

### 3 調査研究

#### 3・1 報文

##### 1) 熊本県で主に眼疾患から検出されたアデノウイルスの分子疫学解析（2008年度～2013年度）

吉岡 健太 日隈 陸太郎<sup>\*1</sup> 清田 直子<sup>\*2</sup> 西村 浩一<sup>\*3</sup> 原田 誠也

#### 要旨

流行性角結膜炎（EKC）等の主な原因ウイルスであるヒト・アデノウイルス（HAdV）の流行型を把握するため、2008年度から2013年度の間に検出されたHAdVの分子疫学解析を行った。その結果、12の型が検出され、特に3型、4型、8型、37型、53型、54型、及び56型の検出率が高かった。また、4型、8型、37型、及び53型で流行の年次変化がみられた。

なお、52型以降の新型HAdVでは、2008年度に54型が検出され、2010年度から53型及び56型も検出されはじめた。これらの新型HAdVによるEKCの臨床症状は他の型より重症で、治療が長引く傾向にあった。

#### キーワード：流行性角結膜炎、アデノウイルス、新型アデノウイルス

#### はじめに

当所は感染症発生動向調査事業として、眼科定点から提供された臨床検体のウイルス検査を行っている。眼科疾患のうち、五類感染症定点把握疾患の一つである流行性角結膜炎（以下「EKC」という。）は、主にヒト・アデノウイルス（以下「HAdV」という。）の感染によって発症する疾患である。HAdVは直径約80nm、正20面体構造のエンベロープを持たない2本鎖DNAウイルスで、2008年までは51種類の型が存在し、A～Fの6種に分類されていた。しかしその後、新たな型が次々と報告され、現在68種類<sup>1)</sup>となり、さらに胃腸炎由来の52型がG種とされたため、種もA～Gの7種となっている<sup>1), 2)</sup>。HAdVの種と引き起こす疾患には明瞭な関連性がみられ、EKCからは従来D種の8型、19型、37型、E種の4型、及びB種の3型などがよく検出されていたが、近年は53型<sup>3), 4)</sup>、54型<sup>5), 6)</sup>、及び56型<sup>7), 8)</sup>といった新型HAdVが検出され、D種に分類されることが報告されている。

眼科領域におけるHAdVの型同定は、従来、分離されたウイルスと眼疾患を起こしやすいHAdVに対する10種

程度の抗血清との中和試験で行われていたが、近年は、PCR法で増幅したDNAの制限酵素切断パターンで型別する方法<sup>9)</sup>、PCR法で増幅されたhexon遺伝子の部分配列を解読することにより型別する方法<sup>10)</sup>、増幅されるDNAのサイズがHAdVの型ごとに異なるように設計したマルチプレックス-PCR法によって型別する方法<sup>11)</sup>などの遺伝学的方法も行われている。しかし、新型HAdVには、複数のウイルスの遺伝子が組み変わることにより生じたキメラウイルスが多数含まれており、53型はhexon領域が22型、fiber領域が8型、及びpenton領域が37型、54型はfiber領域が8型、56型はhexon領域が15型、penton及びfiber領域が9型である。これらのウイルスを正確に型判定するためには、フルゲノム（約36,000bp）の塩基配列を決定する方法が最も確実であるが、現在、当所が保有しているサンガー法によるキャピラリーシーケンサーでフルゲノムの塩基配列を決定することは容易ではない。そこで、簡易型別法として開発されているゲノムのhexon、fiber及びpenton領域の一部をそれぞれPCR法で増幅し、塩基配列を決定する方法<sup>12)</sup>により実施した。

本研究では、眼科の臨床検体から検出されたHAdV

\*1 日隈眼科医院 \*2 現熊本県南広域本部芦北地域振興局保健福祉環境部 \*3 現熊本県北広域本部阿蘇地域振興局保健福祉環境部

を中和試験や遺伝学的方法で型別し、流行型の年次変化と型内の遺伝学的変異及び型による臨床症状の相違について解析を行ったので報告する。

## 材料及び方法

### 1) 検査材料

2008年4月から2014年3月の間に、EKCあるいは結膜炎等の臨床診断名で眼科定点から提供された結膜ぬぐい液460件を検査材料とした。

### 2) 検査方法

① ウィルス分離及び中和試験による型別：A549細胞及びRD-18S細胞を用い、HAdVの分離を行った。その後、HAdV抗血清（1～8型、11型、19型及び37型：デンカ生研または国立感染症研究所配布）による中和試験で型を決定した。また、下記の遺伝子検査法も併用して型別を行った。

②PCR法による遺伝子検査及びダイレクトシークエンス法による型別：2008年4月から2010年7月までの咽頭ぬぐい液130件から分離された株は中和試験のみで型別を行った。残りの咽頭ぬぐい液330件は、ウイルス分離と並行して、咽頭ぬぐい液から直接DNAを抽出し、HAdVのスクリーニング用としてXuら<sup>13)</sup>のAd1/Ad2プライマーによるPCR法でゲノムDNAのhexon C4領域を增幅後、アガロースゲル電気泳動により目的遺伝子の増幅バンド(482bp)を確認した。なお、ウイルスは分離できず、遺伝子のみが検出された検体や、中和法で分離株の型決定ができず、新型HAdVが疑われた株は、再度Takeuchiら<sup>14)</sup>のS28/S52プライマーによるPCR法でhexon loop1領域を、Xuら<sup>13)</sup>の6対の種特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法でfiber領域を、及びFujimotoら<sup>14)</sup>のpenton PCR用プライマーでpenton領域をそれぞれのPCR条件で増幅した。増幅バンドを精製後、ダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定し、BLAST検索及びMEGA5.0を用いた近隣結合法による分子系統樹で型を判定した。

③ 臨床情報の収集：HAdVの型による臨床症状等の相違を調査するため、検体添付の患者情報を参考にするとともに、病原体定点である眼科医院から直接情報を収集した。

## 検査成績

### 1) HAdVの検出状況

眼科の臨床検体460件中192件(41.7%)から、12

種類の型のHAdVが検出された。型の内訳は、37型が55件(28.6%)、56型が33件(17.1%)、53型が21件(10.9%)、3型が18件(9.3%)、8型が17件(8.8%)、4型及び54型が各16件(8.3%)、11型が5件(2.6%)、19型が2件(1.0%)、1型、6型及び34型が各1件(0.5%)、型別不明(NT)が6件(3.1%)であり、新型である53型、54型及び56型は合計70件(36.4%)であった。臨床診断名別にみると、EKCと診断された257件では、163件(63.4%)からHAdVが検出され、37型を筆頭に、3型、4型、8型、53型、54型及び56型の検出率が高かった。一方、結膜炎等と診断された203件では、29件(14.3%)からHAdVが検出され、56型の検出率が比較的高かった(表1)。

### 2) 流行型の年次変化

4型、8型、37型及び53型に流行の年次変化がみられた。4型は2012年度、8型は2013年度に検出率が増加した。37型は毎年度検出されているが、特に2008年度～2009年度及び2013年度の検出率が高かった。53型は2010年度から検出され始めたが、初年度が最も高率に検出された(表2、図1)。

### 3) 月別検出状況

各型の検出数は年度により異なり、定まったパターンはみられなかった(図2)。

### 4) 年齢別検出状況

20代～40代をピークとして、0歳から70歳以上まで幅広い年齢層から検出されたが、92.7%(178件/192件)が20代以上からの検出であり、20歳未満からは非常に少なかった(図3)。

### 5) 系統樹解析

ダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定した一部の株について、hexon、fiber、及びpenton領域の分子系統樹解析を行った。その結果、各型ごとに明瞭なクラスターを形成した。クラスター内の塩基配列の違いはほとんど認められなかつたが、4型(fiber領域)、8型(hexon領域、penton領域)及び56型(penton領域)で、検出年度によりわずかな違いがみられ、サブクラスターを形成した。なお、キメラウィルスとされる53型はhexon領域が22型、fiber領域が8型及びpenton領域が37型と同一のクラスターに分類された。また、54型はfiber領域のみ8型のサブクラスターとして分類され、56型はhexon領域が15型、fiber領域及びpenton領域が9型と同一のクラスターに分類された(図4-a,b,c)。

表1 臨床診断名別アデノウイルス検出状況（2008～2013年度）

	流行性 角結膜炎	結膜炎等		合計		
検体数	257	203		460		
HAdV 1型		1	(3.4)	1	(0.5)	
HAdV 3型	16	(9.8)	2	(6.8)	18	(9.3)
HAdV 4型	13	(7.9)	3	(10.3)	16	(8.3)
HAdV 6型	1	(0.6)			1	(0.5)
HAdV 8型	15	(9.2)	2	(6.8)	17	(8.8)
HAdV 11型	4	(2.4)	1	(3.4)	5	(2.6)
HAdV 19型	1	(0.6)	1	(3.4)	2	(1.0)
HAdV 34型	1	(0.6)			1	(0.5)
HAdV 37型	50	(30.6)	5	(17.2)	55	(28.6)
HAdV 53型	19	(11.6)	2	(6.8)	21	(10.9)
HAdV 54型	16	(9.8)			16	(8.3)
HAdV 56型	25	(15.3)	8	(27.5)	33	(17.1)
HAdV NT	2	(1.2)	4	(13.7)	6	(3.1)
検出数	163		29		192	
検出率	63.4%		14.3%		41.7%	

※( )内は各型の検出数/検出数(%)

表2 型別・年度別アデノウイルス検出数

	2008年度	2009年度	2010年度	2011年度	2012年度	2013年度	合計
検体数	94	21	63	62	97	123	460
HAdV 1型					1		1
HAdV 3型	4		6	2		6	18
HAdV 4型				1	13	2	16
HAdV 6型			1				1
HAdV 8型				1	1	15	17
HAdV 11型	2		2	1			5
HAdV 19型					2		2
HAdV 34型				1			1
HAdV 37型	17	7	3	1	3	24	55
HAdV 53型			12	3	3	3	21
HAdV 54型	4			5	7		16
HAdV 56型			9	9	8	7	33
HAdV NT	1			2	2	1	6
検出数	28	7	33	26	40	58	192
検出率(%)	29.8	33.3	48.5	41.9	41.2	47.2	41.7

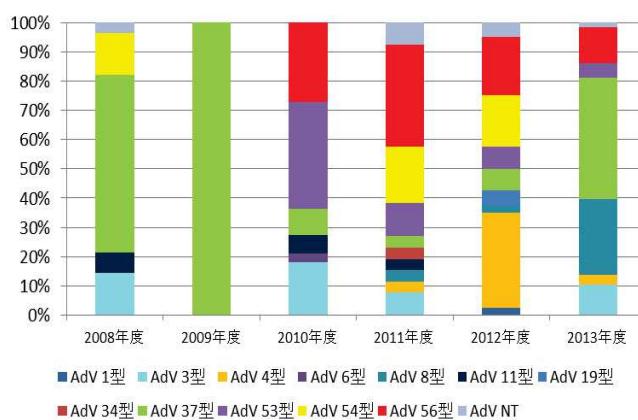


図1 型別・年度別アデノウイルス検出割合

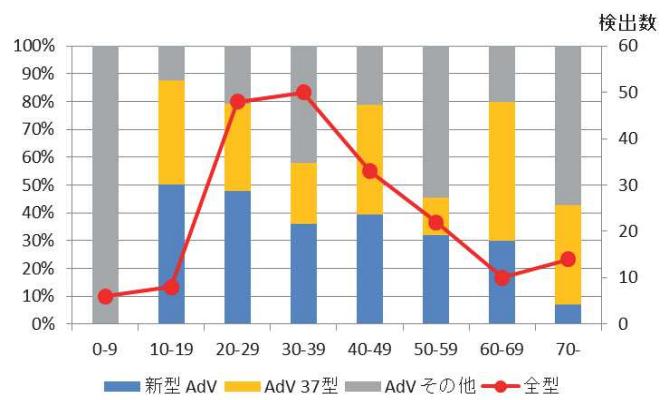


図3 年齢別アデノウイルス検出状況

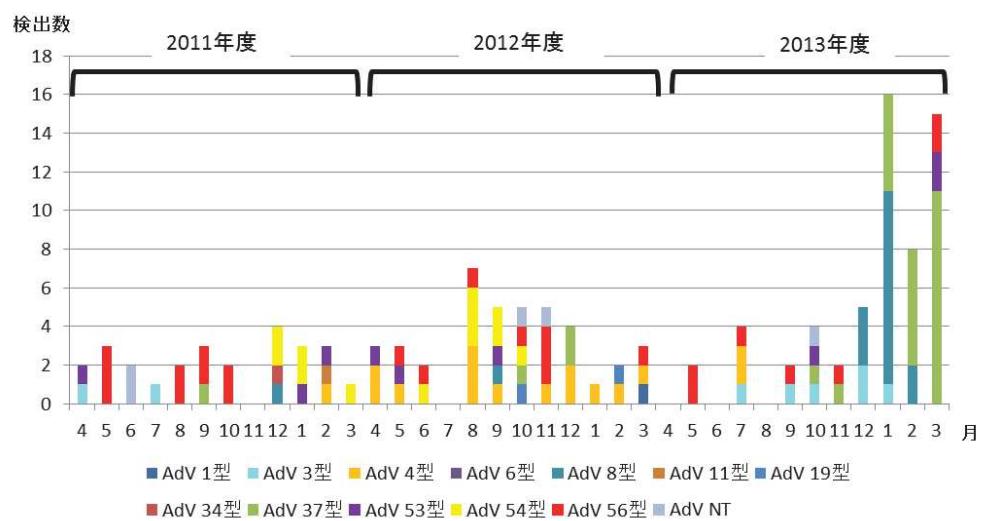
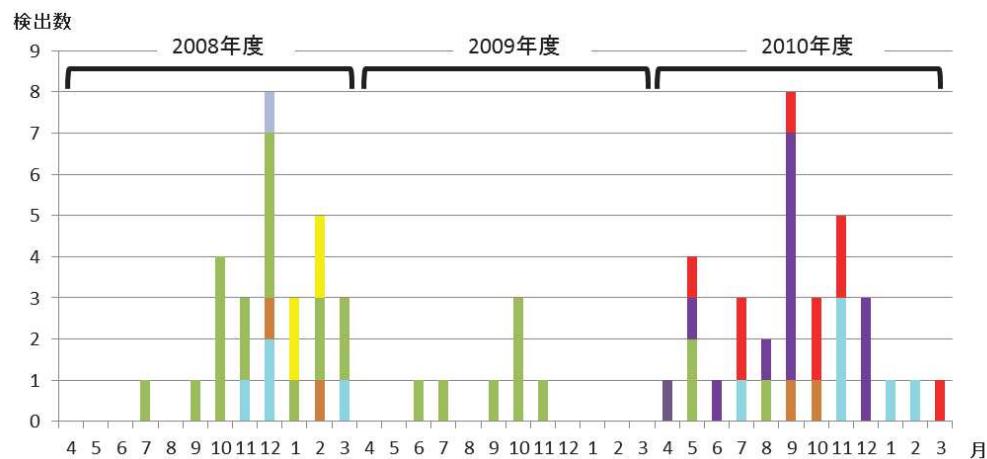


図2 月別アデノウイルス検出状況

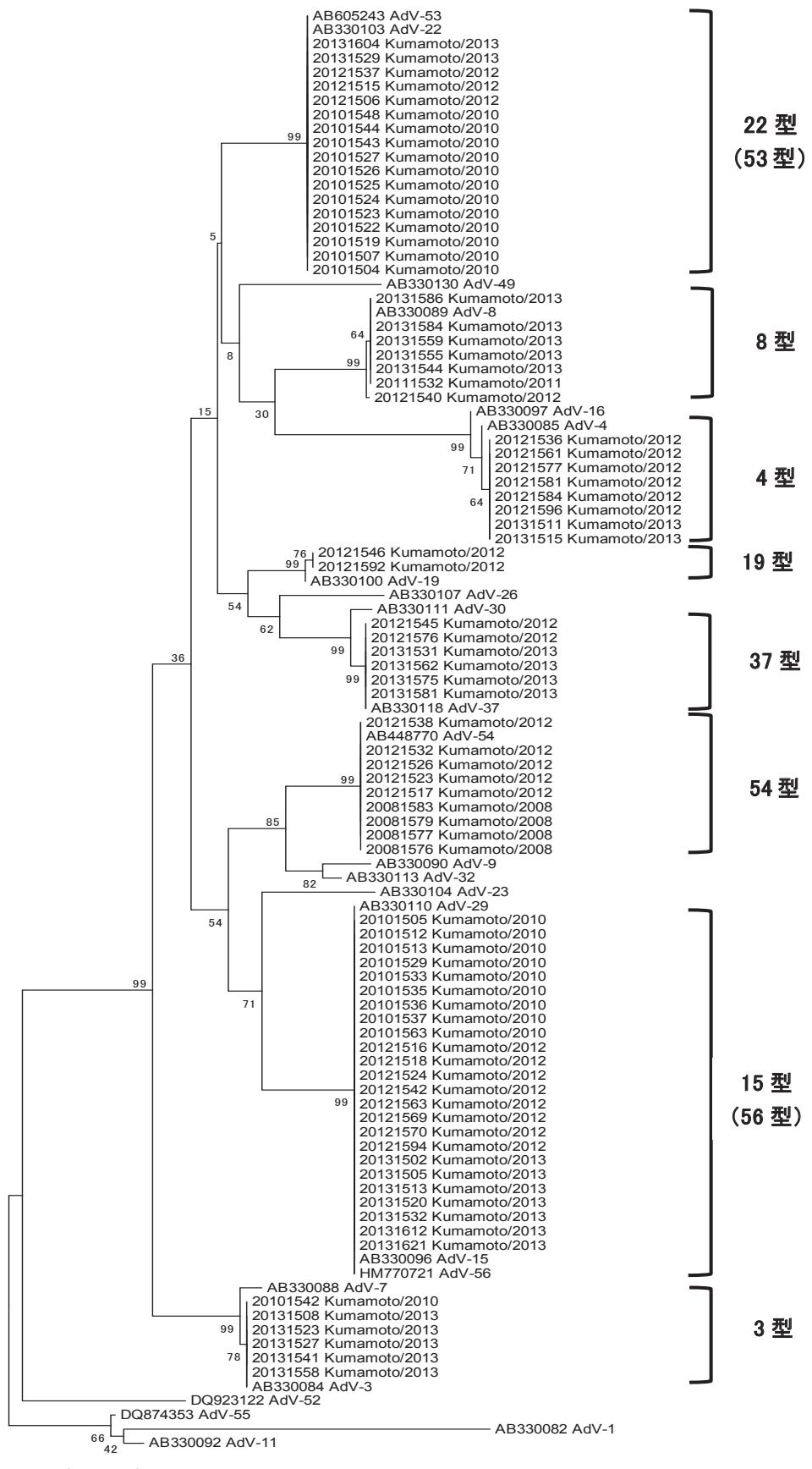


図 4-a hexon 領域の分子系統樹

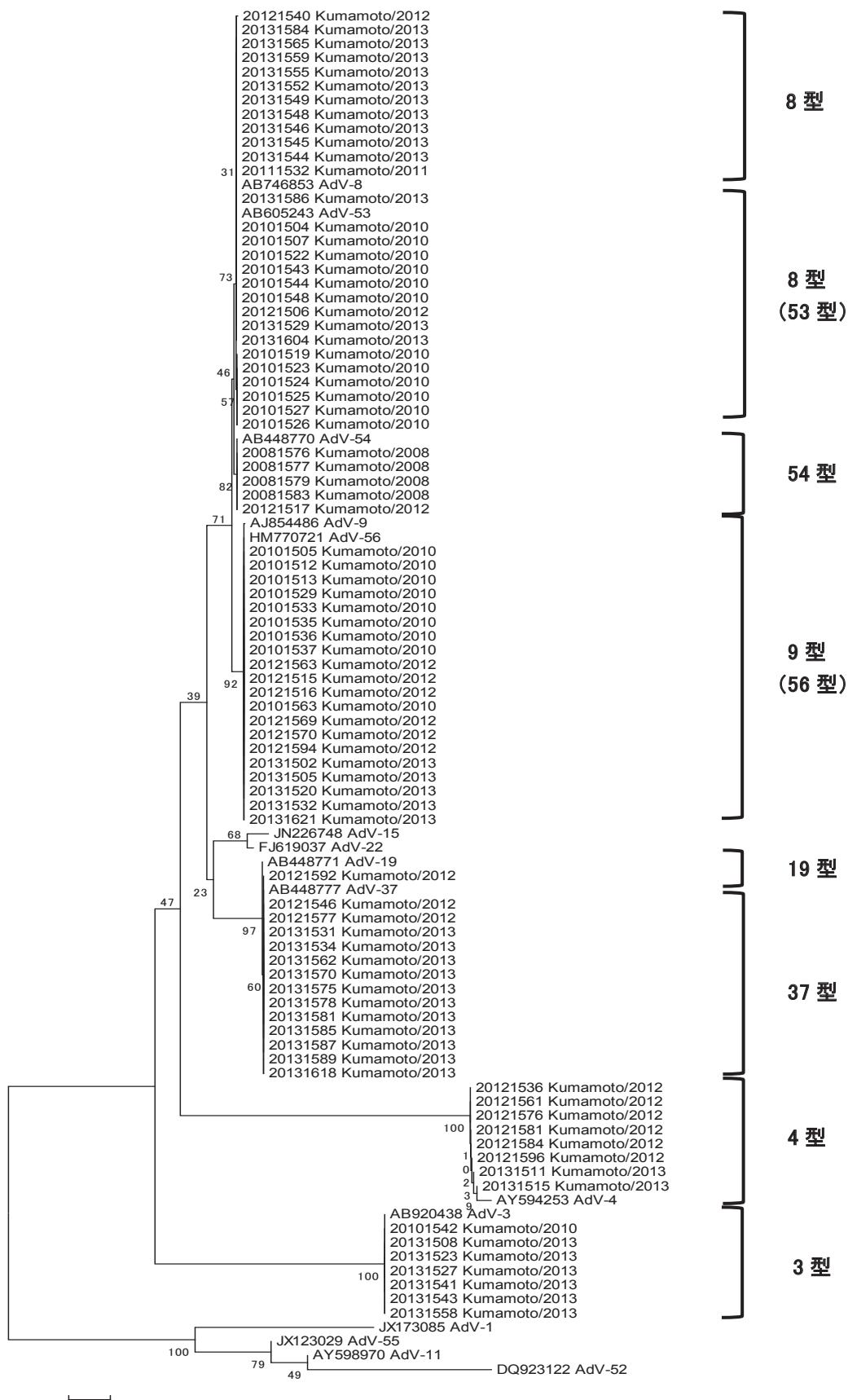


図 4-b fiber 領域の分子系統樹

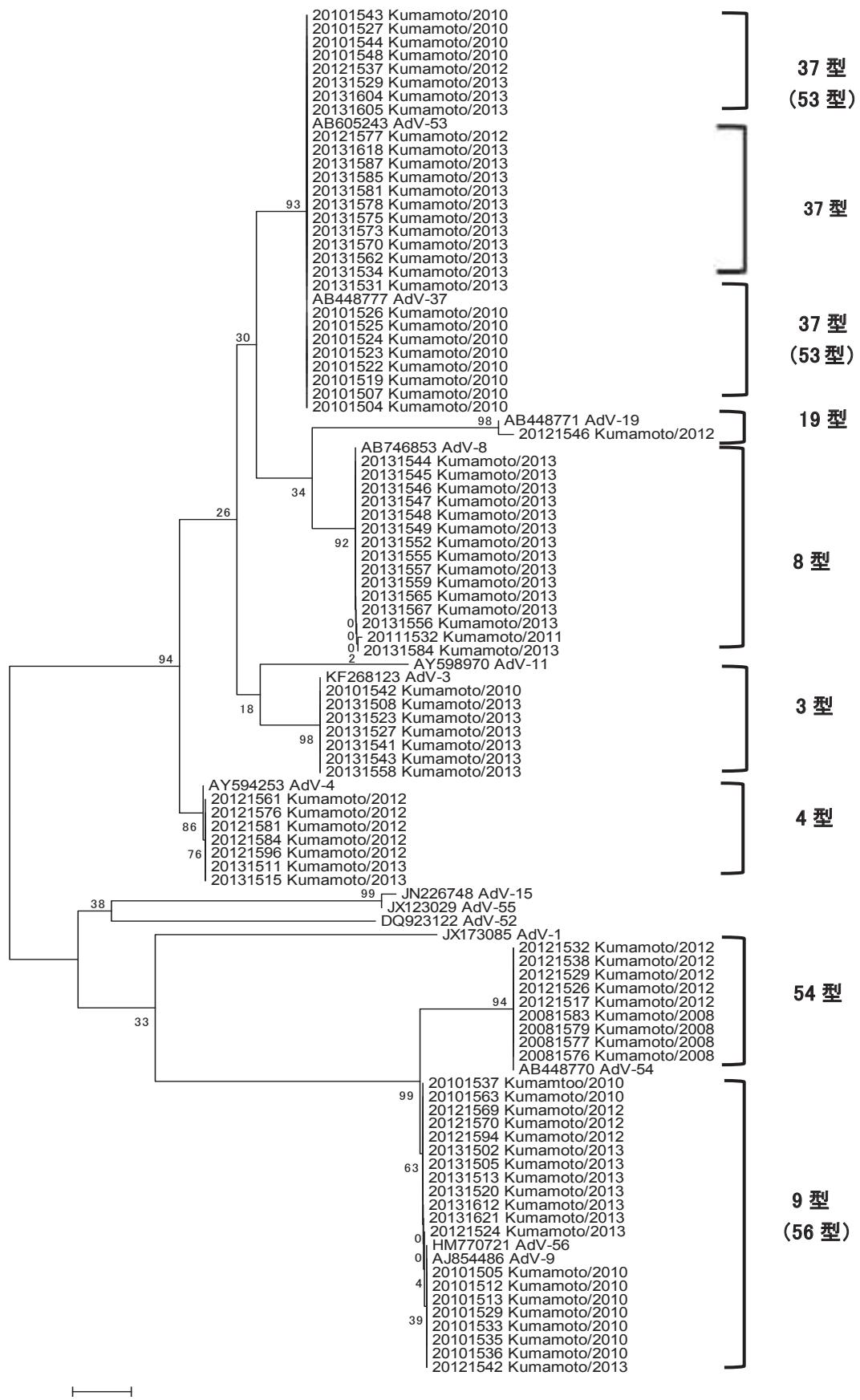


図 4-c penton 領域の分子系統樹

**表3 ウイルス分離とPCR法の比較(件数)**

	PCR(+)	PCR(-)	合計
分離(+)	123	0	123
分離(-)	27	180	207
合計	150	180	330

#### 6) 新型 HAdV の中和試験における交差反応

新型 HAdV はいずれの型も 8 型と交差反応が認められ、HAdV 抗血清で細胞変性効果 (CPE) が抑制される傾向を示した。しかし、実際の 8 型 HAdV と比較すると抑制の弱い株が多く、中にはほとんど抑制の認められない株も観察された。

#### 7) ウイルス分離と PCR 法の比較

両方の検査法を併用した臨床検体 330 件について、検査法ごとの検査成績を比較すると、ウイルス分離では 123 件 (37.3%) から分離され、PCR 法ではそれらをすべて含む 150 件 (45.4%) から検出された (表 3)。

また、ウイルス分離のみで検査した 2008 年 4 月から 2010 年 7 月までの 130 件から 42 株の HAdV が分離され、これらの検体はすべて PCR 陽性であり合計すると、ウイルス分離により 460 件中 165 件 (35.9%) から HAdV が分離された。PCR 法ではこれらをすべて含む 192 件 (41.7%) から HAdV が検出された。なお、ウイルス分離陰性・PCR 陽性となった HAdV の型は、3 型が 1 件、8 型が 14 件、53 型が 2 件、54 型が 6 件、型不明 (NT) が 4 件であった (データ未掲載)。

#### 8) HAdV の型による臨床症状の相違

病原体定点の眼科医院から得られた情報によると、新型 HAdV による EKC の臨床所見は、他の型による EKC より重症な結膜充血を示す例が多く、さらに角膜障害も多い傾向が認められる。また、治癒までに要する期間は、新型及び 37 型で 17~18 日間、その他の型で約 12 日間程度であった。

#### 考 察

EKC の原因となる HAdV の型は、E 種の 4 型、B 種の 3 型及び 11 型等を除くと、主に D 種であり、これまで全国的に 8 型、19 型、37 型などが流行を繰り返してきた。今回、2008 年度から 2013 年度までに、眼科の臨床検体から検出された HAdV の分子疫学解析を行ったところ、12 の型が検出され、EKC と診断された臨床検体から 3 型、4 型、8 型、37 型、53 型、54 型、及び 56 型が多数検出された。特に、4 型及び 8 型は、近年ほとんど検出されていなかったが、4 型は 2012 年度に、8 型は 2013 年度に急増した。Fujimoto ら<sup>15)</sup> も、

長年ほとんど検出されなかつた 8 型による EKC が、2011 年に川崎市で突然散発性に集団発生した事例を報告していることから、これらの型は、まだ EKC の重要な原因ウイルスであり、集団免疫の低下により、大流行を起こす可能性が示唆された。

新型 HAdV のうち、53 型は 2010 年度に初めて検出されたが、検出件数の 36.3% (12 件/33 件) を占め、その後毎年度検出されている。kaneko ら<sup>3)</sup> は、53 型は 1996 年から国内で普通に検出されるようになったが、実際は 1980 年代に EKC から分離されていた類似ウイルスから進化した可能性があると述べている。

54 型は、Ishiko ら<sup>5), 16)</sup> によると、2000 年に神戸及び浜松の EKC 患者から検出され、2001 年には本県の患者からも検出されている。その後、今回の調査で 2008 年に検出されるまで、その動向は不明であるが、54 型は 8 型の抗血清と交差があり、8 型同様、細胞培養による CPE の発現が遅いことから、8 型と誤同定されている可能性が考えられた。

56 型は、Kaneko ら<sup>6)</sup> によると、本県を含む国内 7 道県で 2008 年度に採取された EKC の検体 102 件中 11 件から検出され、このうち 2 件は本県で採取された検体から検出されている。なお、この 2 件は当所ではウイルスが分離できなかつたため、今回の検査成績には含まれていない。以後、2010 年度から毎年度検出され、現在では EKC から検出される主要ウイルスの一つとなっている。

これら 3 種の新型 HAdV はキメラウイルスであり、中和試験において、多くの株で 8 型抗血清との交差反応がみられ、従来の HAdV 抗血清を用いた中和反応では型別決定が困難であることが示された。したがって、今後は、ゲノムの 3 領域の一部を増幅して塩基配列を決定する簡易型別法やフルゲノム解析で型別を行う必要がある。

また、分子系統樹解析の結果、各型の HAdV は、hexon, fiber, penton の 3 領域とも、型ごとに明瞭なクラスターを形成した。さらに、Shimada ら<sup>10)</sup> や Hiroi ら<sup>17)</sup> の分析結果と同様、各クラスター内では標準株と各株が非常に高い相同性を示した。しかしながら、分離年度によるわずかな違いでサブクラスターを形成した株もみられたことから、HAdV は各領域の塩基配列を保ちながらもわずかに変異し、流行を繰り返している可能性が示唆された。

HAdV の検査法に関して、梶原ら<sup>18)</sup> はウイルス分離では 30.4% であった陽性率が、PCR 法では 73.9% と、約 2.4 倍高感度になったと報告している。今回、我々

の調査では、ウイルス分離のみ行った2008年度と2009年の陽性率は30%程度であったが、PCR法を併用した2010年度以降は各年度40%以上となり、幾分検出率が向上した。ウイルスを分離し保存しておくことは、将来的な詳細な解析のために必要不可欠であるが、ウイルスが分離された検体はすべてPCR法で検出されたことから、流行状況を迅速に調査するためには、時間と手間のかかるウイルス分離より、PCR法の方が簡便で効率的な方法であることが示された。

また、型による臨床症状の相違を調査したところ、新型によるEKCは症状の重症化、治癒期間の延長が認められたが、これは、新型HAdVが近年流行し始めたことにより、新型HAdVの抗体の保有者が少ないとも一因であると推察された。

以上のことから、わずかながらも遺伝子の変異や遺伝子の組み変わった新型HAdVの流行等が認められることから、今後も引き続き調査を継続することが重要である。

### まとめ

眼科定点で主にEKCから検出されるHAdVの分子疫学型解析を行ったところ、本県でも流行型の年次変化がみられ、4型、8型、37型、及び53型で流行年度が確認された。2008年度から、新型HAdVが検出されはじめ、これらの型によるEKCは従来の型より重症で治療が長引く傾向が認められた。

また、新型HAdVでは、交差反応により従来のHAdV抗血清を用いた中和試験が困難であることから、hexon, fiber、及びpentonの3領域のシーケンスによる型決定が必須となった。なお、今回行った3領域の遺伝子解析により、HAdVは、各領域の塩基配列を保ちながらもわずかに変異し、流行を繰り返している可能性が示唆された。今後も、引き続き調査を継続することが重要である。

### 文献

- 1) Ghebremedhin B., : European Journal of Microbiology and Immunology 41, 26–33 (2014).
- 2) Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, DelaCruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP: J. Virol 81, 5978–5984 (2007).
- 3) Kaneko H, Aoki K, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N, Ishiko H, Fujimoto T, Ikeda Y, Nakamura M, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T.: J Gen Virol. 92(Pt 6):1251-9 (2011).
- 4) Walsh Michael P, Chintakuntlawar Ashish, Robinson Christopher M, Madisch Ijad, Harrach, Bala' zs, Hudson Nolan R, Schnurr David, Heim Albert, James Chodosh, Seto Donald, Jones Morris S : PLoS ONE 4 (2009) .
- 5) Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Yamazaki S. J Clin Microbiol,46(6):2002-8 (2008) .
- 6) Kaneko H, Suzutani T, Aoki K, Kitaichi N, Ishida S, Ishiko H, Ohashi T, Okamoto S, Nakagawa H, Hinokuma R, Asato Y, Oniki S, Hashimoto T, Iida T, Ohno S : Br J Ophthalmol 95, 32–36 (2011).
- 7) Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. : Virology. 20,409(2),141-7 (2011).
- 8) Kaneko H, Aok K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzalez G, Koyanagi K O, Watanabe H, Suzutani1 T : J Clin Microbiol.49, 484–490 (2011).
- 9) Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, Itoh N, Isobe K, Uchio E, Ohno S, Nakajima H, Hata K, Ishiko H: J Clin Microbiol., 4, 2113-2116. (1996).
- 10) Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Ishiko H : J Clin Microbiol.42(4),1577-1584 (2004) .
- 11) Banik U, Adhikary AK, Suzuki E, Inada T, Okabe N. : J Clin Microbiol.43(3):1064-8 (2005) .
- 12) 国立感染症研究所編：病原体検出マニュアル（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) .
- 13) Xu W, McDonough MC, Erdman DD : J. Clin. Microbiol., 38, 4114-4120. (2000).
- 14) Takeuchi S, Itou N, Uchio E, Aoki K, Ohno S : J Clin Microbiol.,37, 1839-1845(1999).
- 15) Fujimoto T, Matsushima Y, Shimizu H, Ishimaru Y, Kano A : Jpn.J.Infect.Dis.,65, 260-263. (2012)
- 16) Ishiko H, Aoki K : J Clin Microbiol.47, 2678–2679 (2009) ,
- 17) Hiroi Satoshii, Morikawa Saeko, Takahashi Kazuo, Komano Jun, Kase Tetsuo : Jpn. J. Infect. Dis., 66, 436-438 (2013) .
- 18) 梶原淳睦、濱崎光宏、江藤良樹、千々和勝己、鬼木信乃：福岡県保健環境研究所年報, 29, 96–99, (2002) .