

論文の内容の要旨

論文題目

A New Method for Typing of Subgenus D Adenoviruses and Genetic Characterization of Adenovirus Type 8 Isolated in Japan.

和訳

アデノウイルス D 群の新しいタイピング法と日本で分離されたアデノウイルス 8 の分子遺伝学的特徴

指導教官 新家 眞教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

アルン クマー - アディカリ

ヒトアデノウイルス(Ad)は 51 型のセロタイプがあり、ゲノムの相同性、群内の組み換え能などの指標により 6 群(亜属)に分類される。このうち、約 30% が結膜炎の原因ウイルスと考えられている。D 群に属する Ad8, 19, 37 などは流行性角結膜炎の原因ウイルスとして知られ、重篤な結膜炎症状と点状角膜炎などを引き起こす。この疾患は接触感染で流行し、学校などの集団生活で問題となる。また現状では有効な治療法は確立されていない。

この Ad D 群のタイピング法は従来、分離培養法、中和試験法、hexon based PCR-RFLP 法などで行われてきた。しかし分離培養法、中和試験法では 2-4 週間の日数を要し、また hexon based PCR-RFLP 法では 3 日間を要する。本研究は結膜擦過物より直接タイピングする fiber based PCR-RFLP を用いて迅速なタイピング法の開発を目的とした。更に流行性角結膜炎の主因と考えられている Ad8 の過去の分子疫学調査と比較検討するため、都城市(宮崎県、1998 年-1999 年)、広島市(1983 年-1997 年)及び川崎市(1999 年)の検体より分離されたものを用いて解析した。

1. Fiber based PCR-RFLP を用いての Ad D 群のタイピング法

方法 Ad8,9,15,19 及び 37 の fiber gene に関するプライマー、AF2(5' CGC GTG GAA GAT GAC TTC 3')/AR2(5'CGT GCT GGT GTA AAA ATC 3')を用いて結膜擦過物より PCR 法を行い、RFLP の制限酵素には *DdeI*, *HinfI* 及び *RsaI* を使用した。Restriction パターンは Ad8,9,15,17,19,22,28,28,37 及び 39 の例で作成した。具体的なタイピングは急性結膜炎患者の結膜擦過物 102 検体を用いた。熱処理を行った検体より DNA を抽出し、PCR を施行した。また比較検討のため分離培養法、中和試験法、AdTU7/AdTU4' 及び AdnU-S'/AdnU-A のプライマーを用いた hexon based PCR-RFLP 法も同時に施行した。

結果 102 検体のうち 48 例が Ad D 群であった。内訳は Ad8, 45 例、Ad19, 2 例、Ad37, 1 例とタイピングされた。一方、分離培養法、中和試験法では 29 例が Ad D 群と分離された。内訳は Ad8, 26 例、Ad19, 2 例、Ad37, 1 例であった。Hexon based PCR-RFLP 法では我々の fiber based PCR-RFLP 法と同一の結果であった。また分離培養法、中和試験法でタイピングされた例は hexon based PCR-RFLP 法、fiber based PCR-RFLP 法でもタイピングされ同一の結果であった。ウイルスの DNA 測定限界は hexon based PCR-RFLP 法では 1000 genome copy であったが、一方 fiber based PCR-RFLP 法では 100 genome copy であった。

結論 本法は従来のタイピング法と比較して以下に挙げられる利点がある。

- 1) 迅速かつ簡便である。分離培養法、中和試験法では 2-4 週間、また hexon based PCR-RFLP 法でも 3 日間を要する。一方、本法では 1 日を要するのみである。
- 2) 分離培養法、中和試験法は特異性はあるが、抗体などの点で感受性が低いことがある。本法は分離培養法、中和試験法と比較して特異性は同じであった。また感受性は従来の hexon based PCR-RFLP 法と同一であった。

以上の点で Ad D 群のタイピング法に fiber based PCR-RFLP 法は有用と考えられた。

2. Ad8 の分子疫学調査

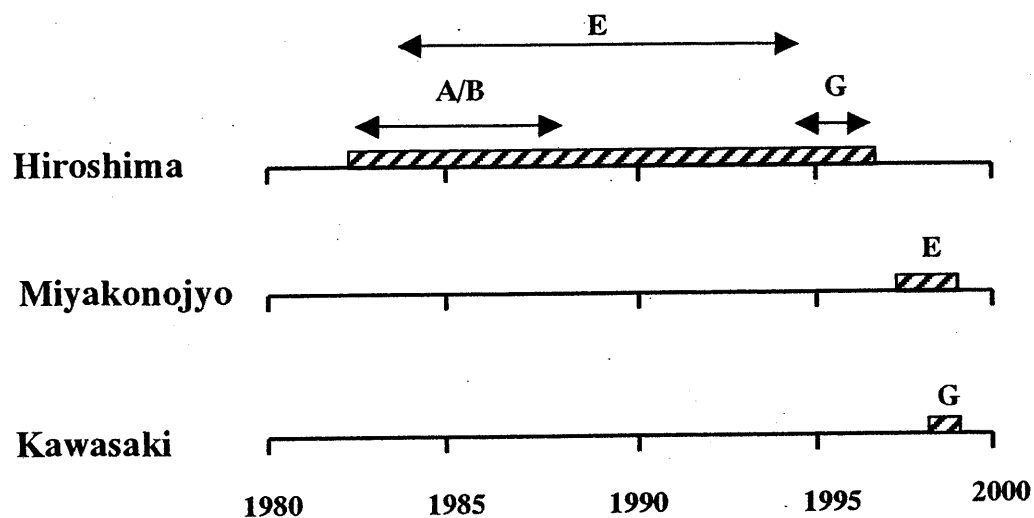
対象および方法 対象は 1998 年-1999 年に宮田眼科病院（都城市）で分離された 26 検体、1983 年-1997 年に広島市で分離された 78 検体、1999 年に川崎市で分離された 5 検体である。Hep2 細胞を用いて、増殖させた後、Wadell と de Jong の方法で Ad8DNA を抽出した。これを制限酵素 (*BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *SaII*, *SmaI*) で切断し、切断像を比較検討した。

結果 図に各都市の結果を示す。

結論 広島 of 検体は 1983 年-1988 年まで Ad8A, Ad8B、1984 年-1995 年まで Ad8E

更には 1995 年-1997 年に Ad8G が分離された。都城の検体は Ad8E が主体であった。また 1 例に一部変異がみられ、過去に報告のないものであった。川崎の検体は Ad8G であった。

Distribution of Ad8 Genome Types by Time and Place in Japan



 - Period of study

 - Period of genome type circulation

A- Ad8A, B-Ad8B, E-Ad8E, G-Ad8G