

結膜炎由来アデノウイルス 8 型分離株の疫学解析

池田 義文 国井 悦子 上村真由美¹ 阿部 勝彦²
野田 衛 藤井 彰人 平崎 和孝 山岡 弘二³
荻野 武雄

1983 年から 2000 年までの約 18 年間に、結膜擦過物から分離されたアデノウイルス(Ad)8 型 129 株について、14 種類の制限酵素で消化し、泳動後の切断パターンを比較した。制限酵素切断パターンは、*Bam*H , *Bcl* I , *Bgl* II , *Bst*E I , *Kpn* I , *Sac* I , *Sma* I , *Eco*R I および *Pvu* II で 2 種類、*Bgl* II , *Sal* I および *Xho* I で 3 種類、*Hind* III と *Pst* I で 4 種類に分けられた。なお、*Bgl* II のパターンはいずれも標準株と異なっていた。以上の結果から、分離株は 1~3 種類の酵素で泳動パターンが標準株と異なる 69 株(Ad8p グループ)と、14 種類全ての酵素で異なる 60 株(Ad8a)の 2 種類の遺伝子型に大別され、Ad8p グループはさらに異なるパターンを示した酵素の組合せから 6 種類の遺伝子型(Ad8p1~Ad8p6)に分けられた。1983 年~1995 年夏の期間は Ad8p グループの遺伝子型が混在していたが、1995 年夏以降は全て Ad8a に入れ替わっていた。

キーワード： アデノウイルス 8 型，結膜炎，制限酵素，分子疫学，遺伝子型

はじめに

アデノウイルス(Ad)8 型は流行性角結膜炎の主な病原ウイルスのひとつとしてよく知られている。広島市では 1983 年から 2000 年までの期間に 3 回の流行がみられた¹⁾²⁾。特に、1995 年には多数の Ad8 型が分離されたことから、制限酵素切断パターンに基づき分離株の遺伝子型について検討したので、その結果について報告する。

方 法

1 供試ウイルス

1983 年 4 月から 2000 年 12 月までの期間に、広島市感染症発生動向調査事業の眼科定点医療機関を受診した患者の結膜擦過物から分離され、中和試験により Ad8 型と同定された 129 株を対象にした。標準株は国立感染症研究所から分与された Trim 株を用いた。

2 ウイルス DNA

ウイルス DNA は既法³⁾に従い抽出した。すなわち、25 cm² 培養フラスコのウイルス HEp-2 細胞が完全に剥がれた時点で細胞を回収し、PBS(-)で 2 回遠心洗浄後、2ml の TE 緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)に浮遊し凍結保存した。1% SDS で可溶化後、プロテナーゼ K (0.5mg/ml)で 37℃ 1 夜処理した。フェ

ノール・クロロフォルムで 2 回抽出し、リボヌクレアゼ(0.5mg/ml)で 37℃ 15 分処理した。エタノール沈殿は-40℃ で 1 夜行い、沈渣を自然乾燥後再蒸留水 200 μ l に溶解し、ウイルス DNA 試料とした。

3 制限酵素による切断

制限酵素(東洋紡)は、*Bam*H I , *Bcl* I , *Bgl* II , *Bgl* III , *Bst*E I , *Eco*R I , *Hind* III , *Kpn* I , *Pst* I , *Pvu* II , *Sac* I , *Sal* I , *Sma* I , *Xho* I の 14 種類を使用し、添付の説明書に従い反応用緩衝液を加えて 1unit/ μ l に調製した。消化は酵素液 10 μ l と DNA 試料 10 μ l を混合し、*Sma* I は 30 分、*Bst*E I は 60 分、*Bcl* I は 50 分、その他の制限酵素は 37℃ で 1 夜行った。

4 電気泳動

サブマリン泳動槽(タカラ)の TPE 緩衝液(90mM Tris-phosphate, 2mM EDTA, pH 8.3, フナコシ)中で 1%アガロース(タカラ SeaKem GTG)を用いて 35mA, 14 時間、または 130mA, 3 時間室温で泳動し、エチジウムブロマイド染色後、DNA 切断パターンを紫外線照射下で写真撮影した。分子量マーカーはファージ DNA の *Hind* III 消化物(東洋紡)を用いた。

5 遺伝子型の分類と表記

得られた DNA 切断パターンは制限酵素別に比較し、標準株と同じパターンはアルファベットの P で、標準株と明らかに異なるパターンの株は分離された順にアルファベットの A, B, または C と表示した。

遺伝子型の分類は Li and Wade⁴⁾の方法に準じて行った。まず、*Bam*H I の切断パターンが標準株と同

*1: 現 社会局保健部食品保健課

*2: 現 (財)広島市農林業振興センター

*3: 現 社会局保健部食肉衛生検査所

表 1 結膜擦過物の血清型別年別 Ad 分離数

血清型	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	計
1 型	1	1	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
2 型	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
3 型	11	18	32	31	13	11	4	6	2	-	5	2	1	-	-	2	-	6	144
4 型	-	61	31	-	8	20	4	11	7	3	1	-	1	-	-	1	1	1	150
7 型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
8 型	3	17	11	-	-	8	2	4	-	-	-	1	75	6	2	-	-	-	129
11 型	-	1	3	4	-	1	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	13
19 型	5	20	-	9	3	1	-	1	4	-	-	-	-	-	2	4	1	3	53
22 型	-	-	-	2	4	3	6	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	2	20
34/35 型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
37 型	8	14	51	25	1	2	-	3	2	-	-	-	1	-	1	-	2	1	111
計	28	132	128	74	29	48	17	28	15	4	6	3	82	8	6	8	4	14	634

じ株の遺伝子型は p 型とし、それと異なる株は a 型とした。次に、用いた制限酵素のうち 1 種類の酵素でも標準株と異なるパターンを示した株は異なる遺伝子型とし、分離された順にアラビア数字で示した(例: p1, p2, …)。

6 患者数およびウイルス分離数

患者数およびウイルス分離数は広島市感染症発生動向調査事業の集計結果を基に、分離陽性者の疫学的事項は検体採取時の検査依頼票に基づき集計した。

結 果

1 Ad 分離状況

1983 年 4 月から 2000 年 12 月までの約 18 年間に、感染症発生動向調査事業の眼科定点で採取された結膜擦過物から分離された Ad の血清型別、年別分離数を表 1 に示した。年により分離される主な血清型は異なるものの、18 年間に 11 種類、634 株が分離された。このうち Ad8 型は 129 株で、Ad4 型(150 株)、Ad3 型(144 株)に次いで多かった。広島市では

1983 年～85 年、88 年～90 年、94 年～97 年と、これまでに 3 回の Ad8 型流行が確認された。特に、95 年には 75 人から分離され、この年に結膜擦過物から分離された Ad の 91.5% を占めた。

臨床診断名別では流行性角結膜炎が 111 人(86.0%)と最も多く、咽頭結膜熱 3 人、急性出血性結膜炎 2 人、急性結膜炎 13 人であった。

2 流行性角結膜炎の年齢群別患者報告数

年により流行の規模は異なるものの、患者の年齢分布は 1995 年を除き 20 歳以上が過半数を占めたが、1995 年は 10 歳未満が 71.4%、20 歳未満では 98.7% と低年齢層の患者が大多数を占め、他の年とは異なる流行像がみられた。そこで、その要因を明らかにすることを目的に、全分離株についてウイルス DNA の制限酵素切断パターン解析を試みた。

3 制限酵素切断パターン

図 1 に *BamH*、*Bcl*、*Bgl*、*BstE*、*Kpn*、*Sac*、*Sma*、*EcoR* および *Pvu* の泳動パターンを示した。これら 9 種類の制限酵素で 129 株は、標準株と同じパターン(P)を示す株(69 株)と標準株とは異

表 2 遺伝子型別、制限酵素別切断パターン

遺伝子型	酵素別切断パターン						初分離年月	分離株数
	<i>BamH</i>	他*	<i>Bgl</i>	<i>Hind</i>	<i>Pst</i>	<i>Sal</i>		
Ad8p	P		P	P	P	P	P	0
Ad8p1	P		A	A	P	A	P	1983/07
Ad8p2	P		A	A	P	P	A	1983/08
Ad8p3	P		A	P	P	P	P	1984/04
Ad8p4	P		A	A	A	P	A	1985/08
Ad8p5	P		A	P	B	P	P	1988/08
Ad8p6	P		A	B	P	P	P	1988/12
Ad8a	A		B	C	C	B	B	1995/06

*: *Bcl*、*Bgl*、*BstE*、*Kpn*、*Sma*、*EcoR*、*Sac*、*Pvu*

表 3 遺伝子型別, 年別 Ad8 型分離数

遺伝子型	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	計
Ad8p1	2	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Ad8p2	1	9	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Ad8p3	-	4	6	-	-	-	-	1	-	-	-	1	23	-	-	-	-	-	35
Ad8p4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ad8p5	-	-	-	-	-	6	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
Ad8p6	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ad8a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52	6	2	-	-	-	60
計	3	17	11	0	0	8	2	4	0	0	0	1	75	6	2	0	0	0	129

なるパターン(A)を示す株 (60株)の2種類に分けられた。*Bgl* , *Hind* , *Pst* , *Sal* , および *Xho* の泳動パターンを図 2 に示した。*Bgl* は標準株とは異なるパターン A を示す 69 株と, パターン B を示す 60 株の 2 種類に分けられ, 標準株と同じパターンを示す株はみられなかった。一方, *Hind* と *Pst* では標準株を含む 4 種類(P, A, B, C)の, *Sal* と *Xho* では 3 種類(P, A, B)のパターンがみられた。

以上の結果を Li and Wade⁴⁾の方法に従い表 2 にまとめて示した。まず, *BamH* , *Bcl* , *Bgl* , *BstE* , *Kpn* , *Sac* , *Sma* , *EcoR* および *Pvu* の 9 種類の酵素では標準株と同じパターンを示したが, *Bgl* , *Hind* , *Pst* , *Sal* および *Xho* のうち, 1 種類から 3 種類の酵素で標準株と異なるパターンを示した 69 株は Ad8p グループ, 14 種類全ての酵素で異なるパターンを示した 60 株は Ad8a とし, 2 種類の遺伝型に大別された。次に Ad8p グループの 69 株は *Hind* , *Pst* , *Sal* および *Xho* の 4 種類の制限酵素における泳動パターンの組合せにより, 分離年月の早いものから順に Ad8p1 から Ad8p6 までの 6 種類に分けられた。Ad8p グループの遺伝子型別分離数は, Ad8p3 が 35 株と最も多く, 次いで Ad8p3 が 13 株, Ad8p5 が 11 株, Ad8p1 が 8 株, Ad8p4 および Ad8p6 が各 1 株であった。なお, 全ての酵素で標準株と同じパターンを示した株はみられなかった。

4 遺伝子型別, 年別分離数

遺伝子型別, 年別 Ad8 型分離数を表 3 に示した。1983 年から 1985 年は Ad8p1, Ad8p2, および Ad8p3 の 3 種類を主流とし Ad8p4 が 1 株混在した流行であった。1988 年から 1990 年は Ad8p5 を中心に流行し, これに Ad8p2, Ad8p3, および Ad8p6 が 1 株ずつ混在していた。1994 年から 1997 年の期間は, 1995 年 10 月までは 1984 年, 1985 年に流行した Ad8p3 が多数分離されたが, 1995 年 6 月に Ad8a が初めて分離されて以降分離数が増加し, 約 5 ヶ月で Ad8p3 から Ad8a に全て入れ替わった(データ示さず)。

5 遺伝子型別年齢群別分離数

Ad8 型の遺伝子型別, 年齢群別分離数を表 4 に示した。遺伝子型別の年齢分布は Ad8p1 が 22 ~ 46 歳, Ad8p2 が 5 ~ 68 歳, Ad8p5 が 1 ~ 13 歳と 53 ~ 88 歳であるが, 1995 年に多数分離された Ad8p3 と Ad8a は全ての年齢群に分布し, 他の遺伝子型に比べて 9 歳以下の占める割合が高かった。

考 察

病原微生物検出情報⁵⁾⁻⁷⁾によると, わが国で結膜擦過物から分離される Ad は年により多少の差はあるものの 3 型, 4 型, 8 型, 19 型および 37 型の 5 種類の血清型が上位を占めている。そのうち 8 型, 19 型, 37 型は結膜擦過物から分離される割合が高く,

表 4 遺伝子型別, 年齢群別 Ad8 型分離数

年齢群	遺伝子型別分離数							計
	Ad8p1	Ad8p2	Ad8p3	Ad8p4	Ad8p5	Ad8p6	Ad8a	
0 ~ 4 歳	-	-	4	-	2	-	12	18
5 ~ 9 歳	-	2	3	-	2	-	7	14
10 ~ 19 歳	-	2	1	-	2	1	3	9
20 ~ 29 歳	3	1	2	-	-	-	14	20
30 ~ 39 歳	4	1	5	1	-	-	10	21
40 ~ 49 歳	1	5	1	-	-	-	3	10
50 ~ 59 歳	-	-	6	-	1	-	8	15
60 ~ 69 歳	-	2	4	-	1	-	1	8

流行性角結膜炎の病因として重要視されている。患者および分離陽性者の年齢分布は例年 20 歳以上の成人が大多数を占めている。広島市においても同様の分離状況であったが¹⁾²⁾ 8 型が多数分離された 95 年は、報告患者の約 65%を 1~9 歳の低年齢層が占め、また、分離陽性者 75 人中 23 人(31%)は 9 歳以下で、他の年とは異なる流行であった(データ示さず)。検査依頼票に基づく分離陽性者の疫学調査から、95 年 10 月頃までは家庭内での発生例が多数を占めていたが、11 月以降は保育園等の施設内感染例が目立つようになり、小規模ながら集団発生が起こっていた可能性が示唆された。このことが低年齢層での患者多発の誘因のひとつと考えられ、保育園等の施設内感染にも注意を払う必要がある。

Ad8 型分離株の遺伝子型については Fujii ら⁸⁾⁹⁾ が 7 種類、Kemp and Hierholzer¹⁰⁾ が 2 種類、Adrian ら¹¹⁾ が 5 種類、De Jong ら¹²⁾ が 4 種類、Tanaka ら¹³⁾ が 2 種類と多数の報告がある。各研究者とも用いた酵素は各々異なるため単純に比較することは困難であるが、Ad8 型には少なくとも 15 種類以上の遺伝子型が存在するものと思われる。

遺伝子型の分類命名法についての統一的な見解は示されていないが、7 種類の酵素を用いた Adrian ら¹⁴⁾、12 種類の酵素を用いた Li and Wadell⁴⁾の方法がよく知られている。今回 14 種類の酵素を用いて解析した結果、129 株は全て標準株(Trim 株)とは異なる 7 種類に分けられ、遺伝子型は Li and Wadell⁴⁾の方法に従って分類命名した(表 2)。Ad8p グループの 69 株は用いた酵素のうちわずか 1~3 種類の酵素で異なる 6 種類の遺伝子型に分けられたが、比較的近縁な株と思われた。一方、Ad8a グループの 60 株は 14 種類全ての酵素で標準株と異なるパターンを示し、95 年 6 月に初めて分離されて以降約 5 ヶ月間で Ad8p グループと全て入れ替わった。Ad8a は 75 年にアメリカ・フロリダのベトナム難民キャンプで流行し、Kemp and Hierholzer¹⁰⁾が *Hind* , *Kpn* , *Sac* , *Sal* , *Sma* の 5 種類の酵素を用いて遺伝子型 Ad8D として報告したウイルスに類似していた。95 年はわが国で分離報告の少ない Ad7 型が全国的流行を引き起こした年でもあり、ウイルスの起源を含め、このような流行株の短期間での入れ替わりが広島市に限られた現象であるのか、他の地域の分離株も含めて幅広く検討する必要がある。

謝 辞

検体採取にご協力いただいた定点医療機関の諸

先生方、ならびに、関係者各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 池田義文 他:感染症サ-ベイランス事業におけるアデノウイルス検出状況, 広島市衛研年報, 13, 42-49 (1994)
- 2) 阿部勝彦 他:感染症サ-ベイランス事業におけるアデノウイルス検出状況(1994 年~1995 年), 広島市衛研年報, 15, 82-86 (1996)
- 3) Noda M et al: Genome types of adenovirus types 19 and 37 isolated from patients with conjunctivitis in Hiroshima City, J Med Virol, 26, 15-22 (1988)
- 4) Li Q and Wadell G: Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents, J Virol, 60, 331-335 (1986)
- 5) 病原微生物検出情報月報, 15, 97-98(1994)
- 6) 病原微生物検出情報月報, 16, 97-98(1995)
- 7) 病原微生物検出情報月報, 21, 24-25(2000)
- 8) Fujii S et al: Restriction endonuclease cleavage analysis of adenovirus type 8: two new subtypes from patient with epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, Japan J Med Sci Biol, 36, 307~313 (1983)
- 9) Fujii S et al: Molecular epidemiology of adenovirus type 8 (Ad 8) in Taiwan: four subtypes recovered during the period of 1980-1981 from patients with epidemic keratoconjunctivitis, J Med Sci Biol, 37, 161-169, (1984)
- 10) Kemp MC and Hierholzer JC: Three adenovirus type 8 genome types defined by restriction enzyme analysis: prototype stability in geographically separated populations, J Clin Microbiol, 23, 469-474 (1986)
- 11) Adrian T et al: Restriction site mapping of adenovirus type 8 genome types, Res Virol, 141, 611-624 (1990)
- 12) De Jong JC et al: Developments in the molecular epidemiology of adenovirus 8 keratoconjunctivitis, J Med Virol, 38, 102-107 (1992)
- 13) Tanaka K et al: Genetic characterization of adenovirus strains isolated from patients with acute conjunctivitis in the City San Paulo, Brazil, J Med Virol, 61, 143-149 (2000)
- 14) Adrian T et al: A proposal for naming adenovirus genome types, exemplified by adenovirus type 6, J Gen Virol, 66, 2685-2691(1985)