

1997年に沖縄県で分離されたアデノウイルス7型の 遺伝子型と抗体保有状況について

糸数清正・大野惇・大城直雅・安里龍二
安慶田英樹*・具志一男*

Antibody and Genome Types of Adenovirus Type 7 Isolated in Okinawa Prefecture in 1997

Kiyomasa ITOKAZU, Atsushi OHNO, Naomasa OSHIRO, Ryuji ASATO,
Hideki AGEDA and Kazuo GUSHI

要旨: わが国では、アデノウイルス7型 (A d 7) の分離は1994年までは希であったが、1995年以後全国各地で重症例や集団発生からのA d 7の分離報告があいつぎ注目されている。本県でも1997年5月にはじめて急性呼吸器系疾患患者からA d 7が3例分離され、さらに、同様な患者1例から血清疫学的検査によりA d 7感染が確認された。この患者4例の症状をみると、肺炎とウイルス関連血球貪食症候群 (VAHS) が特徴的であり、A d 7によるVAHSの報告は希である。

また、今回分離された3例のA d 7分離株は、国立感染症研究所から分与された標準株のA d 7 (A d 7 p) とは若干抗原性が異なっていた。そこで、DNAの制限酵素切断法により遺伝子型別を行ったところ、野田らの報告による1995年以後全国で流行しているA d 7 cと同一株と推定された。

本県のA d 7 pに対する中和抗体陽性率は、1994年度が1.1%、1997年度が0.5%とかなり低い陽性率を示した。しかし、今回の分離株のA d 7 cに対する中和抗体陽性率は1997年度で2.8%とA d 7 pより高い陽性率を示したが、依然3%未満で低率であった。A d 7と同じB亜群のA d 3の中和抗体陽性率も1994年度が27.2%、1997年度が16.1%と1994年度に九州地域の10カ所の地研の共同研究で調査した九州地区のA d 3の平均中和抗体陽性率60.8%より、本県は半分以下の抗体保有率であった。今後、A d 7感染症の流行が懸念されるのでA d 7の動向に注目して、継続的な監視が必要であると思われる。

Key words: Adenovirus Tyep 7, Genome Tyep, Neutralizing Antibody, Okinawa

I はじめに

アデノウイルスは、呼吸系疾患や眼疾患患者および消化器疾患患者等の様々な疾患から分離され多彩な臨床症状を引き起こし、現在47の血清型が知られている¹⁻⁵⁾。その中で特に心臓、肺に基礎疾患を持つ乳幼児では重症化することがあると報告されているアデノウイルス7型 (A d 7) がある^{6) 7)}。

A d 7は、外国では一般的なウイルスではあるが、日本では希なウイルスで、「病原微生物情報」^{8) 9)} によると1980~1994年の14年間に累計で30例しか検出されていなかった。しかし、1995年を境に検出数が増加し、1995年4月~1996年12月までに30機関で274例が分離されている。また、九州地区においても1992年に北九州市で報

告されたのみであったが、1996年以後は、ほぼ全県で分離され、長崎県においては死亡例2例より分離されており¹⁰⁾ いつ本県へ侵入検出されるか懸念されていた。今回、本県においても1997年5月に小児の急性呼吸器系疾患患者の咽頭拭い液よりA d 7が3例分離された。この患者3例と抗体検査でA d 7感染症と確認された1例の計4例の患者の症例について、その概要と分離株3株の制限酵素による遺伝子型別及び本県におけるA d 7の流行についての解析を行ったので報告する。

II 材料及び方法

1. ウイルス分離

検体は、感染症サーベランス事業の病原体検索や流行予測事業の感染源調査において、県内医療機関の小児科および内科の急性呼吸器疾患患者等から採取した咽頭拭

*沖縄県立那覇病院

い液やうがい液等を用いた。

検体は、前処理として、遠心分離 (3,000rpm, 20分) 後、抗生物質を添加し濾過滅菌等の処理を行なった。

この検体をHEp-2, RD-18S, Vero, 及びHeLaの4種類の培養細胞 (一部12月からVeroに変わりCaCo2を使用) に接種しウイルス分離を試みた。培養細胞に接種後、HEp-2またはHeLaに細胞変性効果 (以下CPE) を認めたものは、ラテックス凝集法のアデノレックスドライ (第一化学試薬) を使用しアデノウイルス抗原の一次スクリーニングを行い、アデノウイルス抗原陽性の検体は、マイクロプレート法¹¹⁾ で中和試験による血清型別を行った。

血清型別試験で使用した抗血清は、市販のAd1~7型 (デンカ生研) および熊本地研より分与の11型を用いた。

2. 中和抗体価測定

血清は、Ad7が分離された患者2名と感染が疑われた患者1名のもの及び1994年度と1997年7~10月に採血された各保健所の残余血清で一部の低年齢層については、沖縄市の臨床検査センターの残余血清を使用した。

また、各年度の中和抗体価測定に用いた血清は、9区分の年齢層に分け、各年齢層の対象検体数を20件とした。

検体は、維持液で4倍希釈し、インヒビター除去のため、56℃、30分間で非働化した後、シリンジフィルター (0.45μ) で濾過滅菌した。

対象ウイルス抗原は、国立感染症研究所 (以下感染研) より分与された標準株のAd3と7型および当所で分離されたAd7 (Ad7/226/97, 沖縄) を100TCID₅₀/25μlに調整して用いた。

中和抗体価は、対象ウイルスの増殖を50%以上抑制した血清の最高希釈倍数で表した。

また、抗体価4倍以上を示したものを中和抗体陽性とした。

3. 制限酵素による遺伝子型別

DNAは、図1に示したHirt法により抽出し、制限酵素は、BstE IIを用いた。

ゲルは、Molecular Biology certified Agarose (BIO RAD) を0.5%濃度で使用した。

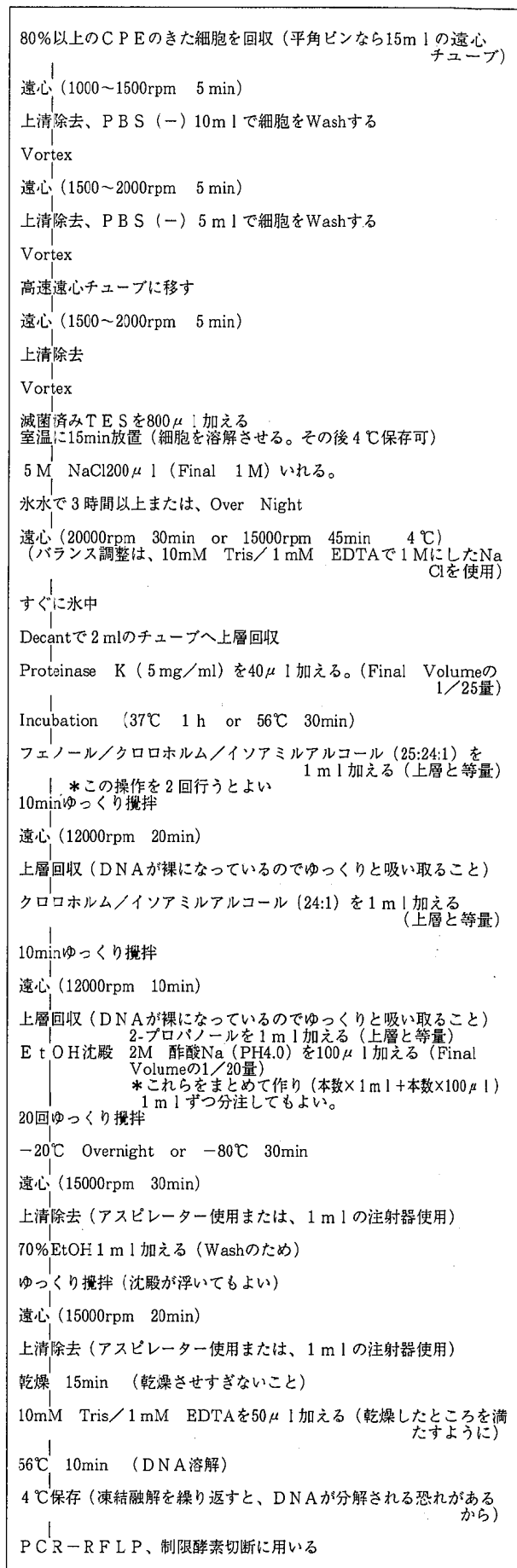


図1. Adeno Virus DNAの抽出 (Hirt法).

Ⅲ 結果

1. ウイルス分離状況

1994年度～1997年度のアデノウイルス分離株数を表1に示した。

1996年度までAd7は分離されておらず、1997年度で、はじめて5月に3株、1998年の2月に2株、計5株分離された。

表1. 沖縄県におけるアデノウイルス分離株数 (1994年度～1997年度).

型名	1994年度	1995年度	1996年度	1997年度
Ad1		3	2	4
Ad2	2	3	1	6
Ad3	6	1	1	
Ad4				
Ad5	1		1	1
Ad6		1		1
Ad7				5
Ad8		2		
Ad11			1	1
型不明		2		
計	9	12	6	18

2. 臨床症状

5月にAd7が分離された患者3名と血清診断（ベア血清）でAd7の感染が確認された患者1名の計4名の症状を調べると、3例については肺炎とウイルス関連血球貪食症候群（VAHS）、もう1例については、気管支炎と咽頭結膜熱が特徴的であった（表2）。また、患者Bは肺炎後遺症のため長期にわたり人工換気療法を行った重症例であった。

表2. アデノ7型感染者の症状.

患者	性別	年齢	発病日	発熱	せき	上気道炎	肺炎	咽頭結膜熱	VAHS	ウイル分離
A	男	4	5/23	39.8	無	有	無	有	無	有
B	女	8カ月	5/21	40.0	有	有	有	無	有	有
C	女	2	5/24	39.8	有	有	有	無	有	有
D	男	1	5/17	-	-	-	有	無	有	無

3. 中和抗体価

分離されたAd7ウイルスは、市販の抗血清で容易に中和され、3型と11型との交差反応はみられなかった。

また、患者血清の中和抗体価の測定に用いた感染研より分与のAd7株では、完全に中和せず、当所での分離株のAd7株では、高い中和抗体価を示した（表3）。

表3. アデノ7型感染者の中和抗体価.

患者 ウイルス抗原	B		C		D	
	急性期	回復期	急性期	回復期	急性期	回復期
Ad3(感染研株)	-	<4	<4	-	<4	<4
Ad7(ク)	-	(32)*	<4	-	<4	(8)*
Ad7(当所株)	-	128	<4	-	<4	32
Ad11(ク)	-	<4	<4	-	<4	<4

*ウイルス接種4日目までの中和抗体価、5日目以後中和されず。

4. 制限酵素による遺伝子型

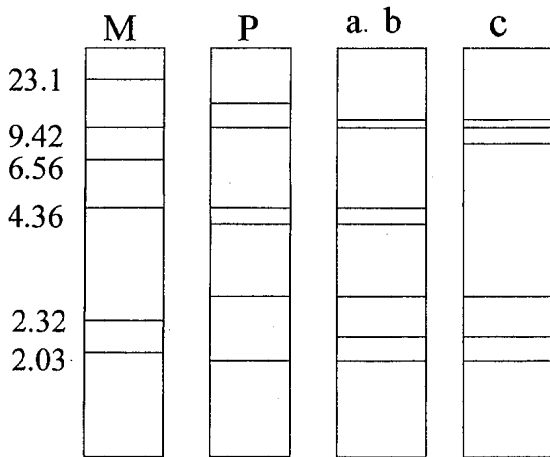
Ad7の制限酵素による遺伝子型別は、野田らの報告⁷⁾によると4種類の型に分けられ、BstEIIによる切断パターンは、図2の様になる¹⁰⁾。今回、5月に分離されたAd7型の3株のBstEIIによる切断パターンは、図3に示したように、感染研より分与のAd7p株と抗原性が異なるAd7のC型（Ad7c）であった。

5. 住民の中和抗体保有率

1994年度と1997年度のAd3とAd7の各年齢区分の中和抗体価を表4、5に示した。

1994年度のAd7pに対する中和抗体陽性率は、1.1%、Ad3に対する中和抗体陽性率は、27.2%であった。

また、1997年度のAd7pとAd7cに対する中和抗体陽性率は、0.5%と2.8%で、分離株のAd7cに対する陽性率が約6倍高かった。Ad3に対する中和抗体陽性率は、16.1%であった。



M : マーカー
P : Ad7 の標準株
a : Ad7 a
b : Ad7 b
c : Ad7 c

図2. BstE II による Ad7 遺伝子型の切断パターン.



M3 : マーカー
P : 感染研分与株
A : Ad7/223/97. 沖縄
B : Ad7/226/97. 沖縄
C : Ad7/227/97. 沖縄

図3. 分離株のBstE II による切断パターン.

表4. 1994年度のアデノウイルス中和抗体価.

抗原: Ad7 p

年齢層	検査人数	中和抗体価							陽性率%
		<4	4	8	16	32	64	128 256 ≥512	
0~4	20	20							0
5~9	20	20							0
10~14	20	20							0
15~19	20	20							0
20~24	20	20							0
25~29	20	20							0
30~39	20	19	1						5
40~49	20	20							0
50~	20	19	1						5
計	180	178	2						1.1

抗原: Ad3

年齢層	検査人数	中和抗体価							陽性率%
		<4	4	8	16	32	64	128 256 ≥512	
0~4	20	17	1		2				15
5~9	20	16	2	1	1				20
10~14	20	19	1						5
15~19	20	14	6						30
20~24	20	10	6	4					50
25~29	20	16	3	1					20
30~39	20	14	5	1					30
40~49	20	12	5	3					40
50~	20	13	2	3	2				35
計	180	131	31	13	5				27.2

IV 考察

当所で行った1994年度~1997年度のアデノウイルス分離状況調査において、1996年度までAd7の分離はなく、1997年度になって、はじめて5株分離された。

分離されたAd7は、市販の抗血清で容易に中和され、抗Ad3と抗Ad11血清との交差反応は、見られなかった。

分離された月は5月に3株、2月に2株であったが、2月に分離された1株は、県内離島の宮古島の医療機関

表5. 1997年度のアデノウイルス中和抗体価.

抗原: Ad7 p

年齢層	検査人数	中和抗体価							陽性率%
		<4	4	8	16	32	64	128 256 ≥512	
0~4	20	20							0
5~9	20	20							0
10~14	20	20							0
15~19	20	20							0
20~24	20	20							0
25~29	20	19	1						5
30~39	20	20							0
40~49	20	20							0
50~	20	20							0
計	180	179	1						0.5

抗原: Ad7 c

年齢層	検査人数	中和抗体価							陽性率%
		<4	4	8	16	32	64	128 256 ≥512	
0~4	20	17	2	1					15
5~9	20	19	1						5
10~14	20	20							0
15~19	20	20							0
20~24	20	20							0
25~29	20	20							0
30~39	20	20							0
40~49	20	19	1						0
50~	20	20							0
計	180	175	3	2					2.8

抗原: Ad3

年齢層	検査人数	中和抗体価							陽性率%
		<4	4	8	16	32	64	128 256 ≥512	
0~4	20	15	2	1	2				25
5~9	20	16	2	2					20
10~14	20	12	3	2	2	1			40
15~19	20	20							0
20~24	20	20							0
25~29	20	18	1	1					10
30~39	20	19	1						5
40~49	20	18	1				1		10
50~	20	13	5	2					35
計	180	151	15	8	4	1	1		16.1

で呼吸系疾患患者からの咽頭ぬぐい液からであり、本島や離島までの全県域にAd7は、侵入していることが示唆された。

Ad7型が分離された5月の患者3例とペア血清よりAd7型感染者と確認された患者1例の臨床症状をみるとA患者を除き、肺炎とVAHSが特徴的であり、特にAd7型とVAHSの関係は、安慶田ら¹³⁾や具志ら¹⁴⁾が報告しており、また、川崎市でも報告されている¹⁵⁾が、非常に希な症状であり、今後注目される臨床症状所見のひとつではないかと思われる。

今回、血清が採取されたのは3例(内ペア血清は1例のみ)の中和抗体価を測定したところ、抗原ウイルスを感染研からの分与された標準株Ad7を用いると完全に中和されず中和抗体価が測定できなかつたが、当所の分離株のAd7を抗原に用いたら完全に中和され高い抗体価を示した。このことから感染研からの分与株と当所の分離株とは抗原性が若干異なることが示唆された。

そこで、制限酵素切断法により、遺伝子型を調べたところ、野田らによって報告されている、BstEⅡによる切断パターンと比較すると、4.3kbpと4.0kbpのフラグメントが消失し、8.3kbpフラグメントが生じていることより、今回、5月に分離された3株は、Ad7cで1995年以後国内で流行した株と同一株であろうと推定された。

また、1998年2月に分離された2株は、まだ制限酵素切断法による遺伝子型別は行っていないが、最近Ad7hの報告もあり¹⁶⁾、今後も分離株の遺伝子型別は疫学的手法として用いていかなければならないと思われた。

また、住民の中和抗体価を1994年度と1997年度に測定したところ、Ad7pに対する抗体保有率は各年度共に低く、1997年度のAd7cに対する抗体保有率も2.8%で低かった。さらに、Ad7と同じB亜属のAd3の抗体保有率も1994年度は、27.2%、1997年度は、16.1%であった。これは、1994年度に調べた九州地区のAd3の平均中和抗体陽性率60.8%より本県の抗体陽性率はかなり低く¹⁷⁾、Ad7に対する免疫力が十分でないことを示し、今後流行する可能性が高いことが示唆された。今後も気道感染症であるAd7に注目して、継続的な監視が必要であろうと思われた。

V まとめ

1. 1995年以後全国で死亡例や集団発生を起こしているAd7が、本県でも1997年5月にはじめて3株分離された。
2. 分離株3株は、Ad7の標準株のAd7pとは、抗原性が異なり、BstEⅡによる制限酵素切断法を行ったところ、野田らの報告による切断パターンからAd7cと推定された。
3. 本県のAd7pに対する中和抗体陽性率は低く、Ad7cに対しても2.8%と低率であった。
4. Ad7と同じ亜群のAd3の中和抗体陽性率も1994年度、27.2%、1997年度、16.1%と1994年度に九州地研の共同研究で調査したAd3の平均中和抗体陽性率60.8%より半分以下の抗体保有率であった。

このことから今後、Ad7の流行が懸念され、感染症サーベランス等によるAd7の動向を把握し警戒しなければならないであろう。

VI 参考文献

- 1) 国立予防衛生研究所病原微生物検出情報事務局 (1994) アデノウイルス感染症1982~1993. 病原微生物検出情報.15(5): 1
- 2) Shizuko YAMADERA, Kazuyo YAMASHITA, Masae AKATSU KA, Nobuko KATO, Madoka HASHIDO, Sakae INOUE and Shudo YAMAZAKI (1995), ADENOVIRUS SURVEILLANCE, 1982-1993, JAPAN. Jpn. J. Med. Sci. Biol 48. 199-210
- 3) 野田衛・荻野武雄 (1995) アデノウイルス. 臨床とウイルス. 23 (増刊号): 225-230
- 4) 内田幸男 (1995) 眼のウイルス感染症. 臨床とウイルス. 23 (増刊号): 322-324
- 5) 中園直樹 (1987) アデノウイルス. ウイルス・クラミジア・リケッチア検査 各論1. (財)日本公衆衛生協会: 68-80
- 6) 厚生省保健医療局 (1996) アデノウイルス7型の流行による死亡事例について (事務連絡)
- 7) 和田靖之・北島晴夫・久保政勝 (1996) アデノウイルス7型による acute respiratory disease with pneumonia の12歳女児例. 感染症雑誌. 70(5): 500-505
- 8) 国立予防衛生研究所病原微生物検出情報事務局 (1996) アデノウイルス7型の出現,1995. 病原微生物検出情報.17(5): 1

- 9) 国立予防衛生研究所病原微生物検出情報事務局 (1997) アデノウイルス7型1995. 4~1996. 12. 病原微生物検出情報.18(4): 1
- 10) 上田竜生・宇藤国英・田本裕美・野口英太郎・田中茂樹・山本浩一・角至一郎・手島秀剛・青木繁・小林伸雄・高柳俊光・吉永宗義 (1998) アデノウイルス7型が分離された死亡例(2例) -長崎県. 病原微生物検出情報. 18(4): 3
- 11) 国立予防衛生研究所学友編 (1982) 改訂2版ウイルス実験学(総論). 丸善, 東京: 266-274
- 12) 野田衛・桐谷未希・阿部勝彦・池田義文・山岡弘二・荻野武雄 (1996) わが国で分離されたアデノウイルス7型の分子疫学 - 広島市. 病原微生物検出情報. 17(5): 4-5
- 13) 安慶田英樹・糸数清正・大城直雅・大野惇・安里龍二・徳村勝昌 (1997) 37.アデノウイルス7型(AD7)によるウイルス関連血球貪食症候群(VAHS)の3例. 第67回日本感染症学会西日本地方会総会抄録.
- 14) 具志一男・安慶田英樹・島袋智志・上原哲・宮城雅也・天久憲治・糸数清正・大野惇 (1997) 14. アデノウイルス7型(Ad7)が分離されたウイルス関連血球貪食症候群(VAHS)の2例. 日本小児科学会沖縄地方会第45回例会抄録
- 15) 清水英明・春山長治・野口さおり (1998) アデノウイルス7型が分離されたウイルス関連血球貪食症候群(VAHS)の1例 - 川崎市. 病原微生物検出情報. 18(4): 3
- 16) 橋戸円・向山淳司・稲田敏樹・井上栄・都築秀明・山下照夫・栄賢司 (1998) わが国におけるアデノウイルス7h型の検出. 病原微生物検出情報. 19(1): 8-9
- 17) 甲木和子 (1995) 九州におけるアデノウイルスの血清疫学 - 九州の10地研による共同研究 -. 衛生微生物技術協議会第17回研究会講演抄録: 48