

平成 25 年度・衛生研究所研究費事業報告
アデノウイルス流行株の型別に関する研究
 (計画年度：平成 25 年度)

研究代表者

ウイルス担当 内田和江

共同研究者

ウイルス担当 鈴木典子 小川泰卓 棚倉雄一郎 富岡恭子 丹貴恵子 篠原美千代
 副所長兼感染症室長 岸本剛

はじめに

アデノウイルス (AD) は咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、肺炎、胃腸炎等、感染症発生动向調査の対象疾患を含む様々な感染症の原因となるウイルスである。現在AからGの種に分類され、69以上の型が知られており、流行株の型等、性状を明らかにすることは、疾患の経過予測や疫学的解析上重要である。しかし近年、新たな型や組換え体の出現により、型別困難なウイルス株の出現例が全国の感染症発生动向調査実施研究機関から報告されている。そこで、当所で検出され、中和試験や限定された遺伝子領域の塩基配列情報では型別が困難だったアデノウイルス株について、抗原決定に係る遺伝子であるヘキソン、ペントン、ファイバーについて、より広い領域の塩基配列を調査し、精度の高い型別法を検討した。

材料および方法

1 検体およびウイルス株

2005～2011年に感染症発生动向調査として採取され、型別不能のD種アデノウイルスが検出された臨床検体からブランククロニングで得られたウイルス (クローン株) 8株、および2010～2012年に当所で培養細胞により分離されたD種アデノウイルス株 (AD37型2株、AD53型1株、AD56型2株) 5株、計13株を遺伝子解析に供した。

2 塩基配列の解析

アデノウイルスのヘキソン (約 2800base)、ペントン (約 1500base)、ファイバー (約 1080base) 遺伝子全長の増幅 (PCR) 及びシーケンス用プライマーは、現在までに登録されたD種アデノウイルスの複数の型の塩基配列のアライメントを確認し、より相同性の高い部分に設定した。(1)の13株についてこのプライマーを用いて遺伝子を増幅し、塩基配列を解析した。得られた配列と相同性のある配列をDDBJのプログラム、BLAST

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>) を使用し

検索した。99～100%の塩基配列の相同性がある株が複数検出され、それらが同一の型のアデノウイルスである場合に、その型を検体ウイルス株の型とした。また、各遺伝子の系統樹をNJ法により作成した。

結果及び考察

設定したプライマーによるPCRと塩基配列解析およびBLASTによる検索の結果、クローン株8検体は、5株がヘキソン、ペントン、ファイバー遺伝子ともにD種のアデノウイルス54型と100%、3株が53型と100-99%の相同性を示したことから、当該の型と決定した。同様に細胞分離株5株を解析した結果、2株がAD37型、1株がAD53型、2株がAD56型に型別され、検体採取時の検査結果と一致した。これら13株から得た塩基配列にデータベース上の既存の株の配列を併せて作成した系統樹では、同一の型の株は全て、ヘキソン、ペントン、ファイバーの各遺伝子とも1つのクラスターに分類された。一方、ペントン遺伝子では、37型と53型、9型と56型が、ファイバー遺伝子では8型と53型、9型と56型がそれぞれ1つのクラスターに分類され、塩基配列でもきわめて高い相同性のあるものであった。

以上の結果から、本研究で設定したプライマーにより、D種アデノウイルスのうち、37、53、54、56型については、遺伝子の増幅と塩基配列解析による型決定が効率よく実施できることが判明した。また、同じ型に属する株間であれば、99-100%の高い相同性があること、型の異なる株でも、同じ型どうしを比較した場合と同等の塩基配列の相同性を示す遺伝子領域があることが示された。今後、アデノウイルスの型別にあたり、解析領域の検討に有用な知見になると考えられる。