

## 札幌市で分離されたアデノウイルス 19 および 37 型の 制限酵素切断によるゲノムタイプの解析

菊地正幸 布目博子 佐藤義晴 中村孝臣 藤田晃三

### 要 旨

1992年1月から1999年3月までに札幌市における感染症発生動向調査眼科5定点からの検体から分離されたアデノウイルス19型(以下Ad-19と略す)および37型について、DNAを抽出して7種類の制限酵素切断パターンによるゲノムタイプの解析を行った。供試したAd-19分離株は3種類のゲノムタイプに分類された。1994年までの分離株は過去に報告されているAd-19aと同じゲノムタイプ、1996年以降に分離された株はAd-19aと比較してEcoRIおよびSmaIの切断パターンが異なるタイプ、1997年に分離された1株はさらにXhoIの切断パターンが異なるタイプであった。Ad-37分離株についても3種類のゲノムタイプに細分された。1993年の2株はAd-37プロトタイプと同じゲノムタイプ、1993年以降に分離された株については、Ad-37プロトタイプとEcoRIの切断パターンが異なるタイプとEcoRIおよびXhoIの切断パターンが異なるタイプに分類された。

### 1. 緒言

ヒトアデノウイルスは、49の血清型が知られており、さらに各血清型はDNAのホモロジー等によりA~Fの6亜群に分類されている<sup>1)</sup>。アデノウイルス感染による臨床像は、呼吸器系疾患、眼科疾患および消化器系疾患など極めて多彩であることが知られている。日本において、眼科疾患患者から分離されるウイルスの多くはアデノウイルスであり、その主な血清型は3型(以下Ad-3と略す)、Ad-4、Ad-8、Ad-19、Ad-37である<sup>2)</sup>。

近年、制限酵素によるウイルスDNAの切断パターンは株ごとに特異的かつ安定であることから、同一血清型の分離株について比較することにより、ウイルスの感染経路や地域特異性、流行株の変化などを詳しく調べることができるようになった。アデノウイルスに関してもこの方法による研究がなされており、分離株について多くのゲノムタイプが認められている。その中でAd-19とAd-37分離株についてのゲノムタイプの解析に関する詳細な報告は他

の血清型と比較して少ない。また、札幌市における感染症発生動向調査眼科検体から分離されたアデノウイルスの血清型を分析すると(表1)、1992年から1995年まではAd-3, 4, 8, 37が主流であったが、1996年以降はAd-19の分離数が増加し、1997年には全アデノウイルス分離株の半数以上を占めていた。そこで札幌市におけるAd-19分離株について、流行株のゲノムタイプを調べるために、制限酵素切断パターンの解析を行った。また、Ad-19と同じD亜群に分類され、毎年分離されているAd-37についても同様の解析を行った結果についても報告する。

### 2. 材料と方法

#### 2-1 材料

1992年1月から1999年3月までの間に、感染症発生動向調査眼科定点である5医療機関において採取された流行性角結膜炎、急性出血性結膜炎、咽頭結膜熱の3疾病およびそれらに分類されない結膜炎患者の結膜拭い液1678検体を材料としてウイルス分離

を実施した。

#### 2-2 ウイルス分離・同定

結膜拭い液をKB, HeLaおよびRD-18S細胞に接種した。アデノウイルス様の細胞変性効果(CPE)が観察された検体の培養上清をアデノレックスドライ(糞便中アデノウイルス検出用試薬・ORION DIAGNOSTICA)に対する凝集を確認後, 中和法により血清型別を行った。血清型別には, 国立感染症研究所分与の抗血清およびデンカ生研製アデノウイルス抗血清を使用した。また, Ad-34については国立感染症研究所に依頼して同定された。

#### 2-3 ウイルスDNAの抽出

以下の方法により, 分離されたアデノウイルスを接種した感染細胞からDNAの抽出を行った。CPEの生じた細胞を回収し, PBS(-)で洗浄後, 緩衝液(10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM NaCl)に浮遊し, SDSで可溶化した後, Proteinase Kで処理した。フェノール-クロロホルム抽出を2回繰り返し, イソプロパノールでDNAを沈殿させた後, TE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)に再浮遊してウイルスDNAを得た。

#### 2-4 制限酵素処理と電気泳動

制限酵素(宝酒造)は, Hind III, EcoR I, Sac I, Xho

I, BamHI, Sma IおよびPst Iを使用し, 添付の反応用緩衝液, RNase, BSA(Sma Iについてのみ)を加えて反応させてウイルスDNAの切断を行った。

電気泳動は, TAE緩衝液(Tris-acetate-EDTA buffer)および1%アガロースゲルを用いて行い, エチジウムブロマイド染色をした後トランスイルミネーターで泳動パターンを観察した。

### 3. 結果

#### 3-1 眼科検体からのウイルス分離状況

1992年1月から1999年3月までに札幌市における眼科定点からの検体から分離されたアデノウイルスの血清型別は表1のようになっている。各血清型の総分離数を比較すると, Ad-4が最も多く, 次いでAd-19, 8, 37の順に多くなっている。年次別にみると, 1992年はAd-4が最も多く分離され, 1994年にはAd-3, 8, 37の分離数が増加した。1995年には分離されていなかったAd-19が1996年に再び分離されるようになり, 全体の35.5%(27/76)を占めていた。1997年になるとAd-19のみで71.0%(76/107)を占め, 1998年には分離数は減少したものの分離株全体の50.7%(34/67)と半数以上を占めていた。

表1 眼科検体からのアデノウイルス分離状況

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	計
Ad-3	11	3	22	7	2	3	19	67
Ad-4	127	17	3	12	5	9	11	184
Ad-7	0	0	0	7	6	4	0	17
Ad-8	33	15	20	38	7	9	2	124
Ad-11	1	2	3	0	0	0	0	6
Ad-19	1	6	6	0	27	76	34	150
Ad-37	0	8	28	55	28	4	1	124
Ad-34	0	0	0	0	0	2	0	2
Ad-NT	6	6	0	4	1	0	0	17

### 3-2 Ad-19 分離株の制限酵素切断パターン

1992 年から 1999 年 3 月までの Ad-19 分離株 150 株のうち 29 株について DNA を抽出し, 7 種類の制限酵素による切断パターンを調べたところ, 過去に報告されている Ad-19a 株<sup>3,4,5,6)</sup>を含む 3 種類のゲノムタイプに細分された。Hind III による切断では, 供試した全分離株が Ad-19 プロトタイプと同一のパターンを示した(図 1A レーン 2-4)。EcoR I による切断パターンでは, Ad-19 プロトタイプとは異なる 2 つのパターンを示した(図 1B レーン 2-4)。1992 年から 1994 年までに分離された株は Ad-37 プロトタイプと同一のパターンを示し, 1996 年以降に分離された株は異なるパターンを示した。Sma I では Ad-19, 37 のプロトタイプとは異なる 2 つのパターンに分類され, EcoR I による切断パターンと同様に, 1992 年から 1994 年に分離された株と 1996 年以降に分離された株とで違いがみられた(図 1C レーン 2-4)。Xho I では Ad-19, 37 両プロトタイプのパターンと異なっていたが, 1997 年に分離された 1 株を除いて同一のパターンを示した(図 1D レーン 2-4)。BamH I, Sac I および Pst I による切断パターンは供

試したすべての分離株について, Ad-19, 37 両プロトタイプと異なる同一のパターンを示した(図 1E, F, G レーン 2-4)。以上の結果から分類された各ゲノムタイプの年次別検出状況を表 2 に示す。

### 3-3 Ad-37 分離株の制限酵素切断パターン

1993 年から 1999 年 3 月までの Ad-37 分離株 124 株のうち 36 株について DNA を抽出して 7 種類の制限酵素で切断した結果, Ad-37 プロトタイプと同一のパターンを示すものを含めて 3 種類のゲノムタイプに細分された。Hind III, Sma I, BamH I, Sac I および Pst I による切断では供試した分離株すべてが Ad-37 プロトタイプと同一のパターンを示した(図 1A, C, E, F, G レーン 6-8)。1993 年に分離された株の 2 株は EcoR I および Xho I についてもプロトタイプと同一のパターン(Ad-37p)を示した(図 1B, D レーン 5, 6)。その他に, EcoR I の切断パターンのみが異なるタイプと EcoR I および Xho I の切断パターンが異なるタイプに分類された。以上の結果から分類された各ゲノムタイプの年次別検出状況を表 3 に示す。Ad-37p 以外の 2 種類のゲノムタイプは 1993 年以降の分離株についてみられた。

表 2 年次別 Ad-19 ゲノムタイプの検出状況

ゲノムタイプ	1992-94	1996	1997	1998	計
Ad-19a	2				2
EcoR I, Sma I で異なるタイプ		13	9	4	26
EcoR I, Sma I, Xho I で異なるタイプ			1		1

表 3 年次別 Ad-37 ゲノムタイプの検出状況

ゲノムタイプ	1993	1994	1995	1996	1997	1998	計
Ad-37p	2						2
EcoR I で異なるタイプ	2	10	6		3	1	22
EcoR I, Xho I で異なるタイプ	1		3	7	1		12

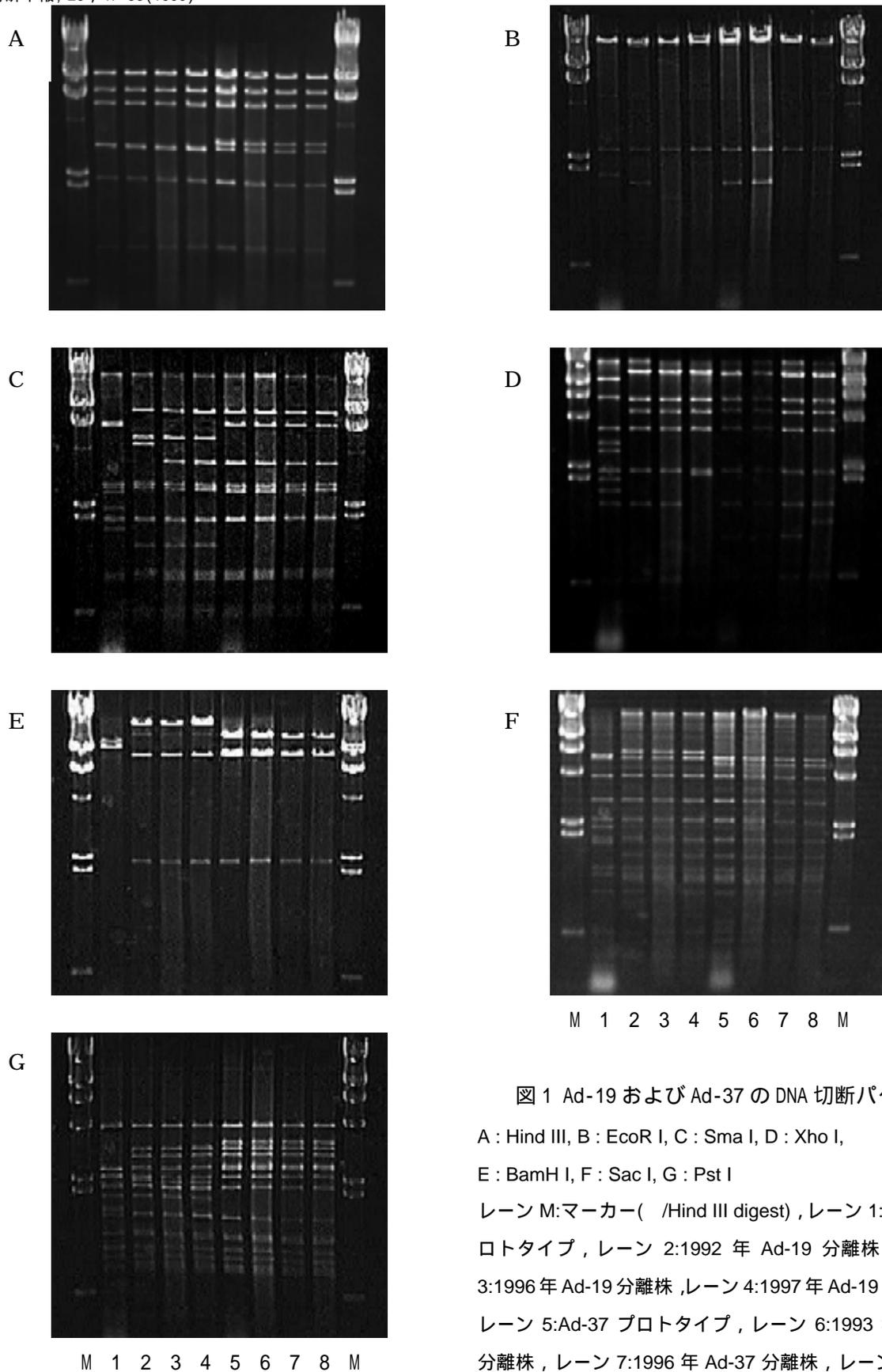


図1 Ad-19 および Ad-37 の DNA 切断パターン

A : Hind III, B : EcoR I, C : Sma I, D : Xho I,

E : BamHI, F : Sac I, G : Pst I

レーン M:マーカー( /Hind III digest), レーン 1:Ad-19 プ  
 ロトタイプ, レーン 2:1992 年 Ad-19 分離株, レーン  
 3:1996年 Ad-19 分離株, レーン 4:1997年 Ad-19 分離株,  
 レーン 5:Ad-37 プロトタイプ, レーン 6:1993 年 Ad-37  
 分離株, レーン 7:1996 年 Ad-37 分離株, レーン 8:1997  
 年 Ad-37 分離株.

#### 4. 考察

Ad-19 プロトタイプは 1955 年に分離されたが<sup>7)</sup>, その後, 1973 年に欧米で流行した流行性角結膜炎の原因ウイルスとして確認されるまで分離された報告はなかった<sup>3)</sup>. 1973 年に分離された Ad-19 のゲノムタイプはプロトタイプとは異なっており 19a 株と表現されている<sup>3,4)</sup>. さらに, 1973 年以降に分離された Ad-19 は, Ad-19a 株と同じ切断パターンを示すものであると報告されている<sup>3,4,5,6)</sup>. 1977 年から 1984 年の間に札幌で分離された Ad-19 について, Higuchi らが制限酵素切断パターンの解析を行い, 分離株すべてが Ad-19a と同じゲノムタイプであることを示した<sup>5)</sup>. 今回, 1992 年以降に札幌市において分離された Ad-19 についての同様の解析を行った結果, Ad-19 プロトタイプとは異なる 3 種類のゲノムタイプに分類された. 1992 年から 1994 年の Ad-19 分離株については, 過去に報告されている Ad-19a 株と同じ切断パターンを示すものであった. 1996 年以降に分離された Ad-19 については, 供試した分離株の大部分が, Ad-19a 株と比較して EcoR I および Sma I による切断パターンが異なるゲノムタイプであり, 1997 年に分離された 1 株については, EcoR I および Sma I に加え Xho I の切断パターンが異なるゲノムタイプであった. これらの結果から, 札幌市において 1994 年までは Ad-19a 株が主流株であり, 1996 年以降は Ad-19a 株とは異なる新しいゲノムタイプの Ad-19 が主流となっていることが示唆された. 新しいゲノムタイプが出現して流行したことによって, 1996 年以降の Ad-19 分離数が増加した可能性があると考えられる.

Ad-37 は, 1976 年に出現した比較的新しい血清型として知られている<sup>8)</sup>. Higuchi らは, 東アジア(札幌, 高雄および釜山)で分離された Ad-37 について制限酵素切断パターンの解析を行い, Ad-37 プロトタイプと同一のパターンを示すゲノムタイプと, Hind III による切断パターンが異なるサブタイプを報告している<sup>5)</sup>. Noda らは広島市で分離された

Ad-37 について同様の研究を行い, Ad-37 プロトタイプと同一のパターンを示す株(Ad-37p), EcoR I でパターンが異なる株(Ad-37a)および Sma I でパターンが異なる株(Ad-37b)を報告している<sup>6)</sup>. さらに, 太箸らは名古屋市で分離された Ad-37 について 6 種類のゲノムタイプ(Ad-37p, a, c, d, e, f)に分類した<sup>9)</sup>. 今回の結果から, 1993 年以降に札幌市において分離された Ad-37 は 3 種類のゲノムタイプに細分された. プロトタイプと同じゲノムタイプである Ad-37p, EcoR I の切断パターンが異なる Ad-37a, さらに Ad-37a と Xho I の切断パターンが異なるゲノムタイプである. この Xho I で異なるゲノムタイプは過去に報告されたゲノムタイプとは異なるタイプであった. 今回供試した分離株のうち, Ad-37p は 1993 年に分離された 2 株のみであり, それ以降の分離株にはみられなかった. Ad-37a は 1996 年を除き, また Xho I で異なるパターンを示すゲノムタイプは 1994 年を除き, 1993 年以降毎年分離されていた. これらの結果から, Ad-37 は 1993 年には 3 種類のゲノムタイプが, 1994 年以降になると Ad-37p を除く 2 種類のゲノムタイプが混在していると考えられる.

病原微生物検出情報<sup>10)</sup>によると, 全国における Ad-19 および Ad-37 の 1998 年以降の分離数に顕著な増加はみられないが, ウイルスゲノムの変異により感染力や病原性が変化する可能性が示唆されており<sup>9)</sup>, 流行状況に注意する必要があると思われる.

#### 5. 結語

1992 年から 1999 年 3 月までに札幌市において分離された Ad-19 および Ad-37 について 7 種類の制限酵素による切断パターンを比較し, 以下の結果を得た.

- (1) 1994 年までに分離された Ad-19 は, 以前から知られている Ad-19a と同じゲノムタイプであった.
- (2) 1996 年以降に分離された Ad-19 は, 1 株を除

いて, Ad-19a と EcoR I および Sma I による切断パターンが異なるゲノムタイプであった。

- (3) 1997 年の Ad-19 分離株 1 株については, 1996 年以降に分離された Ad-19 と Xho I による切断パターンが異なっていた。
- (4) 1993 年に分離された Ad-37 のうち 2 株については Ad-37 プロトタイプと同じゲノムタイプであった。
- (5) 1993 年以降の分離株については, Ad-37 プロトタイプと EcoR I の切断パターンが異なるタイプと, EcoR I および Xho I の切断パターンが異なるタイプに分類された。

## 6. 文献

- 1) Schnurr, D. and Dondeno, M.E. : Two new candidate adenovirus serotype. *Intervirology*, 36, 79-83, 1993.
- 2) Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Pattison, J.R., ed : Principles and practice of clinical virology (third edition), 287-308, John Wiley & Sons Ltd., 1995.
- 3) Wadell, G., de Jong, J.C. : Restriction endonuclease in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.*, 27, 292-296, 1980.
- 4) Kemp, M.C., Hierholzer, J.C., Cabradilla, C.P. et al : The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis : Antigenic and restriction enzyme analyses of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10-years period. *J. Infect. Dis.*, 148, 24-33, 1983.
- 5) Higuchi, M., Nakazono, N., Ishii, K. et al : Antigenic and restriction endonuclease analyses of new adenovirus types 19 and 37 causing acute conjunctivitis. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 31, 547-557, 1987.
- 6) Noda, M., Otagaki, Y., Ikeda, Y. et al : Genome types of adenovirus types 19 and 37 isolated from patients with conjunctivitis in Hiroshima City. *J. Med. Virol.*, 26, 15-22, 1998.
- 7) Bell, S.D. Jr, Rota, T.R., MacComb, D.E. : Adenoviruses isolated from Saudi Arabia. III. Six new serotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 9, 523-526, 1960.
- 8) Schaap, G.J.P., van Bijsterveld, O.P., Beekhuis, W.H. et al : A new intermediate adenovirus type causing conjunctivitis. *Arch. Ophthalmol.*, 97, 2336-2338, 1979.
- 9) 太箸全孝, 柴田伸一郎, 山中克己 : 名古屋市で分離されたアデノウイルス 37 型(Ad37)のゲノムタイプと病原性. *感染症学雑誌*, 71, 724-729, 1997.
- 10) 病原微生物検出情報(月報)20, No.9(No.235), 23, 1999.

# Genome Type Analyses of Adenovirus Types 19 and 37 Isolated in Sapporo

Masayuki Kikuchi, Hiroko Nunome, Yoshiharu Sato, Takaomi Nakamura and Kozo Fujita

Adenovirus types 19(Ad-19) and 37 isolated from patients with conjunctivitis at five ophthalmology clinics in Sapporo between January 1992 and March 1999 were analyzed by seven DNA restriction endonuclease cleavage patterns. Ad-19 isolates examined were divided into three genome types. The Ad-19 strains isolated during the period of 1992 to 1994 were the same DNA cleavage patterns as Ad-19a strains reported previously. Most of the strains isolated since 1996 showed the different cleavage patterns from Ad-19a strain with EcoR I and Sma I. One strain isolated in 1997 differed from Ad-19a with EcoR I, Sma I and Xho I. Ad-37 isolates examined were divided into three genome types. Two strains isolated in 1993 were the same cleavage patterns as Ad-37 prototype with seven restriction endonucleases used in this study. The other strains isolated since 1993 showed two distinct cleavage patterns. One differed from Ad-37 prototype with EcoR I and the other differed with EcoR I and Xho I.