検出された年度も複数年度にわたっていた。B 種ではこの型が流行の中心であることが明らかとなった。E 種である 4 型は検出数が少ないながらも、2013 年度、2015 年度に検出されていることから、まれに大阪市内で流行していたと考えられた。2015 年度以降検出されていなかったが、今後も大阪市内で 4 型の流行が起こる可能性を否定できない。今回解析に用いた検体の中には 3 領域を解析した結果、新型の可能性が高い株が含まれていることが分かった。今後、この株についてより詳細な解析をする必要があると考える。さらに、今回解析した検体については、系統樹解析の結果で Hexon 領域の型と 3 領域の型の組合せを総合した型を比較するといくつか相違があった。当研究所では検査の関係上 Hexon 領域の一部の塩基配列を用いて型別を行っているが、Hexon 領域だけで型別すると本当の型とは異なる判定をしてしまう恐れが大いにあることが改めて明らかとなった。

今回の結果からも、AdV の型別を行う場合は Penton base、Hexon、Fiber の 3 領域の配列を調べる必要性があると考えるが、3 領域の配列を解析するのは手間と時間がかかる。より簡便な型別の方法を検討していく必要性があると考える。

### 【謝辞】

本研究を進める機会を与えていただいた公益財団法人大同生命厚生事業団には深く感謝申し上げます。

### 【参考文献】

1. Wold WSM, Ison MG. 2013. Adenoviruses, p 1732-1767. In Knipe DM, Howley PM (ed), Fields virology, 6th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
2. 国立感染所研究所 HP 『流行性角結膜炎とは』  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/528-ekc.html>
3. 国立感染症研究所. 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査, 診断マニュアル (第 3 版) 平成 29 年 3 月
4. 平井有紀 他, IASR Vol. 39 p125-126, 2018
5. Kaida A, et al., Jpn J Infect Dis 67: 469-475, 2014

6. Ariga T, et al., J Clin Microbiol 43:726-32, 2005.
7. Chen M, et al., PLoS One 10:e0121375, 2015
8. Cheng J, et al., Am J Transl Res 8:2331-42, 2016
9. Hiroi S, et al., J Med Microbiol 61:1097-102, 2012
10. Madisch I et al., J Virol 79:15265-76, 2005

【経費使途明細】

使 途	金 額
合成オリゴ	59,019 円
核酸精製試薬	52,542 円
シークエンス関連試薬	313,632 円
PCR 試薬	41,364 円
器具・消耗品	24,308 円
書籍・データ保存用記憶媒体	9,168 円
合 計	500,033 円
大同生命厚生事業団助成金	500,000 円

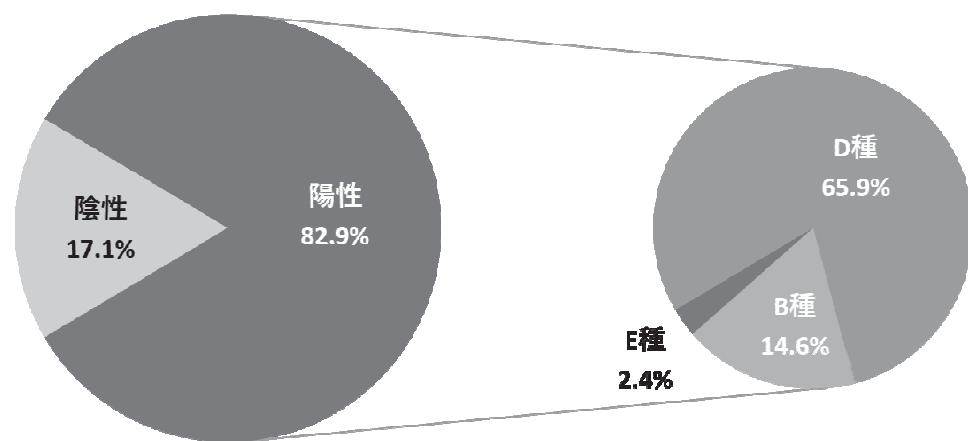


図 1. AdV の陽性率と種の内訳

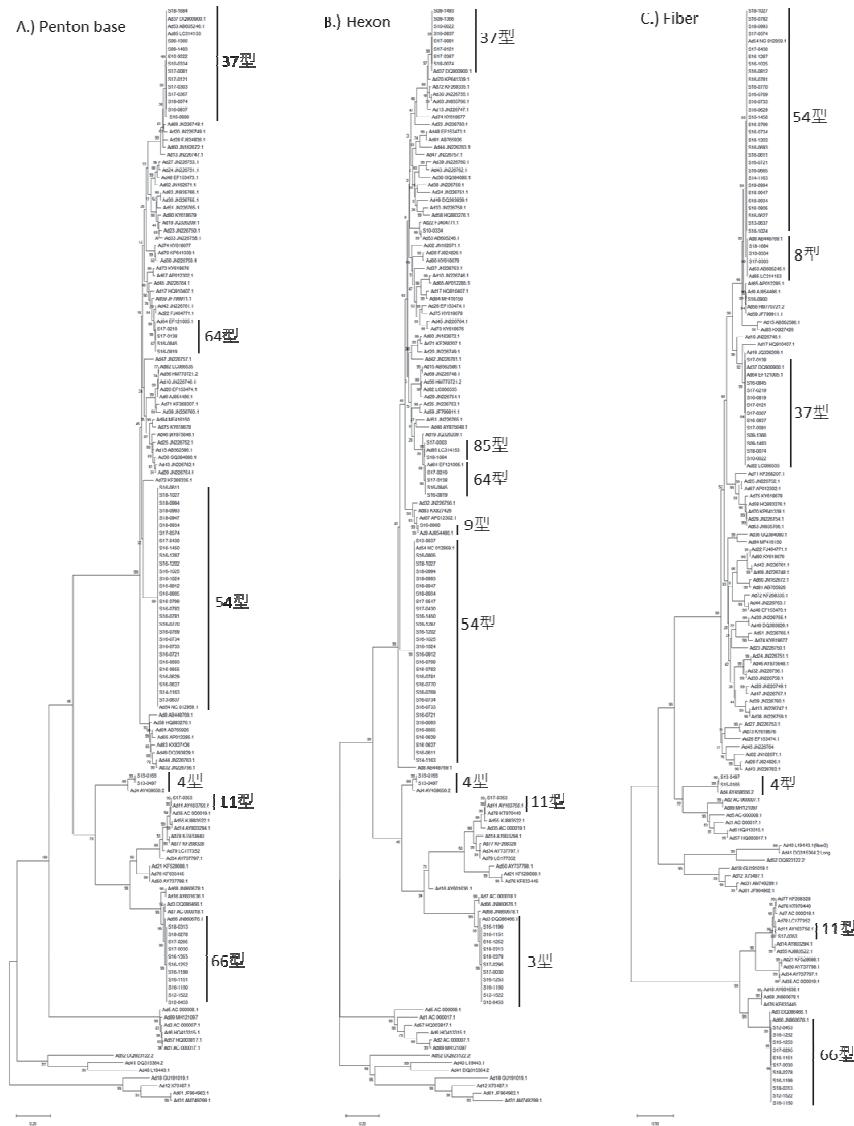


図2. 各領域の系統樹

A. Penton base、B. Hexon、C. Fiber

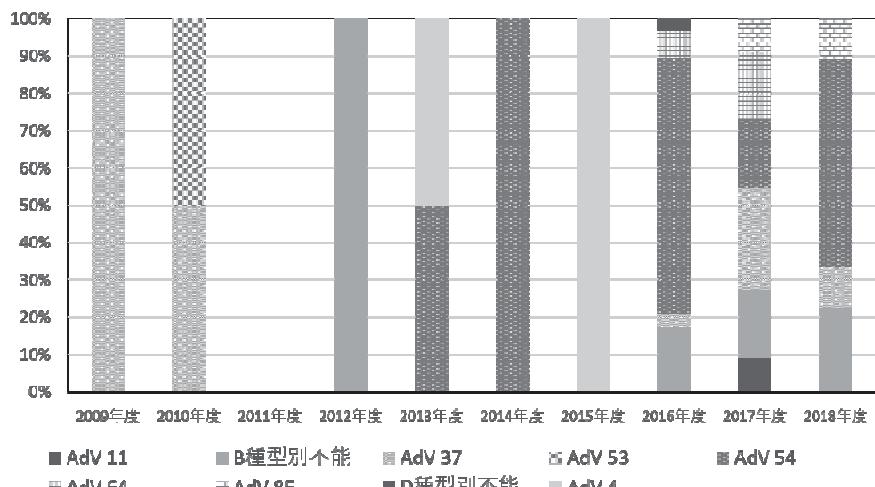


図3 年度別AdVの検出状況