

病原体検出・検査マニュアル
腸管アデノウイルス
(感染性胃腸炎)

令和4(2022)年5月 Ver.2

【Ver.2】 Ver.1 からの主な修正点：リアルタイム PCR のプライマ
ーを F 種用に改変した。

本文に初版からの修正点を赤字で記載。

腸管アデノウイルス（アデノウイルス感染性胃腸炎）検査

マニュアル

ヒトアデノウイルス（アデノウイルス）は Family(科)*Adenoviridae*、Genus(属)*Mastadenovirus*に属し、A～Gの7つの Species(種) (*Human adenovirus A～G*) に分類されている。種ごとに引き起こす疾患が大まかに決まっている。乳幼児で感染性胃腸炎の約10%を占める主要な病原体のひとつである。胃腸炎の原因となるのは主にF種の40および41型である。A種の31型なども原因となることもある。アデノウイルスによる下痢は、3分の1で14日続き、症状が長いことが報告されている。

腸管アデノウイルス(アデノウイルス F 種)は感染患者の急性期糞便中に1グラムあたり10の6乗個以上のウイルス粒子が含まれている。

本マニュアルでは腸管アデノウイルス (F 種) の検査を中心に記載する。下痢症において検出アデノウイルスがF種、A種である場合に病原体として重要である。ある程度の割合でB種やC種などF種、A種以外が検出されることがあるが、下痢症の病原体としての意義は低いと考えられている。

小児においてアデノウイルスはノロウイルス、ロタウイルスとともに主要な感染性胃腸炎の病原体である。

アデノウイルスの種と疾患

表1 主なアデノウイルスの分類と疾患および主な型

種	疾患	型
A	感染性胃腸炎（下痢症）	12、18、31型
B1	急性呼吸器疾患（咽頭炎・肺炎、咽頭結膜熱など）	3、7型
B2	出血性膀胱炎、急性呼吸器疾患	11、34、35、型
C	急性呼吸器疾患（咽頭炎、扁桃炎など）	1、2、5、6型
D	流行性角結膜炎	8、37、53、54、56、64、85型
E	急性呼吸器疾患、流行性角結膜炎	4型
F	感染性胃腸炎（下痢症）	40、41型
G	感染性胃腸炎	52型

(ウイルスの性状、分類、遺伝子型)

アデノウイルス粒子はエンベロープ (envelope) をもたない、直径 70~90nm の正 20 面体構造を有し、その内側に線状の 2 本鎖 DNA を 1 本持つ。ウイルス構造蛋白質は 252 個のカプソメア(ウイルス粒子を構成しているタンパク質の微小単位)から成る。カプソメアは、20 面体の頂点 12 ヶ所にペントン(Penton)が位置し、それ以外の 240 個のカプソメアはヘキソン(Hexon)で、正 20 面体の面を構成する。ペントンはペントンベースおよびペントンベースから放射線状に突出しているファイバーから成る。これらのタンパク質のうちヘキソン蛋白、ファイバー蛋白に抗原決定基が存在し、前者は中和抗体、後者は赤血球凝集阻止 (HI)抗体として検出される。

(参考) 通常、下痢症に関与するアデノウイルス F 種 (40 および 41 型) のみは 2 種類のファイバー (ロングファイバーおよびショートファイバー) を持つ。米国で霊長類からジャンピングインフェクションでヒトに感染して下痢症を引き起こした 52 型も 2 種類のファイバーを持つ。マニュアルの検査においてショートファイバーは使用していない (下図)。

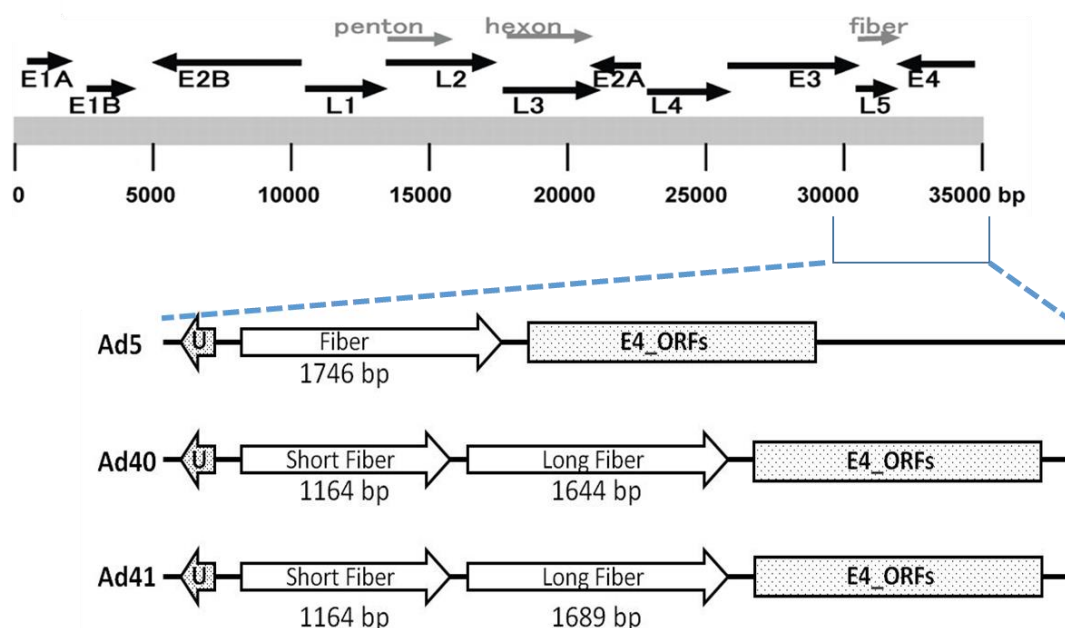


図 アデノウイルス F 種のゲノム

通常のアデノウイルス (図ではアデノウイルス 5 型) は一つのファイバーしか持っていないが、F 種 40 および 41 型は 2 種類のファイバー (通常のコアファイバーに加えて short fiber) を持つ。

疫学

1970年代に下痢症患者の急性期糞便について電子顕微鏡によるウイルス検出が多くなされ、しばしば大量のアデノウイルスが検出された。これらのウイルスは当時 HEp-2、HeLa などの株化細胞による組織培養法でのウイルス分離・増殖が困難で腸管アデノウイルスと呼称されていた。

その後、これらのアデノウイルスは Graham293 細胞、A549 細胞等の株化細胞による分離増殖が可能となり、2つの血清型が確認されて 40 型と 41 型(腸管アデノウイルス)に分類された。また A 種の 31 型は 1965 年に報告されたウイルスで、下痢症の原因となることがある。アデノウイルスは自然界での生存性が高いことから、糞便の水環境汚染の指標として用いられる場合がある¹⁾。

検査法

(1) 検査材料の準備とウイルスゲノムの抽出

1) 検査材料の採取および取り扱い、2) 10%糞便懸濁液の作製、3) ウイルスゲノムの抽出 については、「ノロウイルスの検査マニュアル」と同様に進めることが可能で推奨される。アデノウイルスはノロウイルスと異なって DNA ウイルスであるが、RNA 用のキット (DNase が入っていないもの) を用いて多くの場合は実施することが出来る。

そのため、胃腸炎患者の病原体検査にアデノウイルス検査を実施する場合、すでにノロウイルス検査等を実施した場合は別途アデノウイルス用 (DNA ウイルス) のゲノム抽出をすることは不要である (各施設で使用キットを確認しておくこと)。

(2) コンベンショナル PCR 法

以下に示す PCR 検査法は、PCR 産物の塩基配列を決定することにより、すべての種のアデノウイルスを検出することができる。アデノウイルスにおいては、複数の型が重複感染していることがある。配列解析が困難な場合等には、レファレンスセンター等へ問い合わせることも可能である。

現在、アデノウイルスの型別において組換えが多くみられることから、ヘキソン塩基配列のみならず、ペントンおよびファイバー領域の配列決定が必要となっている。しかし、F 種においては、今のところ組換え型が報告されていない。

そのため、F種の検出・同定には古典的なヘキソン部分配列を用いる方法が現在でも使用できる。F種においても組換え型が報告された場合、マニュアルを対応したものにアップデートする。試薬は TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) を用いた方法を例示する。

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
PCR 法 1 st PCR hex1deg hex2deg	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC CAGCACSCCICGRATGTCAA	+ -	Allard A. et al. J Clin Microbiol ²⁾ . 2001
2 nd PCR nehex3deg nehex4deg	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	+ -	
リアルタイム PCR 法* <F種に特化> Hexon3-Ad40-41 Hexon4-Ad40-41	GACATGACTTTTGAGGTSGAYCCCATGGA CGGCCGAGAACGGCGTACGSAGGTA	+ -	アデノウイルス レファレンスセンター
リアルタイム PCR 法# Hexon3 Hexon4	GACATGACTTTTCGAGGTTCGATCCCATGGA CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA	+ -	Echavarria M. et al. 1998 ³⁾

*F種を高感度で検出が可能だが、種と型の特定はできない。

#コンベンショナルな Realtime-PCR 法であり、ほぼすべてのアデノウイルスが高感度検出可能である (6)。今回、40, 41 型の検出感度が悪いことが明らかとなった。

表 3 1st PCR 法および 2nd PCR 法の PCR 混合液

試 薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
<i>Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	0.25
10 × <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus)	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
フォワードプライマー* (50μM)	0.5
リバースプライマー* (50μM)	0.5
遺伝子解析用蒸留水	37
抽出ゲノム	3.0
計	50

* : 表 2 に示したものを使用する。

反応条件

PCR の反応条件は、1st PCR、2nd PCR とも以下の条件とする。

94°C 3 分、[94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分]×35 サイクル、72°C 5 分

nested PCR を実施する場合は、1st PCR の産物を 10 分の 1 希釈したものを 3μl 用いて、1st PCR と同様に実施する。(通常はシングル PCR のみで nested PCR 不要)

増幅産物 : 1st PCR により 301 bp の増幅産物が得られる。

塩基配列の決定 : 1st PCR で陽性となった場合は、プライマー-hex1deg および hex2deg を用いてシーケンス検査を行う。それにより F 種であることの同定および 40 型か 41 型かの型別が可能である。

>Adeno40

GCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCC
CGGGCCTGGTGCAGTTTCGCCCGTGCCACCGATACCTACTTCAGCCTGGGGAACAAG
TTCAGAAACCCACCGTGGCTCCCACCCACGATGTAACACAGACAGGTTCGCAGCG
ACTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGCACCGCGAGGAAACCGCCTACTCTTACAAAG
TGCGCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGGGTTTTGGACATGGCCAGCACCTAC
TTTGACATCCGCGGCGTGCTG

>Adeno41

GCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTATCTGAGTCC
GGGCCTGGTGCAGTTTGGCCGCGCCACCGATACGTACTTCAGCCTGGGGAACAAGT

TCAGAAACCCCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTACAGCGA
 CTGACGCTGCGATTCTGTCCAGTCCGACCGCGAGGACACCGCTTATTCTTACAAAGTG
 CGCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGGGTGTGGACATGGCCAGTACCTACTTT
GACATCCGCGGCGTGTCTG

40 型および 41 型の PCR 増幅産物の塩基配列は上記のとおりである。41 型では、1 重線のアンダーラインを引いた 1 ケ所のみ、T ではなく C のこともある。四角で囲った部分は、1st PCR のプライマー領域である。2 重線のアンダーラインで示したのは、2nd PCR 用プライマーの領域である。

40および41型は301bp中に15ヶ所塩基配列の違いが見られる（プライマー領域では差が見られない）。下図は40および41型のアライメント結果である。

```

Adeno40      GCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCGGG 60
Adeno41      GCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTATCTGAGTCCGGG 60
*****

Adeno40      CCTGGTGCAGTTTCCCGTCCACCGATACCTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAA 120
Adeno41      CCTGGTGCAGTTTCCCGCGCCACCGATACGTAACCTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAA 120
*****

Adeno40      CCCCACCGTGGCTCCACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCCGAGCGACTGACGCTGCG 180
Adeno41      CCCCACCTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCCAGCGACTGACGCTGCG 180
*****

Adeno40      CTTGCGCCCGTCCGACCGGAGGAAACCGCCTACTCTTACAAAGTGGCGTTTACGCTGGC 240
Adeno41      ATTGCGCCAGTCCGACCGGAGGACACCGCTTATTCTTACAAAGTGGCGTTTACGCTGGC 240
.*****.*****.*****

Adeno40      CGTGGGCGACAACCGGGTTTTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGTCT 300
Adeno41      CGTGGGCGACAACCGGGTGTGGACATGGCCAGTACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGTCT 300
*****

Adeno40      G 301
Adeno41      G 301
*
  
```

Nested PCR における増幅産物の塩基配列（プライマーを除く）は、次の 120bp となる。

>Ad40_120bp

**GCCCGTGCCACCGATACCTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAACCCACCGT
 GGCTCCACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCCGAGCGACTGACGCTGCGCTTCG
 TGCCCGTC**

>Ad41_120bp

**GCCCGCGCCACCGATACGTAACCTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAACCCCACTGT
 GGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCCAGCGACTGACGCTGCGATTTCG
 TGCCAGTC**

この領域の塩基配列でも、BLAST 解析により 40 型および 41 型の同定が可能である。

アデノウイルスの系統樹解析に使用する標準株を表 4 に示した。

F 種以外の型別：

F 種以外の型であることは、BLAST 解析で判明する。その場合は「咽頭結膜熱・流行性角結膜熱検査マニュアル」にしたがって、ペントン、ヘキソン、ファイバー領域の配列決定により型別する。

表 4 アデノウイルスの系統樹解析に使用する主な標準株⁴⁾

血清型	標準株	アクセシオン番号	血清型	標準株	アクセシオン番号
HAdV-A					
HAdV-12	Huie	AB330093	HAdV-31	1315/63	AB330112
HAdV-B					
HAdV-3	G. B.	AB330084	HAdV-7	Gomen	AB330088
HAdV-11	Slobitski	AB330092	HAdV-14	de Wit	AB330095
HAdV-C					
HAdV-1	Ad. 71	AB330082	HAdV-2	Ad. 6	AB330083
HAdV-5	Ad. 75	AB330086	HAdV-6	Tonsil99	AB330087
HAdV-D					
HAdV-8	Trim	AB330089	HAdV-19p	587	AB330100
HAdV-37	G. W.	AB330118			
HAdV-E					
HAdV-4	RI-67	AB330085			
HAdV-F					
HAdV-40	Dugan	AB330121	HAdV-41	Taq	AB330122

PCR における注意点

本マニュアルは感染性胃腸炎のアデノウイルスを簡便に検出・同定することを主眼にしているため、F 種以外のアデノウイルスが想定される場合は「咽頭結膜熱・流行性角結膜熱

検査マニュアル」に示した PCR 法を使用すること。このマニュアルの手法により A~E についても検出は可能である。G 種は日本において検出されておらず、G 種が疑われる場合はレファレンスセンターに相談するのが良い。

(3) アデノウイルス用リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法は、通常の Applied Biosystems® 7500 (LIFE TECHNOLOGIES)、Rotor-Gene (QIAGEN)、LightCycler® 480 (Roche) および Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa) などを用いる。

試薬は TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) を用いたインターカーター法を例示する。

アデノウイルス F 種を高感度に検出できるリアルタイム PCR 法の混合液 (Thermal Cycler Dice の場合)

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	9.5
TB Green® Premix Ex Taq II (TaKaRa) (2×conc.)	12.5
フォワードプライマー (Hexon3-Ad40-41) (10μM)	0.5
リバープライマー (Hecxon4-Ad40-41) (10μM)	0.5
抽出ゲノム (< 100 ng)	2
計	25

プライマーは Hexon3-Ad40-41 と Hecxon4-Ad40-41 の組合せを用いる。

マニュアルの初版で示した Hexon-3 と Hexon-4 を用いた方法 (5) より高感度に検出が可能である。

● 種別・型別は出来ないので、本リアルタイム PCR が陽性になっても F 種 (40 または 41 型) の検出を示すわけでは無いことに注意すること。

[増幅サイクル]:

94°C 1 分 30 秒、95°C 30 秒、[95°C 5 秒、60°C 30 秒]×40、Dissociation or Melt curve.

判定：陽性、陰性コントロールの増幅曲線と融解曲線の確認による。

(4) アデノウイルスの分離同定

腸管アデノウイルスの分離は難しいが、培養細胞に臨床検体を接種することにより分離できる。分離に時間がかかる F 種には実用的でないが、簡単に記載する。

1) 器具

5%CO₂インキュベーター(培養温度 33-37 度)、オートクレーブ、細胞培養用フラスコ(25cm²、75cm²等)、24 穴、48 穴、96 穴マイクロプレート (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、M4655)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:Gibco 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、Graham293 細胞などが適している。

アデノウイルス F 種は増殖が遅く、2 週間おきの継代で 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。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、単層になる前の 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 25cm² (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 プレートには 1ml、48well プレートは 0.5ml、96well プレートは 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 2,000 回転で 20 分間~30 分間 (4°C) 遠心した上清をフィルター* (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 プレート : 100µl~200µl、48well プレート : 100µl、96well プレート : 50µl)。

CO₂ 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。

6) 分離ウイルスの同定

40 および 41 型に対する抗血清の入手は困難で培養に時間を要するので、遺伝子解析により同定する。その他の型で中和抗血清があるものは中和により血清型として同定できる。

文 献 :

1) Tong HI, Lu Y. Effective detection of human adenovirus in Hawaiian waters using enhanced PCR methods. Virol J. 2011 Feb 8; 8:57.

2) Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol. 2001 Feb;39(2):498-505.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Fujimoto T, Hanaoka N, Konagaya M, et al. Evaluation of a silver-amplified immunochromatography kit for adenoviral conjunctivitis. *J Med Virol.* 2019;91(6):1030-1035.

著者：

花岡希、高橋健一郎、藤本嗣人 国立感染症研究所（アデノウイルスレファレンスセンター世話人）

小川 裕貴 （青森県環境保健センター）

渡部 香 （新潟県保健環境科学研究所）

長谷川 道弥 （東京都健康安全研究センター）

清水 英明 （川崎市健康安全研究所）

廣井 聡 （大阪健康安全基盤研究所 微生物部ウイルス課）

藤井 慶樹 （広島市衛生研究所 生物科学部）

高橋 美帆（福井県衛生環境研究センター）

八尋 俊輔 （熊本県保健環境科学研究所）

全国アデノウイルス地区レファレンスセンター