

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09118

研究課題名(和文) 新型の出現に対応したアデノウイルス検出法の開発

研究課題名(英文) Research on detection of novel adenoviruses by genetic methods

研究代表者

廣井 聡 (Hiroi, Satoshi)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：40455548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アデノウイルスペンタノンベース遺伝子領域を用いたリアルタイムPCR法を構築し、新型を含む各型が高感度に検出できることを確認した。また、ヘキソン遺伝子loop1領域を用いたPCR法を作製し、分離株から各型が型別できることを確認した。これらの方法を臨床検体で検討した結果、新型の85型も検出できることが確認された。アデノウイルス性尿道炎の検体からは、最長で約1ヶ月間ウイルス遺伝子が検出可能であることを明らかにした。分離が困難であったり時間がかかったりする種や型で、新たに分離可能な細胞株の検索を行った結果、41型はHEK293細胞でA549細胞より非常に効率よく増殖することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アデノウイルスは感染症サーベイランスにおいて検出数が多い病原体である。近年、新型アデノウイルスが相次いで報告されているが、その検出法や型別法は統一されていない。本研究では、新型を含む各型のアデノウイルスを高感度に検出できるリアルタイムPCR法およびアデノウイルスの分離株の型別に有用なPCR法を構築した。アデノウイルスは様々な疾患の原因となり、肺炎を引き起こしやすい型も存在することから、アデノウイルス感染症の同定や他の感染症との鑑別、そしてアデノウイルス感染症の流行状況の把握に応用できる本研究は、ウイルス学的だけでなく公衆衛生上も有意義である。

研究成果の概要(英文)：A PCR method was developed for type classification of HAdVs, and a SYBR Green I-based real-time PCR assay was developed to sensitively detect novel and original types of HAdV. The type of HAdV that cause urethritis overlaps with that causing the respiratory and conjunctival infections, and recently identified novel HAdV-85 was detected from urethritis case by using the methods. Follow-up examination of the urethritis cases demonstrated that viral DNA could be detected from urine samples 1 month after the first sampling. The real-time PCR assay was also useful for the detection of enteric adenovirus such as HAdV-41. In combination with virus isolation using 293 cells in which HAdV-41 proliferates efficiently, a higher probability of detecting the virus in a clinical sample is expected.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：アデノウイルス サーベイランス

### 1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスは、2008年以降相次いで新型が報告され、2019年の時点で100以上の型が登録されている。各型はA-G種のいずれかに分類され、種および型は症状との相関が認められる。新型アデノウイルスの出現によって、分離株を用いた従来の抗血清による型別法は新型を正確に型別出来ないことから、現状ではアデノウイルス遺伝子の塩基配列を解析することによってのみ正確な型別が可能である。新型の検出は国内でも複数の報告があり、公衆衛生上も新型アデノウイルスを迅速かつ正確に検出、型別することが重要である。

### 2. 研究の目的

病原体サーベイランスにおいて、アデノウイルスは比較的検出数が多い病原体であるが、検出方法はインフルエンザウイルスなどと比べると統一されていない。本研究では、新型アデノウイルスにも対応可能な検出法および型別法を検討し、実際のサーベイランスにも応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

国内で一般的に検出されるアデノウイルス各型の塩基配列を解析して、PCR法による増幅産物の塩基配列から種や型が判別可能となるようなプライマーを設計し、新型を含むアデノウイルスの分離株を用いてその有用性を検討した。さらに、すべての型のアデノウイルスを高感度に検出できるリアルタイムPCR法の確立を目指し、検体および分離株で使用可能か検証を行った。作製したこれらの方法を、実際のサーベイランス検体を用いて検出や型別を行い、その有用性を検討した。また、ウイルス株の分離に時間を要するアデノウイルスについて、より分離効率が良い細胞株の検索を行った。

### 4. 研究成果

1) アデノウイルス A-F 種の塩基配列を基に、ヘキソン遺伝子の複数領域のプライマーを設計し検討した結果、loop1 領域約 600bp が増幅可能なプライマーの組み合わせ (forward: 5'-CCCAGYTTYAARCCHTAYTC-3', reverse: 5'-CCAATGTARTTDGGYCTGTTDGG-3') で検討に用いたすべてのアデノウイルス (1-8 型、11 型、19 型 (64 型)、31 型、37 型、41 型、53 型、54 型、56 型) が増幅可能で、近年国内で一般的に検出されている各型が判別可能であることが確認された。この領域は、アデノウイルスの抗原性に関わる可変領域を含み、型および種によって増幅サイズが異なっている (図 1)。感度の問題から検体への使用には限界があるが、分離株の型別には有用である。

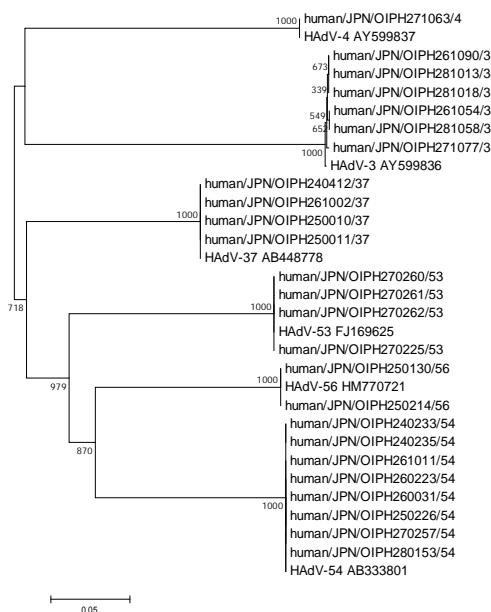


図 2、ヘキソン loop1 領域の分子疫学解析

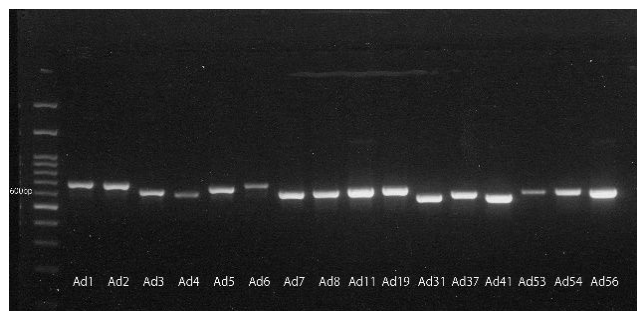


図 1、作製したプライマーによるウイルス検出結果

そこで、この方法を用いて、咽頭結膜熱および結膜炎患者の結膜ぬぐい検体から分離されたアデノウイルス株の分子疫学解析を行ったところ、咽頭結膜熱からは 3 型、4 型、54 型が、結膜炎からは 37 型、53 型、54 型、56 型が検出された。53 型、54 型、56 型の塩基配列は同型間で完全に一致した。3 型では、参照株として用いた HAdV-3 NHRC 1276 strain (AY599836) と比較して、6 株中 1 株に D186N 変異、全ての株で T254I 変異、そして 6 株中 2 株で E255Q 変異が認められ、抗原性が異なるウイルスが同時に市中に存在し、地域流行を引き起こしている事が明らかとなった。

2) 各型のアデノウイルス遺伝子から相同性が高い領域を選んでインターカレーター法によるリアルタイム PCR の条件検討を行い、アデノウイルス検出系の構築を試みた。その結果、ペントンベース遺伝子領域の 90 塩基を増幅するプライマー (forward: 5'-AGTGAAAACGKCCYGC YCTCACAGATCAC-3', reverse: 5'-GGCGTCAGTRAYGGTACDCGYTTRACT-3') を用いることにより、10 TCID<sub>50</sub>/mL の各型の臨床分離株 (1-8 型、11 型、31 型、37 型、41 型、53 型、54 型、56 型、64 型、82 型) から抽出した DNA を問題なく検出できることが確認された。

その検出感度を、10<sup>4</sup> から 10<sup>0</sup> copies/μL に 10 倍階段希釈したアデノウイルス 1 型の DNA コントロールを用いて解析したところ、10<sup>4</sup> から 10<sup>1</sup> copies/μL まで triplicate で検出でき、10<sup>0</sup> copies/μL も 3 分の 2 で検出された (図 3)。また、ウイルス分離との感度比較を行ったところ、分離陽性であった 20 検体から、検体種 (咽頭ぬぐい液、鼻汁、結膜ぬぐい液、尿、便) に関わらずアデノウイルスが検出可能であった。また、分離陰性であった 10 検体のうち 8 検体はリアルタイム PCR 法でも陰性であったが、2 検体から低コピーのウイルスを検出できたことから、ウイルス分離と比べても検出感度が高い結果となった。

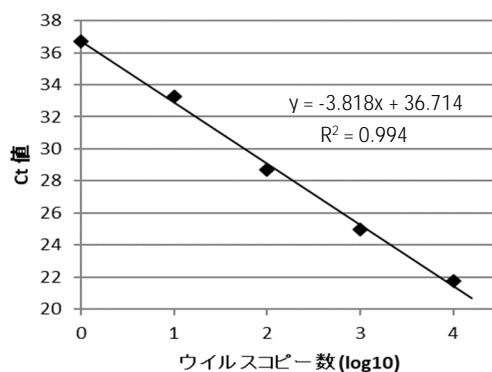


図 3、DNA コントロールを用いた標

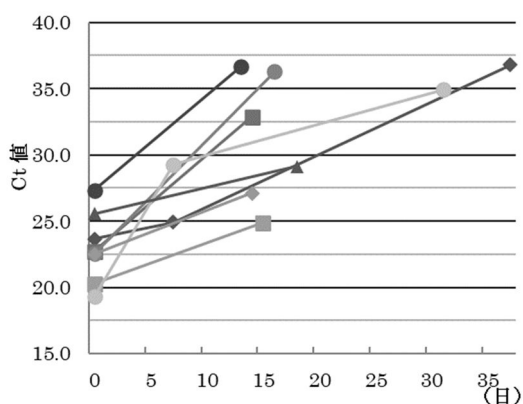


図 4、ウイルス量の経時的変化

次に、臨床検体からのアデノウイルス検出に応用するために、アデノウイルス性尿道炎となった患者の尿から、ウイルス検出および経時的なウイルス量の変化を調べた。アデノウイルスが検出された 19 例のうち 1 例は、2017 年に結膜炎の原因ウイルスとして新たに同定された 85 型で、本リアルタイム PCR 法で検出できることが確認された。また、19 例中 11 例で尿中に排出されるウイルス量を経時的に調べた結果 (図 4) 時間の経過とともに減少し、最長で初診後約 1 ヶ月間は検出可能であることが明らかとなった。ただし、Ct 値が 34.9 以上 (3 copies/μL 以下) の検体ではウイルス分離が陰性であったことから、感染性は低いと考えられる。

3) 当所では様々な型のアデノウイルスを保有しているが、E 種 41 型や D 種 54 型など一部の型や種のアデノウイルスは分離が困難であったり時間がかかったりすることから、新たにサーベイランスで分離に利用可能な細胞株の検索を 41 型および 54 型のアデノウイルス株で検討した。用いた細胞株は MA104、U251、HEp2、HCT116、HEK293 で、A549 細胞と細胞変性効果 (CPE) を比較した。54 型については A549 細胞より強く CPE が出現する細胞は認められなかった。41 型についてはこれまでも分離や解析に用いられている HEK293 細胞でのみ A549 細胞より CPE が強く認められた。また、HEK293 細胞において、41 型の感染により発現量

が変化する細胞接着分子および裏打ち分子を PCR アレイにより検索したが、明らかに変化する分子は見いだせなかった。ウイルスの増殖性を検討するために、HEK293 細胞および A549 細胞に 10 TCID<sub>50</sub> の 41 型株を感染させ、48、96 時間後のウイルスコピー数を測定した。その結果、48 時間までは両細胞共に同程度の増殖性を示したが、96 時間後に HEK293 細胞でさらにウイルス量が増加した (図 5)。従って、サーベイランスにおいて 41 型の感染が疑われる便検体には、A549 より HEK293 細胞を用いる方が効率よく分離できると考えられる。

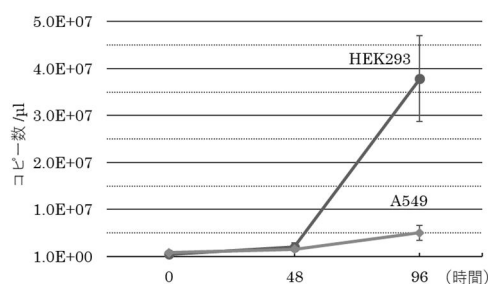


図 5、ウイルス増殖性の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Satoshi Hiroi, Takuya Kawahata, Keiichi Furubayashi	4. 巻 69
2. 論文標題 First isolation of human adenovirus type 85 by molecular analysis of adenoviruses in cases of urethritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 265-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1099/jmm.0.001149">https://doi.org/10.1099/jmm.0.001149</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Hiroi, Takuya Kawahata, Keiichi Furubayashi
2. 発表標題 Genetic analysis of human adenoviruses associated with urethritis
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考