

# 福井県における流行性角結膜炎患者由来 アデノウイルスの遺伝子解析

佐藤かおり・酒井妙子・五十嵐映子・東方美保

Molecular Epidemiology of Human Adenoviruses Associated with Epidemic Keratoconjunctivitis  
in Fukui Prefecture

Kaori SATO, Taeko SAKAI, Eiko IGARASHI, Miho TOHO

## 1. はじめに

ヒトアデノウイルス（以下「HAdV」）は正 20 面体構造をとる 2 本鎖 DNA ウイルスであり、呼吸器疾患や眼疾患、消化器疾患等多彩な臨床症状を引き起こす<sup>1)</sup>。

HAdV は A～G までの 7 種に分類され、さらに 80 種以上の型に分類されており、51 型までは中和反応により規定された血清型として、52 型以降は全塩基配列により規定された遺伝子型として報告されている。そのため、中和反応のみで型同定をすることは困難であり、中和反応の抗原性を規定しているとされるヘキソン領域の遺伝子配列決定による型別が必要となっている。また、近年ヘキソン領域だけでなくファイバー領域やペントン領域も中和抗原性に関与することや、種内の異なる型間での組換え型が報告されていることから、ペントン、ヘキソンおよびファイバーの 3 領域の部分配列による型別が推奨されている<sup>2)</sup>。

本報では、2013～2017 年に福井県において流行性角結膜炎（以下「EKC」）の患者由来検体から検出された HAdV の遺伝子型の推移と、組換え型が多く報告されている D 種 HAdV についての 3 領域解析による遺伝子型別結果を報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 検査材料

2013 年 1 月～2017 年 12 月に県内の 2 医療機関において EKC 患者から採取された結膜拭い液 104 検体を試験に供した。

年別の検体数は 2013 年 4 検体、2014 年 26 検体、2015 年 36 検体、2016 年 25 検体、2017 年 13 検体であった。

### 2. 2 検査方法

#### 2. 2. 1 HAdV の検索

結膜拭い液を 3,000rpm で 10 分間遠心した上清を用いて遺伝子検出による HAdV の検索を行った。遺伝子検出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出後、「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査, 診断マニュアル (第 3 版)」<sup>3)</sup> に準じ、ヘキソン C4 領域の一部を PCR 法により増幅し、目的とする増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。遺伝子型別は MEGA ver.6.0<sup>4)</sup> を用いた NJ 法による系統樹解析により行った。

#### 2. 2. 2 D 種 HAdV についての組換え型検索

A549 細胞を用いたウイルス分離により分離された D 種 HAdV を対象とし、QIAamp Viral RNA Mini Kit

(QIAGEN) を用いて DNA を抽出後、「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査, 診断マニュアル (第 3 版)」<sup>3)</sup> に準じ、ペントン、ヘキソンおよびファイバー領域の一部を PCR 法により増幅し、目的とする増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

ペントン領域 約 273bp、ヘキソン領域 約 532bp およびファイバー領域 約 450bp における型別は MEGA ver.6.0<sup>4)</sup> を用いた NJ 法による系統樹解析により行った。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 HAdV の検索

供試検体 104 検体全例から HAdV が検出された。内訳は 1 型 1 件 (1%)、3 型 17 件 (16%)、4 型 9 件 (9%)、8 型 2 件 (2%)、37 型 18 件 (17%)、53 型 4 件 (4%)、54 型 32 件 (31%)、56 型 3 件 (3%)、64 型 18 件 (17%) であり、54 型、37 型、64 型、3 型の割合が多かった (図 1)。

年別にみると、2013 年は 8 型、2014 年は 4 型、2015 年は 54 型、2016 年は 64 型、2017 年は 54 型の検出率が高かった。8 型は 2014 年以降に検出されていないのに対し、54 型は 2014 年以降に検出されるようになり、2015 年に検出率が急増していた。54 型は 2015 年に全国的に急増し、以降 8 型に替わり EKC の主要病原体となっているが<sup>2)</sup>、福井県においても同様の傾向を示した (図 1)。2016 年は全国的には 54 型の検出率が高かった<sup>5)</sup>が、福井県では 64 型の検出率が高かった。

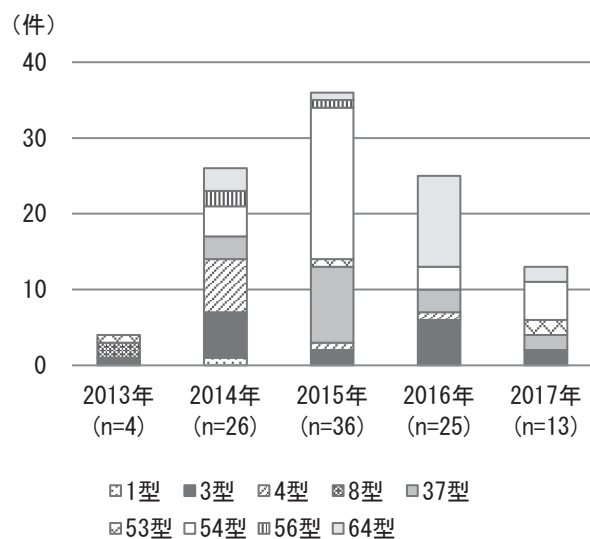


図 1 HAdV の検出状況

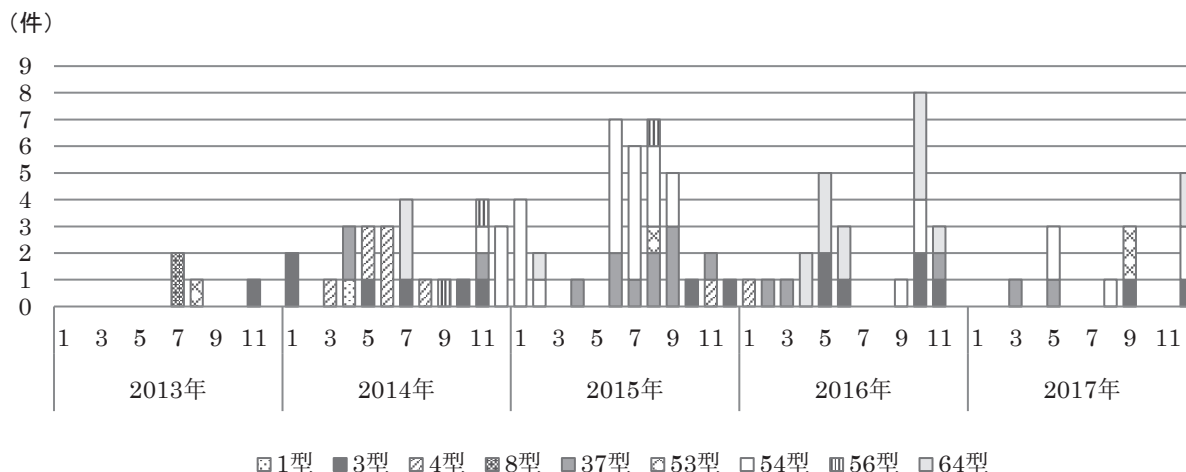


図2 月別検出状況

EKCは例年5～8月に多いが、2015～2018年は秋以降も報告数が増加していると言われており<sup>2)</sup>、当調査においても近年は5～8月に加え、秋以降にも検体が搬入される傾向がみられた。

年により流行する遺伝子型は異なり、その推移に季節性や周期性は見られなかった(図2)。

### 3. 2 D種 HAdV についての組換え型検索

D種のHAdV76株についてペントン、ヘキソンおよびファイバーの3領域における系統樹解析を実施したところ図3～5のとおりであった。

ペントン、ヘキソンおよびファイバーが何型に近いかによって遺伝子型(POHOFO)と表記すると、その内訳は8型(P8H8F8)が2株、37型(P37H37F37)が18株、53型(P37H22F8)が4株、54型(P54H54F8)が31株、56型(P56H56F9)が3株、64型(P22H19F37)が18株であった。すなわち、ヘキソンC4領域のみを用いた型別により53型、54型、56型および64型と型別されていた株が、実際に組換え型であることが確認された。

また、3領域における型別の結果はヘキソンC4領域を用いた型別の結果と同様であった。

## 4. まとめ

2013年～2017年の5年間にEKC患者の検体から検出されたHAdVは、9種類の遺伝子型に型別された。検出されたHAdVはD種が全体の約70%を占め、特に54型の占める割合が高かった。近年では1年を通して検体が搬入されているが、検出された型に周期性はなく、年により流行する型は変化していた。

D種HAdVについて3領域における型別を行ったところ、組換え型と報告されていた53型、54型、56型および64型を実際に確認することができた。

その一方、今回解析対象とした分離株は全て既報の型であり、新たな組換え株を見出すことはできなかった。しかし、新型の出現は大規模流行に繋がるため今後も調査が必要である。

## 謝辞

検体の採取および搬入にご協力いただきました健康福祉センターおよび医療機関の皆様へ深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 田代真人 他：ウイルス感染症の検査・診断スタンダード，羊土社，東京(2011)
- 2) 藤本嗣人 他：アデノウイルス感染症 2008～2017年6月，IASR，**38**，133-147 (2017)
- 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)  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/adenov3.pdf>
- 4) Tamura K. et al. : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0., Mol Biol Evol, 30, 2725-2729(2013)
- 5) IASR 病原微生物検出情報：  
<http://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/gv/2017/dat a2017.41j.pdf>

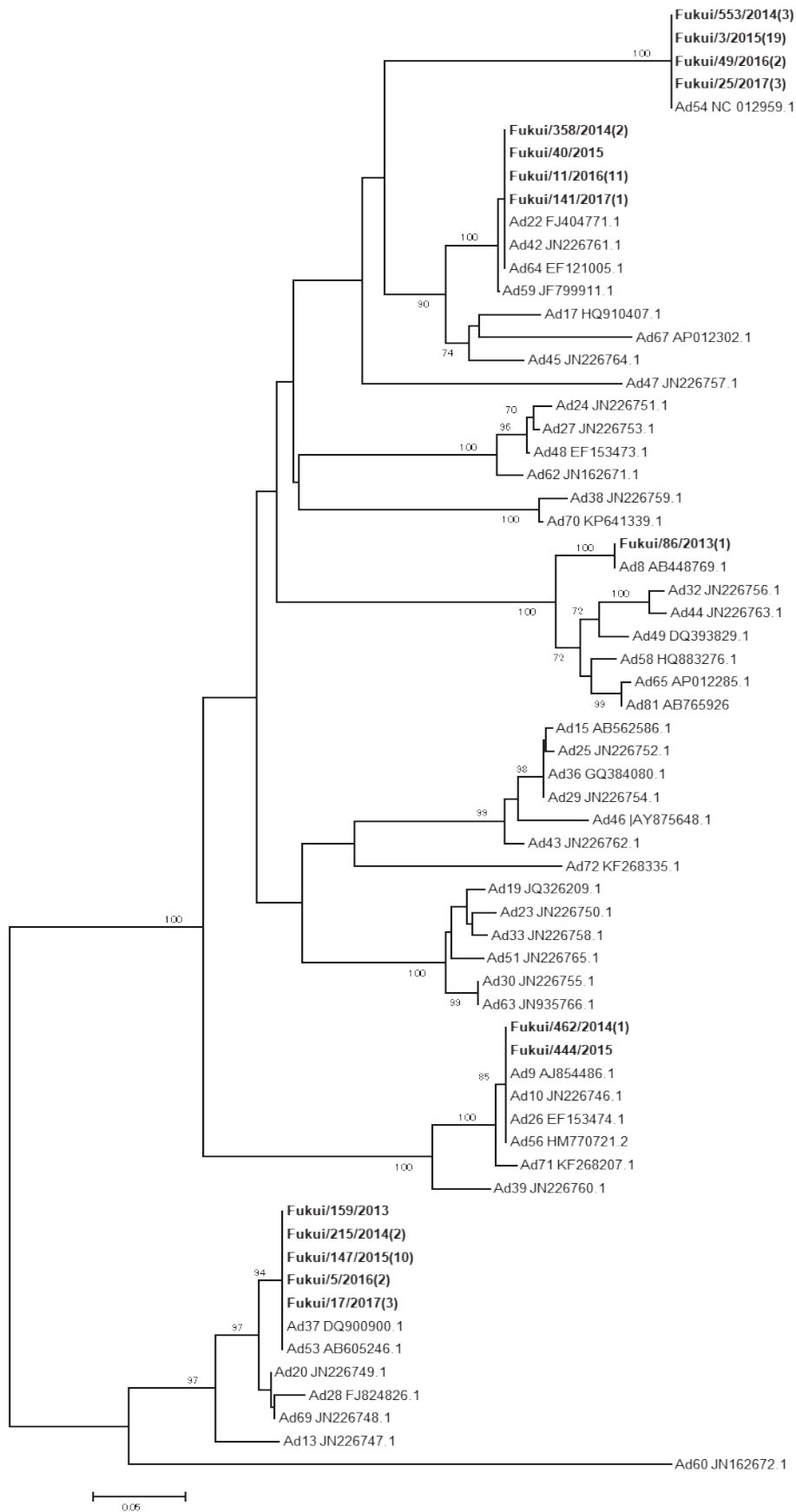


図3 ペントン領域 (273bp) における系統樹 (NJ法)

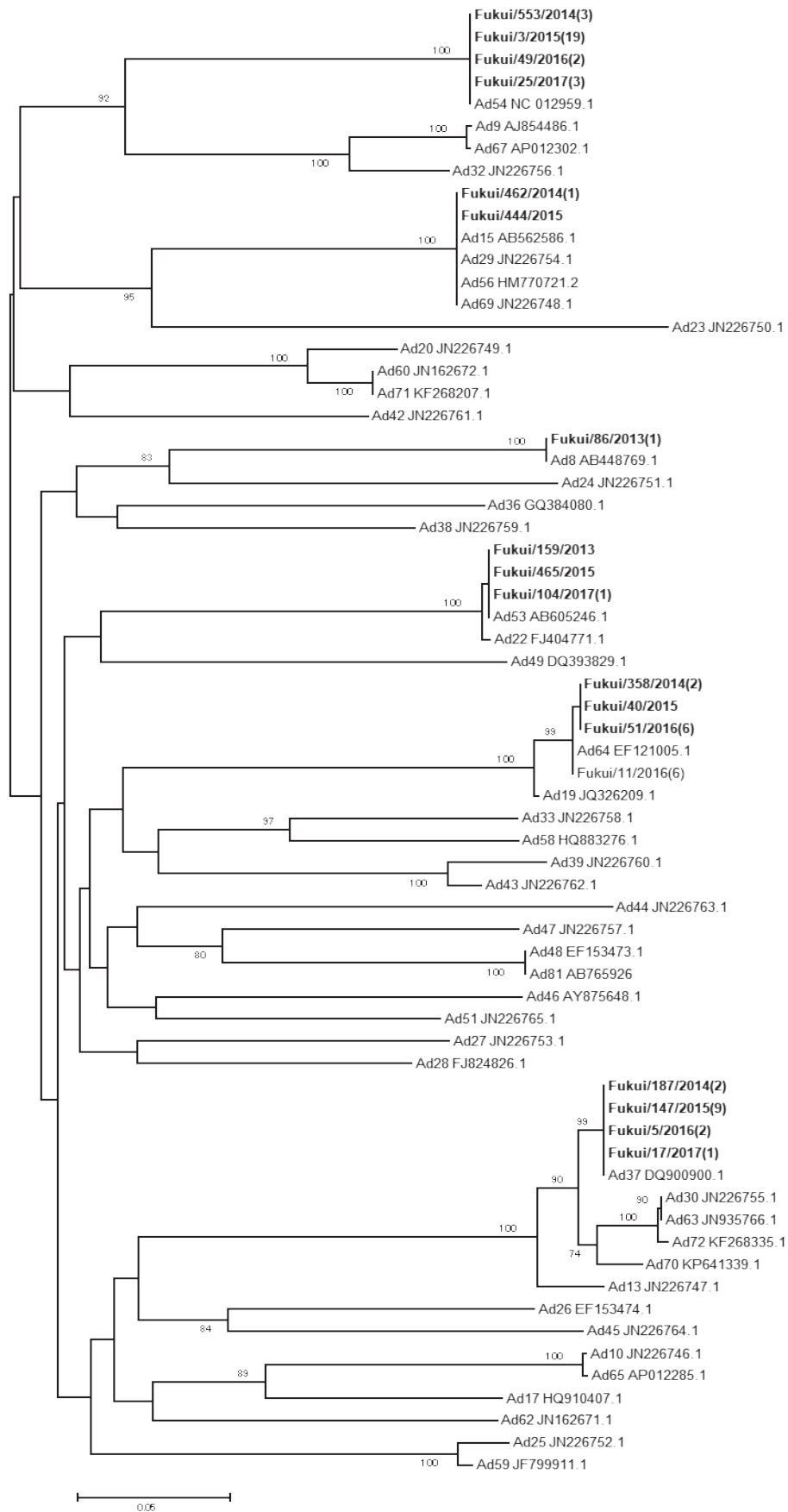


図4 ヘキソン領域 (532bp) における系統樹 (NJ法)

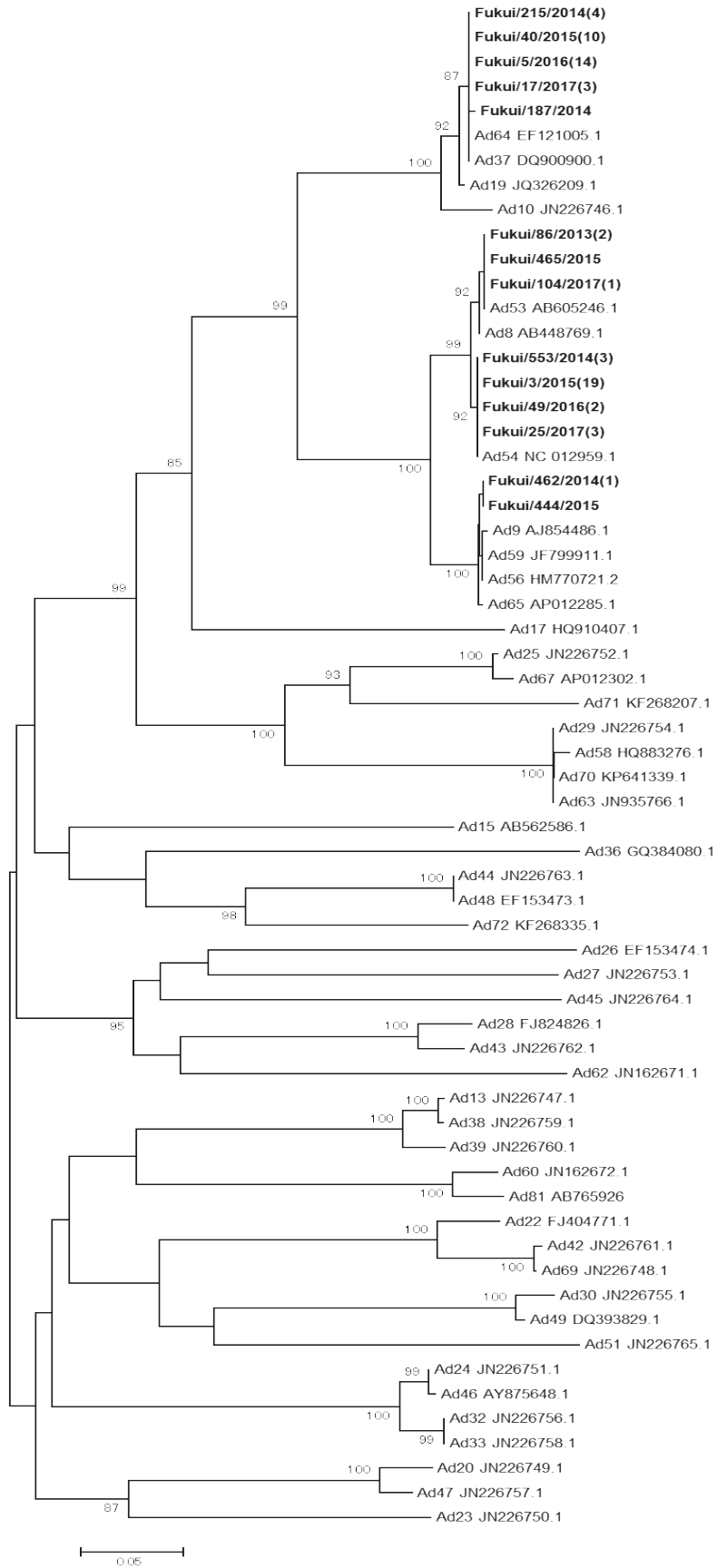


図5 ファイバー領域 (450bp) における系統樹 (NJ法)