

平成 25 年度に広島市内で検出された アデノウイルスの遺伝子解析

田中 寛子 瀧口 由佳理 藤井 慶樹 山本 美和子
京塚 明美 石村 勝之

はじめに

アデノウイルスは咽頭結膜熱・流行性角結膜炎・感染性胃腸炎などさまざまな疾患を引き起こす。平成 20 年までは 51 種類の血清型があり、A～F の 6 種に分類されていた。その後 52 型以降の型が新たに報告され、種も A～G の 7 種となった。アデノウイルスの新しい型やその決定法については世界的に議論が続いているところである。

平成 24 年 5 月に咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査診断マニュアル(以下診断マニュアルという)が改訂され、アデノウイルスの検査法も新しい型別に対応したものが示された。新型アデノウイルスとして報告されているアデノウイルスは、種内の異なった型間での組み換えを起こしている。シーケンスによるアデノウイルスの型の同定においては、組み換え(リコンビナント)に対応するため hexon・fiber・penton の 3 つの構造蛋白質をコードする領域を別々に決定することが推奨されている。

当所で多く検出される C 種アデノウイルス(1・2・5・6 型)について 3 領域のシーケンスによる型別を行ったので報告する。

方 法

1 検査材料

平成 25 年 4 月から平成 26 年 3 月の間に発生動向調査において当所に搬入された検体のうち、細胞培養でアデノウイルスが分離され、かつ中和抗体法により C 種に型別された 20 株について検査を実施した。20 株の血清型別の内訳は 1 型 6 株、2 型 6 株、5 型 7 株、6 型 1 株である。

2 遺伝子検査

HEp2 または Vero 細胞で分離・回収したウイルス培養液上清 140 μ l を用いて QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) で DNA を抽出した。抽出した DNA について診断マニュアルの方法 4 (hexon 領域)・方法 5 (fiber 領域)・方法 6 (penton 領域)に従ってダイレクトシーケンス法で行った。

3 疫学的解析

ダイレクトシーケンス法により決定した hexon 領域 698bp, fiber 領域 306bp, penton 領域 481bp について N-J 法を用いて系統樹解析を行った。レファレンスの遺伝子配列については 3 領域の遺伝子型が全て決定されているものを使用した。それぞれのアクセシオン番号は 1 型(JX173082・JX173083・JX173085・KF268331) 2 型(JX173077・KF268130・KF268310) 5 型(KF268127・KF429754) 6 型(JX423389) である。

結 果

検体情報および中和抗体法による血清型を表 1 に示した。C 種アデノウイルスが検出された患者の診断名は感染性胃腸炎・腸重積等の胃腸炎症状が 16/20 検体で最も多かった。また細気管支炎・肺炎等の呼吸器症状が 3/20 検体であった。

hexon・fiber・penton の 3 つの領域それぞれについての系統樹は図 1・2・3 のとおりである。hexon 領域の遺伝子型と血清型が一致していない株が 4 株あった。また hexon 領域と fiber 領域の遺伝子型は一致しているが penton 領域の遺伝子型が異なる、リコンビナントウイルスが 7 株あった。1130045F・1130055F・1130139T の 3 つの検体については、fiber・penton 領域がレファレンスとした遺伝子型 1・2・5・6 型のどれとも異なる塩基の違いが各 3 塩基あり、系統樹上では他の株と異なるクラスターを形成した。

考 察

診断マニュアルの方法 4 で標的としているのは hexon のループ 1 コード領域であり、この部位は中和反応を規定している領域なので血清型と一致していることが多く¹⁾、hexon 領域の遺伝子型と血清型が一致していない 4 株については、中和抗体法での交差反応の可能性も考えられた。また今回 hexon・fiber 領域と penton 領域の遺伝子型が異なる株が検出され、広島市で胃腸炎や呼吸器症状のある患者から検出されている C 種アデノウイルスにもリコンビナントウイルスが多く存在する

ことがわかった。しかし Penton 領域は他の領域より C 種の遺伝子型間の塩基配列の差が少なく、数塩基の変異が系統樹解析に影響すると考えられるため、遺伝子型決定の際には注意が必要である。

日本では流行性角結膜炎の原因として特に D 種のリコンビナントウイルスの新型アデノウイルスが流行しており^{2), 3)}、血清型別のみでは型別できないため遺伝子型の解析が必須の状況となっている。しかし系統樹解析や BLAST 検索で型を決定する場合、比較されるレファレンス配列が問題となる。過去に全塩基配列が公開されている株に関しては、リコンビナントウイルスである可能性も考慮する必要がある^{4), 5)}。特に多くの株が解析されている hexon 領域では塩基配列が公開されているものが多くあるが、fiber 領域や penton 領域については数が少なく、今後も解析結果の集積が望まれる。

文 献

- 1) 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2版)，(2012)
- 2) Tsuguto Fujimoto et al: A Molecular Epidemiologic Study of Human Adenovirus Type 8 Isolates Causing Epidemic Keratoconjunctivitis in Kawasaki City, Japan in 2011, Jpn. J. Infect. Dis., 65, 260~263(2012)
- 3) 国立感染症研究所：2004~2009年の6年間における流行性角結膜炎患者113名からのアデノウイルス検索ー福井県，病原微生物検出情報，31, 237~238(2010)
- 4) Hiroaki Ishiko et al: Novel Human Adenovirus Causing Nosocomial Epidemic Keratoconjunctivitis, Journal of Clinical Microbiology, 46, 2002~2008(2008)
- 5) Koki Aoki et al: Epidemic Keratoconjunctivitis Due to the Novel Hexon-Chimeric-Intermediate 22, 37/H8 Human Adenovirus, Journal of Clinical Microbiology, 46, 3259~3269(2008)

謝 辞

広島市発生動向調査事業にご協力頂いた定点医療機関各位に深謝します。

表 1 検体情報および血清型

検体	検体種別	年齢(歳)	性別	診断名	血清型(型)
1130045F	糞便	1	男	感染性胃腸炎	1
1130055F	糞便	2	男	腸重積症	1
1130116T	咽頭拭い液	4	女	感染性胃腸炎	1
1130139T	咽頭拭い液	0	女	発疹症	1
1130161T	咽頭拭い液	0	男	感染性胃腸炎	1
1130353F	糞便	1	男	腸重積症	1
1130086F	糞便	1	男	感染性胃腸炎	2
1130149T	咽頭拭い液	0	男	感染性胃腸炎	2
1130166T	咽頭拭い液	1	男	腸重積症	2
1130341F	糞便	0	女	腸重積症	2
1130362F	糞便	4	女	腸重積症	2
1130400T	咽頭拭い液	1	男	肺炎	2
1130132N	鼻汁	0	男	細気管支炎	5
1130171T	咽頭拭い液	0	男	不明熱	5
1130174F	糞便	2	男	腸重積症	5
1130179F	糞便	20	女	感染性胃腸炎	5
1130186T	咽頭拭い液	0	男	細気管支炎	5
1130243F	糞便	3	男	腸重積症	5
1130394F	糞便	0	男	腸重積症	5
1130172F	糞便	1	男	腸重積症	6

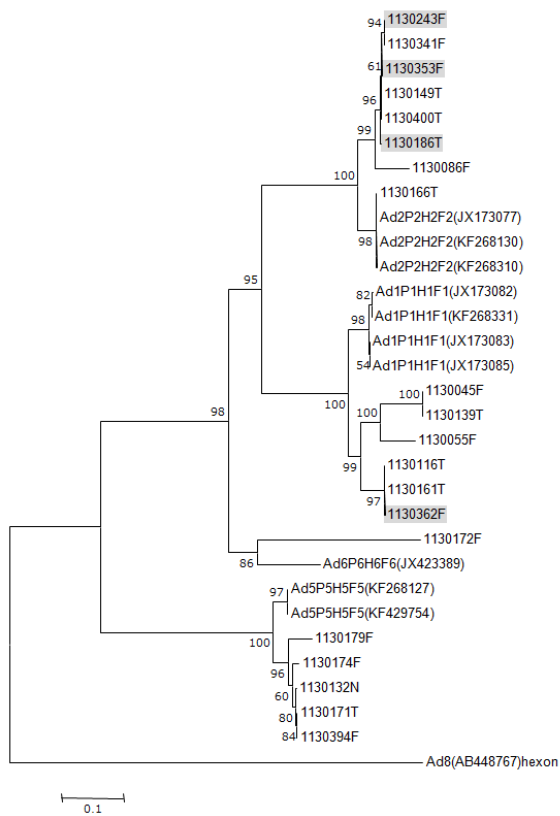


図1 hexon 領域系統樹 (698bp)

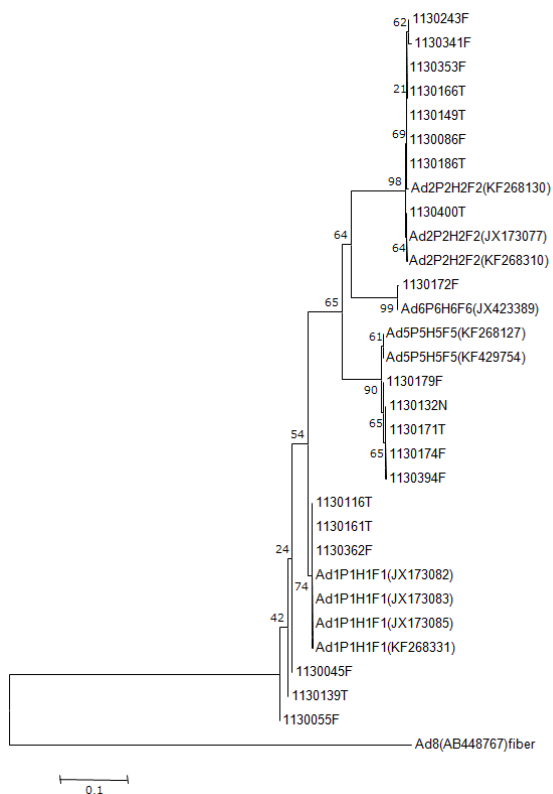


図2 fiber 領域系統樹 (306bp)



図3 penton 領域系統樹 (481bp)