

## ヘキソン領域遺伝子解析によるアデノウイルス型別法の検討

岡田 峰幸, 小川 知子, 窪谷 弘子  
吉住 秀隆, 篠崎 邦子

The Study of Human Adenovirus Genotyping Based on Genetic  
Analysis of Partial Hexon gene.

Mineyuki OKADA, Tomoko OGAWA, Hiroko KUBONOYA  
Hidetaka YOSHIKUNI and Kuniko SHINOZAKI

## 1. はじめに

ヒトアデノウイルス (HAdV) は約35,000塩基のDNAを遺伝子として持ち、アデノウイルス科マストアデノウイルス属に属し、現在6種(亜属:A~F)、51血清型(未確定を含む)に分類される多様なウイルスからなる(表1)<sup>1,2)</sup>。HAdVは、ヒトに急性熱性疾患、上・下気道炎、胃腸炎、結膜炎、出血性膀胱炎等多彩な臨床症状を引き起こすことが知られている。HAdV感染症のうち、“咽頭結膜熱”が、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)」において第五類感染症に指定されており、医療機関(小児科定点)に患者数の届出が義務づけられている。2003年に小児科定点から報告された患者数は、全国で40,714人であった<sup>1)</sup>。またHAdVは、臓器移植後や基礎疾患をもち、免疫能力が低下している患者では重篤な症状を示し<sup>3,4)</sup>、迅速な診断が求められるケースもある。1995年にはHAdV 7型による流行があり、重症・死亡例も報告され問題となった<sup>5,6)</sup>。病原体検出情報によれば、1991年以降日本国内では18血清型の検出が報告されているが、1型から7型で約90%を占めている<sup>6,7)</sup>。

表1 ヒトアデノウイルスの分類

アデノウイルス科 マストアデノウイルス属		
種	属する血清型	
A	12, 18, 31 <sup>+</sup>	[3]
B	3, 7, 16, 21, 50 (B1) 11, 14, 34, 35 (B2)	[9]
C	1, 2, 5, 6	[4]
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23-30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42-49, 51	[22]
E	4	[1]
F	40, 41	[2]

+ 太字は、1991年以降国内で検出報告のある血清型。

最近では、迅速診断のための簡易キット(酵素抗体法、免疫クロマト法)が販売されており、医療機関でのHAdVの検出・診断も実用化されている。検査のため、本研究室に病原体定点から

搬入される検体でも、検査個票にキットによる検出が記載されているものがある。HAdVの検査は、細胞に検体を接種しウイルスを分離した後、中和試験により血清型を同定する方法がとられている。しかしながら、HAdVは血清型が多く、手技も煩雑で時間もかかり、血清型の同定には通常2~3週間を要する。また、血清型間で交差反応があることが知られている<sup>8)</sup>。近年PCR法による迅速な検出や種・特定の血清型の同定を目的とした方法が報告<sup>9,10)</sup>されているが、感度、汎用性において十分とはいえないものが多い。今回、1組のプライマーペアで、多くの血清型のHAdVの主要な中和抗原決定基を含むヘキソンタンパク遺伝子<sup>11,12)</sup>の高度可変領域を増幅・検出し、その型特異的な多型性により、迅速なHAdV血清型(遺伝子型)の同定を行う方法を検討したので報告する。

## 2. 材料と方法

HAdVの標準株として、アデノウイルスレファレンスセンターにより配布された、15血清型のウイルス株を用いた。また、感染症サーベイランス事業に伴う病原体検査により当研究室において分離、HAdVと同定された株(以下分離株)及び、同検査の為に搬入された臨床検体をPCR法および型別法の検討に用いた。

ウイルス分離は、検体をCaCo2及びHeLa細胞への接種により実施し、分離株の同定は中和試験により実施した。HAdVのDNA抽出は市販のキット(High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics)を使用した。PCR法に用いるプライマーは、DNAデータベース上から入手可能であったHAdVヘキソン遺伝子の塩基配列を解析・検討してデザインした以下のものを用いた。Forward primer: AdHex-GT3F; 5'-CSggNCaggAYgCYTCggRgTA-3' [Ad2, 18884-18905], Reverse primer: AdHex-GT1R; 5'-TTRTCYCTRAADSCAATgTARTT-3' [Ad2, 19868-19846]。増幅産物は、高度可変領域を含むため850~950bpと株により大きさが異なる。PCRにはEx Taq DNA polymerase(宝酒造)を使用し、PCR実施条件は95℃3分-[95℃30秒-47℃30秒-68℃60秒; 40cycle]-68℃10分とした。PCR産物は1.2%アガロースゲル電気泳動によりサイズを確認後精製し、ABI-PRISM 3100-Avantを使用し、ダイ・ターミネーター法により塩基配列を決定し、高度可変領域を含む約600bpの塩基配列を用いて分子系統解析を行った。

### 3. 結果

#### 1) 標準株

アデノウイルスレファレンスセンターより分与された15種類のHAdV株についてPCRを実施したところ、すべての血清型のHAdVから予測される大きさの遺伝子増幅が確認された(図1)。またこれらの株の塩基配列を解析し、DNAデータベース上で入手可能なHAdV遺伝子を含めた分子系統解析を行った。図2に得られた分子系統樹を示した。1型及び16型の塩基配列は本領域では非常に似ており(核酸相同性97%)、図2にも示すとおり、本法においては区別することはできなかった。それ以外の各血清型は系統樹上で明瞭に分岐し、型別に利用可能であることが示された。

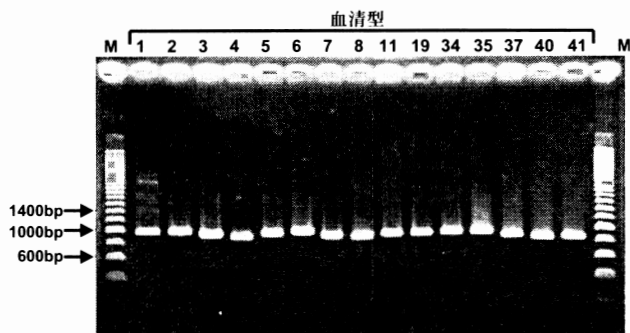


図1 アデノウイルス15血清型標準株のPCR増幅産物の電気泳動像。1.2%アガロースゲル/1x TBE。M: 200bpラダーマーカー。

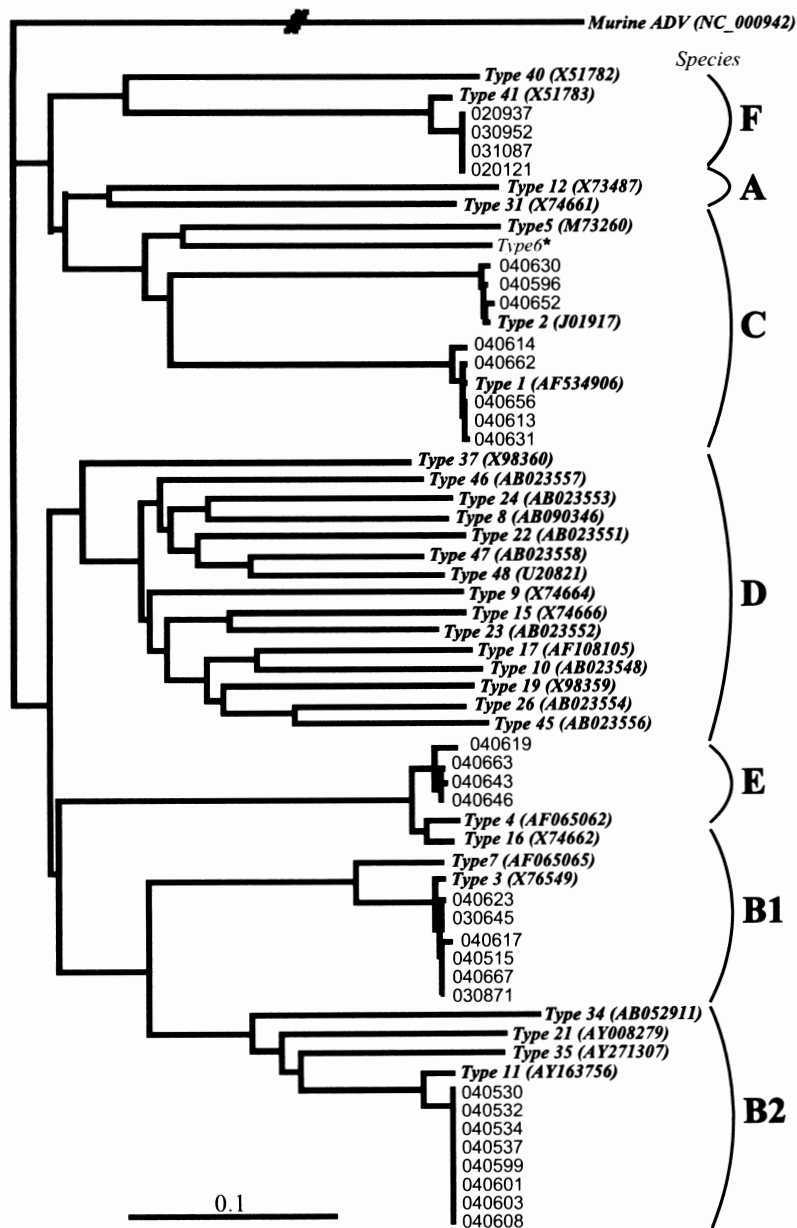


図2 HAdV標準株と検出株(一部)の近隣結合法による分子系統樹(OutgroupとしてMurine adenovirus A, NC\_000912を使用)。斜体はデータベース上のHAdV標準株を、ゴシック体は本法による検出株を示す。カタ括弧により種(A~F)の範囲を示す。  
\* 6型はデータベース上で入手できないため、本研究において解析したデータを用いた。

## 2) 分離株及び臨床検体

平成15年及び16年に当研究室において分離されHAdVと同定された株(分離株: 19株)及び、HAdVが検出された臨床検体(38検体)とウイルス分離陰性ではあるが咽頭炎等HAdV感染症を疑う症状を示す臨床検体[鼻咽頭ぬぐい液等, 14検体]を対象としてPCRを実施した。実施した分離株19株すべてと、分離陽性の臨床検体38検体中32検体(82.1%)でHAdV遺伝子の増幅が認められた。分離陰性の臨床検体14検体ではHAdV遺伝子の増幅は認められなかった(表2)。増幅されたPCR産物の塩基配列を決定し分子系統解析を実施したところ、決定された遺伝子型は、中和試験により決定された血清型と一致した(表2, 図2)。

表2 分離株、臨床検体での検査結果

分離株の中和試験による血清型	PCRと型別の結果			
	分離株		臨床検体	
	PCR*	型別*	PCR	型別
1型	5/5	1型 5	3/7	1型 3
2型	3/3	2型 3	4/4	2型 4
3型	3/3	3型 3	9/9	3型 9
4型	2/2	4型 2	2/4	4型 2
11型	6/6	11型 6	5/5	11型 5
40/41型†			9/9	41型 9
分離陰性			0/14	

\* 数値は 陽性数 / 検査数を示す。

† HAdV 41型は 40/41型用EIAの陽性検体

# 陽性検体の遺伝子(血清)型

## 4. 考察

今回、HAdVの迅速な検出、血清型(遺伝子型)を同定する目的で、PCR及び遺伝子解析による型別法を試みた。これまでも本領域をターゲットとした型別法が報告されているが、PCRによる増幅領域が広く感度が不十分で、特殊な方法を使用するな  
汎用性も低かった<sup>9)</sup>。今回デザインしたプライマーは近年国内で検出・分離が報告されている18血清型のうち、標準株として入手できた14血清型を含む15血清型の増幅・検出が可能であった。また、データベース上に登録されているHAdV遺伝子を含めて塩基配列を比較・解析することにより、国内で報告されているすべての血清型を含む、約30のHAdVの血清型別が可能となった(4型・16型間を除く)。また、本法によって得られた型別結果は、分離株において中和試験で得られた結果と一致し、本法で用いた領域の塩基配列の解析により、迅速なHAdVの血清型決定が可能であることが示された。したがって、特に簡易検出キットによるHAdVが記録されている検体については、本法を用いることでウイルス分離を待つことなく、迅速な型別、結果の還元ができると考えられる。

これまで多く報告されている型特異的PCR・PCR/RFLPによる型別<sup>10)12)</sup>では、特定の血清型や、種レベルでの同定であったが、塩基配列解析・分子系統解析による本型別法は、より明瞭な血清型の型別が可能である。今回、ウイルス分離が陽性でありながら、元の臨床検体からはPCRにより検出できないものがあつたが、

分離陽性の臨床検体のうち8割以上で直接遺伝子を検出・型別できたことは、本法を用いた場合、従来の分離同定法では2~3週間かかっていたものが、最短で2日程度でHAdV血清型の同定が可能となり、大幅な時間の短縮が可能である。このことは、速やかな結果の還元により、感染拡大防止等の感染症対策に有効に生かすことが可能となると思われる。また、変異等により分離ウイルスが難中和性の場合や、型別に使用できる抗血清が入手できない血清型の同定についても非常に有効な方法であると思われる。今後は、検出感度の改善のためにNested PCRの開発や、今回利用できなかった血清型での応用が可能であるか等検討・改良を進めていく。

## 5. 引用文献

- 1) (特集)アデノウイルスと咽頭結膜熱 2003 (2004), 病原微生物検出情報 25, 94-96.
- 2) De Jong, J. C., Errmenbol, A. G., Verweij-Uijterwaal, M. W., Slaterus, K. W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G. J., Khoo, S. H., Hierholzer, J. C. (1999). Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.* 37(12), 3940-3945.
- 3) (特集)アデノウイルス7型の出現, 1995 (1996), 病原微生物検出情報 17, 99-104.
- 4) Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobytsky, W. R., Ash, R. C., Carrigan, D. R., Sedmak, G. V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M. M., Bunin, N. and Casper, J. T. (1994). Increasing Incidence of Adenovirus Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *J. Infect. Dis.* 169 (4), 775-781.
- 5) Bertheau, P., Parquet N., Ferchal, F., Gluckman, E. and Brocheriou, C. (1996). Fulminant adenovirus hepatitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 17 (2), 295-298.
- 6) (特集)アデノウイルス 1995~1999 (2000), 病原微生物検出情報 21, 24-28.
- 7) ウイルス検出状況 (1999-2004,各号), 病原微生物検出情報 Vol. 21-25.
- 8) Hierholzer, J. C., Stone, Y. O. and Broderick, J. R. (1991). Antigenic relationships among the 47 human adenoviruses determined in reference horse antisera. *Arch Virol.* 121, 179-197.
- 9) Takeuchi, S., Itoh, N., Uchio, E., Aoki, K. and Ohno, N. (1999). Serotyping of Adenoviruses on Conjunctival Scrapings by PCR and Sequencing Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 37 (6), 1839-1845.
- 10) Elnifro, E. M., Cooper, R. J., Klapper, P. E. and Bailey, A. S. (2000). PCR and Restriction Endonuclease Analysis for Rapid Identification of Human Adenovirus

- Subgenera. *J. Clin. Microbiol.* 38(6), 2055-2061.
- 11) Fujimoto, T., Chikahira, M., Kase, T., Morikawa, S., Okafuji, T., Yokota, Y. and Nishio, O. (2000). Single-Tube Multiplex PCR for Rapid and Sensitive Diagnosis of Subgenus B and Other Subgenera Adenoviruses in Clinical Samples. *Microbiol. Immunol.* 44(10), 821-826.
  - 12) Allard, A., Albinsson, B. and Wadell, G. (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39 (2), 498-505.
  - 13) Shimada, Y., Ariga, T., Tagawa, Y., Aoki, K., Ohno, S. and Ishiko, H. (2004). Molecular Diagnosis of Human Adenoviruses D and E by a Phylogeny-Based Classification Method Using Partial Hexon Sequence. *J. Clin. Microbiol.* 42 (4), 1577-1584.
  - 14) Crawford-Miksza, L. and Schmurr, D. P. (1996). Analysis of 15 Adenovirus Hexon Protein Reveals the Location and Structure of Seven Hypervariable Regions Containing Serotype-Specific Residues. *J. Virol.* 70 (3), 1836-1844.
  - 15) Gall, J. G. D., Crystal, R. D. and Falck-Pedersen, E. (1998). Construction and Characterization of Hexon-Chimeric Adenoviruses: Specification of Adenovirus Serotype. *J. Virol.* 72 (12), 10260-10264.