

**咽頭結膜熱・流行性角結膜炎  
検査，診断マニュアル  
(第3版)  
平成29年3月**

**国立感染症研究所 感染症疫学センター  
地方衛生研究所**

\*本マニュアルで赤字は第2版からの変更修正を示しています。

## 咽頭結膜熱の病原診断マニュアル

### 目次

#### I. アデノウイルス総論

1. アデノウイルスの種と病原性および型
2. アデノウイルスの構造と機能

#### II. 疾患について

1. 咽頭結膜熱と流行性角結膜炎

#### III. 臨床現場での検体採取

および実験室でのアデノウイルス・スクリーニング法として使用可能な迅速診断

1. 検体採取
2. 臨床現場で可能な迅速診断

#### IV. アデノウイルスの分離および中和反応

1. アデノウイルスの分離培養
2. アデノウイルスの血清型の同定（中和試験）

#### V. アデノウイルスの PCR ならびにダイレクトシーケンスによる型別法

1. 器具および試薬
2. 検査方法
  - 2-1 ウイルスゲノム抽出
  - 2-2 PCR 反応ならびにダイレクトシーケンス

#### VI. アデノウイルスのリコンビナント（組換え）開始点の同定

#### 引用文献

#### 執筆者

#### 謝 辞

本マニュアルは、感染症法の五類定点報告疾患である咽頭結膜熱（pharyngoconjunctival fever, PCF）および流行性角結膜炎（Epidemic keratoconjunctivitis, EKC）の病原体診断法について記載する。

PCF および EKC の病原ウイルスはヒトアデノウイルス **Human mastadenovirus**（以下、アデノウイルスあるいは **HAdV** とする）である。2008 年まで、アデノウイルスには 51 種類の血清型があり、これらは A～F の 6 種に分類されていた。その後、52 型以降の血清型でな

く全塩基配列の決定による遺伝型として（新型として）報告され、52型がG種とされたため種もA～Gの7種となった。現在では、1～51も含め血清型と呼ばず型とされている。血清型のうち19型の一部は血清学的には19型であるが遺伝型としては64型とさるなどの型別法が修正されつつある。型別について、ヘキソンのループ領域を含む配列決定法を組み入れることを推奨する。

新型アデノウイルスは54型が流行性角結膜炎の全国規模流行を2015～2016年に引き起こすなど大規模流行を引き起こす傾向が見られている。

## I. アデノウイルス総論

### 1. アデノウイルスの種と病原性および型

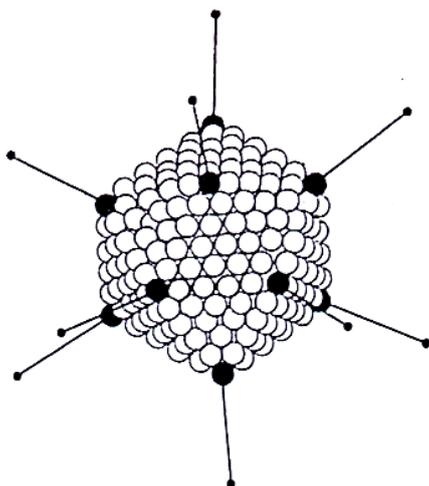
アデノウイルスは、その種と引き起こす疾患の関連性が明確であり、これを大まかにまとめると、次のとおりである。なお、B種はB1およびB2に細分されることもある。疾患との関連が明らかな主な型を太字、2008年以降に報告された型をアンダーラインで示した。

種	疾患	型
A	感染性胃腸炎	(12, 18, <b>31</b> 型)
B1	急性呼吸器疾患（咽頭炎・肺炎，咽頭結膜熱など）	<b>(3, 7, 16, 21, 50</b> 型)
B2	出血性膀胱炎，急性呼吸器疾患	<b>(11, 14, 34, 35, 55</b> 型)
C	急性呼吸器疾患（咽頭炎，扁桃炎など）	<b>(1, 2, 5, 6</b> 型)
D	流行性角結膜炎	<b>(8, 9, 10, 13, 15, 17, 19* (19aは64型), 20, 22-30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42-49, 51, 53, 54, 56</b> 型)
E	急性呼吸器疾患，流行性角結膜炎	<b>(4</b> 型)
F	感染性胃腸炎	<b>(40, 41</b> 型)
G	感染性胃腸炎	<b>(52</b> 型)

\*19型のうち19p（標準株）は流行性角結膜炎（EKC）を引き起こさない。遺伝子型（制限酵素切断により血清学的に19型だが19a）とされてきた株はEKCを引き起こし64型と定義された。

## 2. アデノウイルスの構造と機能

アデノウイルスは、正二十面体構造の頂点からファイバーが突き出した構造をとる。



### アデノウイルスの構造模式図

アデノウイルスの表面蛋白は 240 個のヘキソン (図の○で示した) および正二十面体の 12 の頂点(ペントンベース, 図の●)から伸びる 12 のファイバーから成る。

ファイバーの長さは、種によって異なる。

A 種 28~31nm, B 種 9~11nm, C 種 23~31nm, D 種 12~13nm, E 種 17nm, F 種 28~33nm (Chroboczek et al. 1995).

ヘキソン, ファイバーおよびペントンベースは, それぞれ抗原決定基 (antigenic determinants) を持つ 3 つのカプシド蛋白 (capsid protein, ウイルスの核酸とそれに結合した蛋白を取り囲む蛋白質) である。

**ヘキソン蛋白**: 頂点以外の正二十面体の三角面を構成する蛋白で 6 個 (hexon の hex- は 6 の意味) の蛋白群を構成する。蛋白の直径は 8~10nm で, 中和決定領域はヘキシソンのループ領域に存在する。

**ファイバー蛋白**: 頂点から突き出した構造を持ち, 細胞レセプターへの吸着 (attachment) に関与する。ファイバーは, HI (赤血球結合抑制) 抗原を持ち, HI 試験で利用される。

**ペントンベース蛋白**: ファイバー分子がレセプターへ結合したあとペントンベース蛋白とインテグリン v3 および v5 との結合によりレセプター媒介エンドサイトーシス (飲食作用) によりアデノウイルスが細胞内へ取りこまれる。

なお, アデノウイルスのレセプターは, CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) のほか, シアル酸, ヘパラン硫酸, インテグリンなどが明らかになり, 種 (型) によって, 利用

するレセプターが異なっている。

インテグリン (integrin) は細胞表面タンパク質のひとつで、主に細胞外マトリックスへの細胞接着、細胞外マトリックスからの情報伝達に関与する細胞接着分子である。α鎖とβ鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーであり、異なるα鎖、β鎖が存在し、多様な組み合わせが可能である。歴史的には、細胞外マトリックスにある細胞接着分子フィブロネクチンのレセプターとして同定された。細胞内では、ミクロフィラメントを中心とする細胞骨格に結合し細胞 - マトリックス接着 (細胞基質接着) に関与する。また細胞と細胞の接着に関与する種類のインテグリンも存在する。

## II. 疾患について

### 1. 咽頭結膜熱と流行性角結膜炎

#### 咽頭結膜熱 (pharyngoconjunctival fever: PCF)

咽頭炎 (咽頭発赤, 咽頭痛) および発熱に加えて急性濾胞性結膜炎を生じるウイルス感染症である。初感染では、流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis; EKC) 様の結膜炎を呈することもある。

B種アデノウイルス、なかでも3型(HAdV-3)による場合が多い。その他C種のHAdV-1, 2, 5および6も検出される。同じB種のHAdV-7, HAdV-11も検出されることがあるが、HAdV-14, HAdV-21の日本における検出報告はゼロが続いているが重症の呼吸器感染を引き起こすことがあるので引き続き警戒が必要である。さらに近年に諸外国でHAdV-55による呼吸器感染症報告が増加している。

感染症法における五類定点把握疾患であり、全国の約3,000か所の小児科定点から患者報告がなされ、そのうち10%において病原体定点として検体採取を行っている。

#### 流行性角結膜炎(Epidemic keratoconjunctivitis: EKC)

主にD種のアデノウイルスによる疾患で、主として手を介した接触により感染する。以前は、本疾患患者を扱った眼科医や医療従事者などからの感染が多く見られたが、現在では、職場、病院、家庭内などの人が濃密に接触する場所などでの流行的発生もみられる。適切な治療がなされない場合、数か月以上にわたり角膜上皮混濁(Akiyoshi et al. 2011)がおこり著しくQOLを低下させる恐れがある。適切な診断ができれば、ステロイド点眼液でこのような事態を回避できるとされる。

アデノウイルスは種々の物理学的条件に抵抗性が強いいため、その感染力は強い。19世紀後半、ドイツの労働者間で流行したことが記載されている。その後米国で、"shipyard eye" と呼ばれる眼疾患が流行した。造船所の労働者が眼の外傷の治療の際、医原病的に広がったものと考えられる。

我が国では年度により D 種の 8, 19, 37 型のいずれかによる EKC の流行が見られていた。しかし近年は新型アデノウイルス 53, 54 および 56 型アデノウイルスによる EKC が発生している。

五類定点把握疾患であり、全国約 600 の眼科定点から患者報告がなされ、そのうち 10% において病原体定点として検体採取を行っている。

### Ⅲ. 臨床現場での検体採取

#### および実験室でのアデノウイルス・スクリーニング法として使用可能な迅速診断

##### 1. 検体採取

市販品では、検体中のアデノウイルスが失活しにくい培地と、検体の採取が効率的に出来るフロックドスワブ(咽頭および結膜に用いる)(藤本, 2009)がセットになった UTM (COPAN 社, 品番 359C)を用いることで効率的な検体採取が可能である。

その他、インフルエンザウイルスおよびエンテロウイルス等の検体採取用に使用しているウイルス検体採取用保存培地を用いることも可能である。

採取検体は、咽頭結膜熱では咽頭ぬぐい液を、流行性角結膜炎では角結膜ぬぐい液を用いるのが良い。角結膜ぬぐい液を採取する前に点眼麻酔薬を使用することが多いが、細胞培養に使用するときには細胞毒性を引き起こすことがあるので注意する。発症 4 日以内の検体採取が推奨されている(Tsutsumi H. et al. 1999)。

##### 2. 臨床現場で可能な迅速診断

免疫クロマト法が用いられている。近年は、操作が簡易かつ判定が容易な免疫クロマトキットが用いられる傾向にある。

###### 1) 免疫クロマトキット

免疫クロマトキットによる迅速診断方法が、1997 年に発売された。このキットはクロマトグラフィーを基本原理とする。標識抗体(金コロイド等の、集まると目で確認できる標識とアデノウイルスに対する抗体を結合させたもの)がクロマトグラフィーの途中に塗布されている(図 1 の検体滴下用の穴と B ラインの間)。検体中にアデノウイルスがあると標識抗体とアデノウイルスの複合体を作る。

アデノウイルス陽性の場合、その複合体が抗アデノウイルス抗体を結合した B ラインと抗マウスモノクローナル抗体を塗布した C ラインで捕捉され、バンドが確認できる。

アデノウイルスが陰性の場合、抗アデノウイルス抗体がある B ラインでは何もおこらず、C ラインでのみバンドが見られる。B および C ラインのいずれでもバンドが見られない場合は判定不能となる。

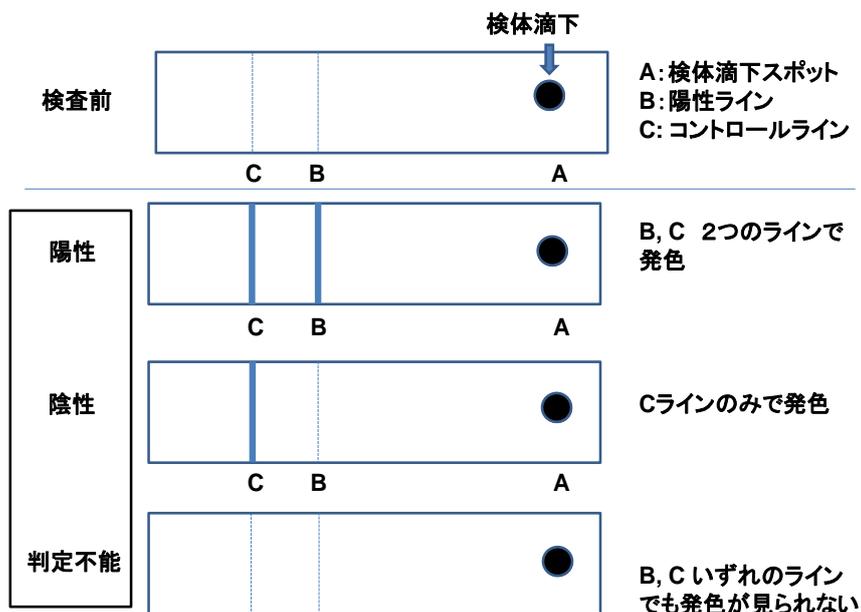


図1. 免疫クロマトキットの反応模式図

免疫クロマト法の非特異反応は少なく、特異度が高い。ただし、検出感度がウイルス分離やPCRに比べ劣るので、偽陰性の可能性を考慮する必要がある。

## 2) アデノウイルスと同時に複数の病原体を検出するキット

2009年ころからアデノウイルスとRSウイルスの同時測定キット（呼吸器感検体）やアデノウイルスとロタウイルス（糞便検体）も市販されるようになった。これらは1回の検査でこれらの検査が同時に出来る利点を持つ。

## IV. アデノウイルスの分離および中和反応

### 1. アデノウイルスの分離培養

アデノウイルスは、培養細胞に臨床検体を接種することにより分離できる。

#### 1) 器具

5%CO<sub>2</sub>インキュベーター（培養温度 33-37°C）、オートクレーブ、安全キャビネット、超細胞培養用フラスコ(25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>等)

24 ウェル,48 ウェル,96 ウェルマイクロプレート（組織培養用）

10ml, 25ml ピペット

その他 マイクロピペット等

## 2) 試薬

**増殖培地:** Dulbecco's modified Eagle's Medium (D-MEM) (high glucose) (和光, Cat No.044-29765 など)や Dulbecco's modified Eagle's Medium(SIGMA, D6046)等を用いると良い。  
Gentamicin Solution (50mg/ml, シグマ Cat.G1397) を培地 500ml に対して 1ml の割合で添加する。ウシ胎児血清(FBS, FCS:ギブコなど)を 5~10%添加する。  
200mmol/l L-Alanyl-L-Glutamine Solution (×100) (和光 016-21841 等)を培地 500mL に対して 5mL 添加する。

**維持培地:** Eagle's Medium(和光, 051-07615 等)あるいは Minimum essential medium Eagle(SIGMA, M4655)に Gentamicin Solution (50mg/ml, シグマ Cat.G1397) を培地 500ml に対して 1ml の割合で添加する。ウシ胎児血清を 1~2%添加する。L-Alanyl-L-Glutamine も増殖培地と同様に加える。

(注 1) 抗生物質についてペニシリン・ストレプトマイシンが用いられることがあるが、マイコプラズマによる細胞汚染を阻止するためゲンタマイシンを用いた方が良い。

(注 2) L-アラニル-L-グルタミン溶液は、L-グルタミンよりも 1.5 倍長期間安定とされる。また、L-グルタミンが分解するとアンモニアが生じて細胞に悪影響をおよぼすが、L-アラニル-L-グルタミンはアンモニアを生じない。

## 3) 細胞

感受性が高い細胞を複数種類使用することが望ましい。A549 細胞, HEp-2 細胞, CaCo-2 細胞, FL 細胞, HeLa 細胞などが適している。特に A549 細胞はアデノウイルスに対する感受性が高い(Enomoto et al. 2010)。難増殖性といわれていた 40 および 41 型も分離可能である。その他, RD 細胞等も使用可能である。

ヒトアデノウイルスは宿主特異性が高いため、ヒト由来以外の細胞はアデノウイルスの分離培養に適していない。ただし、Vero 細胞での増殖はヘルパーウイルスとしてたとえば SV-40 ウイルスが細胞に感染している場合などで増殖が良い場合もある。アデノウイルスは A 種および D 種は増殖が遅く、2 週間のおきの継代で 2 代あるいは 1 週間間隔で 3 代継代し、28 日以上細胞を維持して観察する必要がある (Lennette DA et al, 1995)。HEp-2 細胞 (および RD, HeLa, FL 細胞) は 1 週間以上細胞を維持すると細胞が円形化して CPE (細胞変性) が観察しにくくなる。A549 細胞は 2 週間程の培養でも細胞が傷みにくく、そのまま維持してウイルスを分離することが出来る。

## 4) 細胞の準備

分離用細胞の培養は通常通り実施するが、コンフルエント になる前の 80%程度の細胞層の時 (1~2 日後) に検体を接種する。具体的には細胞培養用フラスコ 25cm<sup>2</sup> (培養液 5ml)

の培養細胞をトリプシン処理して剥がして使用する際は、細胞を約 20ml(3-5 倍にする)の増殖培地に希釈しウイルス分離用プレートに添加する。その際 24well には 1ml, 48well は 0.5ml, 96well は 0.1ml を目安に添加すれば翌日、翌々日に使用できる。細胞の維持を長期間保持したい際やまたは細胞増殖の速いものは細胞数を適宜減らす。

## 5) 接種と CPE 観察

1 検体につき、1 細胞あたり 2well を使用する。多数の検体を扱う際や他の検査法併用のため検体量が少ない際は 48well や 96well のプレートを使用する。その際は検体間のコンタミネーションに極力注意する。

細胞を培養したプレートは接種前に無血清培地または維持培地で 1~2 回洗う。

検体は 800g で 20 分間~30 分間 (4°C) 遠心し上清を細胞に接種する。もしくは 800g で 10 分間 (4°C) 遠心した後に上清をフィルター\* (0.45µm) に通したものを使用すれば細菌汚染はほとんど防げる。\* (ADVANTEC DISMIC-13CP 型番 13CP045AS または DISMIC-25CS 型番 25CS045AS)

処理検体を細胞に添加する (24well : 100µl~200µl, 48well : 100µl, 96well : 50µl)。

CO<sub>2</sub> インキュベーター (33°C~37°C) で 1~2 時間吸着を行った後に細胞の様子を顕微鏡観察後、維持培地を添加する。検鏡した際に検体による細胞毒性が見られる場合は検体を細胞から完全に除去してから維持培地を添加する。

培養は 33°C~37°C インキュベーターで行う。

検体接種翌日には必ず検鏡し検体による細胞毒性が無いか確認した上で、維持培地を交換する。CPE の有無は毎日顕微鏡で観察する。培地の pH が低下し黄色になった際は培地を適宜交換する。

細胞により 1 週間~2,3 週間の間隔で継代を行う。一般的に継代は 2~3 代実施する。しかし、流行性角結膜炎を引き起こす D 種の分離には 7~8 代の継代が必要なこともある。

アデノウイルスの大部分は細胞内に留まっている。したがって継代の際は培養液をピペットの先を使用して細胞ごと回収し、凍結融解を頻回 (5~10 回) または超音波処理をして細胞を完全に破壊させ、ウイルスを放出させる。その後 800g で数分間遠心し細胞残渣を除去した上清を新しい細胞に接種する。

CPE が出現した際は、細胞ごと培養液を回収し、上記と同様に細胞破壊後、上清を同定に使用する。96well プレート使用の際は 24well に再度継代しウイルス量を増やした上で、使用する。

ウイルス量、培養細胞の種類や細胞数等にもよるが、一般的に型別により CPE の出現する期間に差がある。1,2,3,5,6,7,11 型などは比較的早く (1 週間くらい) 出現し、その後の CPE の進行も早い。4,19,37,54 型等の CPE 出現はかなり遅く頻回の継代を要することが多い。

CPE は形態的に主に 2 種類の特徴があり、細胞が伸縮して網目状に抜けていき、半島状や島状に細胞が残る 1,2,3,5,6,7,11 型（伸縮型）と円形化して膨隆しブドウの房状に凝集する 4,19,37,54 型（円形型）に分かれる。54 型はウイルス量が多いときには伸縮型を示すことも多い。

#### **【細胞培養に関する重要事項の確認】**

1) pH：高等脊椎動物の組織や細胞の培養に適した pH は約 7.2~7.4 である。多くの細胞は pH7.8 以上や pH6.8 以下では障害を受ける。培地には平衡塩類が入っており CO<sub>2</sub> インキュベーター中で CO<sub>2</sub> と平衡を保持するように作られている。

2) 2 価陽イオン：Ca, Mg は正常の細胞間接触保持に必要であり、細胞の解離には EDTA を加えたりアルカリ性にしたりする。

1)および2)でアルカリ性になることで細胞が障害を受けないよう CO<sub>2</sub> インキュベーター外へのプレート取り出し時間の短縮や 2)の解離液との接触時間の短縮は重要である。

3) トリプシン：細胞間の結合に関与しているタンパク質を直接消化する。RD 細胞等で長時間トリプシン処理すると細胞が傷むので注意する。

## **2. アデノウイルスの血清型の同定（中和試験）**

(池田義文. 2001 一部改変)

### **細胞の準備**

1) ウイルスが分離された細胞を用い、96 穴培養プレートの各穴に 3~4 倍に希釈した細胞浮遊液を 0.1ml ずつ分注し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で静置培養する。

2) 単層になる前、すなわち 80~90%まで細胞が増殖し多少間隙がみえる頃（培養 1~3 日後）に培養液を捨てて、各穴に 0.15mL ずつの細胞維持液を分注したものをウイルス力価の測定と中和試験に用いる。

(HEp-2, HeLa などの上皮系株化細胞は培養日数が経過すると細胞が盛り上がり、細胞変性(CPE)の観察が難しくなるので、早目に使用する。

### **同定用ウイルス液の調整**

1) 分離培養で 75%以上の細胞が CPE+++を示したときに、細胞をピペティングではがし、遠心管に移す。

2) 1)の細胞浮遊液は凍結融解 4 回繰り返して細胞を破碎する。

3) 800g で 5 分間 冷却遠心し、その上清を試料とする。

4) 細胞維持液で 5~30 倍に希釈し、各希釈につき、96 穴マイクロプレートに用意した培養細胞の 4 穴以上を使用し、25μL ずつ接種する。

5) 翌日から細胞を観察し、3~5 日で CPE+++を示す希釈濃度のウイルスを攻撃ウイルスに用いる。

\*ウイルス液を 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過するとウイルス力価は少し低下するが、同定が容易となることがある。

\*\*アデノウイルスの増殖は遅く、エンテロウイルスのように 10 倍階段希釈で感染価を求めることが困難なことが多い。

\*\*\*ウイルス力価が高いと細胞毒性のため細胞が死に同定不能となることがある。

また、ウイルス増殖の遅い株では細胞増殖が勝り、CPE の観察が難しくなる。そのときは、もう一度継代培養を繰り返す。

## 中和試験

慣れてくると CPE の形態（伸縮型，円形型）によりある程度型を絞り込むことができる。またアデノウイルスの血清型間には中和交差反応があり，全て同じ力価（5 単位または 10 単位）の抗血清を，少なくとも同じ種内の 2 種類以上用いることが，誤った同定を防ぐために必要である。

アデノウイルス 1～7，11，19，31，37 型の中和抗血清はデンカ生研(株)から 100 単位で市販されているので，ウシ胎児血清を含まない培養液で 5 単位または 10 単位に希釈して用いると便利である。

### [培養プレート]

- (1) 96 ウェルのマイクロプレートに細胞を単層培養しておく。
- (2) 8 連または 12 連ピペットで培養上清を除き，各穴に維持液を 0.15mL ずつ入れておく。

[中和用プレート] \*この過程は，滅菌した試験管を用いても良い。

- (3) 中和用プレートのレイアウト(抗血清と攻撃ウイルスの位置を各 2 穴ずつ)を決める。
- (4) レイアウトに従い，至適濃度に希釈したウイルス液 25 $\mu$ L と 5 単位の抗血清 25 $\mu$ L を各穴に分注する。ウイルス対照の穴には抗血清の代わりに細胞維持液を入れる。
- (5) プレートのフタをセットして，プレートミキサーで攪拌・混合する。
- (6) プレートを 37°C(または 34°C)の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 1 時間静置して中和する。

### [接種]

- (7) 中和したウイルス液を中和用プレートから 8 連または 12 連ピペットを用いて培養プレートに接種する。

### [観察]

- (8) 培養プレートを 37°C(または 34°C)で培養し，翌日から毎日 2 回観察する。
- (9) 判定は，接種後 3～5 日目にウイルス対照の CPE が 75%(+++ )となった時点で行い，

CPE を完全に抑制した抗血清の型をウイルスの血清型とする。

\*) 一旦は中和されても、遅れて CPE が出現することがあるので、7～10 日目頃まで観察を続ける。

\*\*）ウイルス対照の CPE が予定日を過ぎても出現しない場合はウイルスの濃度を上げて再試験とする。

同種ウイルスは中和反応が交差することが多く同定しにくい(3,7,11 型, または 1,2,5,6 型). 複数の抗血清で CPE が抑制された際は複数抗血清の濃度を倍々希釈して(10 単位, 5 単位, 2.5 単位...) 再度同定試験を実施し, 比較して決定する。

## V. アデノウイルスの PCR ならびにダイレクトシーケンスによる型別法

50 を超える型があるアデノウイルスについて中和反応だけを用いてアデノウイルスの型別を実施することは現実的とはいえない。また、2008 年以降 (52 型～) は血清型から型へと型の考え方が変更された。そこで、本章ではアデノウイルスの PCR による型別法について述べる。

### 1. 器具および試薬

#### 1) 器具

サーマルサイクラー, 冷却遠心機, マイクロ冷却遠心機, 電気泳動装置, UV 照射写真撮影装置, マイクロピペット(2, 20, 200, 1000 $\mu$ L), チューブ(0.2mL, 0.5mL, 1.5mL), ヒートブロック

#### 2) 試薬

Ex-Taq: TaKaRa, Code No. RR001A または

PrimeSTAR GXL DNA polymerase: TaKaRa, Code No. R050A (こちらの方が感度良い)

ハイピュア ウイルス核酸キット: ロシュ・ダイアグノスティックス, 製品番号 1858874

アガロース(核酸のアガロースゲル電気泳動用): インビトロジェン Cat No. 15510-019

など

GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in DMF : Wako

(エチジウムブロマイドより安全で感度が良いため用いるが, エチジウムブロマイドでも良い)

100bp 分子量マーカー

### 2. 検査方法

## 2-1 ウイルスゲノム抽出

ウイルス核酸抽出用（アデノウイルスでは DNA）のキットとして市販多用されているものをその指示に従って使用する。

## 2-2 PCR 反応ならびにダイレクトシーケンス

PCR-シーケンスによるアデノウイルスの型同定には、約 36,000bp のフルゲノム塩基配列を決定するのが最も確実であるが、現在のサンガ-法によるシーケンス法で全塩基配列を決定することは手間と時間を要す。そこで、ヘキソン、ファイバー、ペントンなどの構造蛋白質をコードする領域の塩基配列を別々に決定することが行われている。

本マニュアルでは 7 種類の PCR 法を示す。方法 1～方法 4 および方法 7 はヘキソン領域を、方法 5 はファイバー領域を、方法 6 はペントンベース領域を標的にしている。方法 1 以外は増幅産物の塩基配列を決定することにより型の同定が可能である。

レファレンスでは方法 4, 5 および 6 の組み合わせを推奨するが、目的によってこれらの方法を使い分けるのが望ましい。

アデノウイルスゲノムの塩基長は種や型によって異なるので、以下特別に明示していない場合は GenBank に登録されている 2 型(J01917)の全塩基配列 35937 bp におけるポジションを基準とする。

**ヘキソン**：ヘキソンコード領域ゲノムの構造は模式図で書くと図 2 のとおりである。

**C** は conserved region(領域)であり、変異が少ない。**V** は variable 領域で変異が多い部分である。**C** 領域は C1～C4, **V** 領域は V1～V3 に分類される(Ebner et al.JV,2005)。ヘキソン領域のループ 1 およびループ 2 は中和抗原決定基を含むことが報告されている。そのためヘキソンコード領域はアデノウイルスの PCR シーケンシングによる同定で最も頻繁に使用されてきた。しかしながら、近年報告されているヘキソン、ペントンベースならびにファイバーコード領域において異なる複数のタイプが組換えを引き起こしたリコンビナントアデノウイルスの出現により、ヘキソンコード領域のみで型別を行うことは危険であり、ときには間違った情報を報告することになるので注意しなければならない。

そこで本マニュアルでは、ヘキソン領域を使用する簡易なアデノウイルス検出および型別の方法と併せて、ウイルスの組換えの有無を判定することを目的とした、ペントンベース、ファイバーコード領域の同定法までを解説する。

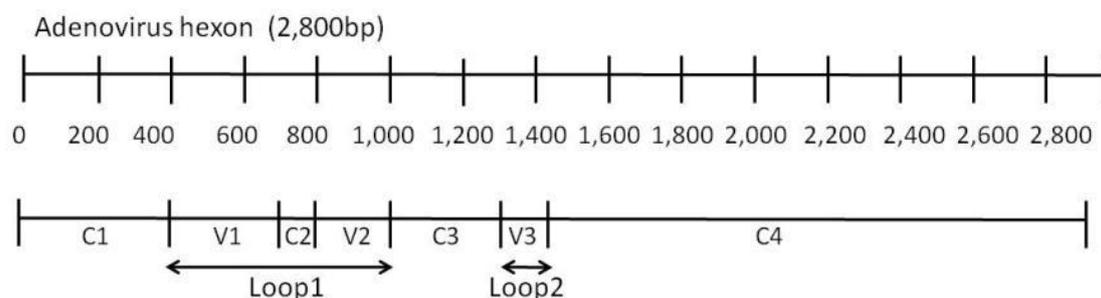


図 2. ヘキソン領域の模式図

### 【主なアデノウイルス PCR 検査法】

方法 1：ヘキソンの C4 領域を使用した高感度なアデノウイルス用 PCR

(この領域の塩基配列決定による型別は一部を除き困難. 種別はおそらく可能)

方法 2：ヘキソン C4 領域を使用する方法 (保存領域による型別. 多くの型は型別できるが一部出来ない型もある)

方法 3：ヘキソンのループ 1 および 2 コード領域 (中和決定領域) を含む領域を使用する方法. 多くの型同定に使用可能

方法 4：ループ 1 領域に着目した PCR-sequencing による方法(多くの型同定に使用可能)

方法 5：ファイバーコード領域を用いた PCR-sequencing による方法(多くの型同定に使用可能)

方法 6：ペントンベース領域内の RGD loop に着目した PCR-sequencing による方法(多くの型同定に使用可能)

方法 7：リアルタイム PCR による定量

### 【ゲノムの塩基配列による型別法】

方法 1 から 3 は, これまで多用されてきた手法で臨床検体に直接使用可能な手法である.

方法 4 から 6 は, 分離されたアデノウイルスについてヘキソン, ペントンベースならびにファイバーコード領域において組換えを引き起こした, リコンビナントアデノウイルスを同定するための手法である. その手順を次に示す.

1) ヘキソンのループ 1 コード領域の塩基配列の決定と BLAST 解析(方法 4)：中和抗原性決定部位による型別.

ε (イプシロン) 抗原部位による型別で, 中和反応を規定している領域なので,

(53 型はこの領域で 22 型などの例外を除き)血清型と一致していることが多い。



2) ファイバーコード領域の塩基配列の決定と BLAST 解析(方法 5) : 細胞レセプターへの吸着する領域による型別.



3) ペントンベースコード領域の RGD ループコード領域を含む塩基配列の決定と BLAST 解析(方法 6) :

これらの組み合わせにより、ヘキソン、ファイバーおよびペントンのそれぞれの型別結果が一致するか否かを確認する。

新たな組換えアデノウイルスを報告する際の記載方法として、ヒトアデノウイルス Human adenovirus (HAdV) - ○型に加えて P: penton, H: hexon, F: fiber の型番を[ ]内につなげて書くことで、より正確な情報の提供が可能なることからこの報告様式を推奨する。

例：新型アデノウイルス 79 型を例に書くと、HAdV- [P11H34F11]である。

すでに新型として認められた型をこの方法で書くと次の表 1 のとおりとなる。NESID への報告では HAdV-53, HAdV-54 および 56 型のいずれかを選べばよい。

表 1. アデノウイルスの表記法

型	表記方法
HAdV-53	HAdV-53 [P37H22F8]
HAdV-54	HAdV-54 [P54H54F8]
HAdV-56	HAdV-56 [P9H15F9]

もし、難同定性のアデノウイルスが検出されたときは、上記の表 1 の右カラムの方法を参考に、HAdV- untyped [P○H○/F○]として NESID 報告の備考欄に記載して報告することを推奨する。これは HAdV-not typed として報告するよりはるかに情報量が多い。相談は国立感染症研究所 感染症疫学センター第四室 (国立感染症研究所 代表 : 03-5385-1111) で可能であり、必要に応じて行政検査として確定検査を行うことが可能である。

ヘキソンコード領域用の PCR 法【PCR 方法 1~3 および 7 の使い方】は、次のように使い分けることができるので参考にしていきたい。

- 1) 臨床検体からの高感度なアデノウイルスの検出が必要なとき ⇒ 方法 1
- 2) 臨床検体からダイレクトにゲノムを抽出して型別が必要なとき ⇒ 方法 2
- 3) 血清型を規定するヘキソンのループ領域 (1 ならびに 2)を使用した型別をするとき ⇒ 方法 3
- 4) 検体中のアデノウイルスのゲノムコピー数を調べる時 ⇒ 方法 7

**PCR\_方法 1 ヘキソン C4 領域（比較的変異が少ない領域）を使用する方法 (Echavarria M. et al. 1998)**

臨床検体からの高感度なアデノウイルスの検出が必要なときに用いる。C4 領域の 140bp(2752-2891)を増幅する。

反応液組成：SpeedSTAR® HS(タカラ)を用いた場合を例示すると次のとおりである (Fujimoto et al. 2009) .

**PCR の混合液（プライマーの塩基配列は表 2 に記載）**

試 薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	11.1
10xFast Buffer I	1.6
dNTP Mixture (2.5mM each)	1.3
フォワードプライマー(Hexon3) (10μM)	0.4
リバースプライマー (Hexon4) (10μM)	0.4
SpeedSTAR HS (5units/μL) (TaKaRa)	0.2
抽出ゲノム	1.0
計	16.0

**【増幅サイクル】:** 94°C 1min, [98°C 5sec, 53°C 5sec, 72°C 5sec]×40 cycles  
 最小検出感度は 10copy 以下であることを確認している。

Echavariia ら(1998 年)は、1998 年の論文で 2.5U の通常の Taq ポリメラーゼを用いて次の条件で PCR 反応を実施している。

**【増幅サイクル】:** 94°C 7min, [94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1.5min]×40 cycles

**PCR\_方法 2 ヘキソン C4 領域（比較的変異が少ない領域）を使用する方法**

(2009 年 7 月衛生微生物検査技術協議会時にアデノウイルスレファレンスセンターとして提示分) (Miura-Ochiai R et al. 2007 改変) C4 領域の 554bp(1906-2459)を増幅する。

この手法での検出感度は 1~10 の 2 乗 copy/reaction 程度である。

**PCR 2 の混合液 (プライマーの塩基配列は表 2 に記載)**

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	33.8
10xbuffer (Ex-Taq 用)	5.0
dNTP(2.5mM each)	4.0
フォワードプライマー (AdnU-S'2) (10μM)	2.5
リバースプライマー (AdnU-A2) (10μM)	2.5
Ex-Taq Hot Start version (TaKaRa) (5U/μL)	0.2
抽出ゲノム	2.0
計	50.0

使用機器：通常のサーマルサイクラー

**[増幅サイクル]:** 94°C 3 min, [94°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 2 min]×40 cycles, 72°C 5 min

**シーケンス反応**

554bp の増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決定する。このうち 350bp の塩基配列をアデノウイルスレファレンスセンターが配布している塩基配列との比較あるいは BLAST によって型別する。この 350 塩基をもとに系統樹を書くと次の図 3 のとおりである。

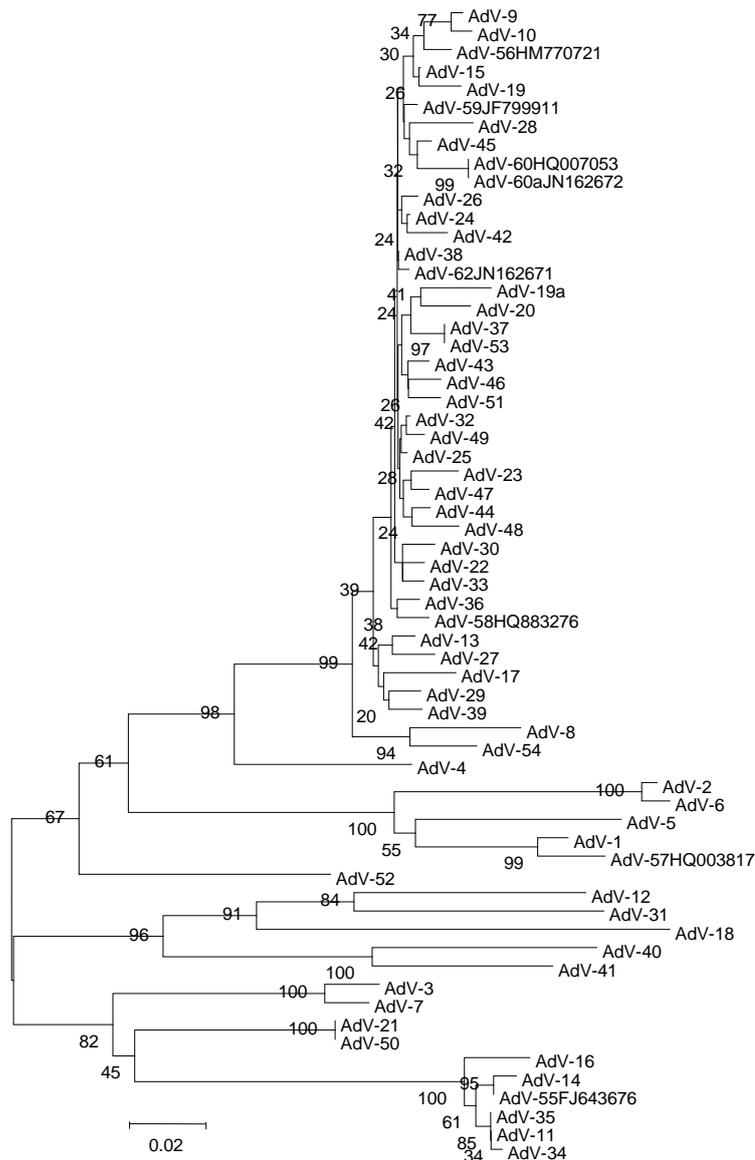


図 3. PCR その 2 によるヘキソン・コンサーブド領域増幅産物の系統解析

11 型と 35 型, 21 型と 50 型, および 37 型と 53 型は区別できない欠点を持つ. 57 型以降も参考のため含めた

(説明)

PCR その 2(Miura-Ochiai et al. 2007)で, アデノウイルス 11 型と 35 型が区別できない理由はヘキシソンの 1760 塩基目からヘキシソンの末端まで 11 型と 35 型が同じであるためである. もっと 5'側の塩基配列を調べれば, 鑑別が可能である.

次の図は, アデノウイルスヘキソン領域をアデノウイルス 11 型と, 34 および 35 型で SimPlot 解析により比較したものである. これら 3 つの型は塩基配列の類似性が高く, 1,760 塩基からは 11 型と 35 型は同じ配列であるため, 図 4 で 35 型の Similarity は 1,760 塩基以降, 1.0

である。

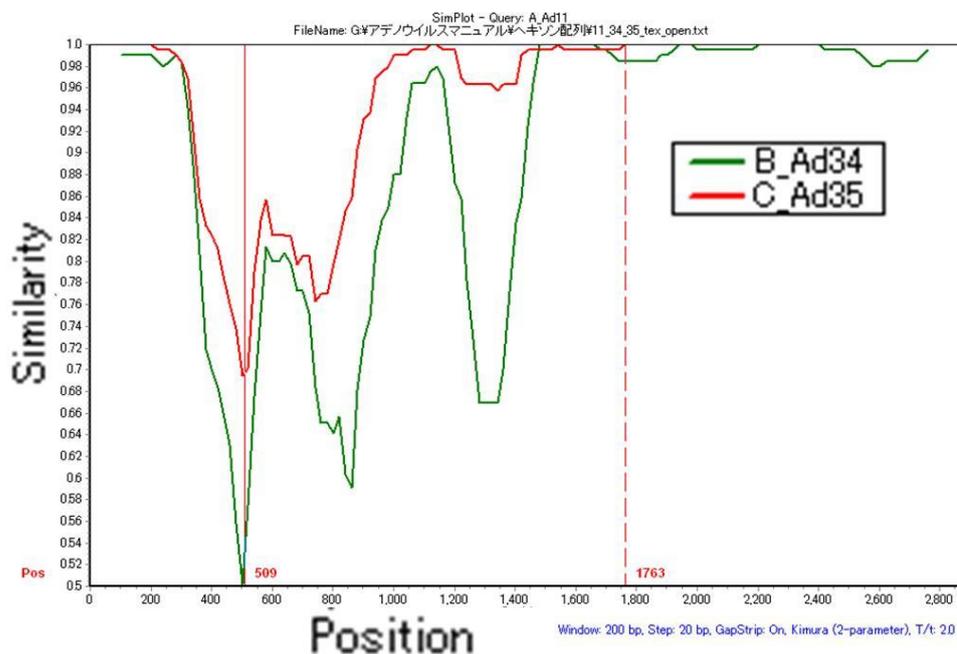


図 4. アデノウイルス 11, 34 および 35 型の SimPlot 解析

同様に、アデノウイルス 21 と 50 を区別できないのは、次の図 5 のとおりアデノウイルス 21 と 50 型が 1490 塩基目から同じであるためである。

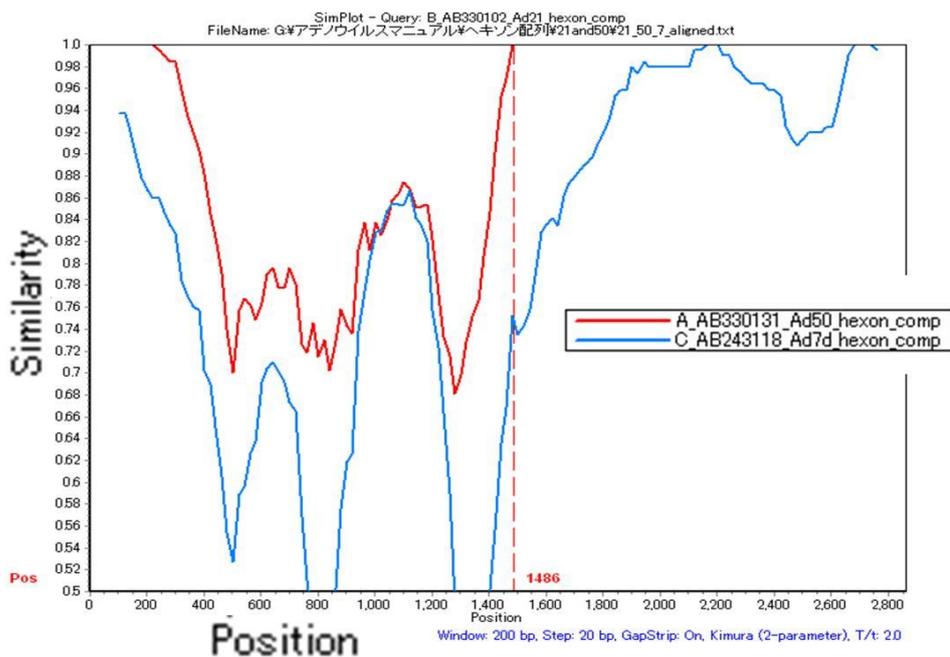


図 5. アデノウイルス 7 型, 21 型, 50 型の Similarity 解析

37 型と 53 型に関しても C4 領域において Similarity が高く鑑別ができない。  
 全ての例を示すことはできないので、これらの例を示すにとどめる。

**3) PCR\_方法 3 中和決定領域とされるヘキソンのループ 1 および 2 コード領域を含む領域を使用する方法。**

ヘキソン全長(約 2.8Kbp)を 1st PCR で増幅し, 2nd PCR でヘキソンのループ 1 および 2 を含む約 1.8kbp を増幅する方法である(マニュアル初版 p.37-42), (Takeuchi et al. 1999).  
 ヘキソンループ 1 領域およびループ 2 領域の参照塩基配列は平成 29 年度 (2017 年) 中に配布する。方法 3 は増幅配列が長く、完全長配列が難しい場合があるので、第 4 版で方法 3 を改訂する予定である。

**PCR 方法 3 の 1st PCR の混合液 (プライマーの塩基配列は表 2 に記載)**

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	9.8
10xGC buffer I (5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	2.0
dNTP(each 25mM)	1.0
フォワードプライマー (Hx5-1) (10μM)	2.5
リバースプライマー (HX3-1) (10μM)	2.5
LA Taq (5U/ μL) (TaKaRa)	0.2
抽出ゲノム	2.0
計	20

アデノウイルス 3 型の場合, HX5-1 および HX3-1 の代わりに

Hx5-NIID: 5'- ATGGCTACCCCTTCGATGATGCCCAAT (ヘキソン領域 1~28bp)

Hx3-NIID: 5'-CTTATGTGGTGGCGTTGCCGGCCGAGAACGG (31bp ; ヘキソン領域 2,806bp まで)を用いて 2806bp(アデノウイルス 3 型の場合)の増幅が見られた(Fujimoto et al. 2008).

**PCR 方法 3 の 2nd PCR の混合液 (プライマーの塩基配列は表 2 に記載)**

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	9.8
10xbuffer (Ex-Taq 用)	2.0
dNTP(2.5mM each)	1.0
フォワードプライマー (Hx5-3) (10μM)	2.5
リバースプライマー (Hx3-4) (10μM)	2.5
Ex-Taq (5U/μL)	0.2

1st PCR 産物	2.0
計	20.0

#### 4) PCR\_方法 4. ループ 1 領域による PCR-sequencing

ループ 1 および 2 を用いる前述の PCR\_方法 3 は、感度があまり高くない欠点を持つ。この方法 4 は、ループ 1 コード領域に着目して下記のプライマーを用い、PCR ならびにダイレクトシーケンス、BLAST 解析を行うことにより感度よく種に関係なく多くのアデノウイルスの型別をすることが可能である。(Fujimoto and Matsushima et al. 2012)

#### PCR 方法 4 の 1st PCR の混合液 (プライマーの塩基配列は表 1 に記載)

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	25.0
5xGXL buffer (5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	10.0
dNTP (2.5mM)	4.0
フォワードプライマー (HX5-3) (10μM)	2.5
リバースプライマー (HX3-4) (10μM)	2.5
GXL DNA polymerase (1.25U/ μL) (TaKaRa)	1.0
抽出ゲノム	5.0
計	50

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて、次のプライマーおよび温度条件でおこなう。

[増幅サイクル]: [98°C 10 ~30sec, 55°C 30 sec, 68°C 2min ]× 40 cycle, 68°C 7min  
(denature の時間はサーマルサイクラーにより最適な時間を確認すること)

シーケンス用反応は

Ad-hexNUF 5'- AACAAARTTYAGRAAYCCCAC

S52 5'-CCCATGTTGCCAGTGCTGTTGTARTACA

を用いて、通常の方法(サンガー法)で塩基配列を決定する (Takeuchi et al. 1999 を改良).

#### 5. PCR\_方法 5. ファイバーコード領域による PCR-sequencing

種特異的なファイバー用マルチプレックス PCR

6 種類の種のファイバーの塩基配列に特異的なプライマー(12 種類, 表 1)を同一チューブ内に混合してマルチプレックス PCR を実施する(Xu W et al. 2000).

### PCR 方法 5 の PCR の混合液

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	24.0
5xGXL buffer (5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	10.0
dNTP (2.5mM)	4.0
フォワードプライマー(AdA1, AdB1, AdC1, AdD1, AdE1, AdF1) (各 50μM)	各 0.5 (total 3)
リバースプライマー (AdA2, AdB2, AdC2, AdD2, AdE2, AdF2) (各 50μM)	各 0.5 (total 3)
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25U/ μL) (TaKaRa)	1.0
抽出ゲノム	5.0
計	50

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて,  
 [98°C 10~30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 2min ]x 40 cycle, 68°C 7min  
 で増幅可能であった。

(denature の時間はサーマルサイクラーにより最適な時間を確認すること)

(Xu W らは r-Taq を用いて,

94°C 5m, [94°C 1m, 54°C 45sec, 72°C 2min]x30 cycle, 72°C 5min)

さらにこれらのプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行いファイバーコード領域の遺伝子配列を決定した後, BLAST 解析を行うことによる型別も可能である。

### 6. PCR\_方法 6 ペントンベース コード領域による PCR-sequencing

この方法は, ペントンコード領域内の変異領域である RGD loop に着目して PCR ならびにダイレクトシーケンス, BLAST 解析をすることにより型別を行う. 下記のプライマーは種に関係なく多くのアデノウイルスの型同定に使用できる(Fujimoto and Matsushima et al. 2012).

### PCR 方法 6 の 1st PCR の混合液 (プライマーの塩基配列は表 1 に記載)

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	25.0
5xGXL buffer (5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	10.0
dNTP (2.5mM)	4.0
フォワードプライマー (Ad-penUF) (10μM)	2.5
リバースプライマー (Ad-penUR) (10μM)	2.5

GXL DNA polymerase (1.25U/ $\mu$ L) (TaKaRa)	1.0
抽出ゲノム	5.0
計	50

PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて、次のプライマーおよび温度条件でおこなう。

**[増幅サイクル]:** [98°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 2min ] $\times$  40 cycle, 68°C 7min

シーケンス反応は、

Ad-penNUF : 5'- GGNTGCGGVGTDGAYTTYAC-3'

Ad-penNUR : 5'- CGRAARGTBACNGGRTCTTGCAT-3'

を用いた通常の方法(サンガー法)でおこなう。

(注意点) 新型アデノウイルスである 53 型は方法 4 ならびに方法 5, 方法 6 を用いて BLAST 解析を行うと

- 1) ヘキソンコード領域では 53 型ならびに 22 型,
  - 2) ペントンベースコード領域では 53 型ならびに 37 型,
  - 3) ファイバーコード領域では 53 型ならびに 8 型の一致率が高く上位に表示される。
- 54 型は同様に、ヘキソンコード領域では 54 型, ペントンベースコード領域では 54 型, ファイバーコード領域では 54 型ならびに 8 型の一致率が高く上位に表示される。
- 一方, 56 型はヘキソンコード領域では 56 型ならびに 15 型, 29 型, ペントンベースコード領域では 56 型ならびに 9 型, ファイバーコード領域では 56 型ならびに 9 型の一致率が高く上位に表示される。つまり検出したアデノウイルスがリコンビナントアデノウイルスである場合は BLAST 解析の結果, ヘキソンコード領域, ペントンベースコード領域ならびにファイバーコード領域でそれぞれ異なるアデノウイルスのタイプが上位に示されることになる。

## 7. PCR\_方法7 アデノウイルス用リアルタイム PCR (Watanabe et al, 2006)

プライマーは方法 1 と同じ。

リアルタイム PCR は、通常の ABI PRISM 7900 HT (ABI), Rotor-Gene(QIAGEN)および Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System(TaKaRa)などを用いる。

試薬は SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いたインターカレート法で実施する。

アデノウイルスのリアルタイム PCR の混合液

試 薬	1 検体あたりの使用量 ( $\mu$ l)
遺伝子解析用蒸留水	9.5
SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (TaKaRa) (2xconc.)	12.5
フォワードプライマー (Hexon3) (10 $\mu$ M)	0.5
リバースプライマー (Hexon4) (10 $\mu$ M)	0.5
抽出ゲノム (< 100 ng)	2
計	25

**[増幅サイクル]:**

95°C 10sec, [95°C 5sec, 60°C 30sec]x40, 95°C 15sec, 60°C 30sec, 95°C 15sec  
(Thermal Cycler Dice® Real Time System(TaKaRa)を使用時)

(参考 : 元の論文での温度サイクルは, [94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1.5min]x40 cycles,  
Watanabe et al. 2005)

陽性コントロール用プラスミドを 10 倍階段希釈して検量線を引き, それにより定量をする.

**表 2 アデノウイルスに使用するプライマー 一覧表**

プライマー名	塩基配列 (5'-3')	極性	文献	方法
Hexon3	GACATGACTTTCGAGGTCGATCCCATGGA	+	Echavarria M. et al. 1998	1, 7
Hexon4	CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA	-		
AdnU-S' 2	TTC CCC ATG GCN CAC AAY AC	+	Miura- Ochiai R et al. 2007	2-1
AdnU-A2	TGC CKR CTC ATR GGC TGR AAG TT	-		
1st	AAGATGGCCACCCCCTCGATGATGCCGAGT CACTTATGTGGTGGCGTTGCCGGCCGAGAAC GG	+	Takeuchi et al. 2000	3
HX5-1		-		
HX3-1	CACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTA GTGTTGTGAGCCATGGGAAGAAGGTGGC	+		
2nd		-		
HX5-3	CACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTA GTGTTGTGAGCCATGGGAAGAAGGTGGC	+		
HX3-4		-		

Hx5-NIID Hx3-NIID	ATGGCTACCCCTTCGATGATGCCCAAT CTTATGTGGTGGCGTTGCCGGCCGAGAACGG	+ -	Fujimoto et al. 2008	3'
1st HX5-3 HX3-4	CACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTA GTGTTGTGAGCCATGGGGAAGAAGGTGGC	+ -	Takeuchi et al. 1999	4
Sequence 用 Ad-hexNUF S52	AACAARTTYAGRAAYCCCAC CCCATGTTGCCAGTGCTGTTGTARTACA	+ -	Fujimoto and Matsushima et al. 2012	4
A 種 AdA1 AdA2	GCTGAAGAAMCWGAAGAAAATGA CRTTTGGTCTAGGGTAAGCAC	+ -	Xu W et al. 2000	5
B 種 AdB1 AdB2	TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT	+ -	Xu W et al. 2000	5
C 種 AdC1 AdC2	TATTCAGCATCACCTCCTTTCC AAGCTATGTGGTGGTGGGGC	+ -	Fujimoto and Matsushima et al. 2012	6
D 種 AdD1 AdD2	GATGTCAAATTCCTGGTCCAC TACCCGTGCTGGTGTAAAAATC	+ -		
E 種 AdE1 AdE2	TCCCTACGATGCAGACAACG AGTGCCATCTATGCTATCTCC	+ -		
F 種 AdF1 AdF2	ACTTAATGCTGACACGGGCAC TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	+ -		

1st Ad-penUF	CARAAYGAYCACAGCAACTT	+		
Ad-penUR	GCRGGMACGTTTTCACTRACGGT	-		
Sequence 用 Ad-penNUF	GGNTGCGGVGTDGAYTTYAC	+	Fujimoto and Matsushim a et al. 2012	6
Ad-penNUR	CGRAARGTBACNGGRTCTTGCAT	-		

上記の塩基詳細は次のとおり.

A	B	C	D	G	H
adenine	(CGT)	cytosine	(AGT)	guanine	(ACT)
K	M	N	R	S	T
(GT)	(AC)	(ACGT)	(AG)	(CG)	thymine
V	W	Y	U	I	
(ACG)	(AT)	(CT)	uridine	inosine	

表 3 使用するプライマーの組み合わせ

PCR	フォワードプライマー/リバー スプライマー (プローブ)	増幅サイズ (bp)	備考
方法 1	Hexon3/ Hexon4	140	ヘキソン C4 領 域(高感度検出)
方法 2	AdnU-S' 2/ AdnU-A2	554	ヘキソン C4 領 域(型別用)
方法 3 1st PCR 2nd PCR	HX5-1/ HX3-1 HX5-3/ HX3-4	約 2,800 約 1,800	ヘキソン(ループ 1 およびループ 2 を 含む)領域 (型別 用)
方法 3' 1st PCR	Hx5-NIID/ Hx3-NIID	約 2,800	同上. アデノウ イルス 3 型
方法 4 1st PCR	HX5-3/HX3-4	約 1,800	ヘキソンループ 1 領域

Sequence 用プライマー	Ad-hexNUF/S52	約 880	
方法 5			ファイバー遺伝子
A 種	AdA1/ AdA2	1444-1537	
B 種	AdB1/ AdB2	670-772	
C 種	AdC1/ AdC2	1988-2000	
D 種	AdD1/ AdD2	1205-1221	
E 種	AdE1/ AdE2	967	
F 種	AdF1/ AdF2	541-586	
方法 6			ペントンベース コード領域
1st PCR	Ad-penUF/ Ad-penUR	約 1,200	
Sequence 用プライマー	Ad-penNUF/ Ad-penNUR	約 500	
方法 7			(方法 1 と同)
Real time PCR	Hexon3/ Hexon4	140	

## VI. アデノウイルスのリコンビナント (組換え) 開始点の同定

現在, 新型アデノウイルスとして報告されているアデノウイルスは, 種内の異なった型間での組み換えを起こしているため, その解析法を以下に示す.

(Lole KS. 1999, Salminen MO. 1995)

リコンビナント開始点を同定する方法として, **Simplot** 解析ならびに **Bootscan** 解析が用いられる. **Simplot** 解析はある長さの遺伝子領域を短い分節にして均等に区切り, 区切られた分節ごとの解析対象の塩基配列 (**Query sequence**) と既知の塩基配列 (**Reference sequence**) 間の遺伝的距離を調べるために用いられる. 一方, **Bootscan** 解析は同様にして短く区切られた分節ごとの **Query sequence** と **Reference sequence** との系統関係を調べるために用いられる. 系統樹解析では解析に使用した遺伝子領域の全領域を用いて遺伝的距離を算出することになるため, その領域でリコンビナントが引き起こされている場合には正確に系統関係を図示することができない. ここでは, 両解析用のフリーソフト **Simplot 3.5.1** (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>) の解析方法を説明する. このフリーソフトは Windows 用の解析ソフトである.

## 1. 解析方法

- 1) DNASIS, MEGA などのマルチプルアライメント機能のあるソフトウェアを用いて、解析に用いる各配列についてアライメント解析をし、5'末端側から 3'末端側までの塩基をそろえておく.
- 2) Text ファイルで下記のように FASTA 形式でアライメントされた各配列を書き込み保存する.

>Virus Name (1)

ATGTACGTCGATCATG . . .

>Virus Name (2)

ATGCGTACTCGTACTA . . .

>Virus Name (3)

ATGACACATGATCAGC . . .

- 3) Simplot のアイコンをダブルクリックしアプリケーションを立ち上げる.
- 4) SeqPage のタブの画面であることを確認して Use first character to identify groups をクリックする.
- 5) Use first N characters to identify groups の部分を選択し、解析に使用する group 名の文字数の最小値を入れて OK をクリックする.  
例) 解析に使用する group 名が HAdV-A12, HAdV-A18, HAdV-A31, Novel virus の場合、最小文字数は 8 となる.
- 6) SeqPage のタブの画面で File→Open をクリックし、作成した Text ファイルを開く.  
以下 (I), (II), (III) に従う.

### (I) Simplot 解析を行う場合

- (1) Simplot のタブをクリックする.
- (2) Commands→Query を選択し、解析対象にしたい塩基配列の group を選ぶ.
- (3) 右上にある Start Scan をクリックすると結果が表示される. 図のように Similarity の最も高い group が入れ替わっている塩基の位置がリコンビナントの引き起こされているおおよその位置となる (図 7).

※ 横軸は塩基の位置、縦軸は Similarity (類似度) を表している. パラメーターは Sliding Window Size, Step (plot 間の塩基数), Gapstrip (アライメント時に認められる Gap を遺伝的距離の計算に省くか否か), 遺伝的距離の算出に用いられたモデルなどがある.

(II) **Bootscan** 解析を行う場合

- (1) **Bootscan** のタブをクリックする.
- (2) **Commands**→**Query** を選択し, 解析対象にしたい塩基配列の **group** を選ぶ.
- (3) 右上にある **Start Scan** をクリックすると結果が表示される. 図のように **% permuted tree** の最も高い **group** が入れ替わっている塩基の位置がリコンビナントの引き起こされているおおよその位置となる (図 8) .

※ 横軸は塩基の位置, 縦軸は **% Permuted tree (Bootstrap 値; 系統関係の信頼度を表す数値)** を表している. パラメーターは **Sliding Window Size**, **Step (plot 間の塩基数)**, **Gapstrip** (アライメント時に認められる **Gap** を遺伝的距離の計算に省くか否か), **Replicates (Bootstrap resampling の反復回数)**, 遺伝的距離の算出ならびに樹形作成に用いられたモデルなどがある.

(III) **Informative sites** 解析 (解析する遺伝子領域における **Query sequence** の **informative sites** (4 つの塩基配列の中で **Query sequence** とある一つの **Reference sequence** が共通で残り 2 つの **Reference sequence** が **Query sequence** と異なる塩基を持つ位置のこと) を調べることでリコンビナントの位置を特定する) を行う場合

- (1) **Seq Page** のタブの画面の右下の **For informative sites analysis** の下に **Query sequence (Query)**, **Query sequence** においてリコンビナントの関係の可能性のある 2 つの **Reference sequence (Ref1** ならびに **Ref2)** および **Query sequence** と最も系統関係が離れている **Reference sequence (Other)** をそれぞれ選択する.
- (2) **FindSites** のタブをクリックし, **informative sites** の塩基の位置ならびにそれぞれの **informative sites** における **Query sequence** と一致する **Reference sequence** の **group** と塩基を確認する. このとき, 一致する **Reference sequence** の **group** が移り変わっていると見られる **informative sites** の塩基位置の間がリコンビナント開始点の可能性のある場所となる (図 9; 赤線の上下で **Query sequence** と一致する **Reference sequence** の **group** が移り変わっているので赤線の塩基の位置の間がリコンビナントの開始点の可能性のある場所となる).
- (3) (I), (II) に従い **Simplot** または **Bootscan** 解析をし, 表を図示した後, リコンビナント開始点の可能性のある塩基位置を横軸の目盛りに沿って表内でダブルクリックする. すると赤い線が表れて区切られ, 区切られた範囲内の各 3 つの **Reference sequence** における **informative sites** の数と線を挟んでいる 2 つの領域での  $\chi^2$  検定の結果ならびに引かれた線の塩基の位置が表示される. 引かれた線は右上の矢印マークをクリックしていくと移動させることができるので

各  $\chi^2$  検定結果の値が最大値となる場所に線を移動させて  $\chi^2$  検定を行う。その結果、有意差が認められれば線が引かれている塩基の位置はリコンビナント開始点であると判定することができる (図 7)。

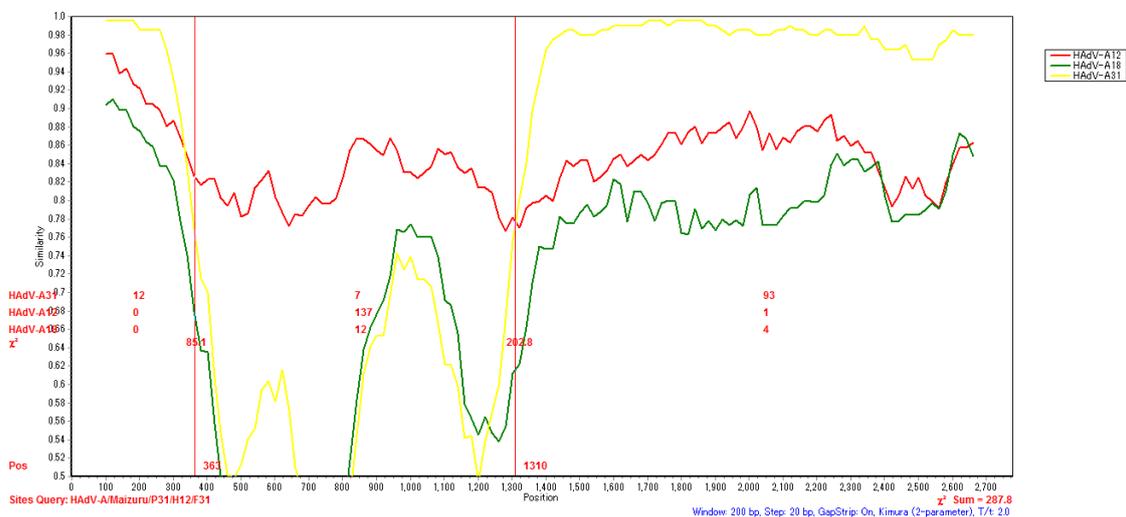


図 7 A 種リコンビナントアデノウイルスにおける Simplot 解析 (Hexon 領域)

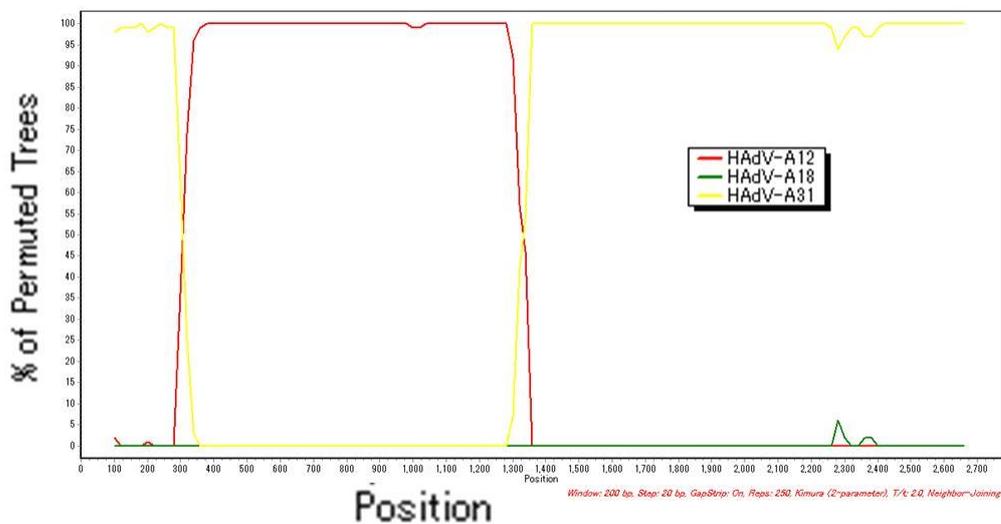


図 8 A 種リコンビナントアデノウイルスにおける Bootscan 解析 (Hexon 領域)

図 9 A 種リコンビナントアデノウイルスにおける Informative sites 解析 (Hexon 領)

Using the letters A, B, C, and D:  
 A= HAdV-A/Mairuru/P31/H12/F31  
 B= HAdV-A31  
 C= HAdV-A12  
 D= HAdV-A18

The following sites support the indicated trees:  
 Totalsites: 266

pos	A	B	C	D	tree#	pos	A	B	C	D	tree#	pos	A	B	C	D	tree#	pos	A	B	C	D	tree#	pos	A	B	C	D	tree#
57	C	C	T	T	1	621	A	G	A	G	2	906	A	C	A	C	2	1374	G	G	A	A	1	2241	T	T	C	C	1
138	G	G	A	A	1	627	A	A	G	G	1	918	C	T	T	C	3	1383	C	C	T	T	1	2244	T	T	C	C	1
168	C	C	T	T	1	628	C	A	C	A	2	936	C	T	T	C	3	1389	G	G	A	A	1	2262	C	T	T	C	3
177	C	C	T	T	1	630	A	C	A	C	2	948	A	T	A	T	2	1404	A	A	T	T	1	2325	C	C	T	T	1
190	T	T	C	C	1	637	G	C	G	C	2	960	T	A	T	A	2	1407	A	A	T	T	1	2355	A	G	G	A	3
234	T	T	C	C	1	643	C	T	C	T	2	975	A	G	A	G	2	1440	C	C	T	T	1	2358	G	G	C	C	1
267	G	G	T	T	1	657	C	G	C	G	2	990	C	T	C	T	2	1448	T	T	C	C	1	2361	T	T	C	C	1
273	T	T	C	C	1	663	T	T	C	C	1	996	A	G	A	G	2	1449	T	T	C	C	1	2379	A	A	G	G	1
306	T	T	C	C	1	670	C	G	C	G	2	1014	A	G	A	G	2	1452	C	C	G	G	1	2382	C	C	T	T	1
318	G	G	A	A	1	675	C	A	C	A	2	1035	G	A	G	A	2	1455	T	T	G	G	1	2385	G	G	A	A	1
354	T	T	A	A	1	678	C	T	C	T	2	1036	T	C	T	C	2	1461	A	A	G	G	1	2403	T	T	C	C	1
363	T	T	C	C	1	684	A	A	C	C	1	1038	A	T	A	T	2	1470	C	C	T	T	1	2421	T	T	C	C	1
381	A	G	A	G	2	696	C	A	C	A	2	1044	A	G	G	A	3	1479	T	T	C	C	1	2430	C	C	G	G	1
390	T	C	T	C	2	699	G	A	G	A	2	1064	C	G	C	G	2	1485	G	G	T	T	1	2472	T	A	A	T	3
397	T	A	T	A	2	700	G	A	G	A	2	1092	A	C	A	C	2	1497	T	T	A	A	1	2481	A	C	A	C	2
398	C	G	C	G	2	706	A	G	A	G	2	1101	T	C	T	C	2	1554	T	T	C	C	1	2487	A	A	G	G	1
399	A	C	A	C	2	718	C	A	C	A	2	1107	C	T	C	T	2	1557	G	G	A	A	1	2488	C	C	G	G	1
402	G	A	A	G	3	720	T	G	T	G	2	1113	T	C	C	T	3	1569	G	G	A	A	1	2494	G	G	A	A	1
406	T	C	T	C	2	722	G	G	A	A	1	1116	T	G	T	G	2	1575	C	C	T	T	1	2502	A	A	G	G	1
407	C	T	C	T	2	723	G	A	G	A	2	1119	C	A	C	A	2	1581	G	A	A	G	3	2517	T	T	C	C	1
409	G	A	G	A	2	731	A	C	A	C	2	1128	G	A	G	A	2	1590	G	G	T	T	1	2520	C	C	T	T	1
413	T	C	T	C	2	735	A	C	A	C	2	1143	G	A	G	A	2	1605	A	A	G	G	1	2538	T	T	C	C	1
421	A	G	A	G	2	739	A	G	A	G	2	1146	T	C	T	C	2	1608	T	T	G	G	1	2562	A	A	T	T	1
426	T	C	T	C	2	740	A	C	A	C	2	1155	A	C	A	C	2	1620	C	C	T	T	1	2583	C	C	T	T	1
431	T	C	T	C	2	749	G	A	G	A	2	1161	T	C	T	C	2	1623	T	T	C	C	1	2619	G	G	T	T	1
433	A	C	A	C	2	750	C	T	C	T	2	1174	A	G	A	G	2	1628	A	A	G	G	1	2625	T	T	C	C	1
447	G	A	G	A	2	754	C	A	C	A	2	1179	A	T	A	T	2	1629	G	G	A	A	1	2637	A	A	G	G	1
453	G	T	G	T	2	756	C	T	C	T	2	1182	G	A	A	G	3	1650	G	G	T	T	1	2640	T	T	G	G	1
456	T	C	T	C	2	757	T	G	T	G	2	1187	A	T	A	T	2	1665	G	G	A	A	1	2643	C	C	A	A	1
457	C	A	C	A	2	759	C	T	C	T	2	1189	A	G	A	G	2	1674	C	C	T	T	1	2646	C	C	A	A	1
459	T	A	T	A	2	760	T	C	T	C	2	1191	A	G	A	G	2	1723	A	A	C	C	1	2721	A	A	A	C	1
460	A	G	A	G	2	777	C	T	T	C	3	1195	A	T	A	T	2	1725	A	A	G	G	1	2739	T	T	C	C	1
475	G	A	G	A	2	779	C	G	C	G	2	1206	C	T	C	T	2	1776	C	C	T	T	1	2748	A	A	G	G	1
476	C	A	C	A	2	780	T	C	C	T	3	1207	A	G	A	G	2	1791	C	C	T	T	1	2769	C	C	T	T	1
477	C	A	C	A	2	783	A	G	A	G	2	1212	G	A	G	A	2	1809	G	G	A	A	1						
486	T	C	T	C	2	799	A	G	A	G	2	1218	C	T	T	C	3	1819	C	C	T	T	1						
490	A	C	A	C	2	800	T	C	T	C	2	1219	A	G	A	G	2	1822	C	C	A	A	1						
502	G	A	G	A	2	813	T	C	T	C	2	1225	G	A	G	A	2	1836	T	T	C	C	1						
504	T	C	C	T	3	814	C	A	C	A	2	1226	G	A	G	A	2	1866	G	G	T	T	1						
511	C	A	C	A	2	819	G	T	G	T	2	1242	T	A	T	A	2	1869	G	G	A	A	1						
514	G	C	G	C	2	834	T	A	T	A	2	1243	G	A	G	A	2	1876	T	T	C	C	1						
516	A	C	A	C	2	838	A	G	A	G	2	1244	C	A	C	A	2	1887	T	T	C	C	1						
517	G	C	G	C	2	839	A	C	A	C	2	1248	C	T	C	T	2	1896	T	T	C	C	1						
520	G	C	G	C	2	842	G	A	G	A	2	1249	G	G	A	A	1	1941	C	C	A	A	1						
521	C	A	C	A	2	843	A	C	A	C	2	1259	G	C	G	C	2	1944	C	C	T	T	1						
522	G	A	G	A	2	846	A	T	A	T	2	1265	A	C	C	A	3	1968	T	T	A	A	1						
525	G	A	G	A	2	850	G	A	G	A	2	1269	C	T	C	T	2	1992	T	T	G	G	1						
546	C	C	T	T	1	851	C	G	C	G	2	1277	G	C	G	C	2	2040	C	C	T	T	1						
555	G	A	G	A	2	858	G	A	G	A	2	1281	T	A	T	A	2	2041	C	C	T	T	1						
558	G	T	G	T	2	859	T	C	T	C	2	1287	C	T	T	C	3	2125	A	A	C	C	1						
569	C	A	C	A	2	860	C	T	C	T	2	1291	G	T	G	T	2	2127	G	G	T	T	1						
574	G	C	G	C	2	861	C	C	G	G	1	1292	C	T	C	T	2	2128	C	C	T	T	1						
583	A	G	A	G	2	865	T	C	T	C	2	1335	T	T	C	C	1	2131	T	T	C	C	1						
597	A	C	A	C	2	867	G	A	G	A	2	1336	C	C	T	T	1	2157	A	A	G	G	1						
602	T	C	T	C	2	873	G	A	G	A	2	1341	T	T	C	C	1	2166	A	A	G	G	1						
603	T	A	T	A	2	885	A	T	A	T	2	1353	G	C	C	C	1	2169	C	C	T	T	1						
611	G	C	G	C	2	888	T	C	T	C	2	1354	C	C	T	T	1	2196	T	T	C	C	1						
620	C	T	C	T	2	892	G	C	G	C	2	1362	G	G	A	A	1	2205	C	C	T	T	1						

## 引用文献

Akiyoshi K, Suga T, Fukui K, Taniguchi K, Okabe N, Fujimoto T. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a nursery school in Kobe City, Japan in 2008. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(4):353-5.

Chroboczek J. et al: adenovirus fiber. The molecular repertoire of adenovirus I ,p.163-200. 1995.

Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol.* 2005 Oct; 79(20):12635-42. Erratum in: *J Virol.* 2006 Mar; 80(5):2586.

Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Charache P. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 1998 Nov;36(11):3323-6.

Fujimoto T, Hamamoto I, Taniguchi K, Chikahira M, Okabe N. Molecular epidemiology of adenovirus type 3 detected from 1994 to 2006 in Hyogo Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Mar;61(2):143-5.

Fujimoto T, Konagaya M, Enomoto M, Tsuboi K, Hashimoto K, Taniguchi K, Kodama T, Okabe N. Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan;63(1):31-5.

Fujimoto T, Matsushima Y, Shimizu H, Ishimaru Y, Kano A, Nakajima E, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N. A molecular epidemiologic study of human adenovirus type 8 isolates causing epidemic keratoconjunctivitis in Kawasaki city, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis.* 2012 May;65(3):260-3.

藤本嗣人, 榎本美貴, 小長谷昌未, 谷口清州 : フロックドスワブのアデノウイルス検体採取での有用性. *感染症誌* 83: 398~400, 2009.

池田義文, アデノウイルス性結膜炎(流行性角結膜炎, 咽頭結膜熱)の検査マニュアル第1版, 2001.

Lennette DA, Lennette ET, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 7th ed. p.180, 1995.

Lole KS, Bollinger RC, Parnjape RS, Gadkari D and Kulkarni SS. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* **73**:152-160

Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, Suzuki E, Ishiko H. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):958-67.

Nakamura M, Hirano E, Kowada K, Ishiguro F, Yamagishi Z, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, Fujimoto T. Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J Med Virol.* 2012 Jan;84(1):81-6.

Okada M, Ogawa T, Kubonoya H, Yoshizumi H, Shinozaki K. Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene. *Arch Virol.* 2007 Jan;152(1):1-9.

Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, Itoh N, Isobe K, Uchio E, Ohno S, Nakajima H, Hata K, Ishiko H. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1996 Sep;34(9):2113-6.

Salminen MO, Carr JK, Burke DS and McCutchan FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **11**:1423-1425.

Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, Ohno S. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1839-45.

Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, Yamanaka T, Kuniya Y et al. Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol.* 1999 June; 37(6): 2007–2009.

Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses

by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2000 Nov; 38(11):4114-20.

Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, Akiyoshi K, Ito M, Suga S, Komada Y. Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. Pediatr Int. 2005 Jun;47(3):286-91.

財団法人 日本公衆衛生協会：厚生省監修 微生物検査必携 ウイルス・クラミジア・リケッチア検査 第3版

## 執筆者

第三版（本稿）・・・第三版は第二版の間違いを修正し、2012年から2017年までの状況の変化を反映したものです。（赤字で示したところが修正点です）

## 執筆者

藤本嗣人，花岡希，小長谷昌未：

国立感染症研究所 感染症疫学センター

清水 英明，松島 勇紀，岡部信彦： 川崎市健康安全研究所

萩 美貴： 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター

秋吉 京子： 神戸市環境保健研究所

中村 雅子： 元福井県衛生環境研究センター

## 協力者

地区アデノウイルスレファレンスセンター（著者の川崎市健康安全研究所，福井県衛生環境研究センターに加え，新潟県保健環境科学研究所，東京都健康安全研究センター，大阪府立公衆衛生研究所，広島市衛生研究所，宮崎県衛生環境研究所）

## 謝辞

本マニュアルを作成するにあたり，日本アデノウイルス研究会（<http://www.adeno.org/>）の先生方とのご意見を内容に一部反映しております。この場を借りて，日本アデノウイルス研究会の先生方に深謝致します。さらに，多くの地方衛生研究所の先生方にご指導を賜り，深く感謝いたします。

引き続きご指導頂き，さらに良いマニュアルに改訂いたします。

\* 地方衛生研究所の先生方で間違い等、お気づきの点がございましたら、[fujimo-t@nih.go.jp](mailto:fujimo-t@nih.go.jp)までご連絡ください。