

アデノウイルス結膜炎の分子疫学

—札幌, マニラとメルボルンの比較—(図5, 表4)

青 木 功 喜 (青木眼科 札幌市)
 沢 田 春 美 (北海道衛生研究所 札幌市)
 品 川 森 一 (帯広畜産大獣医公衆衛生学教室 帯広市)
 川 名 林 治 (岩手医大細菌学教室 盛岡市)

Molecular Epidemiology of Adenoviral Conjunctivitis in Japan, the Philippines and Australia

Koki Aoki, ¹⁾Harumi Sawada²⁾, Moriichi Shinagawa³⁾
 and Rinji Kawana⁴⁾

¹⁾ Aoki Eye Clinic, Sapporo, Hokkaido

²⁾ Hokkaido Institute of Public Health, Sapporo

³⁾ Department of Veterinary Public Health, Obihiro University of
 Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro Hokkaido

⁴⁾ Department of Microbiology, Iwate Medical University, Morioka

要 約

日本, フィリピンおよびオーストラリア3国においてアデノウイルス結膜炎の血清型である Ad3, Ad4, Ad8, Ad11, Ad19, Ad37の DNA を Sal I, Sma I, Hind III, BamHI の制限酵素で切断し分析したところ, 従来報告のみられなかった新しい遺伝子型を見出した. すなわち, AdB 群において Ad3では Ad3f と Ad3g を, Ad11では Ad11b, 11c, 11d を, さらに AdD 群の Ad37では 37a の variant を見出した. PCF の主因である Ad3では, 札幌で Ad3f と Ad3g が1983年から交互に4年間にわたって流行していることが判った. マニラでは Ad3p, メルボルンでは Ad3p から Ad3f へと変遷していた. Ad11では札幌で Ad11c と Ad11d, メルボルンで Ad11c という新しい遺伝子型を見出した. EKC の主因である Ad8については, 札幌では Ad8b であったがメルボルンとマニラでは共に Ad8p であった. これに対して新しい EKC の病因である Ad37では, 札幌とマニラは Ad37p であったがメルボルンでは Ad37a が見出された. 一方, Ad4と Ad19は従来の Ad4a と Ad19a であった. アデノウイルスの遺伝子型は古くからよく知られている血清型 Ad3, 8, 11では genomic variant が多く, 新しい血清型 Ad4, 19, 37は variant が少なかった. 今回, 血清型でも Ad34か Ad35が決定できない中間型のアデノウイルスが EKC 患者の結膜から分離された. (日眼 92: 1818—1824, 1988)

キーワード: アデノウイルス結膜炎, DNA 切断像, 分子疫学, 遺伝子型, 血清型

Abstract

Restriction endonucleases Sal I, Sma I, Hind III and BamH I were used to analyze 164 strains of Adenovirus (Ad, 3, 4, 8, 11, 19, 34/35, 37) isolated from patients with epidemic conjunctivitis in

別刷請求先: 〒003 札幌市白石区本通り6丁目北2番1号 青木眼科医院 青木 功喜
 (昭和63年6月28日受付, 昭和63年8月8日改訂受理)

Reprint requests to: Koki Aoki M.D.

Shiroishiku Hondori 6 kita 2-1 Sapporo 003, JAPAN

(Received June 28, 1988 and accepted in revised form August 8, 1988)

Sapporo, Manila and Melbourne. We detected six new genome types, namely Ad3f, 3g, Ad11b, 11c, 11d and Ad37a. It was noted that recently elected serotypes such as Ad4, 19 and 37 have few genome types. Genome types of subgenus AdB, the main causes of pharyngoconjunctival fever, were shown to be Ad3f, Ad3g, Ad11p, Ad11c and Ad11d in Japan, Ad3p, Ad11a and Ad11b, in the Philippines and Ad3p, Ad3f and Ad11c in Australia. Genome types of subgenus D, the main causes of epidemic keratoconjunctivitis were Ad8b, Ad19a and Ad37p in Japan, Ad8p, Ad19a and Ad37p in the Philippines and Ad8p, Ad19a, Ad37p and Ad37a in Australia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1818—1824, 1988)

Key word: Adenoviral conjunctivitis, DNA cleavage pattern, molecular epidemiology, genome type, serotype

I 緒 言

我々は感染症のサーベイランス情報の一環としてウイルス性結膜炎の臨床的、ウイルス学的研究を過去10年間にわたり札幌地方において遂行してきた^{1)~3)}。最近、流行性結膜炎はAd19, EV70, CA24variantなどが広範囲の地域に流行しており、これら病原体に関する国際間の情報交換の必要性がより増加してきている。

最近、分子生物学的手法によりウイルスの同一血清型に複数の遺伝子型が存在する事実が判明する⁴⁾と共に、各遺伝子型の分布を知ることはウイルスの血清型の変異の仕方⁵⁾や、各地方における遺伝子型の推移より、さらに詳細な感染様式の年次変遷⁶⁾などの情報も与えられ、分子疫学という新しい分野の開発をみている。

アデノウイルス性結膜炎は流行性を示す結膜炎として最も良く知られており⁷⁾、アデノウイルスの血清型はアデノウイルスのカプシドプロテインに相当する、hexon と fiber を決定基とした血清反応によって決定されていた。しかし最近の制限酵素の発見でウイルスのDNAを制限酵素で切断し、その塩基配列の切断像の比較により、いわゆる遺伝子型が判るようになった。我々はこれまで台湾、韓国、フィリピンおよび我が国の東アジア4カ国において、血清型の検索と共にアデノウイルス性結膜炎の遺伝子型の解明を試みてきたが⁸⁾、今回はさらにオーストラリアでの成績と比較検討したので報告する。

II 方 法

ウイルスの株

1983年10月から1986年10月までに結膜炎患者から分離できたアデノウイルス165株、すなわち札幌における108株、マニラの29株、メルボルンの28株を材料として

用いた。これらを血清型別にみるとAd3:50株、Ad4:17株、Ad7:1株、Ad8:45株、Ad11:10株、Ad19:20株、Ad34/35:1株とAd37:21株である。なお対照としてはAd3(GB)、Ad4(RI-67)、Ad11(Slobitski) Ad8(Trim)、Ad19(587)、Ad34(Compton) Ad35(Holden) Ad37(GW)の標準株をATCC(American Tissue Culture Center)から購入して用いた。

なおこれらの株はHeLa細胞で増殖させ、DNA制限酵素による解析に用いた⁹⁾。

ウイルスDNAは既報のごとく感染細胞から得、Sal I, Sma I, Hind III, BamH I, (Takara Shuzo Co. Japan)を用いて消化し、DNAの制限酵素断片は1.0%アガロースゲルで分離した。なお上記の制限酵素以外にAd34/35についてはBgl II, Hpa I, Kpn I と Pst I をAd37ではEcoR Iを用いて消化した。なおAd8についてはSouthern hybridizationを原法に従って行った¹⁰⁾。

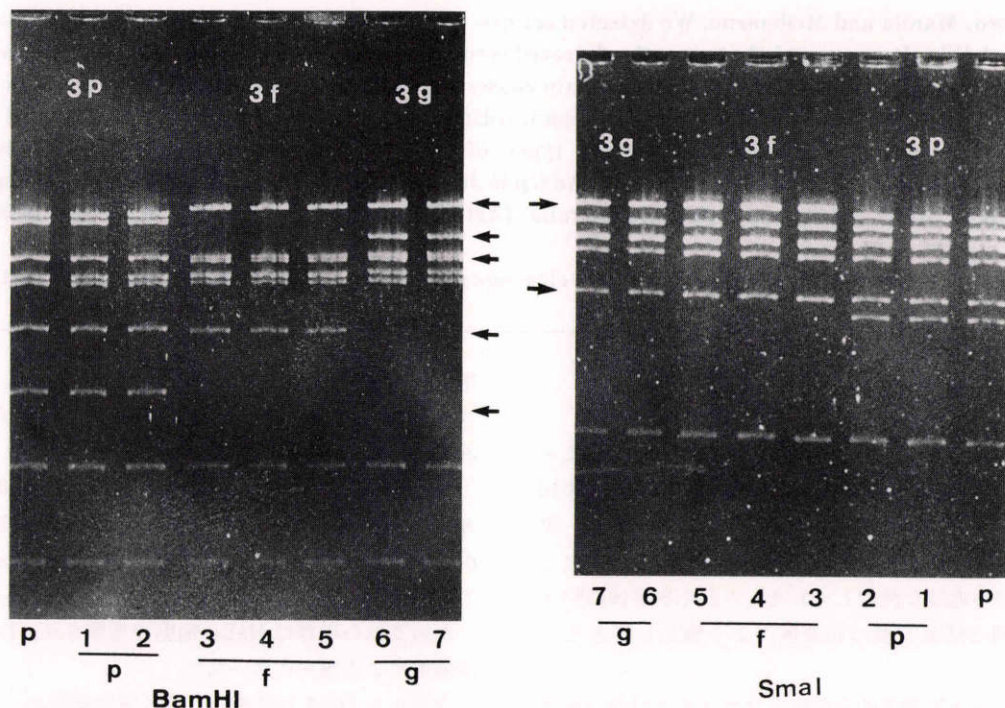
III 結 果

1 Subgenus B

Ad3:図1に示す如くメルボルンで分離された株(lane 1)とマニラから得られた株(lane 2)は、BamHIで切断すると、標準株(lane P)と同じように切断されAd3pと判定された。しかし札幌で得られた24株(lane 3, 4)は同じ札幌で分離された19株(lane 6, 7)と図1の如く異なる切断像を示し、これらはAd3f, Ad3gと命名された。なおメルボルンの3株(lane 5)は札幌の24株(lane 3, 4)と同じAd3fパターンを示した。Ad3fとAd3gはSmaIで切断すると標準株(lane P)と同じ切断像を示した。

札幌において分離した1983年から1986年までのAd3, 43株のgenome typeの推移は、表1の如く年度によって3fか3gが交互に流行していることが判った。

Ad7:マニラにおいて1株を分離したのみであり、



1=Philippines(1984) 2,5=Australia(1984) 3,6=Japan(1984),4='86,7='85 P=(ATCC)

図1 アデノウイルス3型のDNA切断像

表1 札幌で分離されたアデノウイルス3型の遺伝子型の年次推移

アデノ3型 遺伝子型	分離株数			
	1983	1984	1985	1986
Ad3f	3 (33.3)	7 (87.5)	4 (25)	10 (100)
Ad3g	6 (66.7)	1 (12.5)	12 (75)	0 (0)

()=%

表2 切断像によるアデノウイルス11の遺伝子型の分類

Enzyme	11p	11a	11b	11c	11d
Bam HI	□	■	■	■	■
Hind III	□	■	■	■	■
SmaI	□	■	□	■	■

□ Ad11pに見られる切断像

■ Ad11pと異なる切断像

その遺伝子型は標準株と異なり Ad7b に相当する切断像を示した。

Ad11: 図2に示す如く標準株 (lane P) と同じ切断像を示したものは、札幌で分離された2株 (lane 1) で Ad11p と判定された。マニラで分離された1株 (lane 2) は標準株 (lane P) とは BamHI, Hind III, SmaI のいずれも異なるパターンを示し Ad11a と命名された。残りのマニラの Ad11 (lane 3) は BamHI, Hind III で Ad11a と異なる切断像であり、SmaI により Ad11p と同じパターンであり、Ad11b と判定された。札幌の2株のメルボルンの1株 (lane 4) は BamHI, SmaI による切断時には Ad11a と同じ切断像を示し、

Hind III では独特のパターンを示したので Ad11c と命名した。札幌の2株 (lane 5) は Hind III と SmaI で切断した時には同じパターンを示し、BamHI で独特なパターンを示したので Ad11d とした。(図2, 表2) Ad34/35: 札幌において1株 (TA) 分離できた。この TA は中和交叉試験で Ad34 と Ad35 の標準株に強く交叉し、切断像を Bgl II, Hind III, BamHI, Hpa I, Sma I, Kpn I, Pst I の7つの制限酵素で切断したが、BamHI, SmaI, HpaI を用いた時は Ad35 と同じで、Pst I と HpaI を用いるとそれぞれことなる像を示し、Bgl II と Hind III では Ad34 と同じ pattern を示した。その comigating analysis は表3の如

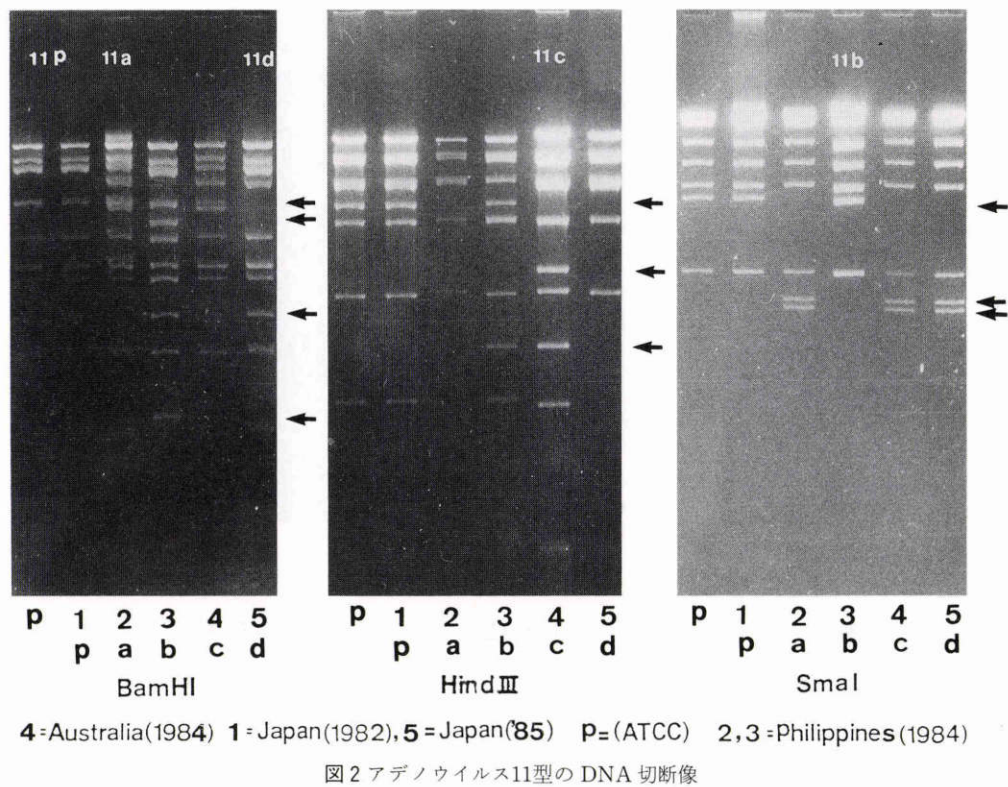


表3 TA. アデノウイルス34及び35の DNA 切断フラグメントの解析

	フラグメント数							共通フラグメント	
	Bgl II	Hind III	Bam HI	Hpa I	Sma I	Kpn I	Pst I	計	%
TA	12	9	12	6	10	6	9	64	100
Ad34	id ^{a)}	id	9/11	6/7	9/9	3/5	8/10	56/63	88
Ad35	8/10 ^{b)}	6/8	id	id	id	4/5	7/10	53/61	85

a) id : TA と同一の切断パターン
b) 8/10 : TA と共通のフラグメント数/フラグメント数

くである.

2 Subgenus D

Ad8：今回の検索に用いられた Ad8はその DNA の収量によって5μg/16cm dish を良好, 0.3μg/16cm dish 以下のものを不良という基準で分けると, 表 4 に示す如き分布であった. 今回の survey ではメルボルンとマニラは, DNA 収量の良好な株のみを用いたが, Ad8の使用株は表 4 の如く 3 地区ともメルボルン17株, マニラ13株, 札幌15株とほぼ同じ割合であった. DNA 収量の良いものは従来の方で検索できたが, 札幌の収量不良群は DNA の量が限られ宿主 DNA の混入が多いため, Ad8の prototype DNA を³²P で標識

表4 アデノウイルス 8 型の増殖性と遺伝子型

	増殖状態			遺伝子型
	良 5μg 16cm dish	不良 0.3μg	(-)	
Melbourne	5	—	—	Ad8p
Manila	7	—	—	Ad8p
Sapporo	5	13*	15	Ad8b

した probe を用意して, Southern hybridization により遺伝子型の型分けを行ったが, メルボルンとマニラの株は Ad8p であるのに対して, 札幌の株はすべて

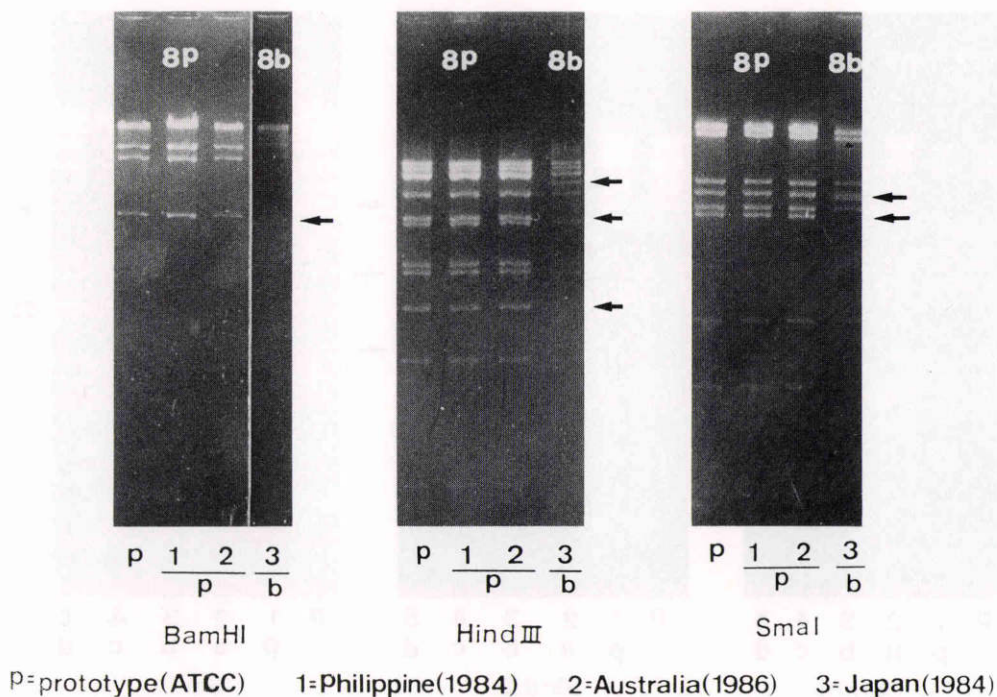
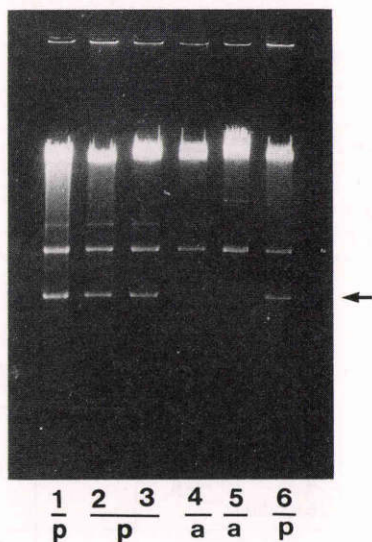


図3 アデノウイルス8型のDNA切断像



1= prototype (ATCC) 2,3,6= Japan (1984) Australia 4=(1984) 5=(1986)

図4 アデノウイルス37型のDNA切断像

Ad8bであった。その切断像は図3に示した。

Ad19:メルボルン, マニラ, 札幌共にこれらの genome type は今迄の報告通りと同じ Ad19aであった。

Ad37: 今回の Sal I, Sma I と Hind III の3つの制限酵素による切断像はメルボルン, マニラ, 札幌の3地域とも標準株と同じ Ad37pであった。しかし EcoR I による切断像ではメルボルンの分離株中に Ad 37a という genome type を見出した。その切断像は図4に示した。

3 Subgenus E

Ad4: Sma I, Hind III と BamHI では17株のうち16株は Ad4a であり、マニラの1株は Ad4b で、その切断像は図5に示した。

VI 考 案

アデノウイルスの結膜炎に関連する型は Ad3, 4, 7, 8, 11, 19, 37である。しかし我々の過去10年間の研究では札幌では Ad7は1株も分離できず、我が国においては現在きわめて稀な型となっていると思われる¹¹⁾。これに対して Ad4, 19, 37が1978年頃より我国にも流行し、最近の結膜炎の起因ウイルスとしてよく知られ

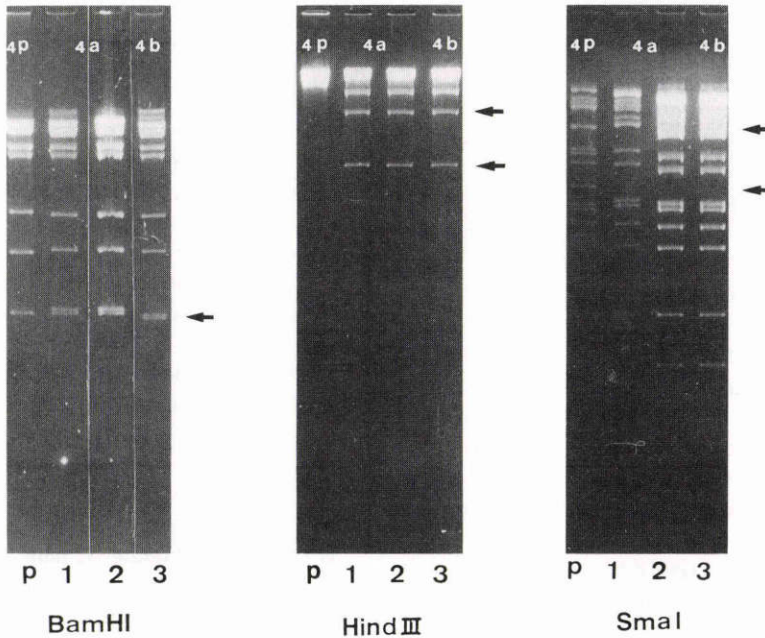


図5 アデノウイルス4型のDNA切断像

始めている¹²⁾。しかし血清疫学的にはこれらの型を保有している率は低く、我が国に侵入して長いとは思わない。

一方 Ad3 と Ad8 は古くから咽頭結膜熱 (PCF) 及び流行性角結膜炎 (EKC) の病因として存在していたが、Ad3 抗体保有の80%以上の人は若年期に感染するのが一般的である¹³⁾のに対して Ad8 は結膜から結膜への感染形式を示し、抗体保有率は30%に過ぎない。Ad11 は尿中から分離されることが最も多く、Ad3 の上気道からの分離と同じく結膜および結膜以外の病巣からの検出もよく知られている¹⁴⁾。

アデノウイルスの genomic variant として報告されているものは、Ad3 では従来 a から e まだが Wadell や O'Donnell¹⁵⁾によって報告されていたが、我々は今回新しい genome type として見出した Ad3f と Ad3g が我が国において主体を占めていた。1983年から1986年の間の Ad3 発生状態は交互に流行を示していることを示していた。諸外国では Ad7 が多い¹⁶⁾のに較べて、我が国では Ad3 が多く、繰り返されるこの Ad3 の流行を通して、recombination などにより新しい genome type を生んでいると思われる¹⁷⁾。

これと同じ現象は結膜を主体して流行している Ad8 や、結膜以外に尿道などを介して散布されると思われる Ad11 などと同様なことが言える。今回、我が国

では Ad8 は Ad8b を、Ad11 では Ad11c と Adaad という新しい genome type を見出した。

オーストラリア、フィリピンでは Ad8p、台湾と韓国とアメリカでは Ad8c から Ad8f の4つの genomic variant を認めている¹⁷⁾¹⁸⁾。Ad11 ではオーストラリアは Ad11c、フィリピンは Ad11a と Ad11b、そして我が国では Ad11p、Ad11c、Ad11d と国によりその流行している遺伝子型が異なっている。

Ad8 は増殖が悪いのでその DNA の収量が充分でなく、遺伝子型の検討が従来遅れていたが、今回 Southern hybridization を用いた検討の結果、増殖の差は遺伝子型とは関係がないと考えられた。

これに対して Ad4、19、37 などではそれぞれ Ad4a、Ad19a と Ad37p が主体であり、variant を出す程流行していないことが考えられる¹⁹⁾。しかしその型によって variant の出来やすい型の存在も考えられるので、長期間の観察が必要である²⁰⁾。

アデノウイルスの genome type は DNA の塩基配列をみているが、これらの型には中間型と考えられる型が特に B 群に多い。すなわちアデノウイルスの A 群と B 群は DNA のホモロジーが他の群に較べて低いためと考えられる²¹⁾。

今回我々は Ad34 と Ad35 の区別が血清学的にも遺伝子型からもつかない中間型を見出した。このことは

今後これらの分類の上で、より詳細な分子生物学的アプローチを必要としていると考えられる。

文 献

- 1) 青木功喜, 加藤道夫, 大塚秀勇他: 新型ウイルス (Ad37) による角結膜炎の臨床疫学的ならびに病原学的研究. 日眼 89: 294—298, 1985.
- 2) 青木功喜, 川名林治, 松本一郎他: 日本とフィリピンにおけるウイルス性結膜炎の病因と臨床像の比較. 臨床眼科 40: 1261—1265, 1986.
- 3) 青木功喜, 川名林治, 沢田春美他: 結膜炎由来アデノウイルス株の分子疫学—日本とフィリピンの比較—. 日眼 90: 1245—1249, 1986.
- 4) Adrian TH, Wadell G, Hierholzer JC, et al: DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. Arch Virol 91: 277—290, 1986.
- 5) Shinagawa M, Iida Y, Matsuda A, et al: Phylogenetic relationships between adenovirus as infected from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. GENE 55: 85—93, 1987.
- 6) Wadell G: Molecular epidemiology of human adenoviruses. Current Topics Microbiology Immunology 110: 192—220, 1984.
- 7) 青木功喜, 川名林治: 感染結膜炎の臨床疫学的並びに病因学的研究. 日眼 90: 233—237, 1986.
- 8) Ishii M, Nakazono K, Fujinaga, et al: Comparative studies on etiology and epidemiology of viral conjunctivitis in three countries of East Asia, Japan, Taiwan and South Korea. Int J Epidemiol 16: 98—103, 1987.
- 9) Shinagawa M, Matsuda A, Ishiyama T, et al: A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. Microbiol Immunol 27: 817—822, 1983.
- 10) Southern EM: Southern hybridization. J Mol Biol 98: 503, 1975.
- 11) 青木功喜: アデノウイルス結膜炎の病因と臨床像. 眼科 29: 123—128, 1987.
- 12) Kemp MC, Hierholzer JC, Cabradilla CP, et al: The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: Antigenic and restriction enzyme analyses of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10 year period. J Inf Virol 148: 24—33, 1983.
- 13) 青木功喜, 沢田春美: 結膜炎関連アデノウイルスの血清疫学. 日眼 91: 181—186, 1987.
- 14) Schmitz H, Wigand R, Heinrich W: World-wide epidemiology of adenovirus infections. Am J Epidemiol Virol 117: 456—466, 1983.
- 15) O'Donnel B, Bell E, Payne SB, et al: Genome analysis of species 3 adenoviruses isolated during summer outbreaks of conjunctivitis and pharyngoconjunctival fever in the Glasgow and London areas in 1981. J Med Virol 18: 213—227, 1986.
- 16) Wadell G, de Jong JC, Wolontis S: Molecular epidemiology of adenovirus: Alternating appearance of two different genome types of adenovirus 7 during epidemic outbreaks in Europe from 1958 to 1980. Inf Imm Virol 34: 368—372, 1981.
- 17) Fujii S, Nakazono N, Ishii K, et al: Molecular epidemiology of adenovirus type 8 in Taiwan: Four subtypes recovered during the period of 1980—1981 from patients with epidemic keratoconjunctivitis. J Med Sci Biol 37: 161—169, 1984.
- 18) Kemp MC, Hierholzer JC: Three adenovirus type 8 genome types defined by restriction enzyme analysis: Prototype stability in geographically separated populations. J Clin Microbiol 23: 469—474, 1986.
- 19) Ren CS, Nakazono N, Ishida S, et al: Genome types analysis of adenovirus type 4 isolates, recently obtained from clinically different syndromes in some areas in Japan. J Med Sci Biol 38: 195—199, 1985.
- 20) Kennett ML, Rodger SM, Dickson KE, et al: Further characterization of 41 isolates of adenovirus type 19/37 by serum neutralization and DNA restriction enzyme analysis. J Hyg Camb 97: 368—372, 1981.
- 21) Adrian Th, Wigand R: Adenovirus 3—7, an intermediate strain of subgenus B. Intervirology 26: 202—206, 1986.