

令和元年6月24日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20119

研究課題名(和文) 尿道炎におけるアデノウイルスの分子疫学的研究及び病原性の解析

研究課題名(英文) Molecular epidemiological study and virulence analysis of Human adenovirus in urethritis.

研究代表者

花岡 希 (Hanaoka, Nozomu)

国立感染症研究所・感染症疫学センター・主任研究官

研究者番号：00584517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：男子尿道炎は最も患者数の多い性感染症の一つである。近年、アデノウイルス(Ad)の関与が指摘されているが、病原性等について不明な点が多い。そこで本研究では、尿道炎患者と尿道炎症状のないヒトの初尿中の病原体を網羅的に比較解析することで、Ad性尿道炎の存在を調べた。さらに、Ad性尿道炎患者の症状など詳細も検討し、Ad性尿道炎の特徴も解析した。約400症例の尿道炎患者と約120例の無症状者を解析した結果、尿道炎患者群で有意にAdが検出された。また、分離同定されたAd型が流行性角結膜炎関連型と一致すること、尿道炎症状が消失後も長期間にわたって、感染可能なAdが尿中に大量に排出されていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行によって我が国においてもアデノウイルス性尿道炎が存在することや、症状消失後も大量の感染可能なウイルス排出が明らかになったことによって、アデノウイルス感染環の一端も明らかとなった。また、尿道炎に関連するアデノウイルスは主に流行性角結膜炎と関連するアデノウイルスと一致していたが、一部我が国での眼での流行状況と尿道炎関連アデノウイルスの検出状況が異なることから、さらなる研究の必要性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Background: Urethritis is a common sexually transmitted disease, and human adenoviruses have been found to be associated with nonchlamydial nongonococcal urethritis. However, the Molecular epidemiological study and virulence analysis for HAdV in the urine of patients with urethritis remain unclear.

Method: Male patients with urethritis and an asymptomatic group were screened using their First void urine (FVU) for urethritis-related pathogens to identify those with HAdV DNA.

Results: The positive detection rate of HAdV DNA was significantly higher in the urethritis group than in the asymptomatic group. Of 398 patients with urethritis, HAdV was isolated in all 32 cases (23 cases in which only HAdV DNA was detected w). Of 124 control cases, one had HAdV mono-infection. The most frequently detected HAdV type was 56, followed by types 37 and 64. Regarding the relationship between symptoms and isolated HAdVs, the virus was isolated for up to 12 days after urethritis symptoms disappeared.

研究分野：感染症

キーワード：尿道炎 アデノウイルス 病原体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景 d

性感染症(STI:Sexually Transmitted Infection)は、性行為によって感染する感染症であり、性行動が多様化している現代社会において、大きな問題となっている。STI の中でも尿道炎は、特に男性患者に多くみられる疾患であり、6 - 7 割が淋菌やクラミジアによって引き起こされることがわかっている。残りの 3 割については、非クラミジア性非淋菌性尿道炎(非クラミジア性 NGU:Non-gonococcal urethritis)として知られ、PCR 法に代表される高感度遺伝子検出法の適用等により、主な原因菌として、これまで同定が困難であったウレアプラズマやマイコプラズマ等が同定されている。これらの原因菌による疾患は、難治性であり治療期間が数カ月間に及ぶ場合もあり、また慢性化した状態や、繰り返し頻繁に発症することもある。一方で、健常者と尿道炎患者との比較疫学調査ではこれらの細菌感染は尿道炎患者と健常者の間で有意な検出差は認められ無い (Bradshaw, et al., JID. 2006:193, p333-5.) との報告もある。加えて、原因菌が検出されない場合も多く、病因は不明の場合も多い(性感染症 診断・治療 ガイドライン 2011) ことから、非クラミジア性 NGU における起因微生物の同定には更なる調査研究が必要である。また新たに近年、非クラミジア性 NGU から有意にアデノウイルス (Ad:Human adenovirus) が検出され、尿道炎起因ウイルスとしての可能性が指摘されている (Bradshaw, et al., JID. 2006:193,p333-5., Hiroi, et al., Jpn J Infect Dis. 2012;65(3):273-4. )。

Ad は、咽頭等の呼吸器系感染や眼感染、腸管感染や免疫不全患者には脳炎や全身性の血液感染等、ヒトの様々な部位に対して感染症を引き起こす DNA ウイルスである。泌尿器感染としては Ad11 型による出血性膀胱炎がよく知られているが(医学ウイルス学 第 4 判。White D and Fenner F.1996) 尿道炎への関与についてはほとんどわかっていない。全国約 970 ヶ所におよぶ性感染症定点からの報告では、梅毒や性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の 4 疾患のみが報告対象であり、その他の起因微生物に関する積極的 STI サーベイランスの実施が望まれている。申請者らは咽頭結膜熱や流行性角結膜炎を中心とした Ad レファレンスセンターとして日々呼吸器感染や眼感染等に関連した Ad の分離同定や詳細な遺伝学的解析等を行っており、特徴的な流行はこれまでにない新規の組み換え Ad が関与していることや一部の Ad では持続感染が可能であり、他のウイルスや細菌の感染に伴い再活性化することも報告している。

そこで本研究では、STI の中で特に尿道炎における Ad の関与を確認するために、淋菌やクラミジア、マイコプラズマ、ウレアプラズマ、トリコモナス、ヘルペスそして Ad 等を対象とした網羅的な調査研究を行い、検出できた Ad の血清型や遺伝型について詳細に解析を行い、他の微生物との相関関係や尿道炎における感染 Ad の分子疫学的解析と病原性の解析を行いたいと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、STI 関連微生物同定を行っている先行研究を継続しつつ、検出方法を PCR 法から Real-time PCR 法へ改良し、STI への Ad 関与実態を調査する。特に我が国における尿道炎に関連する Ad の分子疫学的解析と病原性の解析を目指す。

国立感染症研究所や関連機関での倫理審査やインフォームドコンセントを踏まえた上で、年間約 200 症例の尿道炎患者を対象とした疫学的調査や健常人(尿道炎否定患者)由来の尿との検査比較を行い、Ad やその他の細菌との関連の調査を行う。また、分離された Ad に関して遺伝学的解析や、Ad 検出尿を用いた病理学的解析を行い、尿道炎における Ad 感染の有無、特に尿道上皮細胞内での Ad 増殖の同定を目指す。

以上より、尿道炎における Ad 関与割合の検討。尿道炎関連 Ad の詳細な遺伝学的解析。尿道炎関連細菌等と Ad との関連。慢性化した尿道炎や繰り返し起こる尿道炎との Ad の関わりについて明らかにでき、これらの研究結果を進展させ、尿道炎に対する Ad の病原性解析等へ進める。

### 3. 研究の方法

本研究課題遂行上で最も重要な点は、尿道炎患者や健常者から同意書を得た上で一定数の尿やうがい液の検体確保である。これまでの申請者らの先行研究から、泌尿器専門医や泌尿器医院との連携体制が確立できており、さらに国立感染症研究所の倫理審査会の承認を得て、本研究課題のための新たな検体採集に関する承認を得ている。

本研究課題において軸となるのは、良質な検体の確保である。そのためには各関係機関と綿密な調整が必要であるが、この点についてもすでに先行研究において、良質な検体保管・郵送方法を確立している。具体的には、医療機関において、検体提供の同意を得られた尿やうがい液検体を採取後直ちに冷蔵保存し、一週間以内に、国立感染症研究所へ所定の手続きを経てゆうパックにて郵送し、検体の一部を、ホルマリン固定、エノール固定、凍結保存、培養細胞(A549細胞等)への接種、DNA 抽出を完了させる。本方法では、AdDNA が検出された検体から高頻度で Ad が分離できている(データ未公表)。また、その他の検体についても、先行研究(藤本ら。ウイルス感染症--病原体検査のための検体採取 10 原則。小児科 52(4), 471-475, 2011-04。)の進んでいるウイルス保存性の高い検体採集・保存キットである UTM(COPAN)等を用いて行う。また、協力研究者として、淋菌の研究者や STI 関連の研究者、また STI 医療関係者等とさらなる

る連携を取る。

27 年度の計画：先行研究によって、すでに検体採取から郵送、遺伝子抽出、PCR 検査などの一連のスクリーニング系は構築されており、迅速に研究をスタートできる。先行研究からの改良点として、病原体検出法をより特異性の高い Real-time PCR 法を中心とした簡便なスクリーニング系を構築し、スクリーニングを行う。尿道炎起因菌や関連を指摘されている微生物を検出対象とし、具体的には淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、クラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、マイコプラズマ (*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma hominis*)、ウレアプラズマ (*Ureaplasma urealyticum*(biovar2))、腐性ブドウ球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、パラインフルエンザ菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、ヘモフィリス他 (*Haemophilus haemolyticus*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、ヘルペス (*Herpes simplex virus*)、Ad を検出対象とした遺伝子検出系をまとめ、統一した試薬組成や反応条件の下で簡便にスクリーニングを実施できるように改良する。感度検定やポジティブコントロールとして、検出プライマー配列を有する合成 DNA 配列を基にしたプラスミドベースの DNA を開発し使用する (Hanaoka, et al. *Microbiol Immunol.* 2009 May;53(5):305-8.)。ウイルス分離に用いる培養細胞には、ヒト肺線癌上皮細胞由来の A549 細胞、ヒト胎児横紋筋肉腫由来 (WHO 由来のポリオウイルス分離用) RD 細胞、アフリカモドリザル腎臓上皮細胞由来 Vero 細胞を用いる。ウイルス分離は Ad の詳細な解析には不可欠な手法である (藤本ら、. *小児科* 52(12):1923~1929, 2011)。上記、スクリーニング系の構築、検出感度検定、検体採取キットの性能検定、既存サンプルからの Ad 検出・分離を進めつつ、適時、国立感染症研究所及び協力機関における倫理審査の承認を得る。

\*Ad の検出・分離ができれば STI 関連 Ad として報告する。

平成 28 年度以降：実際の臨床検体年間約 200 症例 (尿検体) 合計 400 症例以上を目指し、疫学的解析に耐えうる倦怠数を確保する。特に、非クラミジア性非淋菌性尿道炎や非クラミジア性子宮頸部炎患者に着目し、集中的に Ad 同定、分離を目指す。申請者らの先行研究では 244 例の NGU 患者から 14 例 Ad が検出されており (データ未公表) また、オーストラリアの報告では約 600 症例の NGU 患者から 2%にあたる 12 症例で Ad が同定されている (Tabrizi, et al. *Sex Health.* 2007Mar;4(1):41-4.)。本調査研究においても同様の検出効率、もしくは最適化されたウイルス検出・分離法 (Enomoto, et al., *Jpn J Infect Dis.* 2010 Sep;63(5):338-41.) を用いることからそれ以上の検出が期待できる。分離できた Ad についての詳細な遺伝子解析を行い、フルゲノム解析等を行い、既存の遺伝型と比較する。以上より、STI 患者から分離・同定された Ad の血清型や遺伝型について詳細に解析を行い、他の微生物との相関関係や STI における感染 Ad の分子疫学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

2015 年から 2018 年度における本研究において、およそ 800 症例の尿道炎患者の全初尿や一部うがい液や眼脂等を採取し、尿道炎関連微生物のスクリーニングを実施した。詳細な患者情報と組み合わせた病原体検出結果を解析し報告した (5-3.5.7.8)。また、アデノウイルス性尿道炎の迅速診断法の検討もを行い、およそ 5 分で高感度で尿中のアデノウイルスを検出できる系を開発した (5-2.6)。アデノウイルス性尿道炎の症状に着目した検討では、新たに尿道炎症状のない対象群を設定し、統計学的に優位にアデノウイルス性尿道炎が存在していることを明らかにし、また、尿道炎症状消失後も、1 週間以上尿中に大量の感染可能なアデノウイルスを排出し続けることを明らかにした (5-1.4.7)。尿道炎に関連するアデノウイルスは主に流行性角結膜炎と関連するアデノウイルスと一致していたが、一部我が国での眼での流行状況と尿道炎関連アデノウイルスの検出状況が異なることから、さらなる研究の必要性が認められた。

本研究の遂行によって我が国においてもアデノウイルス性尿道炎が存在することや、症状消失後も大量の感染可能なウイルス排出が明らかになったことによって、アデノウイルス感染環の一端も明らかとなった。

本研究等によって得られたアデノウイルス性尿道炎を含む、淋菌性、クラミジア性尿道炎患者の情報等をまとめ、IASR Vol. 38 p.145-146: 2017 年 7 月号に報告した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1: Hanaoka N, Ito S, Konagaya M, Nojiri N, Yasuda M, Fujimoto T, Deguchi T. Infectious human adenoviruses are shed in urine even after disappearance of urethral symptoms. *PLoS One.* 2019 Mar 6;14(3):e0212434.

2: Fujimoto T, Hanaoka N, Konagaya M, Kobayashi M, Nakagawa H, Hatano H, Tsukahara-Kawamura T, Uchio E, Kaneko H. Evaluation of a silver-amplified immunochromatography kit for adenoviral conjunctivitis. *J Med Virol.* 2019 Jun;91(6):1030-1035.

3: Deguchi T, Ito S, Hatazaki K, Horie K, Yasuda M, Nakane K, Mizutani K, Tsuchiya T, Yokoi S, Hanaoka N, Shimuta K, Ohnishi M, Muratani T, Nakano M. Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae strains isolated from the urethra of men with acute urethritis and/or epididymitis. J Infect Chemother. 2017 Nov;23(11):804-807.

4: Hanaoka N, Konagaya M, Fujimoto T. [Laboratory Diagnosis of Human Adenovirus for Surveillance in Japan in 2014]. Kansenshogaku Zasshi. 2016 Jul;90(4):507-11. Japanese.

5: Ito S, Hanaoka N, Shimuta K, Seike K, Tsuchiya T, Yasuda M, Yokoi S, Nakano M, Ohnishi M, Deguchi T. Male non-gonococcal urethritis: From microbiological etiologies to demographic and clinical features. Int J Urol. 2016 Apr;23(4):325-31.

6: アデノウイルス尿道炎の診断におけるイムノクロマト法を用いた迅速診断キットの有用性の検討. 花岡 希, 伊藤 晋, 小長谷 昌未, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会誌(0917-0324)29 巻 1 号 Page77-82(2018.09)

7: 郵送検査残渣を用いた尿道炎起因微生物の探索. 花岡 希, 萬田 和志, 草刈 栄治, 伊藤 晋, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会誌(0917-0324)27 巻 1 号 Page69-73(2016.07)

8: 単純ヘルペスウイルス 1 型が原因と考えられ症状が遷延した後淋菌性尿道炎の 1 例. 伊藤 晋, 花岡 希, 山田 壮一, 安田 満, 出口 隆. 泌尿器科(0914-6180)29 巻 9 号 13.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 尿道炎原因微生物の診断に関する検討 迅速免疫クロマトキットを用いたヒトアデノウイルスおよび単純ヘルペスウイルスの検出. 伊藤 晋(あいクリニック), 花岡 希, 伊藤 貴子, 安田 満, 出口 隆. 日本性感染症学会. 2018.
2. 尿道炎原因微生物の診断に関する検討 原因微生物と潜伏期間. 伊藤 晋(あいクリニック), 伊藤 貴子, 花岡 希, 安田 満, 出口 隆. 日本性感染症学会. 2018.
3. 尿道炎原因微生物の診断に関する検討 原因微生物と排尿痛の程度. 伊藤 晋(あいクリニック), 伊藤 貴子, 花岡 希, 安田 満, 出口 隆. 日本性感染症学会. 2018.
4. 尿道分泌物よりアデノウイルス D 種 64 型が検出できた尿道炎. 尾上 泰彦(プライベートケアクリニック東京), 花岡 希, 小長谷 昌未, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会. 2017.
5. 尿道炎に関連するアデノウイルスの検出方法の検討 迅速診断キットの有用性について. 花岡 希, 伊藤 晋, 小長谷 昌未, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会. 2017.
6. Human mastadenovirus における尿道炎発症に関わるサイトの探索. 飯田 雅, 花岡 希, 藤本 嗣人, 伊藤 晋, 出口 隆, 安田 満, 小柳 香奈子, 渡邊 日出海. 日本性感染症学会. 2017.
7. 単純ヘルペスウイルスが原因と考えられ症状が遷延した後淋菌性尿道炎の 2 例. 伊藤 晋, 伊藤 貴子, 花岡 希, 山田 壮一, 安田 満, 出口 隆. 日本性感染症学会. 2017.
8. ヒトアデノウイルス陽性男子尿道炎の臨床的特徴. 伊藤 晋, 安田 満, 花岡 希, 高梨 真樹, 出口 隆. 日本泌尿器科学会総会. 2016.
9. Adenovirus Infection as STI. Nozomu Hanaoka. 19th IUSTI Asia-Pacific Conference. 2016
10. アデノウイルス性尿道炎患者変遷と市中アデノウイルス流行状況との関連性. 花岡 希, 伊藤 晋, 安田 満, 高梨 真樹, 出口 隆, 山岸 拓也, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会. 2015.
11. ヒトアデノウイルス陽性男子尿道炎の臨床的特徴. 伊藤 晋, 花岡 希, 安田 満, 高梨 真樹, 伊藤 貴子, 出口 隆. 日本性感染症学会. 2015.
12. 郵送検査残渣を用いた尿道炎起因微生物の探索. 花岡 希(国立感染症研究所感染症疫学センター), 萬田 和志, 草刈 栄治, 藤本 嗣人. 日本性感染症学会. 2015.

13. うがい液淋菌検査における APTIMA Combo2 と COBAS4800 不一致例の増加. 伊藤 晋, 安田 満, 高橋 聡, 花岡 希, 伊藤 貴子, 出口 隆. 日本性感染症学会.2015.
14. マイコプラズマ、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、膣トリコモナスを含む尿道炎起炎微生物の検討.伊藤 晋, 安田 満, 高梨 真樹, 花岡 希, 前田 真一, 出口 隆.日本泌尿器科学会総会. 2015.

〔図書〕(計 1 件)

【腎と透析ベッドサイド検査事典】(第10章)感染マーカー、感染症検査 アデノウイルス腎と透析(0385-2156)84 巻増刊 Page287-289(2018.05)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

2018 年 11 月 日本性感染症学会 2017 年度学術奨励賞

ホームページ等

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/aden-pfc-m/2110-idsc/4th/4325-adenovirus-page.html>

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-vol38/7370-idx449.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤晋

ローマ字氏名：Ito shin

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。