

## ネパールにおける感染性結膜炎の病因検索

内藤 毅<sup>1)</sup>, 青木 功喜<sup>2)</sup>, 大口 剛司<sup>2)</sup>, 大神 一浩<sup>2)</sup>  
大野 重昭<sup>2)</sup>, 塩田 洋<sup>1)</sup>, Jeevan K. Shrestha<sup>3)</sup>, Madan P. Upadhyay<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部眼科学分野

<sup>2)</sup>北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座眼科学分野

<sup>3)</sup>B. P. Koirala Eye Center of Tribhuvan University Teaching Hospital, Nepal

## 要 約

目 的：ネパールの感染性結膜炎患者に対し，病因検索を行った。

方 法：インド国境の僻地とカトマンズのトリブバン大学眼科で，感染性結膜炎患者から検体を採取し，現地でキャピリア<sup>®</sup>アデノ・アイ（以下キャピリア）検査を行った。残った検体を日本に持ち帰り，polymerase chain reaction (PCR) 法でヒトアデノウイルス (HAdV) とクラミジアの検出，および血清型の同定を行った。同時に，僻地のトラコーマ小児患者の病因検索を PCR 法で行った。

結 果：キャピリアは僻地で 0/6，大学では 13/30 (43%) が陽性であった。PCR 法は僻地で 1/6 (17%)，大学

では 30/30 (100%) が陽性で，すべて HAdV-8 であった。クラミジアは僻地の 1 例のみが陽性で，C 型であった。トラコーマ小児患者 214 例のうち 97 例からクラミジアトラコマティス C 型が検出された。

結 論：ネパールではアデノウイルスは 8 型，クラミジアトラコマティスは C 型が優位であることが明らかになった。(日眼会誌 113 : 1088—1091, 2009)

キーワード：ネパール，感染性結膜炎，ヒトアデノウイルス，クラミジアトラコマティス，キャピリア<sup>®</sup>アデノ・アイ

## Pathogenesis of Infectious Conjunctivitis in Nepal

Takeshi Naito<sup>1)</sup>, Koki Aoki<sup>2)</sup>, Takeshi Ohguchi<sup>2)</sup>, Kazuhiro Ohgami<sup>2)</sup>  
Shigeaki Ohno<sup>2)</sup>, Hiroshi Shiota<sup>1)</sup>, Jeevan K. Shrestha<sup>3)</sup> and Madan P. Upadhyay<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine

<sup>3)</sup>B. P. Koirala Eye Center of Tribhuvan University Teaching Hospital, Nepal

## Abstract

**Purpose** : We investigated human adenovirus (HAdV) and *Chlamydia trachomatis* in patients with infectious conjunctivitis in Nepal.

**Method** : We obtained swabs from 6 patients with infectious conjunctivitis in a remote area near the Indian border (group A), and from 30 patients at the B. P. Koirala Eye Center of Tribhuvan University Teaching Hospital in Kathmandu (group B). Rapid diagnosis of HAdV was conducted in Nepal, using Capilia<sup>®</sup> adeno eye (Capilia), a rapid adenoviral antigen diagnostic kit using immunochromatography. Residual swabs were brought to Japan and examined for HAdV and *Chlamydia trachomatis* using polymerase chain reaction (PCR). Etiological analysis of 214 patients with trachoma was also investigated by PCR.

**Results** : Capilia results were negative for the six samples of group A and positive for 13 patients (43%) in group B. PCR showed one (17%) as positive in group A and 30 (100%) in group B. The serotype of all HAdV positive samples was HAdV-8. C serovar of *Chlamydia trachomatis* was detected in ninety seven cases out of 214 patients with trachoma.

**Conclusion** : HAdV-8 and *Chlamydia trachomatis* serotype C seem to be prevalent in Nepal. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 1088—1091, 2009)

**Key words** : Nepal, Infectious conjunctivitis, Human adenovirus, *Chlamydia trachomatis*, Capilia<sup>®</sup> adeno eye

別刷請求先：770-8503 徳島市蔵本町3 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部眼科学分野 内藤 毅

(平成20年11月25日受付，平成21年6月3日改訂受理) E-mail : naito@clin.med.tokushima-u.ac.jp

Reprint requests to : Takeshi Naito, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 3 Kuramoto-cho, Tokushima-shi 770-8503, Japan

(Received November 25, 2008 and accepted in revised form June 3, 2009)

## I 緒 言

従来、ネパールにおける感染性結膜炎の研究は臨床疫学的観察が主体であり、病原学的な検討はほとんどなされていない。しかも、我々が調べた限りでは、ネパールの感染性結膜炎に関して検討した報告はない。感染性結膜炎は流行地域により病原微生物に地域差がみられることはよく知られている<sup>1)</sup>。すなわち、流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis : EKC) の原因であるアデノウイルスの血清型は、我が国では 4, 37, 53, 22.37/H8 の中間型が多いが、これは我が国特有で今まで調べた諸外国では 8, 19a が主体である。特にアジアのバングラデシュ、ベトナム、韓国、台湾、米国では 4, 8, 19a が主体である。また、クラミジアは日本では D~K 型による封入体性結膜炎が主体であるが、トラコーマの世界的疫学ではアフリカと中近東は A 型であり、日本を含むアジア諸国は C 型である。

ネパールの北はヒマラヤ山脈に面し、南はインド国境に面するタライ地方である。標高差が大きく、都市部の首都カトマンズとタライ地方の僻地では約 1,000 m の標高差があり、気温も 5~9°C 異なる<sup>2)</sup>。2001 年の国勢調査によると、トイレの普及率は都市部 92.4%、僻地 17.2% で、水道の普及率は都市部 84.1%、僻地 34.7% であった。衛生状態に影響すると思われる他の情報として、成人の識字率は都市部 73.6%、僻地 28.4% で<sup>3)</sup>、僻地では過酷な生活状況と考えられ、衛生に関する教育や情報に乏しいと思われた。このようにネパール国内でも地域により気候が大きく異なり、大都市の首都カトマンズとタライ地方などの僻地では、衛生状態はきわめて落差が大きい。

今回我々は、流行性角結膜炎の代表であるアデノウイルス結膜炎、および慢性結膜炎の代表であるトラコーマ患者を対象に、ネパールにおける疫学的に異なる地域の感染性結膜炎の病因検索を試みたので報告する。

## II 実験方法

ネパールにおける感染性結膜炎の病因検索を目的とし、主に都市では流行性角結膜炎を起こすアデノウイルスを中心に検索し、地方ではトラコーマ患者のクラミジアに関して病因検索を行った。

対象は 2006 年 9~11 月にネパールの僻地であるインドとの国境近くのタライ地方でみられた急性濾胞性結膜炎患者 6 例 (男性 4 例、女性 2 例、7~40 歳) と、首都カトマンズのトリブバン大学病院 B. P. Koirala Eye Center でみられた急性濾胞性結膜炎患者 30 例 (男性 16 例、女性 14 例、0.2~72 歳) である。また、2006 年に Proctor Foundation から分与されたネパール西部の僻地における臨床的にトラコーマ小児患者と診断された 214 名を対象とした。

### 1. アデノウイルス結膜炎の病因検索

現地で各患者からインフォームド・コンセントを得た後、キャピリア<sup>®</sup>アデノ・アイ (わかもと製薬、以下キャピリア) を用いてスクリーニング検査を行った<sup>4)</sup>。さらに残った検体を日本に持ち帰り、polymerase chain reaction (PCR) 法を行った。PCR 法は、我々が開発したアデノウイルス 51 血清型すべてを増幅するプライマーを設計し、real-time PCR 法で DNA を増幅した後、アデノウイルスの血清型を同定し、さらに系統解析を行った。また、キャピリアの定性結果と定量 PCR 法で測定したアデノウイルス DNA 量との比較検討も行った<sup>5)~7)</sup>。

### 2. アデノウイルス陽性と重症度の関係

結膜炎の重症度を重症、中等症、軽症に分類し、アデノウイルス陽性との関連を検討した。結膜炎の重症度は、炎症が上下の眼瞼結膜円蓋部まで及ぶものを重症、下眼瞼結膜から上眼瞼結膜までで上眼瞼結膜円蓋部には及ばないものを中等症、下眼瞼結膜のみの炎症を軽症と分類した。

### 3. クラミジア・PCR 系統解析

クラミジア (*Chlamydia trachomatis*) についても PCR 法を行い、系統解析を行った。残った検体から DNA を抽出し、major outer membrane protein (MOMP) 遺伝子にクラミジア 15 血清型すべてを増幅するプライマーを設計し、970 bp 領域を nested PCR 法で増幅した。増幅産物の一部、約 400 bp の塩基配列を解読し、既知の血清型参照配列とともに遺伝子系統解析を行った。系統解析は、2-パラメーター法で nucleotide distance を算出し、neighbor-joining 法で系統樹を作成して行った。

*C. trachomatis* C/TW 3/OT (GenBank Accession No. AF 352789) を Genotype C とし、それ以外を C variant とした。

## III 結 果

### 1. アデノウイルス検査結果

僻地 6 例と大学病院 30 例を合わせた 36 例全体ではキャピリア陽性は 13 例 (36%) で、これらはすべて大学病院の検体であった。PCR 法の結果では、全体では 31 例 (86%) で陽性であった (表 1)。大学病院の検体すべてでアデノウイルスが陽性であったが、僻地の検体からは 1 例のみ陽性であった。アデノウイルスの血清型はすべて 8 型であった。キャピリア検出結果とアデノウイルスの DNA 量の関係を示したのが表 2 である。キャピリア陽性と DNA 量には関連性がみられ、DNA 量が  $10^8$  コピー以上ではすべて陽性結果が得られた。系統解析では日本における human adenovirus (HAdV) 8 の分離株よりも変異が少なく、標準株に近い系統に属していた。

### 2. アデノウイルス陽性と重症度の関係

結膜炎の重症度を重症、中等症、軽症に分類し、アデノウイルス陽性との関連を検討したが、陽性率は各群で

表 1 アデノウイルス検査結果

対象：僻地 6 例 + 大学病院外来 30 例		
年齢群	キャピリア陽性(%)	PCR : HAdV 8(%)
乳幼児 : 12	4(33)	12(100)
小児 : 7	2(29)	7(100)
成人 : 14	5(36)	9 (64)
老人 : 3	2(67)	3(100)
計 36	13(36)	31 (86)
・キャピリア陽性	僻地 : 0/6 (0%)	大学 : 13/30 (43%)
・PCR 陽性	僻地 : 1/6(17%)	大学 : 30/30(100%)

PCR : polymerase chain reaction, HAdV : human adenovirus.

表 2 アデノウイルス簡便迅速検出結果と DNA 量

キャピリア(-)	DNA 量(コピー/ml)	キャピリア(+)
1	1~9×10 <sup>4</sup>	0
0	1~9×10 <sup>5</sup>	0
10	1~9×10 <sup>6</sup>	1
5	1~9×10 <sup>7</sup>	2
0	1~9×10 <sup>8</sup>	6
0	1~9×10 <sup>9</sup>	3
0	1~9×10 <sup>10</sup>	1

ほぼ同等であり、特に関連性はみられなかった(表 3)。

### 3. クラミジア・PCR-系統解析結果

クラミジアの検出結果では僻地サンプルの 1 例が陽性であったが、大学病院のサンプルはすべて陰性であった。この陽性サンプルを系統解析した結果、クラミジアトラコマティス C 型が検出された。一方, Proctor Foundation から分与されたトラコマの小児患者 214 例では C 型が 97 例にみられた。Prototype と同じ genotype C は 87 例であり, 他の 10 例は解析領域内での塩基配列が異なり変異がみられた。

なお, これらの分与された検体からは HAdV 8 variant が 2 例, HAdV 3 が 1 例検出された。

## IV 考 按

トラコマは水資源に恵まれていないネパールの僻地では依然流行が止まっていない。僻地は亜熱帯で初夏から秋にかけて特に高温多湿な気候である。しかも水道, 電気, トイレのない家が多く, 衛生状態が悪いネパールの僻地ではトラコマ患者はまれでなく, クラミジアトラコマティスが検出された。これに対し, カトマンズはタライ地方に比べ海拔は 1,000 m 以上高く気温も 5~9°C 低く, 気候は穏やかである。しかも大都市で人口は密集しているとはいえ, 水道や電気があり, 衛生状態は比較的良い。しかし, 大学病院で採取した検体の PCR 法の結果では, すべての検体からアデノウイルスが検出された。これに関しては, 院内感染も否定できないと思

表 3 アデノウイルス陽性と重症度の関係

結膜炎の重症度	HAdV 陽性数(%)
軽症	8/10(80)
中等症	13/15(87)
重症	10/11(91)
計	31/36(86)

HAdV : human adenovirus.

重症度の判定基準は, 軽症 : 炎症が下瞼結膜まで, 中等症 : 上瞼結膜まで, 重症 : 上円蓋結膜まで。

われた。さらに, キャピリアの陽性率がなぜ低かったのかは不明であるが, real-time PCR 法の結果から, DNA コピー数の少ないものにキャピリア陰性が多いことが裏付けられた。大口らの報告によると, キャピリアの最小検出感度は  $7.0 \times 10^4$  コピー/ml であり,  $1 \times 10^8$  コピー/ml 以上ではすべて陽性であった<sup>5)</sup>。我々の今回の結果でも,  $1 \times 10^8$  コピー/ml 以上ではすべて陽性となっていて, この報告と一致していた。しかし, 今回の結果では,  $1 \sim 9 \times 10^6$  コピー/ml でキャピリア陰性が多く, このことがキャピリアの陽性率に影響していた。

我が国の院内感染例の際に無選択に採取した検体では, 臨床症状を示さなくとも少量のアデノウイルス DNA を検出される場合が含まれている<sup>8)</sup>。これらが感染したことは確実であるが, 感染源になっていたという確証は報告されていない。すなわちキャピリアで検出するのはヘキソン蛋白質であり, ウイルス粒子が完成する効率は 10% 未満であるため, 簡易検査による陽性が症状の index とイコールではない。今回認められた, ネパールの結膜炎患者における少量の DNA 検出は, 院内感染時のような状態がネパールでは存在していると考えられる。EKC 患者ではウイルスを分離できるのは 10 日以内であり, キャピリアでは感染が終わった後でも陽性に出ることはまれでない。これらのことから, ネパールでは住民が低濃度のウイルスで常に汚染されている状態である可能性が考えられた。

アデノウイルスに有効な消毒剤はごく限定されており, 我が国においても正しい消毒剤の選択が行われていないことが多い<sup>9)</sup>。ネパールにおける消毒はアデノウイルスに特異的な選択はなされておらず, 石鹼が一般的であり, アデノウイルスは診察環境に常在して, 今回アデノウイルス抗原が多く検出されたと推定される。

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Proctor Foundation から分与されたトラコマの血清型同定でも C 型が最も多く, 今回僻地の検体のうち検出された 1 例も血清型は C 型であった。またトラコマと診断した中には HAdV 8 も 2 例検出できた。

今回の調査で得られた結果からは, ネパールではアデ

ノウイルスは 8 型, クラミジアトラコマティスは C 型が優位と思われた。我が国におけるトラコーマ患者の serovar は, 徳島大学眼科保存株の分子生物学的解析 (未発表) でも C 型が検出されており, アジアにおけるトラコーマ分子疫学でも C 型が優位であるという結果と同じであった。ネパールのトラコーマ患者から検出された血清型は標準株が多く, 変異は 10% であった。

ネパールにおけるトラコーマ小児患者の検体を分与していただいた Proctor Foundation の Dr. Littman に感謝します。

#### 文 献

- 1) 竹内 聡: アデノウイルス結膜炎の臨床, 疫学および分子遺伝学. 井上幸次, 内尾英一, 大野重昭(編): 眼のウイルス感染症. 金原出版, 東京, 1—12, 2002.
- 2) Gurung H: Nepal, Atlas & Statistics. Himal Books, Lalitpur, Nepal, 2006.
- 3) International center for integrated mountain development, Central bureau of statistics: Nepal census indicators 2001 & trends. Hill side press, Kathmandu, Nepal, 2003.
- 4) 大口剛司, 有賀俊英, 三浦里香, 島田康司, 中島晴彦, 田川義継, 他: アデノウイルス迅速診断キット「キャピリア®アデノ」の検討. 臨眼 59: 1189—1192, 2005.
- 5) 大口剛司: ヒトアデノウイルス結膜炎における DNA コピー数の測定および血清型同定の臨床的意義. 日眼会誌 111: 5—10, 2007.
- 6) Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, et al: Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. J Clin Microbiol 45: 958—967, 2007.
- 7) Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Ishiko H: Molecular diagnosis of human adenoviruses D and E by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence. J Clin Microbiol 42: 1577—1584, 2004.
- 8) Kaneko H, Maruko I, Iida T, Ouguchi T, Aoki K, Ohno S, et al: The possibility of human adenovirus detection from the conjunctiva in asymptomatic cases during nosocomial infection. Cornea 27: 527—530, 2008.
- 9) 赤沼正堂: Real-time PCR 法を用いたアデノウイルスに対する消毒薬の評価. 日眼会誌 111: 384—390, 2007.