

学位論文題名

Molecular epidemiologic study of the relationship
between genomic change of adenovirus and
epidemics of adenoviral keratoconjunctivitis

(アデノウイルス角結膜炎の流行と遺伝子変異との
関連性に関する分子疫学的研究)

学位論文内容の要旨

【背景】

ヒトアデノウイルス (HAdV) は現在 51 種の血清型が同定されており、その生物学的特徴や免疫原性、遺伝子の相同性などから HAdV-A から HAdV-F の 6 つの亜属に分類されている。亜属及び血清型により引き起こされる疾患には特徴があり、その程度も様々である。いくつかの血清型では研究が非常に活発に行われており、ウイルス学の分野に多大な功績を残している。眼科領域で最も多いものは流行性角結膜炎であり、我が国では年間 60～100 万人の患者が発生している。原因血清型は HAdV-3 (B 亜属)、-4 (E 亜属)、及び-8、-19、-37 の D 亜属が中心であり、その中でも D 亜属の HAdV は重篤な角結膜炎を引き起こすことが知られている。しかしながら HAdV についての重要な発見、研究は主として A、C 亜属について行われたものであり、眼科でもっとも重要な D 亜属、E 亜属などについては未だ不明な点が多い。

分子生物学的手法の発達に伴い、DNA レベルでウイルスの差異について検討されるようになると、同一血清型の間でも DNA に違いがあることがわかり、遺伝子型の概念が定着した。遺伝子型の違いによって、例えば HAdV-19 や-4 などのようにその病原性や流行性に大きな変化が生じることがわかり、HAdV の流行と遺伝子型の変異との間には密接な関係があることが示唆されている。

本論文では眼疾患に関連した HAdV の分子疫学研究として、特に HAdV-37 と-4 について札幌市で分離された株を用いて調査した。

【対象と方法】

札幌市で過去流行性結膜炎患者から分離された HAdV-4、-37 それぞれ 36 株、51 株を対象とした。HAdV-4 について、28 株は 1984 年から 2001 年までの間に市中感染より分離されたもので、残り 8 株は 2001 年に流行性結膜炎の院内感染例より分離されたものである。各ウイルスを A549 細胞に接種し、80% 以上の細胞変性効果を確認した後細胞を回収、感染細胞より Shinagawa らの方法によってウイルス DNA を抽出した。

1. DNA restriction

回収されたウイルス DNA を、HAdV-4 については Bam HI, Eco RI, Sma I, Xho I の 4 種の制限酵素で、HAdV-37 については Bam HI, Bgl I, Bgl II, Eco RI, Hind III, Sac I, Sma

I, Xho I の 8 種の制限酵素で切断、各株の切断パターンを標準株及び既知の変異株と比較、検討した。

2. PCR/塩基配列解析/系統解析

アデノウイルス DNA の構造タンパクをコードする遺伝子のうちヘキソン領域の 3'末端 956bp 及びファイバー領域の全長を増幅するようにプライマーを選択し、94 度 1 分-50 度 1 分-72 度 2 分、36 サイクルの条件で PCR 反応を行った。得られた PCR 産物に対し両端の PCR プライマーの他、ヘキソンで 2 本、ファイバーでは 3 本の各血清型特異的な内部プライマーを作成し、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を用いシーケンス反応を行った。その後 373A DNA auto sequencer を用い各 PCR 産物の塩基配列を同定した。決定された塩基配列は他の血清型の標準株(p)の同領域の配列と比較、アラメント後、系統樹を作成し、各配列の遺伝子間距離などを調査した

【結果】

1. HAdV-4

全ゲノムの DNA 切断パターンは 1984 年～1998 年の株と、2001 年の株の 2 つに大別された。前者の切断パターンは過去に報告のある HAdV-4 変異株、HAdV-4a と一致し、HAdV-4a と同定された。後者は Eco RI, Xho I の 2 種の切断パターンは HAdV-4a と一致したが、Bam HI, Sma I の 2 種の切断パターンは過去に報告のあるどの HAdV-4 変異株とも一致せず、新たな遺伝子型 HAdV-4c と同定された。ヘキソン末端部の塩基配列パターンは調査した 36 株すべてで一致し、HAdV-4p と 96.1% の相同性を持っていた。系統解析においても bootstrap 値 100% で HAdV-4p と単一のクラスターを形成していた。ファイバー領域の配列は 5 種に分類され、ヘキソンと同様 bootstrap 100% で HAdV-4 と単一のクラスターを形成した。1984 年から 1998 年までの HAdV-4a では 4 種のファイバー遺伝子が同定され、この 4 種は一つのクラスターを形成していたが、2001 年に分離された株はこの 4 種とは異なった配列で、HAdV-4a とは別の枝に位置していた。

2. HAdV-37

全ゲノム切断での遺伝子型は標準株と同じパターンである HAdV-37/D1 を含め 8 種の遺伝子型が検出された。3 種はすでに過去に報告のある遺伝子型であったが、残り 5 種は現在まで報告のない新たな遺伝子型であった。各年代において中心となる遺伝子型には差があり、1990 年から 93 年までは D1, D3 が、1994 年から 1997 年までは D6, D8 が、1999 年以降は D10, D11 が中心となっていた。ヘキシソンの塩基配列では 4 種の配列が検出され、標準株と比べ最大 5 カ所の点突然変異が生じていた。ファイバーも同様に 4 種の配列が存在し 3 カ所に変異がみられた。各遺伝子型の塩基配列は 1 例を除き 1 種のヘキソン/ファイバーに対応しており、両者には密接な関連がみられた。また、遺伝子型の推移と札幌市における HAdV-37 の流行の間にも関連性があり、特にファイバーの塩基配列パターンは各流行により異なっていた。

【考案】

HAdV-4 の札幌市における流行は 1993 年以降減少している。Itakura らは近年札幌市で分離された HAdV-4 を調査し、調査した株の遺伝子型はすべて HAdV-4a であったと報告しており、変異がみられないことが減少傾向の 1 つの原因ではないかと述べている。また、アデノウイルス結膜炎の院内感染は日本各地で発生しているが、そのほとんどは D 亜属によるもので HAdV-4 による院内感染例はまれである。今回 HAdV-4 による院内感染が発生した背景には新たな遺伝子型 HAdV-4c の発生が一つの要因になっているのではと考えら

れた。また、この遺伝子型は院内感染のみならず 2001 年の市中感染株でも検出されており、今後の分離動向には注意を払う必要があると考えられた。HAdV-37 は過去十数種の変異株が同定されているが、Adrian らによれば互いに DNA の相同性は高く、安定した血清型であるとされている。今回同定された 8 種の遺伝子型でも 95% 以上の切断断片が一致しており、安定性が確認された。しかしながらヘキソン/ファイバーの塩基配列をみると計 8 カ所に変異がありその変異は遺伝子型の変化と一致していた。HAdV-37 は札幌市で過去 1990~91 年、1994~96 年、及び 1999 年以降に多発をみている。中心となる遺伝子型の推移はこの流行によく一致し、特にファイバー遺伝子は 1 流行ごとに異なっていた。ファイバーはウイルスが感染細胞に接着、侵入するために重要な部位であり、今回みられた HAdV-4,-37 のファイバーの変化が HAdV の流行性に何らかの影響を及ぼしていることが考えられ、今後詳細なファイバー遺伝子の調査が必要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学位論文題名

Molecular epidemiologic study of the relationship between genomic change of adenovirus and epidemics of adenoviral keratoconjunctivitis

(アデノウイルス角結膜炎の流行と遺伝子変異との
関連性に関する分子疫学的研究)

ヒトアデノウイルス (HAdV) は流行性結膜炎の起因ウイルスとして知られており、主として HAdV-3 (B 亜属)、-4 (E 亜属)、及び-8、-19、-37 の D 亜属によって引き起こされる。HAdV は分子生物学の発達においてよく研究が進められたウイルスであるが、眼科でもっとも重要な D 亜属、E 亜属などについては未だ不明な点が多い。同一血清型の間でもその DNA には変異が起き、時として HAdV-19 や-4 などのように病原性や流行性に大きな変化が生じることがわかっている。本研究では眼疾患に関連した HAdV の分子疫学研究として、特に近年流行様式に変化のみられる HAdV-37 と-4 について札幌市で分離された株を用いて調査した。

HAdV-4 は 2001 年の院内感染株を含む 1984 年から 2001 年までに分離された株について、HAdV-37 は 1990 年から 2001 年までに分離された株について、その遺伝子型、及びヘキソン、ファイバーの塩基配列を調査し、過去に報告されている株と比較検討した。その結果、HAdV-4 について、全ゲノムの DNA 切断パターンは 1984 年～1998 年の株と、2001 年の株の 2 つに大別され、前者の切断パターンは過去に報告のある HAdV-4a と一致した。後者は Eco RI, Xho I の 2 種の切断パターンは HAdV-4a と一致したが、Bam HI, Sma I の 2 種の切断パターンは過去に報告のある HAdV-4 変異株のどれとも一致せず、新たな遺伝子型 HAdV-4c と同定された。ヘキソン末端部の塩基配列は調査した 36 株すべてで一致し、4 型標準株と単一のクラスターを形成していた。ファイバー領域の配列は 5 種に分類され、ヘキソンと同様 HAdV-4 標準株と単一のクラスターを形成していた。1984 年から 1998 年までの HAdV-4a では 4 種のファイバー遺伝子が同定され、この 4 種は一つのクラスターを形成していたが、2001 年に分離された株はこの 4 種とは別系統の枝に位置していた。このことから 2001 年院内感染を引き起こした株は新たな系統の fiber 遺伝子を持つ新遺伝子型によって引き起こされたことが明らかとなった。次いで HAdV-37 では、

12年間で8種の遺伝子型が検出された。各年代において中心となる遺伝子型には差があり、1990年から93年まではD1, D3が、1994年から1997年まではD6, D8が、1999年以降はD10, D11が中心となっていた。ヘキソンの塩基配列では4種の配列が検出され、標準株と比べ最大5カ所の点突然変異が生じていた。ファイバーも同様に4種の配列が存在し3カ所に変異がみられた。各遺伝子型の塩基配列は1例を除き1種のヘキソン/ファイバーに対応しており、両者には密接な関連がみられた。また、遺伝子型の推移と札幌市におけるHAdV-37の流行の間にも関連性があり、特にファイバーの塩基配列パターンは各流行により異なっていた。

アデノウイルス結膜炎の院内感染は全国で発生しているがHAdV-4による院内感染例はまれである。今回HAdV-4による院内感染が発生した背景には新たな遺伝子型HAdV-4cの発生が一つの要因になっているのではと考えられ、新たなファイバー遺伝子により宿主の免疫応答などに何らかの影響を与えたのではないかと推察された。HAdV-37では8種の遺伝子型が検出されたが、3回の流行はすべて別の遺伝子型によって起こり、特にファイバー遺伝子は1流行ごとに異なっていた。ファイバーはウイルスが感染細胞に接着、侵入するために重要な部位であり、今回みられたHAdV-4,-37のファイバーの変化がHAdVの流行性に影響を及ぼしていることが考えられ、今後詳細なファイバー遺伝子の調査が必要であると考えられた。

発表に際し、副査小野江教授より特にD亜属のレセプターといわれるシアル酸について、HAdVの命名法、宿主における免疫反応性などについて質問があった。次いで副査長嶋教授より流行とDNA変異との関連、培養過程におけるウイルス変異、fiber遺伝子の構造、遺伝子変異の検出と流行予測の可能性について質問があった。最後に主査大野教授より世界的なアデノウイルスの疫学や眼科領域にとどまらないアデノウイルスの基本的な知見と今後の展望について質問があり、申請者は過去の報告や自身のデータをもとに概ね妥当に解答した。

これらの論文はJournal of Clinical Microbiology誌で高く評価され、今後アデノウイルスの分子疫学や感染機構の解明、遺伝子変異による流行予測などに寄与していくことが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。