

20. 愛知県におけるアデノウイルス流行状況と組換え型アデノ

ウイルスの探索

○廣瀬 絵美、中村 範子、皆川 洋子、安達 啓一、安井 善宏、伊藤 雅、佐藤 克彦
(愛知県衛生研究所)

【研究目的】

アデノウイルス (HAdV) は流行性角結膜炎、咽頭結膜熱、感染性胃腸炎、出血性膀胱炎、肺炎など多様な疾患の病原ウイルスである。近年、遺伝子組換え型 HAdV の出現が国内外より報告されている。全国で多く検出されている組換え型 HAdV もあり、一例として、ペントンベース (P) 及びヘキソン (H) 領域は HAdV-54、ファイバー (F) 領域は HAdV-8 の配列を有している組換え型 HAdV-54[P54/H54/F8]が、2015 年以降、流行性角結膜炎の原因ウイルスの主流となっている。HAdV は重篤な症状を引き起こすこともあることから、組換え型を含む HAdV の流行状況の把握は重要である。そこで本研究では、愛知県の患者から分離されたウイルス株を用いて、従来の遺伝子解析において用いられてきたヘキソン領域での解析に加え、ペントンベース及びファイバー領域での解析を実施することにより、組換え型 HAdV を探索することを目的とする。

【研究の必要性】

HAdVはエンベロープを持たない2本鎖DNAウイルスで、物理化学的な抵抗性が強いウイルスである。感染力が強く、学校や家庭内での集団発生も報告されており、発生動向に注意が必要である。そのため、当所では感染症発生動向調査事業において5類定点把握疾患患者を中心にHAdVの検索を行っている。我々は以前に2009年から2015年に搬入された2,515名の患者検体についてHAdVの検索を行い、468名488検体からの検出を報告した(愛知県衛生研究所報, No. 66, 20-27, 2016)。HAdVはA～G種に分類され、100を超える型が存在している。従来は培養細胞を用いてウイルスを分離し、中和試験などにより血清型を決定する方法が一般的であり、HAdV-51までは血清型として報告された。2007年以降には、遺伝子組換え等に基づいて新しい型が多く報告されており、HAdV-52以降は全塩基配列の決定により遺伝型として報告されている¹⁾。現在では、組換え型HAdVを含めた型別は血清学的検査だけでは困難であり、全ゲノム解析の代替として抗原決定基を持つペントンベース、ヘキソン及びファイバー領域の遺伝子解析により行われる。

当所における従来のHAdV検出は、ウイルス分離株の血清型別と並行して、臨床症状からHAdVの感染が疑われた患者検体について遺伝子検出を行っていた。主にヘキソン領域のみの解析を行っていたため、検出HAdVに組換え型HAdVが混在している可能性が考えられた。これまでにHAdV-6の中和抗血清が組換え型HAdV-57[P1/H57/F6]に対して交差反応を示すことが報告されており、他県では血清型別によりHAdV-6とされた株の中にHAdV-57が混在していたという報告もある²⁾。

そこで、当所の過去の分離株を用いて組換え型 HAdV の検索を行うこととした。詳細な遺伝子解析

等に基づく組換え型 HAdV の検出は、HAdV 遺伝子組換えと疾患や症状との関連の解明につながり、公衆衛生学上重要であると考えられる。

【材料と方法】

①アデノウイルス流行状況の把握

2014年4月から2019年3月までに感染症発生動向調査等の目的で愛知県内（名古屋市を除く）の病原体定点にて採取された患者の糞便、咽頭ぬぐい液、尿、結膜ぬぐい液等 9,483 検体を材料とした。各検体を Veal infusion broth で処理し、10,000×g で 20 分間遠心分離し、その上清を Vero、HeLa、RD 細胞に接種した。顕微鏡下での観察において細胞変性効果のみられた分離株について、HAdV-1～7 の抗血清を用いて、中和試験により型別を行った。

また、ウイルス分離と並行して、臨床症状から HAdV 感染の疑われた患者の 2,983 検体について、遺伝子検出を試みた。臨床検体からウイルス DNA を抽出し、ヘキソン loop1 領域を増幅する HAdV 特異的プライマーを用いた PCR 法を行った³⁾。得られた増幅産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、型別を行った。ウイルス分離されたものの、中和試験で型別できなかった株についても同様に、分離株からウイルス DNA を抽出し、型別を行った。

②組換え型アデノウイルスの探索

中和試験にて型別された分離株の中で、多く検出される C 種（HAdV-1, 2, 5, 6）に着目し、分離株からウイルス DNA を抽出した。まず、従来の型別で使用しているヘキソン loop1 領域について PCR 法を行い、得られた増幅産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。さらに、ペントンベース及びファイバー領域についても同様に塩基配列を決定し⁴⁻⁶⁾、各領域について MEGA7 ソフトウェアを用いて Maximum likelihood method により系統解析を行った。

【結果と考察】

ウイルス分離及び遺伝子検出を試みた結果、512 検体（5.4%、512/9,483）から HAdV が検出された。種別では C 種が最も多く 253 件であり、上・下気道炎検体から 106 件、感染性胃腸炎検体から 68 件検出された。その他に、心筋炎、弛緩性麻痺、無菌性髄膜炎、けいれん重積、脳炎脳症等の患者検体からも検出された。次いで、B 種が多く 116 件であり、咽頭結膜熱検体から 35 件、上・下気道炎検体から 34 件検出された。その他に出血性膀胱炎、意識障害、麻しん疑い等の患者検体からも検出された。F 種は 96 件であり、そのうち 90 件は感染性胃腸炎検体から検出された。E 種は 26 件であり、そのうち 15 件は上・下気道炎検体から検出された。D 種は 15 件であり、そのうち 8 件は流行性角結膜炎検体から検出された。A 種は 6 件であり、そのうち 5 件は感染性胃腸炎検体から検出された（図 1）。HAdV の種別と引き起こす疾患には関連があるとされており、本研究においても同じ傾向がみられた。また、少数ではあるが、脳炎脳症、意識障害、弛緩性麻痺、けいれん重積など重篤な症状の患者検体からも HAdV が検出され、さらにウイルス株も分離されていることから、HAdV がこれら重篤な症状に関与している可能性が考えられた。

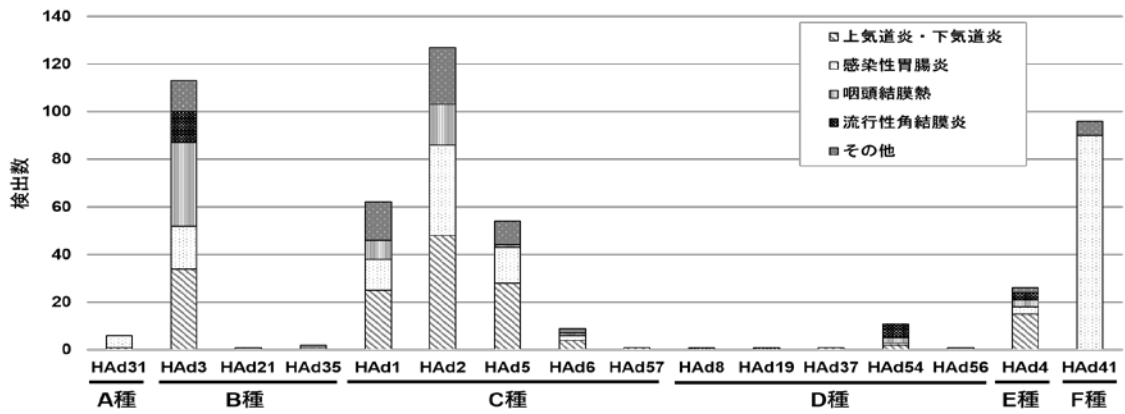


図 1. 臨床症状別アデノウイルス検出数

次に、最も多く検出されたC種(HAdV-1, 2, 5, 6, 57)に着目し、ウイルス分離の有無を調べた。それぞれの型の分離率はHAdV-1: 98.3%(59/60)、HAdV-2: 93.4%(114/122)、HAdV-5: 73.6%(39/53)、HAdV-6: 88.9%(8/9)であり、HAdV-57は分離されなかった。これらから臨床症状に偏りがないように株を選抜し、HAdV-1: 15株、HAdV-2: 22株、HAdV-5: 22株、HAdV-6: 6株、計65株について、ペントンベース、ヘキソン及びファイバー領域の塩基配列の決定を試みた。3領域すべてを解析できた株は65株中62株であり、それぞれについて系統解析を行った。

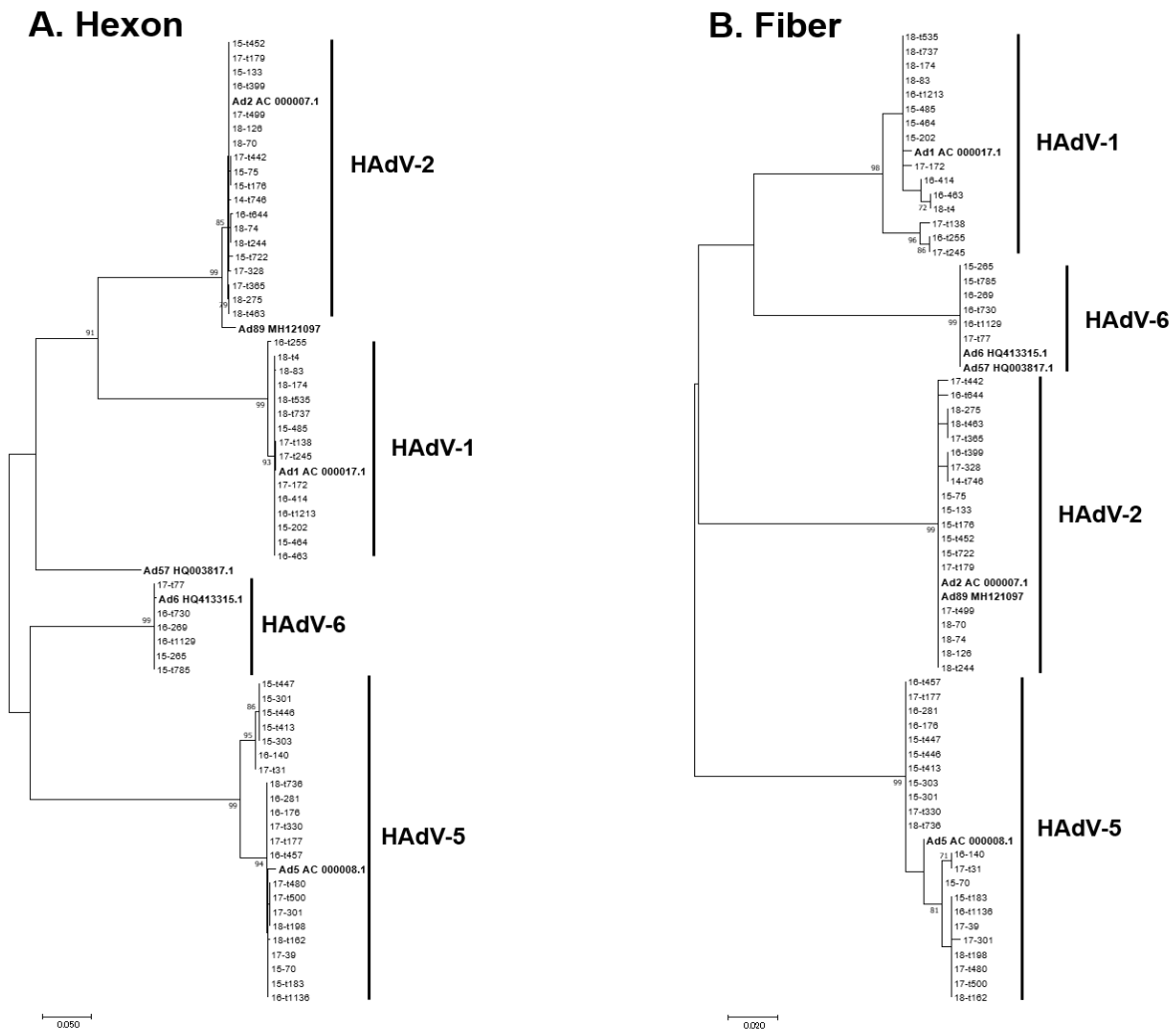


図 2. HAdV C種 各領域の系統解析 (A:ヘキソン、B:ファイバー)

その結果、ヘキソン及びファイバー領域に関しては、中和試験による血清型別と同じ型に分類された(図 2A, B)。ペントンベース領域に関しては、血清型のprototypeと異なる多様なクラスターに分類された(図 3)。このうち、2019 年に報告された組換え型HAdV-89⁷⁾と高い相同性のみられた 6 株に着目した(図 3 傍線部)。HAdV-89 はペントンベース領域に独自の配列を有するHAdV-2 との組換え型HAdV [P89/H2/F2]である。この 6 株はペントンベース RGD loop領域のアミノ酸配列に、HAdV-89 に特徴的な 363 番目のアラニン(A)からグルタミン酸(E)への置換、及び 364 番目のプロリン(P)の欠失がみられ、RGD loop領域のアミノ酸配列はHAdV-89 と 100%一致した(図 4)。その一方で、ヘキソン及びファイバー領域はHAdV-5 に分類された(図 2A, B)。このことから、これらの株がHAdV-89 とHAdV-5 の組換え型HAdV [P89/H5/F5]である可能性が示唆された。HAdV-89 の検出は日本において 1 例報告されている⁸⁾が、HAdV-5 との組換え株はいまだ報告されておらず、新規組換え型HAdVであると考えられる。本研究では、3 領域で解析を行ったが、HAdV-89 は他の領域においても特徴的な配列を有することが報告されており、今後はその領域についても解析を進める予定である。

【まとめ】

本研究により、愛知県内における組換え型も含めた HAdV の流行状況が明らかになった。3 領域すべてを解析できた 62 株のうち 6 株が新規組換え型 HAdV [P89/H5/F5]である可能性が示唆された。これらの株は胃腸炎や上気道炎等の患者検体から分離された。今後、さらに多くの株について検討し、臨床症状との関連を明らかにすることにより、公衆衛生の向上に寄与できると考えられる。

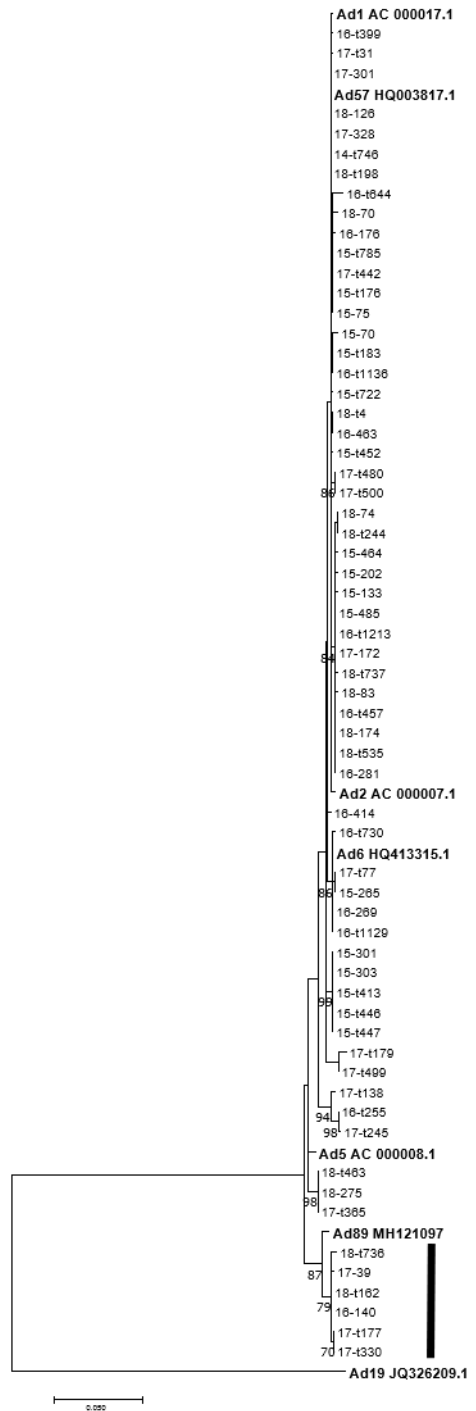


図 3. HAdV C 種 ペントンベース領域の系統解析

Species/Abbrv	Group Name	310	320	330	340	350	360	370
1. Ad1_AC_000017.1		Q	G	G	G	A	G	G
2. Ad2_AC_000007.1		Q	G	G	G	A	G	G
3. Ad5_AC_000008.1		Q	G	G	G	A	G	G
4. Ad6_HQ413315.1		Q	G	G	G	A	G	G
5. Ad57_HQ003817.1		Q	G	G	G	A	G	G
6. Ad89_MH121097		Q	G	G	G	A	G	G
7. 16-140		Q	G	G	G	A	G	G
8. 17-39		Q	G	G	G	A	G	G
9. 17-177		Q	G	G	G	A	G	G
10. 17-4330		Q	G	G	G	A	G	G
11. 18-162		Q	G	G	G	A	G	G
12. 18-4736		Q	G	G	G	A	G	G
13. 18-70		Q	G	G	G	A	G	G
14. 18-74		Q	G	G	G	A	G	G
15. 18-44		Q	G	G	G	A	G	G
16. 15-202		Q	G	G	G	A	G	G
17. 15-464		Q	G	G	G	A	G	G
18. 15-485		Q	G	G	G	A	G	G

図 4. ペントンベース RGD loop 領域のアミノ酸配列

【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深く感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Seto D, *et al.*, J Virol. 2011 Jun; 85(11):5701-5702.
- 2) 辰己智香ら, 病原微生物検出情報. 2017; 38:143-144.
- 3) Takeuchi S, *et al.*, J Clin Microbiol. 1999 Jun; 37(6):1839-45.
- 4) Xu W, *et al.*, J Clin Microbiol. 2000 Nov; 38(11):4114-20.
- 5) Fujimoto T, *et al.*, Jpn J Infect Dis. 2012 May; 65(3):260-3.
- 6) Adhikary A K, *et al.*, J Clin Microbiol. 2004 Feb; 42(2):670-673.
- 7) Dhingra A, *et al.*, Sci Rep. 2019 Jan 31; 9(1):1039-51.
- 8) Takahashi K, *et al.*, Viruses. 2019 Dec; 11(12):1131-1145.

【経費使途明細】

使 途	金 額
プラスチック（フィルターチップ、PCR チューブ）消耗品	65,988 円
遺伝子増幅試薬	83,600 円
遺伝子解析（Seq 反応）試薬	151,800 円
合 計	301,388 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円