

4 および 5 塩基対認識制限酵素を用いた アデノウイルス 4 型の DNA 切断像解析

金井 光

横浜南共済病院眼科

要 約

目 的：アデノウイルス 4 型 (Ad 4) の DNA 解析を行い、遺伝子型の年次変化を検討した。

対象と方法：札幌市内の 4 眼科診療所で急性ウイルス性結膜炎患者から採取された Ad 4 16 検体 (前期 7 検体, 1993 年 12 月～1994 年 3 月, 後期 9 検体, 1995 年 3～5 月) に対し, 4 および 5 塩基対認識制限酵素 *Taq* I, *Hinf* I を用いて DNA 切断解析を行った。

結 果：16 検体の genome type はすべて Ad 4 a であった。Subgenome type を解析すると, 前期の 7 検体はすべて同一であった。後期の 9 検体には 2 種類の subgenome type が存在し, 5 検体は前期と同一, 4 検体は異

なる subgenome type であった。2 種類の subgenome type の類似性は高く, 起源が同一であると考えられた。過去の文献との比較では, 今回の Ad 4 は 1985～1989 年にみられた subgenome type とは異なった。

結 論：Ad 4 の遺伝子型は変異により年次的に変化していることが推定された。(日眼会誌 103: 386—391, 1999)

キーワード：DNA 制限酵素切断解析, 遺伝子型, ウイルス性結膜炎, アデノウイルス 4 型

Genome Analysis with Restriction Endonucleases Recognizing 4-or 5-base Pair Sequences of Adenovirus Type 4

Hikaru Kanai

Department of Ophthalmology, Yokohama Minami Kyosai Hospital

Abstract

Purpose : To ascertain the chronological change of subgenome types of adenovirus type 4 (Ad 4) through DNA analysis.

Materials and Methods : We evaluated sixteen Ad 4 strains from patients with acute viral conjunctivitis at four eye clinics in Sapporo, northern Japan. Seven strains were obtained from December 1993 through March 1994 (first period). Nine strains were obtained from March through May in 1995 (second period). These strains were analysed using DNA restriction endonucleases recognizing 4-or 5-base-pair sequences, *Taq* I and *Hinf* I.

Results : The genome type of sixteen strains was Ad 4 a. Seven strains in the first period showed the same subgenome type. Nine strains in the second pe-

riod showed two subgenome types : five strains showing the same subgenome type as in the first period, and four showing a different subgenome type. The two subgenome types were similar in DNA pattern, suggesting that both were derivatives of a common subgenome type. All the sixteen strains were a new subgenome type which was different from those previously isolated during 1985-1989.

Conclusion : The subgenome types of Ad 4 in 1993-1995 have changed from those in 1985-1989.

(J Jpn Ophthalmol Soc 103: 386—391, 1999)

Key words : DNA restriction endonuclease analysis, Genome type, Viral conjunctivitis, Adenovirus type 4

I 緒 言

アデノウイルス 4 型 (Ad 4) 結膜炎は 1979 年頃から我

が国でもみられるようになり, 現在 Ad 結膜炎の主要な原因の一つである¹⁾. 従来ヒトへの感染がきわめて稀であった Ad 4 が結膜炎の原因として各地に広がった理由

別刷請求先：236-0032 横浜市金沢区六浦 500 横浜南共済病院眼科 金井 光

(平成 10 年 10 月 14 日受付, 平成 10 年 12 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to: Hikaru Kanai, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama Minami Kyosai Hospital, 500 Mitsuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0032, Japan

(Received October 14, 1998 and accepted in revised form December 2, 1998)

として、ウイルスが変異してヒト結膜に対する親和性を増したことが考えられている。

近年、分子生物学的手法を用いたウイルスの遺伝子レベルでの解析が行われ、ウイルスの遺伝子型と変異の状況が検討されてきた。Wadell²⁾は Ad 4 の DNA を 6 塩基対認識制限酵素を用いて切断し、その切断像を比較することにより、Ad 4 が標準株 Ad 4p および Ad 4a の 2 つの genome type に分類されることを示した。Wang ら³⁾は 1990 年の日本各地の Ad 4 の genome type を検討し、我が国の結膜炎由来の Ad 4 はすべて Ad 4a であることを明らかにした。Li ら⁴⁾は 1965~1984 年までの 19 年間に Ad 4a は一部が Ad 4a₁, Ad 4b に変異した以外よく保存され変化しなかったと述べた。

Itakura ら⁵⁾は Ad 4a の DNA を 4 塩基対認識制限酵素 *Taq* I および 5 塩基対認識制限酵素 *Hinf* I を用いて検討すると、さらに細かい分類が可能であることを明らかにし、subgenome type と呼んだ。そして、Ad 4a は subgenome type のレベルでは年次的に変異を続けていることを示した。これらの報告から、ウイルスの遺伝子型と変異の検討に制限酵素を用いた DNA 解析が有用であり、特に 4 塩基対認識制限酵素および 5 塩基対認識制限酵素を用いてウイルスの subgenome type を同定することによりウイルスの時間的推移、地域的広がりを検討することが可能であることが明らかになった。

今回、我々はこの方法を用いて、Ad 4 の subgenome type の一地域内での動向を知る目的で、① 同一地域で採取された Ad 4 の subgenome type と 1 年後に同地域で採取された Ad 4 の subgenome type の比較、② 同一地域内 4 施設における subgenome type の比較を行い、ま

た今回と同じ札幌市内で 1985~1989 年までに採取された Itakura ら⁵⁾の Ad 4 の subgenome type との比較、検討を行ったので報告する。

II 実験方法

1. 対象

1993 年 12 月 27 日から 1994 年 3 月 1 日までの前期 65 日間および 1995 年 3 月 15 日から 5 月 1 日までの後期 48 日間に、札幌市内の 4 か所の眼科診療所において臨床的にアデノウイルス感染が疑われた患者の結膜擦過物として採取され、札幌市衛生研究所で分離され、中和法により血清型が同定された Ad 4 の 16 株を対象とした。検体は前期に 7 株、後期に 9 株採取された。

2. 方法

1) ウイルス培養および DNA 抽出

75 cm² 培養びんに Hep-2 細胞と 2% 子牛胎児血清入り E-MEM (Eagle's minimal essential medium) を加え、Ad 4 臨床分離株を接種し 2~3 日間培養した。細胞変性効果を確認後、得られたウイルスから Shinagawa ら⁶⁾の変法により DNA を抽出した。

2) DNA 切断

Ad 4 の genome type の解析には 6 塩基対認識制限酵素 *Bam*H I, *Eco*R I, *Sma* I, *Xho* I, そして subgenome type の解析には 5 塩基対認識制限酵素 *Hinf* I および 4 塩基対認識制限酵素 *Taq* I (以上宝醸造) を用いた。各検体に制限酵素と反応緩衝液 (宝醸造) を加え各制限酵素の至適温度で 3 時間反応させ、DNA を切断した。各制限酵素が認識する塩基配列、使用した反応緩衝液の組成および反応温度は表 1 のとおりである。

表 1 制限酵素の特性

| 制限酵素 | 認識する塩基配列 | 反応緩衝液の組成 | 反応温度 |
|----------------|----------------------------|--|------|
| <i>Bam</i> H I | ↓ GGATCC CCTAGG ↑ | 20mM Tris · HCl (pH8.5), 10mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 100mM KCl | 30℃ |
| <i>Eco</i> R I | ↓ GAATTC CTTAAG ↑ | 50mM Tris · acetate (pH7.5), 10mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 100mM NaCl | 37℃ |
| <i>Sma</i> I | ↓ CCCGGG GGGCCC ↑ | 33mM Tris · acetate (pH7.9), 10mM Mg · acetate, 0.5mM DTT, 66mM K · acetate, 0.01% ウシ血清アルブミン | 30℃ |
| <i>Xho</i> I | ↓ CTCGAG GAGCTC ↑ | 50mM Tris · HC (pH7.5), 10mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 100mM NaCl | 37℃ |
| <i>Hinf</i> I | ↓ GANTC CTNAG ↑ | | 37℃ |
| <i>Taq</i> I | ↓ TCGA AGCT ↑ | | 65℃ |

矢印は切断部位を示す

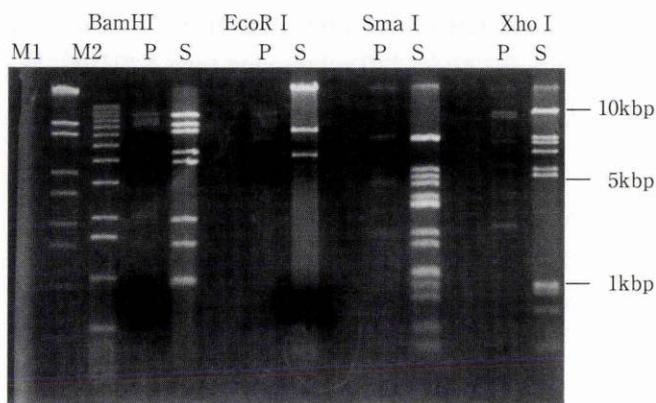


図1 アデノウイルス(Ad)4の genome type 解析.

M1, M2: マーカー, それぞれ λ EcoT 14 I, 1 kb ladder, P: Ad4 標準株, S: 検体 No. 1. 検体の genome type は標準株と異なる.

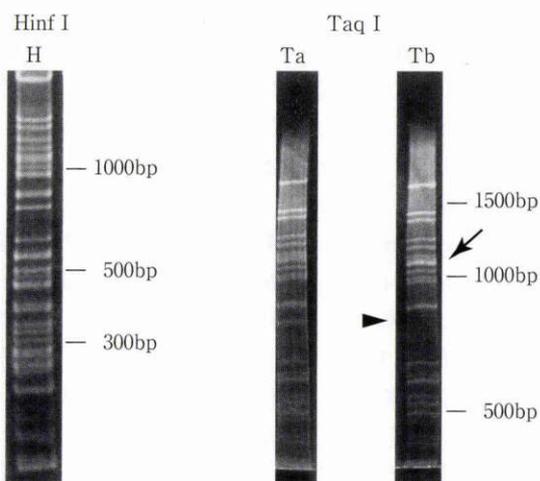


図2 Ad4の subgenome type 解析.

H: 検体 No. 4, Ta: 検体 No. 10, Tb: 検体 No. 9, Tb は Ta と比較するとバンドが1本欠失し(矢じり), 新たに1本付加されていた(矢印).

3) 電気泳動および写真撮影

Genome type 解析: 1.2% アガロースゲルおよび泳動用緩衝液[10 mM Tris · HCl(pH 7.4), Na · acetate, acetic acid, 1 mM EDTA (pH 8.0)]を用い, 室温で 125 V, 60 mA で2時間電気泳動した.

Subgenome type 解析: 5%あるいは10% ポリアクリルアミドゲルおよび泳動用緩衝液[tris base, boric acid, 0.5 mM EDTA (pH 8.0)]を用い, 4°C の低温室内で 120~150 V で2~3時間, DNA 切断パターンの異同を詳細に比較検討できるよう電圧, 時間の条件を変えて電気泳動した.

電気泳動を終了したアガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲルは, 1 μ g/ml ethidium bromide でそれぞれ10分間および2分間染色を行った後, 紫外線照射下で切断パターンを確認し, 写真撮影した.

表2 検体採取日, 施設, subgenome type

| No. | 検体採取日 | 施設(地区) | subgenome type |
|------|------------|---------|----------------|
| [前期] | | | |
| 1 | 93. 12. 27 | A (白石区) | a* |
| 2 | 93. 12. 28 | A | a |
| 3 | 94. 1. 3 | A | a |
| 4 | 94. 1. 5 | A | a |
| 5 | 94. 1. 12 | A | a |
| 6 | 94. 2. 3 | A | a |
| 7 | 94. 3. 1 | B (西区) | a |
| [後期] | | | |
| 8 | 95. 3. 13 | B | a |
| 9 | 95. 3. 15 | C (中央区) | b* |
| 10 | 95. 3. 16 | D (東区) | a |
| 11 | 95. 3. 24 | C | a |
| 12 | 95. 4. 3 | D | a |
| 13 | 95. 4. 10 | C | b |
| 14 | 95. 4. 14 | C | b |
| 15 | 95. 4. 14 | C | b |
| 16 | 95. 5. 1 | C | a |

*: a, b はそれぞれ *Taq* I で Ta, Tb の切断像を示した subgenome type を表す

III 結 果

Ad4 の genome type の解析結果を図1に示した. 4種類の6塩基対認識制限酵素によるDNA切断像は, それぞれ今回検討した16株すべて同一であり, Ad4 pとは異なるDNA切断像を示した.

次に, 図2に *Hinf* I, *Taq* I による切断像を示した. *Hinf* I では1種類, *Taq* I では2種類の切断像(図2 Ta, Tb)がみられた. *Taq* I による2種類の切断像を比較すると, Tbでは900 bp 付近のバンドが1本欠失し, 1,100 bp 付近に新たなバンドが付加されていた. その他のバンドは共通であった.

前期, 後期の切断像を比較すると, 前期の *Taq* I による切断像はすべて Ta, 後期の切断像は5検体が Ta, 4検体が Tb であった. したがって, 前期の7検体は *Hinf* I, *Taq* I ともにすべて同一の切断像を示し, これらは同一の subgenome type であると判定した. また, 後期の9検体のうち, 5検体が前期と同一の subgenome type, 4検体が異なる subgenome type であった.

表2に16検体の採取時期, 採取施設, subgenome type を示した. 前期の7検体のうち, 6検体は同一施設 A で採取され, 残る1検体は施設 B で採取された. 後期の9検体は, 1検体が前期と同じ施設 B で採取され, 6検体が施設 C, 2検体が施設 D で採取された. 後期にみられた新しい subgenome type は4検体すべて施設 C で採取さ

れたものであり、このうち 2 検体 (No 13, 14) は同胞例の家族内感染であった。

IV 考 按

今回の検体を 6 塩基対認識制限酵素で切断した DNA 切断像は Ad 4 p とは異なるものであった。過去我が国において確認された Ad 4 の genome type はすべて Ad 4 a であるが、今回もその切断パターンを過去の報告²⁾³⁾⁷⁾と比較したところ、すべて Ad 4 a であると考えられた。

Subgenome type の解析に用いた *Taq* I, *Hinf* I は 6 塩基対認識制限酵素と比較すると、より多数の DNA 断片に切断するため、6 塩基対認識制限酵素による解析では判定できない微細な DNA 断片の比較が可能である。これらの制限酵素を用い、Ad 4 に関しては Itakura ら⁵⁾、Ad 3 に関しては Itakura ら⁸⁾および Shiao ら⁹⁾が subgenome type の解析を行っている。この方法により、今回の検討では前期に採取された Ad 4 の 7 株はすべて同一であり、後期に採取された 9 株には 2 種類の subgenome type が存在することがわかった。2 種類の subgenome type を比較すると、*Taq* I による DNA 切断像の差はバンド 1 本の欠失と新たな 1 本の付加であり、これはウイルス DNA の中で *Taq* I による認識部位が 1 か所変化したことにより生じた差と考えられた。また、*Hinf* I による切断像は全く同一であった。したがって、2 つの subgenome type の DNA 切断像の類似性から、これらは別々のものが異なる感染経路を経て偶然同時に存在したのではなく、同一の subgenome type を起源とし、変異によって異なる subgenome type となったものではないかと考えられた。これは、Ad 4 の年次変異に伴う変化を示すものと推察された。

これら 2 種類の subgenome type を採取施設別に比較すると、前期にみられた subgenome type は後期も含めると 4 施設すべてで採取された。4 施設はそれぞれ札幌市内で区が異なり、この subgenome type は札幌市内各地に存在したのと考えられた。このことから、Ad 4 は結膜炎流行時以外でも 1 つの subgenome type は地域内に広く分布し、しかも 1 年後にも存在していることがわかった。これに対し、後期に新たにみられた subgenome type 4 検体は 1 施設のみから採取された。4 検体のうち、2 検体は同胞例で同じ 1995 年 4 月 14 日に採取されたが、他は 3 月 15 日、4 月 10 日と散発的に採取されており、施設周囲の限られた地域にこの subgenome type は存在したと考えられた。ウイルスの地域的な広がりには偏りがあることが subgenome type の解析により確認された。

Itakura ら⁵⁾は今回の検体採取施設に含まれる施設 A において、1985～1989 年までの 5 年間に採取された検体は、*Hinf* I, *Taq* I によりそれぞれ H1～H9, T1～T9 の各 9 種類に分類され、その組み合わせから 12 の subgenome type が存在したと報告した。今回得られた DNA

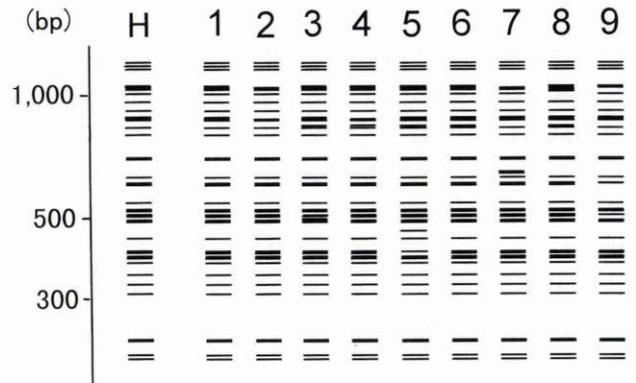


図 3 Ad 4 DNA の *Hinf* I による切断像の模式図。

H: 今回の検体. 1-9: Itakura ら⁵⁾の分類 H1-H9 を表す. H は 1 に相当すると考えられた。

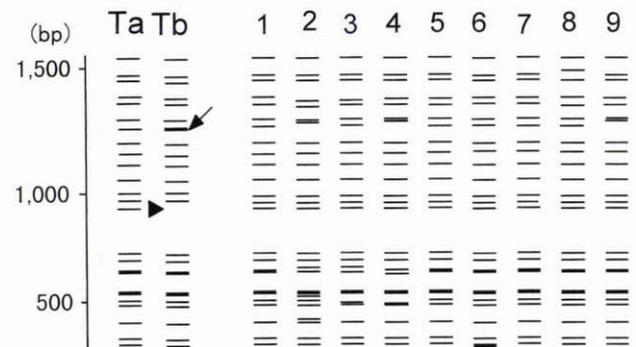


図 4 Ad 4 DNA の *Taq* I による切断像の模式図。

Ta, Tb: 今回の検体. 1-9: Itakura ら⁵⁾の分類 T1-T9 を表す. 矢じり: バンドの欠失. 矢印: バンドの付加. Ta は 5 に相当すると考えられた. Tb は 1-9 のいずれとも異なった。

切断像をこの分類と比較し、図 3, 4 に示した。実験環境、条件の異なる 2 つの結果の異同を厳密に比較するのは不可能であったが、写真上で各バンドの数とパターンの模式図を作成し比較した結果、*Hinf* I による DNA 切断像は Itakura ら⁵⁾の H1 に最も近く、他のタイプとは異なった。*Taq* I による DNA 切断像は、前期の 7 検体および後期の 5 検体は Itakura ら⁵⁾の T5 に最も近かった。後期の 4 検体は、Itakura ら⁵⁾の分類のいずれの subgenome type とも異なっていた。Itakura ら⁵⁾の 12 の subgenome type に H1 T5 という組み合わせは存在しないため、今回の検体は後期の 4 検体も含め Itakura ら⁵⁾の 12 の subgenome type とは異なる subgenome type であると判定した。

Itakura ら⁵⁾の検討では、Ad 4 の subgenome type には年次変化がみられ、同じ subgenome type が 2 年間以上続けて出現することはなかった。また、1985 年と 1988 年の Ad 4 結膜炎流行がみられた年には同一の subgenome type が多数を占めたが、流行がなかった 1987 年には 6 種類の subgenome type が確認され、これらは翌年にはすべて新しい subgenome type に変わったと報

告した。これに対し、今回の検討では Ad 4 結膜炎の流行がみられなかった 1993 年に subgenome type は 1 種類しかみられず、1995 年にも同じ subgenome type が出現し、Itakura ら⁵⁾の報告と比較してウイルスの変異が少ないと考えられた。厚生省感染症サーベイランスのデータによれば、今回検討した 1993 年以降 Ad 4 の検出は減少傾向にある。このことから、Ad 4p は Ad 4a に変異し 1979 年以降結膜炎の大流行を起こしたが、1993 年以降は変異が起こるほどには流行が多くなかったためにウイルスの変異が減ったのか、または流行が減った原因として Ad 4 の中和抗体保有率が上昇し、感染の拡散の機会が減ったのか、という点は今後の検討課題である。Ad 4 感染が減少した理由としてもう一つ考えられることは、Ad 4 は我が国に侵入当時は咽頭結膜熱の形をとるものが多かったが、その後、結膜炎単独の型が多くなってきたという点である。すなわち、長期間にわたって我が国において流行を繰り返している Ad 3 が現在も咽頭結膜熱の臨床像を持続し、咽頭からの分泌物で感染する機会を有しているのに対し、眼から眼へと感染する機会はより少ないと考えられる。

Shiao ら⁹⁾は Ad 3 に関して、1990 年の全国 11 か所の眼科施設で分離された株は結膜炎流行地域では同じ subgenome type がみられ、感染源、感染経路が共通である可能性があるとして述べた。Ad 4 は過去数年ごとに結膜炎の大流行を起こしてきた¹⁾が、これら多数の結膜炎が Ad 3 同様すべて共通の感染源、感染経路により生じたものであるかどうかは明らかでない。また、Ad 4 はこれまでに流行性角結膜炎、咽頭結膜熱、急性出血性結膜炎といった様々な臨床症状を呈することが報告^{10)~12)}されているが、これが subgenome type と関連があるのかどうかに関しても依然不明である。

今回行った検査は 6 塩基対認識制限酵素を用いた場合と比べ切断された DNA 断片のバンドの数が増えるが、これには写真上でバンド同士の重なりが増え、条件の異なる他の結果との比較が容易ではないという難点もある。しかし、同一ゲル上での比較は極めて高感度であり、これまで血清型別の検討のみであった Ad に関して subgenome type のレベルで分子疫学情報を得ることが可能となった。

近年 Ad ヘキソン蛋白には、血清型により長さが異なり、型特異的残基の 99% 以上を含む¹³⁾とされる hypervariable region (HVR) の存在がわかった。この HVR の塩基配列やアミノ酸配列を比較することにより Ad の変異を検索することが試みられており、今後この方法によりさらに臨床疫学情報の解析を進めていきたい。

御指導、御校閲を賜りました横浜市立大学医学部眼科学講座大野重昭教授に深く感謝いたします。また、本実験を進めるに当たり、終始御指導をいただきました青木眼科医院院長青木功喜先生に厚く謝意を表します。また、様々の御指導、御助

言を賜った横浜市立大学眼科学講座伊藤典彦先生、伊奈川和香先生、内尾栄一先生、札幌市衛生研究所吉田靖宏先生、菊地由生子先生、藤田晃三先生に心から感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第 100 回日本眼科学会(1996 年 4 月、京都)において発表した。

文 献

- 1) 青木功喜：感染性結膜炎。増田寛次郎(編)：眼科学大系 2 A 結膜・角膜・涙。中山書店、東京、81—100、1993。
- 2) Wadell G: Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 110: 191—220, 1984.
- 3) Wang LT, Aoki K, Isobe K, Shiao S, Toba K, Kobayashi N, et al: Genome analysis of adenovirus type 4 strains isolated from acute conjunctivitis in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 41: 308—311, 1997.
- 4) Li Q, Wadell G: The degree of genetic variability among adenovirus type 4 strains isolated from man and chimpanzee. *Arch Virol* 101: 65—77, 1988.
- 5) Itakura S, Aoki K, Sawada H, Ishiguro N, Shinagawa M: Changes in subgenome types of adenovirus type 4 isolated from patients with ocular disease between 1985 and 1989 in Sapporo, Japan. *J Clin Microbiol* 29: 1740—1743, 1991.
- 6) Shinagawa M, Matsuda A, Ishiyama T, Goto H, Sato G: A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol* 27: 817—822, 1983.
- 7) Guo D, Shinawawa M, Aoki K, Sawada H, Itakura S, Sato G: Genome typing of adenovirus strains isolated from conjunctivitis in Japan, Australia, and the Philippines. *Microbiol Immunol* 32: 1107—1118, 1988.
- 8) Itakura S, Aoki K, Sawada H, Shinagawa M: Analysis with restriction endonucleases recognizing 4- or 5- base pair sequences of human adenovirus type 3 isolated from ocular diseases in Sapporo, Japan. *J Clin Microbiol* 28: 2365—2369, 1990.
- 9) Shiao S, Aoki K, Isobe K, Wang LT, Itoh N, Toba K, et al: Genome analysis of adenovirus type 3 isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 34: 413—416, 1996.
- 10) Aoki K, Kato M, Ohtsuka H, Ishii K, Nakazono N, Sawada H: Clinical and aetiological study of adenoviral conjunctivitis, with special reference to adenovirus types 4 and 19 infections. *Br J Ophthalmol* 66: 776—780, 1982.
- 11) Grayston JH, Yang YF, Johnson PB, Ko LS: Epidemic keratoconjunctivitis in Taiwan: Etiological and clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 13: 492—498, 1964.

12) **Mizzi A, Rocchi G, Lumbrose B, Tosato G, Barbieri F** : Acute hemorrhagic conjunctivitis during an epidemic outbreak of adenovirus - type - 4 infection. *Lancet* 2 : 822—823, 1975.

13) **Mikszal LC, Schnurr DP** : Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype - specific residues. *J Virol* 70 : 1836—1844, 1996.
