

## 原著論文

### 眼科疾患から検出されたアデノウイルス血清型の経年変化 (1997~2000年)

梶原淳睦, 濱崎光宏, 江藤良樹, 千々和勝己, 鬼木信乃夫\*<sup>1</sup>

流行性角結膜炎 (EKC) 等の眼科疾患の原因ウイルスを PCR 法及び培養細胞を用いたウイルス分離法により検索した。その結果, 培養細胞を用いたウイルス分離では35株のアデノウイルスが分離され, ウイルス分離の陽性率は30.4% (35/115)であった。一方, PCR 法では73.9% (85/115)が陽性であり, PCR 法はウイルス分離法の約2.4倍高感度にアデノウイルスを検出することができた。PCR 法と制限酵素を用いた RFLP 法により決定したアデノウイルスの血清型は1997及び98年は19型が最も多かったが, 1999及び2000年は8型の方が多くなった。特に, 1999年5月以降は8型が主に検出され, EKC の病原ウイルスの変化が明らかになった。EKC は例年6 - 9月をピークとする流行を繰り返し, 流行状況は4年間で大きな差はなかった。しかし, 各年の流行を引き起こしているアデノウイルスの血清型は変化していることを明らかにすることができた。

[ キーワード : アデノウイルス, 血清型, 流行性角結膜炎 (EKC), PCR ]

#### 1 はじめに

EKC 等の眼科疾患の多くはアデノウイルスが原因となって引き起こされている。ヒトアデノウイルスは DNA の相同性等により A-F の6亜属に分類され, 47の血清型に分類されている<sup>1)</sup>。従来より EKC 等の患者から培養細胞を用いて病因ウイルスの分離同定をしているが, ウイルスの分離同定には2週間以上の時間がかかり, ウイルス分離率は約20-30%であった。これはエンテロウイルスによる感染症からのウイルス分離率40-70%に比べ1/2以下である。また, 培養細胞を用いたウイルス分離では細胞の種類によりウイルス感受性が異なることも考えられる。最近, PCR 法と制限酵素を用いた RFLP 法により, EKC 等の患者の結膜ぬぐい液よりアデノウイルスの迅速で, 高感度な検出・血清型別の同定方法が報告されている<sup>2)</sup>。そこで同法を感染症発生动向調査事業により採取された検体に適用し, 培養細胞を用いたウイルスの分離同定結果と比較してきた<sup>3)</sup>。その結果, EKC の原因ウイルスの検出率を向上させ, ウイルス分離法では捉えられなかった病原ウイルスの変化を明らかにしたので報告する。

#### 2 材料及び方法

ウイルス分離には Vero, FL, RD-18s, HEp-2細胞を使用した。ウイルス分離材料は1997年4月から2000年12月までに福岡県筑紫野市内の一眼科医院を受診した流行性角結膜炎, 咽頭結膜熱及び急性結膜炎の患者より採取された結膜ぬぐい液115検体を用いた。疾病ごとの内訳は流行性角結膜炎が113件, 咽頭結膜熱が1件, 急性結膜炎が1件であった。

##### 2・1 ウイルス分離

ウイルス分離は, 96穴マイクロプレートに培養細胞( $5 \times 10^6$  cells/ml)を0.1 ml ずつ分注し, 浮遊状態の細胞に結膜ぬぐい液25  $\mu$ lを1検体当たり2 穴接種し, 37℃, 1週間 CPE の出現を観察した。最長4代継代し CPE 陰性の場合には分離陰性とした。分離されたアデノウイルスは国立感染症研究所より分与された抗血清, またはデノンカ生研製の抗血清を用い中和試験により同定した。

##### 2・2 PCR法

PCR 法は Saitoh-Inagawa らの方法により行った<sup>2)</sup>。即

表 1 プライマー及び PCR 産物

Primer	Nucleotide positions*	Sequence	PCR product length(bp)
AdTU7	20,734 - 20,753	5'-GCCACCTTCTTCCCCATGGC-3'	1,004
AdTU4'	21,718 - 21,737	5'-GTAGCGTTGCCGCGCAGAA-3'	
AdnU-S'	20,743 - 20,762	5'-TTCCCCATGGCNCACAACAC-3'	956
AdnU-A	21,679 - 21,698	5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3'	

\* : numbered by using Ad2 nucleotide sequence<sup>4)</sup>

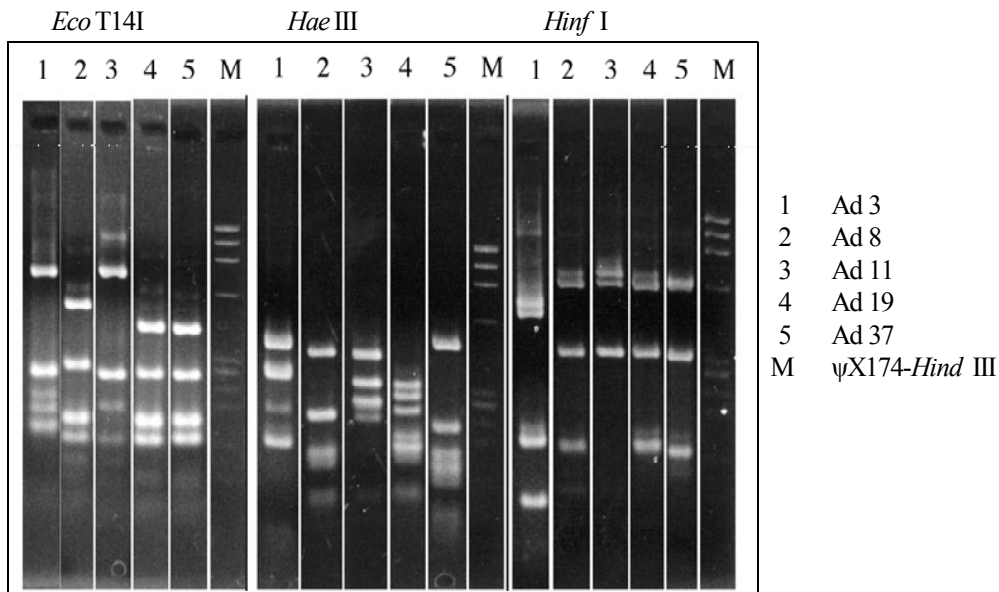


図 1 PCR 産物の制限酵素切断パターン

ち、結膜ぬぐい液 200  $\mu$ l を 12000  $\times$  g で 30 分間遠心し、沈殿させた角結膜成分に 100  $\mu$ l の 0.31 mg/ml Proteinase K, 0.5% Tween20, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH8.3) を加え 55  $^{\circ}$ C, 1 時間消化し、95  $^{\circ}$ C, 1 分間加熱し DNA を抽出した。10000  $\times$  g で 10 分間遠心した上清 10  $\mu$ l に表 1 のプライマーを用い、まず AdTU7, AdTU4' で 1st PCR を、次いで AdnU-S', AdnU-A で nested-PCR で増幅した。表 1 にプライマー及び PCR 産物のアデノウイルスゲノム上の位置を示した。PCR 条件は 1st 及び nested-PCR とともに 94  $^{\circ}$ C 1 分、50  $^{\circ}$ C 1 分、72  $^{\circ}$ C 2 分を 36 サイクル行った後、72  $^{\circ}$ C で 7 分間加熱した。PCR 産物は 3% アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

### 2・3 RFLP 法

PCR 法により増幅された DNA のバンドが確認されたものは、EcoT14I, HaeIII, HinfI の 3 種の制限酵素を用いて付属のバッファー中にて 37  $^{\circ}$ C, 1 夜消化した。酵素消化後の DNA フラグメントは 1% アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色し、切断パターンよりア

デノウイルスの血清型別を決定した。

### 3 結果

眼科疾患の患者より採取された 115 件の検体から、培養細胞を用いたウイルス分離では 35 株のアデノウイルスが分離された。アデノウイルスは大半が HEp-2 細胞により分離され、一部 FL 細胞でも分離された。ウイルス分離の陽性率は 30.4% (35/115) で、分離されたウイルスの血清型別は 3 型 (12 株), 8 型 (1 株), 11 型 (1 株), 19 型 (18 株), 37 型 (3 株) であった。

表 2 ウイルス分離及び PCR 法により検出されたアデノウイルスの血清型

分離方法	陽性数(%)	血清型					陰性
		Ad 3	Ad 8	Ad 11	Ad 19	Ad 37	
ウイルス分離	35(30.4)	12	1	1	18	3	80
PCR	85(73.9)	12	26	1	31	15	30

一方、PCR 法では 73.9% (85/115) が陽性であり、

RFLP 法により同定されたウイルスの血清型別は 3 型 (12 株), 8 型 (26 株), 11 型 (1 株), 19 型 (31 株), 37 型 (15 株) であった。PCR 産物の制限酵素による切断パターンを図 1 に示した。ウイルス分離で決定されたウイルスの血清型と PCR 法で決められた血清型は全て一致した。培養細胞を用いたウイルス分離と PCR-RFLP 法との検出結果の比較を表 2 に示す。また、各年の PCR-RFLP 法でのアデノウイルスの検出状況を表 3 に示した。

表 3 検出されたアデノウイルス血清型の年次推移

分離年	検体数	血清型別陽性検体数					計
		Ad3	Ad8	Ad11	Ad19	Ad37	
1997	36	2	5		9	6	22
1998	40	7	6	1	16	3	33
1999	23	1	7		5	3	16
2000	16	2	8		1	3	14
合計	115	12	26	1	31	15	85

#### 4 考察

アデノウイルスの流行状況は、1997 及び 1998 年は 19 型が最も多かったが、1999 及び 2000 年は 8 型の方が多くなった。また、1997 年は 37 型が、1998 年は 3 型も比較的多数検出された。3 型は咽頭結膜熱 (プール熱) の原因ウイルスとしても知られ、1998 年は夏季に同病の流行があったため EKC から分離が多くなっている。各月のアデノウイルス検出状況は、1997-98 年は 19 型が年間を通じて検出され、3, 8, 37 型は散発的に検出されていたが、1999 年以降、19 型の検出数が減少し、9 月より 8 型の検出数が増加した。特に、2000 年 5 月以降は 8 型が主に検出され、EKC の病原ウイルスの変化が明らかになった。

EKC は例年 6-9 月をピークとする流行を繰り返し、流行状況は 4 年間で大きな差はなかった。しかし、各年の流行を引き起こしているアデノウイルスの血清型は変化していることを明らかにすることができた。

感染症発生動向調査では感染症流行の実態を監視する目的で、培養細胞によるウイルス分離を中心に病原体を特定している。一方、PCR 法が広く用いられるようになり、迅速で高感度な病原体検索が可能になってきている。今回用いた PCR 法では約 3 日で結果の判定が可能であり、ウイルス分離法の約 2.4 倍高感度であった。また、アデノウイルスの亜属や血清型による分離率の違いが明らかになった。即ち、B 亜属のアデノウイルス (3, 11 型) では検出率は培養細胞法と PCR 法でほぼ同程度であったが、D 亜属 (アデノウイルス 8, 19, 37 型) では培養細胞法によるウイルス分離率は低く、特にアデノウイルス 8 型では PCR 法の 3.8% しか分離することがで

きなかった。この差がウイルス分離に用いた培養細胞の感受性によるものか、不感染性粒子の形成等のウイルスの側の原因によるものかは不明であるが、培養細胞を用いた病原体検索では病原ウイルスの流行状況を捉えきれないことが明らかになった。PCR 法ではウイルス遺伝子の特定の一部分だけが増幅され、抗原性の変化などの情報が得られない等の問題はあがあるが、病原体の検索として高感度であり培養細胞を用いたウイルス分離法と併用することが望ましい。さらにこれらの結果から、PCR 法で陽性になった検体からのウイルスの分離培養方法を検討する必要がある。

また、アデノウイルス 19 型と 37 型は標準抗血清による中和試験では交差が見られたが、PCR-RFLP 法では明瞭に区別することができた。従って、PCR-RFLP 法は検出方法としてばかりでなく同定方法としても有力であり、抗原変化など血清学的方法で型別の同定が出来ない場合にも利用可能である。

#### 5 まとめ

1. 眼科疾患からのアデノウイルスの検出率は培養細胞を用いた際には 30.4% であったが、PCR 法を用いると 73.9% と迅速、高感度に検出でき、2 つの方法で決定された血清型は一致した。
2. アデノウイルスの血清型別では B 亜属の検出率はほぼ同等であったが、D 亜属特に 8 型では分離率は PCR 法の 3.8% と、培養細胞を用いた方法では流行ウイルスをとらえられていないことがわかった。
3. アデノウイルスの検出に PCR 法を導入することにより、1999 年以降の EKC の病原ウイルスの変化 (19 型 8 型) を明らかにできた。

#### 文献

- 1) D. Schnurr & M. E. Dondero : Intervirology, 36, 79 - 83, 1993.
- 2) W. Saitoh-Inagawa et al. : J. Clin. Microbiol., 34, 2113-2116, 1996.
- 3) J. Kajiwara et al. : Jpn. J. Infect. Dis., 52, 18-19, 1999.
- 4) K. Chroboczek et al. : Virology, 186, 280-285, 1992.

## **Trend of adenovirus serotypes detected from patients with ophthalmological diseases ( 1997 - 2000 )**

**Jumboku KAJIWARA, Mitsuhiro HAMASAKI, Yoshiki ETO, Katsumi CHIJIWA  
and Shinobu ONIKI \*<sup>1</sup>**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences and Oniki Eye Clinic \*<sup>1</sup>*

*Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135 , Japan*

*Futsukaichi 713-4, Chikusino, Fukuoka 818-0051 , Japan \*<sup>1</sup>*

In this study ,we used polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation using cell culture to detect adenovirus(Ad) on swabs from patients with conjunctivitis including epidemic kerato-conjunctivitis (EKC), who visited an eye clinic in Chikushino City in Fukuoka Prefecture. Virus isolation in culture and serotyping identified Ads from 35 specimens out of 115 (30.4%), whereas PCR identified 85 specimens out of 115 (73.9%), the PCR positivity being about 2.4 fold higher than virus isolation. In 1997 and 1998, Ad serotypes identified by PCR coupled with restriction fragment length polymorphism (RFLP) was mostly Ad 19, while in 1999 and 2000, Ad 8 was the most frequent serotype. Especially after September 1999, Ad 8 was mainly detected from EKC patients. The study revealed that the serotype of Ad causing EKC has changed in the course of time.

[Key words : Adenovirus, Sero type, Epidemic kerato-conjunctivitis, Polymerase chain reaction]