

咽頭結膜熱・流行性角結膜炎

検査・診断マニュアル

(第4版)

令和5年1月

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

地方衛生研究所

咽頭結膜熱・流行性角結膜炎の病原診断マニュアル

目次

はじめに

1. アデノウイルスの種と病原性および型について
2. アデノウイルスの構造と機能
3. 検体採取に関して
4. アデノウイルスの分離
5. および中和反応
6. アデノウイルス核酸同定検査法
7. 検査目的と知りたいことの範囲
8. 器具および試薬
9. ウイルスゲノム抽出
10. 【方法 1】 汎アデノウイルス検出 Realtime PCR
11. 【方法 2】 汎アデノウイルス検出 Nested PCR-シーケンス
12. 【方法 3】 種判別可能なファイバー領域 PCR と汎アデノウイルス ペント
ンベース領域の PCR-シーケンス法
13. マニュアル使用における注意点とお願い等
14. 参考文献
15. 執筆者
16. 問い合わせ先
17. 付録表

はじめに

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。各疾患ともに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)であることから、本マニュアルは、PCF、EKC 関連アデノウイルス検査法であり、広く一般的なアデノウイルス検査法として利用可能であることを目指した。これまでに、第3版までいくつかのバージョンを重ねて改良してきたが、本第4版ではアデノウイルスの同定及び型別検査に重点を置き、大幅な改訂を行った。

現在アデノウイルスの型別は混迷している。51型までは血清型、それ以降は遺伝型として登録されるようになったが、新規遺伝型としての認定方法が公的に定まっていないためである。そのため、日本におけるアデノウイルスサーベイランスにおいては、後述するヘキソン遺伝子配列を基にした型判別結果を重視している。本マニュアルでは以下の段階的な同定方法を提案する。

① 核酸検査での種とおおよその型の決定

② 主要構造タンパク質の部分配列遺伝型による型別を基にした遺伝型による型別決定

*本マニュアルは、病原体検索として PCR 法や Realtime PCR 法の基礎技術と知識を習得している方向けとする。また、アデノウイルスの背景情報等に関しては、以下の2報の IASR アデノウイルス特集号を参照されたい。

・IASR Vol.38. 2017年7月号 (<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/38/449.pdf>)

・IASR Vol.42. 2021年4月号 (<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/42/494.pdf>)

1. アデノウイルスの種と病原性および型について

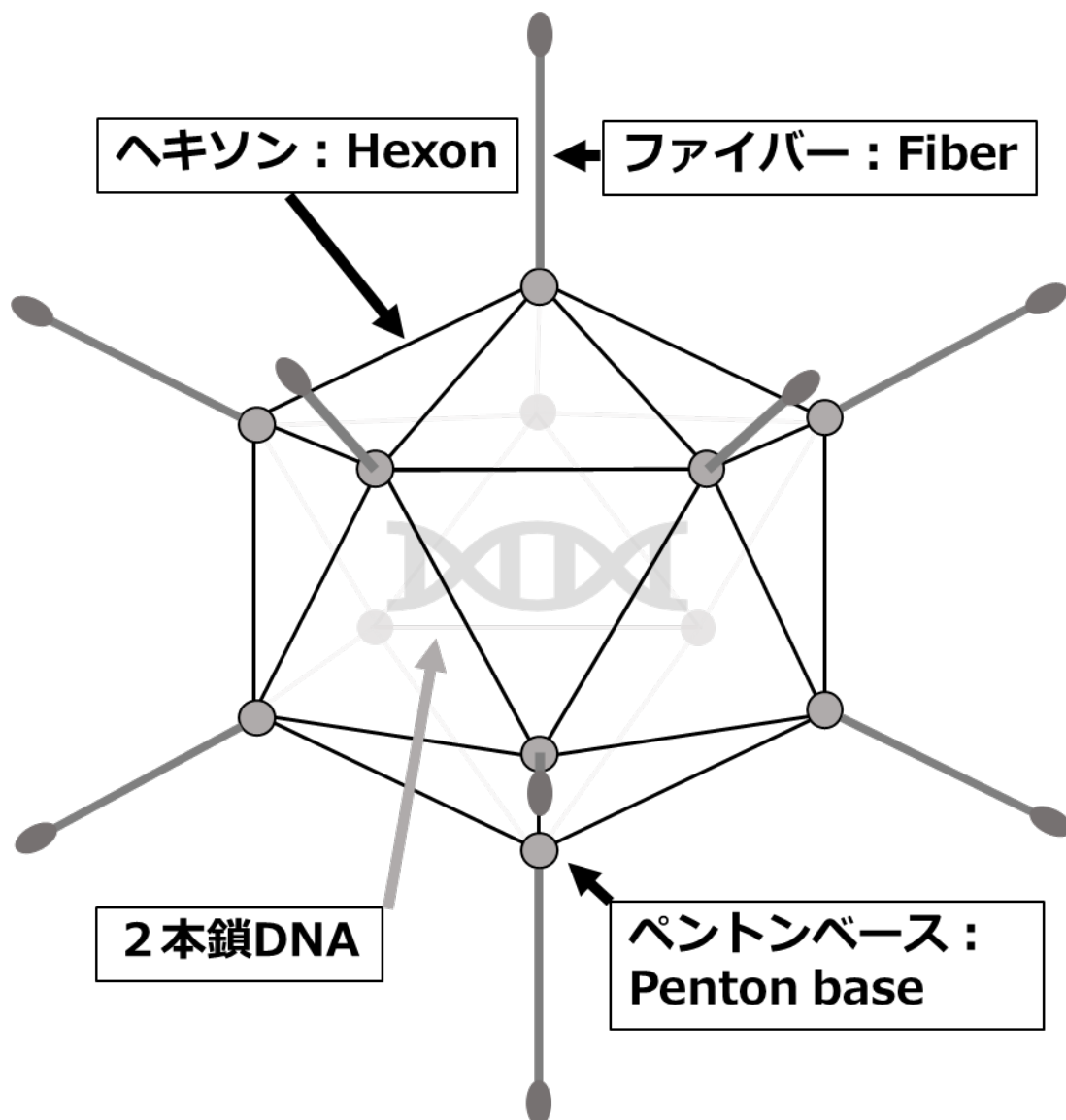
種と疾患との関連性を以下にまとめた。なお、B種はB1およびB2に細分されることもある。2008年から2020年までに日本において同定された型と、主要型を表に示した。

アデノウイルスの種と疾患と型

種	疾患	型
A	感染性胃腸炎	12、31
B1	急性呼吸器疾患（咽頭炎・肺炎、咽頭結膜熱など）	3、7、21
B2	出血性膀胱炎、急性呼吸器疾患	11、14、34、35、55
C	急性呼吸器疾患（咽頭炎、扁桃炎など）	1、2、5、6、57
D	流行性角結膜炎	8、9、10、13、15、33、37、46、 51、53、54、56、64（19a*）、85
E	急性呼吸器疾患、流行性角結膜炎	4
F	感染性胃腸炎	40、41
G	感染性胃腸炎	52

*近年遺伝子解析によって19型の中で流行性角結膜炎と関連する19a型が64型の新型として変更された（Zhou X, et al. 2012）。

2. アデノウイルスの構造と機能



アデノウイルスの構造模式図

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)を持つ主要構成カプシド蛋白(capsid protein)である。正 20 面体の蛋白構造物内に 2 本鎖 DNA を有する。

ヘキソン (Hexon) 蛋白：頂点以外の正二十面体の面を構成する蛋白で、主要な中和決定領と関連していると考えられている。

ファイバー (Fiber) 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 (Penton base) 蛋白：インテグリン等の宿主レセプターと結合しエンドサイトーシスに関連する。

3. 検体採取に関して

検体採取の方法が選択可能な場合は、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（咽頭用、鼻咽頭用）がセットになった UTM (COPAN 社)や新型コロナウイルス等のウイルス検体採取用保存培地を用いることで効率的な検体採取が可能である。

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)。

4. アデノウイルスの分離

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。

I. 器具

5%CO₂ 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、細胞培養用フラスコ(25cm²、75cm²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 ピペット等、マイクロピペット等

II. 試薬（A549 細胞を用いた例を示す。培地や血清等は各細胞や試験環境に合わせて最適化したものを使用すべきである）

増殖培地：（FBS 5%－10%）

E-MEM 500ml (SIGMA M4655)に直接以下の試薬を添加し、濾過滅菌して使用する。

- ・ 非動化 FBS(ろ過滅菌済) 50ml
- ・ L-アラニン/L-グルタミン(和光 016-21841) 5ml
- ・ 50mg/ml GENTAMICIN（和光 07806061） 1ml
- ・ AmphotericinB (和光 019-23891) 500μl

維持培地：（FBS 2%－5%）

E-MEM 500ml (SIGMA M4655)に直接以下の試薬を添加し、濾過滅菌して使用する。

- ・ 非動化 FBS(ろ過滅菌済) 10ml
- ・ L-アラニン/L-グルタミン(和光 016-21841) 5ml
- ・ 50mg/ml GENTAMICIN（和光 07806061） 1ml
- ・ AmphotericinB (和光 019-23891) 500μl

III. 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 細胞等が適している。特に A549 細胞はアデノウイルスに対する感受

性が高く(Enomoto et al. 2010)、現在最も推奨している分離用細胞である。また、A549 細胞は長期の培養にも耐え、難増殖性といわれていた 40 型および 41 型も分離可能である。

IV.細胞の準備（継代）（A549 細胞を用いた例を示す。）

分離用細胞の培養は常法に従い実施する。コンフルエント前の 80%程度生育時での検体接種が最適であるがコンフルエント細胞を用いても分離は可能である。具体的には細胞培養用フラスコ 25 cm²（培養液 5–10 ml）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 15 ml 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 24 well には 500–600 µl 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希釈率を変え細胞数を適宜減らす。

V.接種と細胞変性（CPE: cytopathic effect）の観察（A549 細胞を用いた例を示す。）

1 検体につき、1 細胞あたり 2 well の使用が推奨であるが 1 well でも可能である。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 48 well や 96 well 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維持培地に置換しておく。各種検体の処理は常法に従う、検体中の夾雑物が多い場合は、チビタン等の小型卓上遠心機で遠心し、上清を使用する。検体を 24 well では 1 well に 100 µl 程度細胞に添加する。2 well 使用できる場合は、残りの well に 1–10 µl 添加する。アデノウイルスは比較的検体中のウイルス量が多いことと、生存ウイルスが存在すれば長期培養で分離可能なため、細胞への吸着作業は必要ない。*極少量のウイルスで核酸検出が限界点の場合は、通常のウイルス分離常法に従い、インキュベーター内での吸着作業等を実施してもよい。

必ず検体接種後、検鏡すること。顕鏡の際に検体による細胞毒性が見られる場合は検体を希釈して、細胞毒性が見られない濃度でのウイルス分離を試みる。

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、培養を継続する。CPE の有無は毎日顕微鏡で観察する。

検体未接種コントロールの細胞が栄養飢餓を示す場合、追加で 10%FBS 培地を 50–100 µl 程度追加する。細胞の状況により 2、3 週間の間隔で継代（24 well であれば、元の well から 100 µl 新しい細胞の well へ接種する）を行う。一般的に継代は 2~3 代実施する。D 種 8 型や 54 型は増殖が遅いため分離に時間がかかるが、分離が可能な場合は概ね 1 カ月以内で分離が可能である。

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、新しい細胞へ接種する。（必要に応じて凍結融解法で細胞を完全に破壊させた後、細胞に接種してもよい）。

CPE が出現した際は、プレートごと凍結融解し、細胞ごと培養液を回収し、上清を同定に使用する（細胞混入していても後述の核酸検査には支障は無い）。

*培地の pH が低下し黄色になった際は培地内でのバクテリア等の増殖等が考えられる、ゲンタマイシンなどの効果が低くなっている場合もあるので、完全に黄色になる前に、速やかに継代すべきである。

ウイルス量や培養細胞の種類、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り、8 型、54 型の CPE 出現は遅い (Kawamura et al. 2020)。

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場合や円形化して膨隆しブドウの房状に凝集する場合がある。

ウイルス分離には検体中の生存ウイルス量とウイルス自身の増殖能に依存する。検体中の増殖可能なウイルス量が低い場合でもアデノウイルスは分離が可能なため、新しい培地を追加し細胞を維持したり、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。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 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。

VI.細胞培養に関する重要事項の確認

- 1) pH : 細胞の培養に適した pH は約 7 程度である。8 以上や pH6 以下では障害を受ける。培地には平衡塩類が入っており 5%CO₂ インキュベーター中で CO₂ 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 の影響で細胞が障害を受けないよう CO₂ 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。

5. 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)

I. 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 0.2 ml ずつ分注し、37°C の CO₂ 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 0.15 mL 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、CPE の観察が難しくなるので、早目に使用する。

II. 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、25 μ L 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 μ 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。

III. 中和試験

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]

- (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 μ L と 5 単位の抗血清 25 μ 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 $^{\circ}$ C(または 34 $^{\circ}$ C)の CO₂ インキュベーター中で 1 時間静置して中和する。

IV. 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。

V. 観察

- (8) 培養プレートに 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。

6. アデノウイルス核酸同定検査法

2008 年以降（52 型～）アデノウイルスの型判別は血清型から遺伝型へと考え方が変更され、現在 100 を超える型が登録されている (<http://hadvwg.gmu.edu/>)。多くの遺伝型が登録されている現状では、中和反応によりアデノウイルスの解析は重要であるが、型の判別法として中和試験の実施は現実的とはいえない。また、アデノウイルスの遺伝型同定には、約 36000bp の完全長ゲノム塩基配列を決定するのが最も確実であるが、現在のサンガー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し、遺伝型の推定に利用されている。Human Adenovirus Working Group (<http://hadvwg.gmu.edu/>) は、新しい組換え型の指定や管理等を実施しているが、定まった登録方法がなく、議論が必要な状況である。一方で組換え型表記としては、PHF 表記：PXXHXXFXX（Penton:XX 型、Hexon:XX 型、Fiber:XX 型）という表記が一般化している。例：D 種 53 型は、HAdV-D53 (P37H22F8)、54 型は、HAdV-D54 (P54H54F8) となる。

2022 年 12 月現在 NESID 登録における集計上の型指定では自由記載(備考欄を除く)はできないため、組み換え型等を同定した場合は“Other”としての登録しか方法はない。そこで本マニュアルでは、主に中和領域と相関性の高いヘキソン領域における遺伝子配列を用いた型の決定(推定)を優先し、型の登録を推奨する。一方で、病原体同定の目的に応じて、柔軟に対応可能なように次項において検査目的別に方法を段階的に選択できるようにした。方法 3 まで実施し、巻末付録表 1.アデノウイルスの組換え型一覧を参照し、NESID 登録型が存在していない型であった場合は、ヘキソンで判別した型での登録を行い、可能であれば、備考欄に PHF 表記を記入いただくか、レファレンスセンター世話人花岡希 (nozomu@niid.go.jp) まで連絡いただきたい。流行が確認された新型は NESID で選択が可能ないように調整する予定である。

巻末の付録表 2 には、「アデノウイルス核酸検査に使用するプライマー 一覧表」を、付録表 3 には「使用するプライマーの組み合わせと増幅サイズまとめ」、付録表 4 には、「本マニュアルと第 3 版マニュアルとのプライマーの関係」、付録表 5 には「各方法で配列解析した場合の配列解析判別不可型まとめ (判別不可のみ記載)」を示した。

7. 検査目的（知りたいことの範囲：どこまで解析するのか？）

- ① アデノウイルスの有無：アデノウイルスが存在するか否か？
→（方法1もしくは方法2、または両方（推奨）を実施）
- ② 種とおおよその型の決定：種の判別・ヘキソン部分配列による型別
→（方法2）
- ③ 主要構造タンパク質（ヘキソン、ペントンベース、ファイバー）の部分配列遺伝型による型別：アデノウイルスの同定と型（PXXHXXFXX）、亜型か、新型の可能性かの判別。
*NESID 上に登録型がない場合は、ヘキソン部位の解析結果を優先して登録する。
→（方法3）

*ご相談は個々の地区代表の先生方か国立感染症研究所感染症危機管理研究センター第4室の花岡（nozomu@niid.go.jp）までご連絡ください。

方法概要

方法1：汎アデノウイルス検出 Realtime PCR（インターカレーター法）：定量可能

方法2：汎アデノウイルス検出 Nested PCR-シーケンス

方法3：種判別可能な部分的なファイバー領域と汎アデノウイルス ペントンベース領域の PCR-シーケンス法

*方法2、3を実施し、結果を組み合わせれば、ヘキソン、ファイバー、ペントンの組み合わせで、すべての型を判別できます。

8. 器具および試薬

通常の核酸検査機器や試薬類を使用する。消耗品類も PCR や Realtime PCR 検査グレードのものを使用する（低吸着のフィルター付き滅菌チップが望ましい。）。本マニュアルでは参考として一部の試薬に関する組成や反応時間を示すが、各自利用している試薬の説明書に従うのが望ましい。）

1) 器具

遠心機、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロピペットと対応フィルターチップ(2、20、200、1000 μ L)、チューブ(0.2mL、0.5mL、1.5mL)、8連チューブと蓋、96 ウェルプレートとシール（PCR、Realitme PCR）、ヒートブロック等

Realtime PCR 機器：

ABI PRISM 7000 や、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System、Quant Studio5（Thermo Fisher Scientific 社）、Rotor-Gene(QIAGEN)、CFX96 Real-Time PCR Detection system（Bio-Rad 社）、LightCycler 480 System（Roche Diagnostics 社）、

Thermal Cycler Dice® Real Time System(TaKaRa)、MIC (BMS)で実施可能。

***その他の機種をご使用の場合は、環境に合わせて事前に動作の確認を行う。**

PCR 機器：通常のサーマルサイクラーであれば問題ない。

2) 試薬*一例を示す。

核酸抽出キット：ハイピュア ウイルス核酸キット (High Pure Viral Nucleic Acid Kit: Rche)：日本ジェネティクス 11858874001

PCR 酵素：PrimeSTAR GXL DNA polymerase: TaKaRa, Code No. R050A.

RealtimePCR 酵素：TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus): TaKaRa, Code No.RR820A.

アガロース：アガロース ME: 岩井化学 50013R

50 x TAE buffer：ニッポンジーン 313-90035。

ゲルカッター：FastGene アガロースゲルカッター：日本ジェネティクス FG-830

GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10,000X：Wako 519-20301

(エチジウムブロマイドでも良い)

100bp 分子量マーカー：NEB N3231L.

アガロースゲル精製キット：FastGene Gel/PCR Extraction Kit：日本ジェネティクス FG-91302

9. ウイルスゲノム抽出

各種臨床検体等から添付文章に従って抽出する。*キャリアーRNA や DNA は、添加しない。

検体種に合わせて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され多用されているキットを使用すれば、概ね抽出可能である。*ハイピュア ウイルス核酸キットでは、培養細胞、全血、血清、髄液、咽頭ぬぐい液、UTM、尿、便等多様な検体からアデノウイルス核酸を抽出可能である。

10. 【方法 1】 汎アデノウイルス検出 Realtime PCR (インターカレーター法) : 定量可能 (Watanabe et al. 2006)

Realtime PCR 試薬*以下の試薬の一例を示す。

TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus): TaKaRa, Code No.RR820A.

ABI7500、QuantStudio5 を用いた場合を示す。

☆Rox の有無などは、試薬添付の方法で機器ごとに最適化すること。各試薬濃度を調整し、全量 25 µl の反応系でも問題はない。

試薬	1 検体あたりの使用量 (µl)
遺伝子解析用蒸留水	6.0
TB Green Premix Ex Taq II(TaKaRa) (2×conc.)	10.0
フォワードプライマー (Hexon3) (10µM)	0.8
リバースプライマー (Hexon4) (10µM)	0.8
Rox Reference Dye II	0.4
抽出ゲノム	2.0
計	20.0

【Primer 塩基配列】

Hexon3: GACATGACTTTCGAGGTCGATCCCATGGA

Hexon4: CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA

【反応時間】 *ABI7500、QuantStudio5 を用いた場合を示す。

初期変性

95 °C 30 sec

PCR 反応

95°C 5 sec	×40
60°C 30 sec	*測定

Melt Curve

95°C 15 sec

60°C 1 min

95°C 15 sec

【陰性、陽性コントロール】

必ず陰性コントロールを作成すること。陽性コントロールは、アデノウイルス核酸を使用できれば特に型にこだわる必要はない。

【定量】

定量も可能であり、定量用プラスミドを 10 倍段階希釈等して検量線を作成し、定量が可能である。検出用プライマー配列を組み込んだ陽性コントロールプラスミドを使用する。(合成依頼等は、花岡 (nozomu@niid.go.jp) までご連絡ください。)

結果の判定方法

Realtime PCR 機への依存なく、自動判定で 30 サイクル前後で 100 copy/ 反応までは、100 %の再現性で良好に検出できる。30-40 サイクルでの反応の立ち上がり等は、融解曲線解析で、サンプル (検体) のピーク TM 値と、陽性コントロールの TM 値と陰性コントロールの TM 値とを比較し解析すること。陽性コントロールは 87°C、88°Cがピークになる。陰性コントロールで非特異的な増幅が認められる場合が多く、陰性コントロールでのピーク TM 値を確認し、結果の判断をする必要がある。

特徴：基本的には、汎用性の高いプライマーではあるが、一部の型に対して低感度を示す。特に、8 型と 54 型の場合は、100 倍程度感度が低下するため、定量の際には、以下に示した型に合わせた Primer セットの利用を推奨する (方法 2 で D 種 8 型もしくは 54 型の場合は、定量を型別プライマーでやり直した方が良い。)。1 型、31 型については、感度低下が 10 倍以内であるため、検出に大きな影響は与えない。本方法は 100 copy 以下も検出可能であるが、陰性コントロールとの比較が難しくなる等、本法のみでの同定は推奨しない。方法 2 も高感度であるため、併用での同定を推奨する。

*下痢症と関連する Ad40 型や Ad41 型も本法では低感度を示すため、これらの型をターゲットとする場合は、「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 (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AdenoVirusDiarrhea20220518.pdf>) を参照すること。

【型別用 primer set】

*配列は付録表 2 参照。

Ad1 型用 primer

- ・ HEXON3_Ad1
- ・ HEXON4_Ad1

Ad31 型用 primer

- ・ HEXON3_Ad31
- ・ HEXON4_Ad31

Ad8、Ad54 型用 primer

- ・ HEXON3_Ad8_54
- ・ HEXON4_Ad8_54

11. 【方法 2】 汎アデノウイルス検出 Nested PCR-シーケンス (Okada, 2007)
PCR 試薬*以下の試薬の一例を示す。

PrimeSTAR GXL DNA polymerase: TaKaRa, Code No. R050A.

*非常に高濃度にアデノウイルス核酸が増幅されたため、陽性コントロール核酸には、高濃度のアデノウイルスは用いないこと。検体中の核酸濃度は不明なため操作（汚染）には十分気を付けること。

*必ず、陰性コントロールを作成すること。1st PCR の陰性コントロール、2nd PCR の陰性コントロール、Nested PCR としての 1st-2nd PCR 一貫した陰性コントロールの使用が望ましい。

1st PCR の混合液

試薬	1 検体あたりの使用量 (μ l)
遺伝子解析用蒸留水	31.5
5× PrimeSTAR GXL Buffer	10.0
dNTP mixture	4.0
Ad hex-GT3F (50 μ M)	1.0
Ad hex-GT2R (50 μ M)	1.0
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25 U / μ L)	0.5
抽出ゲノム	2.0
計	50.0

【Primer 塩基配列】

Ad hex-GT3F: CSGGNCAGGAYGCYTCCGGRGTA

Ad hex-GT2R: CACCCATGTTTRCCWGTNCTGTT

【反応時間】

94 °C 1.5 min

98 °C 10 sec

55 °C 15 sec

68 °C 30 sec

×30(1st PCR のみ実施する場合は、35 cycles にする。)

68°C 3 min

2nd PCR の混合液

試薬	1 検体あたりの使用量 (μ l)
遺伝子解析用蒸留水	31.5
5×PrimeSTAR GXL Buffer	10.0
dNTP mixture	4.0
Ad hex-GT2F (50 μ M)	1.0
Ad hex-GT1R (50 μ M)	1.0
PrimeSTAR GXL DNA polymerase(1.25 U / μ L) (TAKARA)	0.5
1st PCR 産物	2.0
計	50.0

【Primer 塩基配列】

Ad hex-GT2F: AAYAARTTTAGRAAYCCCAC

Ad hex-GT1R: TTRTCYCTRAADSCAATGTARTT

【反応時間】

94 °C 1.5 min

98 °C 10 sec

55 °C 15 sec

68 °C 30 sec

×30

68°C 3 min

【結果の判定方法】

1st PCR 増幅産物はおよそ 1000 bp 程度、2nd PCR では 800-900 bp 程度のバンドが増幅される。サイズによる型や種の判別はできないため、アガロースゲル電気泳動などで、増幅バンドを確認後、バンドを切り出し、精製し、シーケンス解析を行う。使用プライマーは増幅プライマーが良い。臨床検体の検査の場合は、1st PCR の結果を確認せずに、常に 2nd PCR までを実施し、2nd PCR 産物でのシーケンス解析の実施を推奨する。

【結果の解析】

*解析例を示す。一番慣れている方法で配列解析を行っていただいで構わない。

得られた配列情報（#以下特徴の項目参照）を既存のアデノウイルスゲノム配列登録データベース内から最も一致度の高い配列を探し、登録情報と比較する。

（本マニュアルでは巻末に示した付録表 5 アデノウイルス遺伝子情報を用いて解析を行った。）

NCBI のウェブサイト (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) からの BLAST 解析 (BLASTN: Nucleotide Blast) が便利である。

1. FASTA フォーマットの配列をコピー等し、「BLAST」ボタンを押す。
2. 得られた結果から、一致度が高い結果順を参考に、目的の検体中のアデノウイルスの種類とおおよその型を判別する。

*データベースによっては、一つの型のみ結果が多く、同じスコアですべて埋まってしまう可能性もある。解決策の中で最も簡単な方法は、検索時に、「BLAST」ボタン下にある「+Algorithm paramters」の「+」をクリックし、“Max target sequences”の項目を 500 等に設定し、BLAST する。表示結果が 500 位まで表示されるので、スコアの異なる結果が表示される。*多数の配列検索をする場合はサーバーに負荷がかかるため、注意が必要である。

特徴：汎用性の高い Nested PCR で、ほぼすべてのアデノウイルスが高感度 (100 copy/反応以上) で検出可能である。方法 1 よりも感度が高い場合もあり、10-100 copy/反応でも検出が可能な場合もある。一方で、増幅過多により、電気泳動の際やゲルの切り出し、精製に関して、扱いに注意が必要である。実験室汚染の原因になりやすい。比較的長いヘキソン部位を増幅でき、種は確定でき、ほとんどのおおよその型も決定できるが、現状では、組換えの有無は判定が難しい、BLAST 解析においては、2nd PCR 産物領域では、7 型と新規 66 型が区別できないが、これは 66 型が従来の 7h 型であるためであり、判別できなくとも、NESID の登録時は 7 型で間違いない。また、69 型と 88 型も 15 型系統で判別不可であるが、69 型、88 型ともに検出は稀である。111 型と 9 型も判別不可である。

第 3 版マニュアル記載の方法では、11 型、34 型、35 型間、7 型、21 型、50 型間で判別が不可であったが、これらの判別は本方法では可能である。

以上から検出自体が非常に稀であるが、本方法で 9 型、69 型と 88 型、(15 型) が検出された場合は、方法 3 を実施し、レファレンスセンターにご連絡いただきたい。*本マニュアル記載の PCR-シーケンス法での型判別における判別不可型に関しては、巻末の付録表 6 各方法で配列解析した場合の配列解析判別不可型まとめ (判別不可のみ記載)を参照のこと。

#2nd PCR での増幅産物と 2nd PCR で使用したプライマーでのシーケンス解析を推奨する。サンガーシーケンス法であれば、上流、下流プライマーが完全に重複している領域のみの配列だけでなく、波形がきれいに読めている重複領域の外側の領域の配列も含めて、配列情報として利用可能である。ほぼすべての増幅領域のシーケンス解析が可能となる。

(重複領域のみでの解析では、各々のサンガーシーケンス法に依存するが、1 リードが 600b 程度の場合は、800bp の 2nd PCR 産物の解析では、重複領域はおおよそ 400bp 弱になる。この場合は、複数の型間 (主にハイナンバー (60 番以降)) で判別ができない場合がある。前後領域を少しでも追加し、おおよそ 600bp ほど配列が得られれば、上記と同様にほぼすべての主要型の判別が可能である。) *付録表 6 参照。

13. 【方法 3】 種判別可能なファイバー領域 PCR と汎アデノウイルス ペントンベース領域の PCR-シーケンス法

型別判定のために、ファイバーとペントンベースの部分配列を決定する。

【種の判別可能な部分的なファイバー領域 PCR (Xu W et al. 2000)】

種特異的なファイバー用マルチプレックス PCR であり、本法のみでも判別が可能だが、ヘキソン部位での型別が優位な現状では、方法 2 の実施による種の決定とおおよその型決定を推奨する。

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)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)。

臨床検体から抽出した核酸でも同定可能であるが、アデノウイルスコピー数が少ない場合は増幅が困難な場合があるため、本方法のみでの判定は推奨しない。種に絞った PCR の方が、感度が良い場合もある。種特異的な反応系での組成は、以下の組成表の遺伝子解析用蒸留水を不足分追加すればよい。

複数種の混合感染でも各々の種のコピー数を検出できる場合もあり、そのような状況で特に有用である。

PCR 試薬* 以下の試薬の一例を示す。

PrimeSTAR GXL DNA polymerase: TaKaRa, Code No. R050A.

試薬	1 検体あたりの使用量 (μl)
遺伝子解析用蒸留水	27.0
5×GXL buffer (5 mM Mg ²⁺ 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 50 μM)	各 0.5 (total 3)
リバースプライマー (AdA2、AdB2、AdC2、AdD2、AdE2、AdF2) (各 50 μM)	各 0.5 (total 3)
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25 U / μL) (TaKaRa)	1.0
抽出ゲノム	2.0
計	50

【Primer 塩基配列】

A 種	AdA2	CRTTTGGTCTAGGGTAAGCAC
AdA1	B 種	
GCTGAAGAAMCWGAAGAAAATGA	AdB1	TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC

AdB2	GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT	E 種	
C 種		AdE1	TCCCTACGATGCAGACAACG
AdC1	TATTCAGCATCACCTCCTTTCC	AdE2	AGTGCCATCTATGCTATCTCC
AdC2	AAGCTATGTGGTGGTGGGGC	F 種	
D 種		AdF1	ACTTAATGCTGACACGGGCAC
AdD1	GATGTCAAATTCCTGGTCCAC	AdF2	TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC
AdD2	TACCCGTGCTGGTGTAAAAATC		

【反応時間】

94 °C 1.5 min

98 °C 10 sec

55 °C 15 sec

68 °C 30 sec

×30

68°C 3 min

【結果の判定方法】

PCR 終了後電気泳動によってバンドの有無とサイズを確認する。

*おおよその判別が可能である。

さらに、バンドを切り出し、精製後、シーケンス解析を実施することで配列情報も得られる。*シーケンスプライマーには、バンドサイズから想定した種毎に合わせたプライマーを用いても良いが、混合プライマーでもシーケンス解析は可能である。方法 1 と同様に BLAST 解析によって、ファイバーの型を決定できる。*部分配列での決定。

A 種では、およそ 1500 bp、B 種では、700 bp 前後、C 種では、2000 bp 程度、D 種では 1200 bp 程度、E 種は 967 bp、F 種は、550 bp 前後である。*付録表 3 参照。

特徴：汎用性が高く、増幅サイズで判別可能な PCR 法であるが、検体によっては、複数バンドが出現し、サイズのみでは決定できないことも多い。しかしながら、簡便に混合感染を判別できる方法としては、本方法のみであるため、電気泳動時にきれいに出現している増幅 DNA バンドは、すべて切り出してシーケンス解析を実施すべきである。

【ペントンコード領域による PCR-sequence (Fujimoto 2012)】

PCR 試薬*以下の試薬の一例を示す。

PrimeSTAR GXL DNA polymerase: TaKaRa, Code No. R050A.

*非常に高濃度にアデノウイルス核酸が増幅されたため、陽性コントロール核酸には、高濃度のアデノウイルスは用いないこと。検体中の核酸濃度は不明なため操作（汚染）には

十分気を付けること。

*必ず、陰性コントロールを作成すること。1st PCR の陰性コントロール、2nd PCR の陰性コントロール、Nested PCR としての 1st-2nd PCR 一貫した陰性コントロールの使用が望ましい。

臨床検体から抽出した核酸でも同定可能である。

1st PCR 混合液

試薬	1 検体あたりの使用量 (μ l)
遺伝子解析用蒸留水	31.5
5×PrimeSTAR GXL Buffer	10.0
dNTP mixture	4.0
Ad-penUF (50 μ M)	1.0
Ad-penUR (50 μ M)	1.0
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25 U / μ L)	0.5
抽出ゲノム	2.0
計	50.0

【Primer 塩基配列】

Ad-penUF: CARAAYGAYCACAGCAACTT

Ad-penUR: GCRGGMACGTTTTCACTRACGGT

【反応時間】

94 °C 1.5 min

98 °C 10 sec

55 °C 15 sec

68 °C 30 sec

×30

68 °C 3 min

2nd PCR 混合液

試薬	1 検体あたりの使用量 (μ l)
遺伝子解析用蒸留水	31.5
5×PrimeSTAR GXL Buffer	10.0
dNTP mixture	4.0

Ad-penNUF (50 μM)	1.0
Ad-penNUR (50 μM)	1.0
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (1.25 U / μL) (TaKaRa)	0.5
1stPCR 産物	2.0
計	50.0

【Primer 塩基配列】

Ad-penNUF: GGNTGCGGVGTDGAYTTYAC

Ad-penNUR: CGRAARGTBACNGGRTCTTGCAT

【反応時間】

94 °C 1.5 min

98 °C 10 sec	×30
55 °C 15 sec	
68 °C 30 sec	

68 °C 3 min

【結果の判定方法】

PCR 終了後電気泳動によってバンドの有無とサイズを確認する。

1st PCR ではおよそ 1200 bp、2nd PCR では、およそ 500 bp が増幅される。

さらに、バンドを切り出し、精製後、シーケンス解析を実施することで配列情報を得る。

*シーケンスプライマーには、2nd PCR 用のプライマーを用いる。方法 1 と同様に BLAST 解析によって、ペントンベースの型を決定できる。*部分配列での決定。

特徴：汎用性が高く、検体中のアデノウイルス濃度によっては、1st PCR のみでもシーケンス解析が可能である。電気泳動による増幅確認時には、1st PCR 産物も同時に泳動すべきである。

14. マニュアル使用における注意点等

本マニュアルは以下の方法について目的別に段階的に方法を示したものである。

従来からのウイルス分離法と中和試験法の概説

核酸検査方法 1：汎アデノウイルス検出 Realtime PCR (インターカレーター法)

核酸検査方法 2：汎アデノウイルス検出 Nested PCR-シーケンス

核酸検査方法 3：種判別可能な部分的なファイバー領域と汎アデノウイルス ペントンベース領域の PCR-シーケンス法

現在遺伝子配列情報を基にした新型の決定は、Human Adenovirus Working Group (<http://hadvwg.gmu.edu/>) が主導して決定すると公表されているが、その審査日程や工程は不明である。科学的根拠に基づいた公平な型決定工程が示されるべきであり、議論が必要な現状である。本マニュアルでは、核酸検査方法 2 までの結果で、およそそのヘキソン型は決定できる。アデノウイルスレファレンス実施においては、最低限この方法を実施していただき、型別判定結果を NESID 等に登録していただきたい。加えて、方法 3 実施での新型の発見や新型が複数の地域で報告等あった場合は、NESID での型の選択項目に随時迅速に追加できるようにする予定である。新型アデノウイルスは地方衛生研究所ネットワークで最も多く同定されている。新型の可能性があった場合は、可能な限り、ウイルス分離とゲノム配列決定を目指して、報告していただきたい。

15. 参考文献

- IASR Vol. 38. 2017 年 7 月号. (<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/38/449.pdf>)
- IASR Vol. 42. 2021 年 4 月号. (<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/42/494.pdf>)
- Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, et al. Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63(5):338-341.
- 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.
- 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.
- Tsukahara-Kawamura T, Hanaoka N, Konagaya M, Uchio E, Fujimoto T. Characteristic of slow growth in cell culture of adenovirus type 54 causing nationwide outbreak epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *Jpn J Ophthalmol.* 2020;64(3):312-320.
- 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.
- Zhou X, Robinson CM, Rajaiya J, et al. Analysis of human adenovirus type 19 associated with epidemic keratoconjunctivitis and its reclassification as adenovirus type 64. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(6):2804-2811. Published 2012 May 14.

16. 執筆者・協力者（敬称略、順不同）

アデノウイルスレファレンスセンター

・花岡希、高橋健一郎、野尻直未、吉田初佳、齋藤智也：国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

・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

・高橋 美帆：福井県衛生環境研究センター

・廣井 聡：大阪健康安全基盤研究所

・藤井 慶樹：広島市衛生研究所

・八尋 俊輔：熊本県保健環境科学研究所

17. 問い合わせ先

地方衛生研究所の先生方等で試薬や機器の組み合わせによって、本マニュアルで示したプライマー等が反応しない場合や、お気づきの点がございましたら、以下までご連絡ください。

アデノウイルスレファレンスセンター 世話人

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター 第4室 花岡希

TEL：03-5285-1111（内 2043）Email: nozomu@niid.go.jp

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

付録表 1 アデノウイルスの組換え型一覧 (2022 年 12 月現在) <http://hadvvg.gmu.edu/>参照

Adenovirus Genotype	Name	Accession NO.	Year (Publication)	Penton base	Hexon	Fiber
HAdV-D113	P20H42F42	MW694832	2021	20	42	42
HAdV-D112	P112H112F67	TBA	2018	112	112	67
HAdV-D111	P37H9F9	LC652931	2016	37	9	9
HAdV-D110	P67/H110/F9	OM830315	2018	67	110	9
HAdV-D109	P22/H19/F9	OM830314	2018	22	19	9
HAdV-C108	P1H2F2	N/A	2014	1	2	2
HAdV-D107	P102H107F25	MK174992	2010	102	107	25
HAdV-B106	P11H11F35	ON393912	2020	11	11	35
HAdV-D105	P105H59F9	ON393913	2020	105	59	9
HAdV-C104	P1H1F2/2017/CHN	MH558113	2021	1	1	2
HAdV-D103	P103H33F30/1986/DEU	KF268322	2019	103	33	30
HAdV-D102	P102H38F30/1984/DEU	KF268312	2019	102	38	30
HAdV-D101	P101H37F45/1988/DEU	KF268324	2019	101	37	45
HAdV-D100	P100H17F30/1986/DEU	KF268330	2019	100	17	30
HAdV-D99	P9H46F39/1987/DEU	KF268211	2019	9	46	39
HAdV-D98	P98H46F9/1986/DEU	KF268332	2019	98	46	9
HAdV-D97	P67H28F60/1987/DEU	KF268320	2019	67	28	60
HAdV-D96	P23H32F62/1988/DEU	KF268327	2019	23	32	62
HAdV-D95	P95H9F15/1984/DEU	KF268206	2019	95	9	15
HAdV-D94	P33H15F9/1982/DEU	KF268201	2019	33	15	9
HAdV-D93	P28H37F38/1988/DEU	KF268334	2019	28	37	38
HAdV-D92	P92H32F27/1986/DEU	KF268325	2019	92	32	27
HAdV-D91	P37H37F17/DEU	KF268208	2019	37	37	17
HAdV-D90	P33H27F67/2017/BGD	98% Partial	TBA	33	27	67
HAdV-C89	P89H2F2/2015/DEU	MH121097	2019	89	2	2
HAdV-D88	P88H15F9/1963/USA	MF476842	TBA	88	15	9
HAdV-D87	P9H15F25/1967/USA	MF476841	TBA	9	15	25
HAdV-D86	P9H25F25/1978/SWE	KX868297	2018	9	25	25
HAdV-D85	P37H19F8/2015/JPN	LC314153	2018	37	19	8
HAdV-D84	P43H17F84/2011/PAN	MF416150	2017	43	17	84
HAdV-D83	P83H9F15/2010/PAR	KX827426.1	2016	83	9	15
HAdV-D82	P56H15F37/2011/JPN	LC066535.1	2015	56	15	37

HAdV-D81	P65H48F60/2012/JPN	AB765926.1	2014	65	48	60
HAdV-D80	P19,23H28F22/2014/DEU	KY618679	2022	22	28	22
HAdV-B79	P11H34F11/2015/JPN	LC177352	2016	11	34	11
HAdV-B78	P11H11F7/2013/USA	KT970441	2016	11	11	7
HAdV-B77	P35H34F7/1985/DEU	KF268328	2013	35	34	7
HAdV-B76	P21H21F16/DEU	KF633445	2013	21	21	16
HAdV-D75	P75H26F29/2015/DEU	KY618678	2017	75	26	29
HAdV-D74	P70H74F51/2015/DEU	KY618677	2017	70	74	51
HAdV-D73	P67H45F27/2015/DEU	KY618676	2017	67	45	27
HAdV-D72	P72H30F72/1985/DEU	KF268335	2013	72	30	72
HAdV-D71	P9H20F71/1987/DEU	KF268207	2013	9	20	71
HAdV-D70	P70H70F29/2014/DEU	KP641339	2015	70	70	29
HAdV-D69	P53H15F69/1955/SAU	JN226748	2013	53	15	69
HAdV-B68	P16H3F16/2004/ARG	JN860678	2011	16	3	16
HAdV-D67	P67H9F67/2005/BGD	AP012302	2013	67	9	67
HAdV-B66	P66H7F3/1987/ARG	JN860676	2012	66	7	3
HAdV-D65	P58H10F9/2004/BGD	AP012285	2012	58	10	9
HAdV-D64	P22H19F37/1993/USA	EF121005	2006	22	19	37
HAdV-D63	P30H30F29/1959/USA	JN935766	2012	30	30	29
HAdV-D62	P62H62F62/1993/GBR	JN162671	2014	62	62	62
HAdV-A61	P31H31F31/2004/JPN	JF964962	2011	31	61	31
HAdV-D60	P60H20F60/2009/CAN	HQ007053	2013	60	20	60
HAdV-D59	P64H25F56/2007/USA	JF799911	2012	64	25	56
HAdV-D58	P58H58F29/1996/ARG	HQ883276	2011	58	58	29
HAdV-C57	P1H57F6/2001/RUS	HQ003817	2011	1	57	6
HAdV-D56	P56H15F9/2008/FRA	HM770721	2010	56	15	9
HAdV-B55	P14H11F14/2006/CHN	FJ643676	2009	14	11	14
HAdV-D54	P54H54F8/2000/JPN	AB333801	2009	54	54	8
HAdV-D53	P37H22F8/2005/DEU	FJ169625	2009	37	22	8

付録表2 アデノウイルス核酸検査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')	文献	方法
Hexon3 Hexon4	GACATGACTTTTCGAGGTCGATCCCATGGA CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA	Echavarria M. et al. 1998	1
HEXON3_Ad1 HEXON4_Ad1	GATATGACTTTTGAGGTGGATCCCATGGA CAGCCGAGAAGGGCGTGCGCAGGTA	本マニュアル	1
HEXON3_Ad8_54 HEXON4_Ad8_54	GACATGACCTTTGAGGTGGACCCCATGGA CCGGCGGAGAAGGGCGTGCGCAGGTA	Kawamura T. et al. 2019	1
HEXON3_Ad31 HEXON4_Ad31	GATATGACATTTGAAGTTGACCCCATGGA CCCGCGGAGAAGGGTGTGCGCAGATA	本マニュアル	1
1st Adhex-GT3F Adhex-GT2R	CSGNCAGGAYGCTCGGRGTA CACCCATGTTRCCWGTNCTGTT	Okada. Et al. 2007	2
2nd Adhex-GT2F Adhex-GT1R	AAYAARTTTAGRAAYCCCAC TTRTCYCTRAADSCAATGTARTT		
A種 AdA1 AdA2	GCTGAAGAAMCWGAAGAAAATGA CRTTTGGTCTAGGGTAAGCAC	Xu W et al. 2000	3
B種 AdB1 AdB2	TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT		
C種 AdC1 AdC2	TATTCAGCATCACCTCCTTTCC AAGCTATGTGGTGGTGGGGC		
D種 AdD1 AdD2	GATGTCAAATTCCTGGTCCAC TACCCGTGCTGGTGTA AAAATC		
E種 AdE1 AdE2	TCCCTACGATGCAGACAACG AGTGCCATCTATGCTATCTCC		

F 種 AdF1 AdF2	ACTTAATGCTGACACGGGCAC TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC		
1st Ad-penUF Ad-penUR	CARAAYGAYCACAGCAACTT GCRGGMACGTTTTTCACTRACGGT	Fujimoto T, et al. 2012	3
2nd Ad-penNUF Ad-penNUR	GGNTGCGGVGTDGAYTTYAC 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	

付録表 3 使用するプライマーの組み合わせと増幅サイズまとめ

PCR	フォワードプライマー/リバープライマー (プローブ)	増幅サイズ(bp)
方法 1	Hexon3/ Hexon4	140
方法 2 1st PCR 2nd PCR	Adhex-GT3F / Adhex-GT2R Adhex-GT2F / Adhex-GT1R	約 1000 約 800-900
方法 3-ファイバー 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 3-ペントンベース		
1st PCR	Ad-penUF/ Ad-penUR	約 1200
2nd PCR	Ad-penNUF/ Ad-penNUR	約 500

付録表 4 本マニュアルと第 3 版とのプライマーの関係

PCR	フォワードプライマー/リバースプライマー (プローブ)	第 3 版掲載方法
方法 1	Hexon3/ Hexon4	配列が方法 1 と同じ。
方法 2 1st PCR 2nd PCR	Adhex-GT3F / Adhex-GT2R Adhex-GT2F / Adhex-GT1R	無し
方法 3-ファイバー A 種	混合プライマー	方法 5 と同じ方法
方法 3-ペントンベース 1st PCR 2nd PCR	Ad-penUF/ Ad-penUR Ad-penNUF/ Ad-penNUR	方法 6 を改変

付録表 5 本マニュアルで使用したアデノウイルス遺伝子情報

種	型	Accession NO.	D	29	JN226754.1	D	58	HQ883276.1	D	87	MF476841.1
C	1	AC_000017.1	D	30	JN226755.1	D	59	JF799911.1	D	88	MF476842.1
C	2	AC_000007.1	A	31	AM749299.1	D	60	HQ007053.1	C	89	MH121097.1
B1	3	DQ086466.1	D	32	JN226756.1	A	61	JF964962.1	D	90*	-
E	4	AY458656.1	D	33	JN226758.1	D	62	JN162671.1	D	91	KF268208.1
C	5	AC_000008.1	B2	34	AY737797.1	D	63	JN935766.1	D	92	KF268325.1
C	6	HQ413315.1	B2	35	AC_000019.1	D	64	EF121005.1	D	93	KF268334.1
B1	7	AC_000018.1	D	36	GQ384080.1	D	65	AP012285.1	D	94	KF268201.1
D	8	AB448769.1	D	37	DQ900900.1	B	66	JN860676.1	D	95	KF268206.1
D	9	AJ854486.1	D	38	JN226759.1	D	67	AP012302.1	D	96	KF268327.1
D	10	JN226746.1	D	39	JN226760.1	B	68	JN860678.1	D	97	KF268320.1
B2	11	AY163756.1	F	40	L19443.1	D	69	JN226748.1	D	98	KF268332.1
A	12	X73487.1	F	41	DQ315364.2	D	70	KP641339.1	D	99	KF268211.1
D	13	JN226747.1	D	42	JN226761.1	D	71	KF268207.1	D	100	KF268330.1
B2	14	AY803294.1	D	43	JN226762.1	D	72	KF268335.1	D	101	KF268324.1
D	15	AB562586.1	D	44	JN226763.1	D	73	KY618676.1	D	102	KF268312.1
B1	16	AY601636.1	D	45	JN226764.1	D	74	KY618677.1	D	103	KF268322.1
D	17	HQ910407.1	D	46	AY875648.1	D	75	KY618678.1	C	104	MH558113.1
A	18	GU191019.1	D	47	JN226757.1	B	76	KF633445.1	D	105*	ON393913
D	19	JQ326209.1	D	48	EF153473.1	B	77	KF268328.1	B	106*	ON393912
D	20	JN226749.1	D	49	DQ393829.1	B	78	KT970441.1	D	107	MK174992.1
B1	21	KF528688.1	B1	50	AY737798.1	B	79	LC177352.1	C	108*	-
D	22	FJ404771.1	D	51	JN226765.1	D	80	KY618679.1	D	109*	OM830314
D	23	JN226750.1	G	52	DQ923122.2	D	81	AB765926.1	D	110*	OM830315
D	24	JN226751.1	D	53	FJ169625.1	D	82	LC066535.1	D	111	LC652931.1
D	25	JN226752.1	D	54	AB333801.2	D	83	KX827426.1	*90,105,106,108,109,110 使用できない公開配列なし。<2022年12月現在>		
D	26	EF153474.1	B2	55	FJ643676.1	D	84	MF416150.1			
D	27	JN226753.1	D	56	HM770721.2	D	85	LC314153.1			
D	28	FJ824826.1	C	57	HQ003817.1	D	86	KX868297.2			

付録表 6 各方法で配列解析した場合の配列解析判別不可型まとめ（判別不可のみ記載）

*2022年12月時点でのNCBIデータベースに対しての結果であり、数塩基の差で結果が変わる場合もある。

< 1リードが600bと仮定した場合 >

《方法2、3を実施し、結果を組み合わせれば、ヘキソン、ファイバー、ペントンの組み合わせで、すべての型を判別できる》

方法	ターゲット	長さ	Primer	型別不可の組み合わせ	対応、考察等
	Hexon	800-900bp	Ad hex-GT2F	7型と66型(7h)	66型は従来7h型であり、本方法で7型と登録してもよい。
	2nd PCR		Ad hex-GT1R	9型と111型	本法で111型を9型として登録してもよい。
				56型と82型	現状では56型として登録してもよい。
				69型と88型	15型系統であり、検出は稀。本法で15型として登録してもよい。
2	Hexon	増幅産物の両端- 100bの場合		7型と66型(7h)	66型は従来7h型であり、本方法で7型と登録してもよい。
	2nd PCR			9型と67型、111型	本法で67型と111型を9型として登録してもよい。
				15型と29型、69型、88型	15型系統であり、検出は稀。本法で15型として登録してもよい。
				30型と63型	63型は30型の皿型ともいえる型であり、本法で30型として登録してもよい。
				56型と82型	現状では56型として登録してもよい。
				64型と85型	現状では64型として登録してもよい。600bpよりも長く読めれば、判別可能。*85型の全国的拡大が示唆されているため、可能であれば方法3の実施推奨。
				93型と101型	日本では検出されていない。37型系統。
3	Fiber				
	A種	1500bp	F_600b リード	-	
			F_600b リード	-	
	B種	700bp	R_600b リード	77型と78型	7型系統。方法2との組み合わせで判別可能。
	C種	2000bp	F_600b リード	2型と104型	R側の結果と組み合わせで判別可能
			6型と57型	R側の結果と組み合わせで判別可能	
		R_600b リード	-		
D種	1200bp	F_600b リード	22型と80型	R側の結果と合わせて判別可能	

		27 型と 92 型	R 側の結果と合わせて判別可能
		29 型と 63 型	Fiber のみでは判別不可。
		32 型と 33 型	R 側の結果と合わせて判別可能
		37 型と 64 型	Fiber のみでは判別不可。
		53 型と 85 型	Fiber のみでは判別不可。
		59 型と 88 型と 94 型	56 型系
		60 型と 97 型	R 側の結果と合わせて判別可能
		102 型と 103 型	R 側の結果と合わせて判別可能
R_600b リード		9 型と 56 型と 88 型と 111 型	F 側の結果と合わせて判別可能
		29 型と 63 型	Fiber のみでは判別不可。
		37 型と 64 型と 82 型	82 型は、F 側結果で判別可能。37 型と 64 型は判別不可。
		44 型と 48 型	F 側の結果と合わせて判別可能
		53 型と 85 型	Fiber のみでは判別不可。
Penton			
2nd PCR	500	56 型と 82 型と 86 型	Penton のみでは判別不可
		37 型と 53 型と 85 型	Penton のみでは判別不可
		16 型と 68 型	Penton のみでは判別不可
		77 型と 78 型	Penton のみでは判別不可