

氏名	かわむら ともこ 川村 朋子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1839 号		
学位授与の日付	令和 2 年 9 月 13 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Characteristic of slow growth in cell culture of adenovirus type 54 causing nationwide outbreak epidemic keratoconjunctivitis in Japan （日本国内で大流行した流行性角結膜炎を引き起こす 54 型アデノウイルスの細胞培養における遅い増殖速度の特性）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	内尾 英一
	（副査） 福岡大学	教授	今福 信一
	福岡大学	講師	戸川 温
	福岡大学	講師	石井 一成

内 容 の 要 旨

【目的】

ヒトマストアデノウイルス (Ad) は全身のさまざまな臓器に感染する DNA ウイルスで、A から G の 7 種に分類され、そのうち D 種が主に流行性結膜炎 (EKC) の原因ウイルスとして知られている。世界では D 種に属する 8 型 Ad (Ad8) が主な流行型ではあるが、日本では 54 型 Ad (Ad54) が、過去 4 年間にわたり大流行している。臨床検体を用いた Ad54 の特徴として、ウイルス分離に時間がかかり分離しにくいことが報告されているが、Ad54 のウイルス増殖について詳細に分析した基礎的研究が現在までない。今回われわれは Ad54 の増殖速度を、他の EKC を引き起こす主要な型である 37 型 (Ad37)、64 型 (Ad64)、コントロールとして 5 型 (Ad5) と比較するため、A549 細胞を用いて定量的に分析した。

【対象と方法】

細胞変性 (CPE) の観察： 1.0×10^5 コピー/ μL を含む合計 $50 \mu\text{L}$ のそれぞれのウイルス (Ad5, 37, 54, 64) を、A549 細胞に接種し、7 日間 CPE を観察した。

Ad ウイルスゲノムコピー数 (vGCN) の測定： 感染後、6 時間、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日目 (dpi) に上清とペレットに分けウイルスを回収した (図 1)。vGCN ($/\mu\text{L}$) はリアルタイム PCR で測定した。

ウイルス力価測定： A549 細胞を含む 96 ウェルに各型の 3 倍連続希釈ウイルス液を $100 \mu\text{L}$ 接種し、7 日間 CPE を観察した。50% 組織培養感染量 (TCID₅₀) を Spearman-

Karber's 法で求めた。

増殖速度(growth rate)の計算：ウイルスの増殖速度を比較するために、増殖速度を Ad の細胞内ゲノム増加速度(ウイルスが培養上清に排出されるまでの A549 細胞内でのゲノム複製速度)と定義した。ウイルスが上清に放出される直前の時を決定し、接種後 6 時間でのペレット中のウイルス量との間に直線を引いた(具体的には、Ad5、37、64 については 6 時間、2 dpi、Ad54 の場合は 6 時間、3 dpi の 2 点間で直線を引いた(図 3a))。成長率は直線の傾き(成長率= $\Delta \log$ ウイルス量/ Δ 時間)から計算した。統計的分析は、Tukey-Kramer 検定(N=3)を使用し、p 値<0.05 を統計学的有意とみなした。

感染細胞あたりの初期転写因子 E1 遺伝子の発現レベルの測定：E1 遺伝子の mRNA 量を調べるために、感染後 1、2、3 日においてペレットから抽出したウイルス DNA から cDNA を合成した。cDNA に含まれる各型の E1 の mRNA をリアルタイム PCR で測定した。また同時にそれぞれにペレット中に含まれる細胞数を RNase P 遺伝子を用いて測定した。細胞あたりの E1 遺伝子の発現レベルは、式 $2^{-Ct} / \text{細胞数}$ から計算した。各実験条件を 3 つのウェルで分析し、3 回繰り返した。統計的分析は Tukey-Kramer 検定(N=3)を使用し、p 値<0.05 を統計学的有意とみなした。

E1 遺伝子のプロモーターと E1 オープンリーディングフレーム (ORF) を含む領域の系統解析：増殖速度と直接的に関係する E1 領域と、その上流の推定 E1 プロモーター領域について、Genbank から入手した Ad5 (AY339865.1)、Ad37 (AB448775.1)、Ad54(AB333801.2)、Ad64 (JQ326307.1)、Ad8(AB448767.1)、Ad type 56 (Ad56: HM770721.2) について系統学的に比較した。

【結果】

CPE

図 2 は、Ad による CPE を示している。Ad5、37、および 64 に感染した A549 細胞は、3 dpi で拡大し、丸みを帯び明るく撮影された。4 dpi で、ウェルプレートの底(矢印)が観察できるほどに凝集した。Ad54 感染細胞は 4 dpi で膨張し始め、5 dpi で明確な CPE が確認された。Ad5、37、および 64 に感染した細胞は、ウェルプレートの底が観察されてから 24 時間以内にすべて培養液中に浮遊したが、Ad54 ではすべての細胞が培養液に浮遊するまで 48 時間かかった。他の型と比較して Ad54 は CPE の確認により多くの時間を要した。

vGCN と TCID₅₀ の型別比較

Ad5、37、および 64 では、1 dpi でペレットの vGCN が約 100 倍に増加した。これら 3 つの型では vGCN は 3 dpi 以内に最大である 10,000 倍に達した(図 3a)。Ad5、37、および 64 は、2 dpi で培養上清にウイルス排出が認められた(図 3b)。Ad54 では、2 dpi で、接種した vGCN の 100 倍になり、6 dpi で 10,000 倍に達した。上清へのウイルス排出は 3 dpi で観察された。他の型と比較して、Ad54 はペレットと上清の両方でウイルス増加に要する時間が長かった。TCID₅₀ は、Ad54 で最も低かった。

増殖速度の比較

細胞内の vGCN 増加は Ad5, 37, 64 では 2 dpi、Ad54 では 3 dpi に生じていた (図 3b)。増殖速度は表 2 に示す。Ad54 は他の型と比べ増殖速度が有意に遅かった。

E1 遺伝子発現の確認 (図 4)

Ad54 E1 遺伝子の相対的発現レベルは、1 dpi で他の型に感染した細胞よりも有意に低く、2 dpi および 3 dpi で徐々に増加した。

E1 遺伝子、推定プロモーターと ORF の系統発生分析

Ad37 と 64 の E1 遺伝子と推定プロモーター領域 ORF の DNA 配列は、系統学的に最も近かった。Ad54 は Ad8 に最も近かった。系統発生的に Ad5 は Ad54 から最も遠かった (図 5a、b)。

【結論】

A549 細胞での Ad54 の増殖速度は、Ad37, Ad64, および Ad5 と比較して遅かった。増殖速度の遅延は、ウイルスの侵入あるいは E1 転写開始の遅延が原因でゲノム複製が遅れた可能性がある。Ad54 の増殖速度が遅いことは罹病期間を延長させる可能性があり、Ad54 によって引き起こされる EKC には、さらなる注意が必要である。

審査の結果の要旨

本論文は、日本で 2015 年以降 5 年間にわたり最も検出された多く検出された型であるヒトアデノウイルス 54 型 (Ad54) のウイルス学的特徴を、A549 細胞を用いて他の型 (Ad37、Ad64、および Ad5) 比較分析した報告である。Ad54 では細胞変性の出現、ウイルスゲノムコピー数の増加、増殖速度は、他の型よりも遅く、E1 遺伝子の相対的発現レベルは、感染後 1 日目では他の型よりも Ad54 の方が有意に低かった。E1 遺伝子領域と、E1 遺伝子プロモーター領域の系統学的解析では Ad54 は Ad8 に最も近かったという知見を得た。Ad54 の増殖速度が遅いという特徴は流行性角結膜炎 (EKC) の罹病期間を延長させる可能性があり、Ad54 によって引き起こされる EKC には、さらなる注意が必要であることが示唆された。

1. 斬新さ

Ad54 についてウイルスの定量的増殖解析を行った初めての報告であり、極めて斬新である。

2. 重要性

アデノウイルスは種別、型別で引き起こす疾患や臨床症状の程度に違いがある一方で眼科的治療薬はいまだに存在しない。そのため感染予防や、感染制御が重要になるが、今回の Ad54 のように増殖速度が他の型に比べ遅いウイルスでは潜伏期間や罹病期間が延長する可能性が示唆されたため、通常のアデノウイルスよりもより嚴重な感染制御が必要であることが示唆された点で重要性が高い。

3. 実験方法の正確性

ヒトアデノウイルス D 種はヒト以外の動物に感染させることが難しく、また不死化ヒト結膜上皮細胞に実験的に感染させることが難しいという既報があり、今回はアデノウイルスに感受性をもち、ウイルス分離する際に最もよく使用されている A549 細胞を使用している。加えて、正確な統計手法をもちいて解析が実施され、実験方法の正確性は確保されている。

4. 表現の明確さ

目的、方法、結果は正確かつ明瞭に表現されている。考察については今回の報告における位置づけを示すとともに、実施した検討の不十分な点を明確に示している。

5. 主な質疑応答

Q: 新型と従来の血清型の違いはなにか。

A: 従来は中和抗体を用いた型別法だったが、型が多くなってくると保存されている中和抗体だけでは判別不可能になってきたため、2006 年からペントン、ファイバー、ヘキソンの型を記載する遺伝子型での型別法になった。そのため 52 型以降は新型とよばれます。

Q: ほかの型とくらべ 54 型の臨床症状の違いを説明してください。

A: 臨床症状もある程度強いが、慢性期の角膜混濁が多いのが特徴で、角膜合併症が他の型とくらべて多いことが特徴です。

Q: 54 型がこの数年間流行している原因と角膜障害が多くなる原因はなんだと思われますか。

A: 増殖が遅く、長らく患者から 54 型の DNA が検出されることから、患者から他者へ感染させる機会が多くなるのが一つ、また増殖が遅いことで宿主の免疫を長い期間活性化させることで角膜障害を起こすのではないかと考えています。

Q: 54 型は A549 細胞の中では増殖しにくい一方で、臨床検体からは長い間ウイルスが排出されているという一見乖離した結果と思われる。実際ウイルスの増殖が初期に遅

いと免疫から排除される傾向にあるが、それはどう考えますか。

A: この 54 型は A549 細胞以外の HeLa 細胞や、RD 細胞などでも増殖が遅いと報告されています。増殖が遅い結果、ゲノムの検出も長らくされるのだらうと考えています。

Q: インターフェロンをノックアウトされているような細胞系で増殖するという事は、おそらくアデノウイルスにはヒトの免疫を抑制させる、細胞培養の場合は必要とされないアクセサリ遺伝子が存在して、それがヒトでは働いて 54 型が全国的に感染させている可能性があると思われる。E1 遺伝子は必須の遺伝子で、一見あまり重要と思われていないそのほかの遺伝子がそういう免疫応答に関与しているとおもわれるがどうか。

A: ご指摘ありがとうございます。In vitro のこの研究では解析できない項目ですが、今後検討したいと思います。

Q: アデノウイルスの感染する際に使用するレセプターの違いはなんですか。

A: EKC に関連する D 種ではシアル酸、C 種ではコクサッキーアデノウイルスレセプター (CAR)、そのほかヘパラン硫酸などが知られています。

Q: 例えば 293 細胞を使った実験で同じ実験をするとどうなると考えますか？

A: 293 細胞は E1 遺伝子が組み込まれているので、54 型を増殖させたとすると、速度が遅れることなく、他の型と同じようなゲノムの増殖曲線を描くと考えています。

Q: 結膜上皮細胞内での増殖変化をみる必要があるのではないか。また in vivo での実験が必要なのではないか。

A: 今回は臨床検体からの分離の際に最も用いられている A549 細胞を使用した。ご指摘の通り結膜上皮細胞を用いた実験を行いたかったのですが、入手困難でした。またヒトマストアデノウイルスはラットやウサギには感染しないことがわかっているため、in vivo での実験が難しく、現時点では in vitro の実験系しか行えません。将来結膜上皮については行いたいと考えています。

本論文は独創性を有しており、今後のアデノウイルス研究に貢献する内容であり、学位論文に値すると評価された。