

博士（医学）大口剛司

学位論文題名

ヒトアデノウイルス結膜炎におけるDNAコピー数の
測定および血清型同定の臨床的意義

学位論文内容の要旨

ヒトアデノウイルス (HAdV) は現在 51 種類の血清型が知られており、そのうちヒトに結膜炎を引き起こす血清型は主に HAdV-3, 4, 7, 8, 11, 19, 37 の 7 種類である。HAdV は病原性が非常に強く、より重症な結膜炎となり、またその感染力の強さから家族内感染や院内感染を引き起こすウイルスである。

HAdV 結膜炎の診断はこれまでに中和試験、ウイルス分離培養、イムノクロマト法、定性的 PCR 法などが行われてきた。しかし、中和試験、ウイルス分離培養は診断に日数を要するため、臨床の場に還元できず、イムノクロマト法は迅速だが感度が低く、これまでの PCR 法は定性のみ可能で、定量は出来ないという欠点があった。近年では、real-time PCR 法を用いた定量的 PCR 法が開発され、様々なウイルス性疾患についてその病態とウイルス DNA 量との関連が明らかとなってきた。

そこで本研究は、ヒトアデノウイルス (HAdV) 結膜炎の散発例において、この方法を用いて HAdV-DNA の検出とコピー数の測定を行い、結膜炎重症度別、病日別、血清型別およびイムノクロマト法陽性例と陰性例について検討を行った。また、院内感染した例についてもそのコピー数の分布を検討し、散発例との比較検討をおこなった。さらに、遺伝子系統解析により血清型を同定し、その意義についても検討した。

結膜炎重症例やイムノクロマト法を用いた HAdV 簡易検出キット陽性例では HAdV-DNA が結膜病巣部により多く存在していることが明らかとなった。血清型別、病日別の検討では特に差はみられなかった。また、DNA コピー数の分布は散発例が 10 の 5 乗から 10 の 10 乗で、院内感染例では DNA コピー数が 10 の 3 乗から 10 の 10 乗と院内感染例では散発例に比べ幅広く分布していた。院内感染例は手術や点眼薬の影響で病状が修飾されているとも考えられるが、コピー数の検討からは院内感染の臨床症状は散発例に比べ多様であることが示唆された。

Real-time PCR 法により、HAdV 結膜炎の病態が解明されつつはあるが、HAdV 結膜炎には潜伏感染や持続感染の有無、また、それらは感染源となり得るのかなどいまだ不明な点も多い。今後、これらの病態の解明に real-time PCR 法が役立つものと期待される。また、HAdV に有効な治療法はないが、現在様々な抗ウイルス剤が治療薬として期待されている。今後これら治療薬の開発にもこの real-time PCR 法が役立つと期待される。

遺伝子系統解析で血清型は HAdV-3, 4, 8, 19, 37 が同定された。当時 HAdV-37 が流

行しており、この検討においても HAdV-37 が最も多く同定された。血清型を同定することは感染源を特定することが可能で、それが出来れば感染予防や感染拡大防止に役立てることが可能である。また、HAdV はその感染力の強さから全国的および世界的流行へとつながるため、公衆衛生学的にも重要である。血清型を同定し、臨床の場に還元することは HAdV を監視する意味でも重要である。さらに、今回同定された血清型のうち、HAdV-4, 8, 37 でウイルス変異がみられていた。このため、今後これらのウイルスによる結膜炎の流行および院内感染に注意する必要がある。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　大　野　重　昭

副　查　教　授　小　野　江　和　則

副　查　教　授　上　出　利　光

学　位　論　文　題　名

ヒトアデノウイルス結膜炎におけるDNAコピー数の

測定および血清型同定の臨床的意義

近年、real-time PCR 法を用いた定量的 PCR 法が開発され、様々なウイルス性疾患においてその病態とウイルス DNA 量との関連が明らかとなってきた。ヒトアデノウイルス (HAdV) に関しても定量可能なリアルタイム PCR 法が開発され、病変部位からウイルス DNA の定量が可能となり、HAdV 結膜炎の病態についてより詳細な検討が可能となってきた。そこで本研究は、HAdV 結膜炎の散発例において、この方法を用いてウイルス DNA コピー数の測定を行い、結膜炎重症度別、病日別、血清型別およびイムノクロマトグラフィ法陽性例と陰性例について検討を行った。また、院内感染した例についてもそのコピー数を検討し、散発例との比較検討をおこなった。さらに、遺伝子系統解析により血清型を同定し、その意義についても検討した。その結果、結膜炎重症例やイムノクロマトグラフィ法陽性例では HAdV-DNA が結膜病巣部により多く存在していることが明らかとなった。また、コピー数の分布は散発例が 10 の 5 乗から 10 の 10 乗で、院内感染例では DNA コピー数が 10 の 3 乗から 10 の 10 乗と院内感染例では散発例に比べ幅広く分布していた。院内感染例は手術や点眼薬の影響で病状が修飾されているとも考えられるが、コピー数の検討からは院内感染の臨床症状は散発例に比べ多様であることが示唆された。Real-time PCR 法により、HAdV 結膜炎の病態が解明されつつはあるが、HAdV 結膜炎には潜伏感染や持続感染の有無、また、それらは感染源となり得るのかなどいまだ不明な点も多い。今後、これらの病態の解明に real-time PCR 法が役立つものと期待される。遺伝子系統解析で血清型は HAdV-3, 4, 8, 19, 37 が同定された。当時本邦では HAdV-37 が流行しており、この検討においても HAdV-37 が最も多く同定された。血清型を同定することは感染源を特定することが可能で、それが出来れば感染予防や感染拡大防止に役立てることが可能である。また、HAdV はその感染力の強さから全国的流行へつながるため、公衆衛生学的にも重要である。血清型を同定し、臨床の場に還元することは HAdV を監視する意味でも重要である。さらに、今回同定された血清型のうち、HAdV-4, 8, 37 でウイルス変異がみられていた。このため、今後これらのウイルスによる結膜炎の流行および院内感染に注意する必要がある。

審査にあたっては、副査小野江和則教授から(1) アデノウイルスの血清型は今後増えることはあるのか、(2) 血清型による感染部位や症状の違う理由はウイルスの親和性の問題なのか、

について質問があり、(1) アデノウイルスは現在 51 種類の血清型が同定されているが、変異が繰り返されているため、血清型が増える可能性があること、(2) ファイバー やヘキソンなどウイルスのヒト細胞への親和性および病原性の相違により感染部位や症状が異なると回答した。また、(3) 結膜炎はどういう機序で治癒していくのか、については局所免疫や中和抗体などの全身免疫が成立して自然治癒の経過をたどると回答した。一方、副査上出利光教授からは、(1) PCR でヘキソン遺伝子部位を調べた理由について質問があり、この部位を調べることによってアデノウイルスの 51 種類全ての血清型が同定可能であるためと回答した。(2) 発症から数日経過しても DNA コピー数が高い理由については、今回の検討はウイルス分離培養陽性例を対象として用いているため、いかなる病日でもある程度のウイルス粒子が結膜に存在していたと回答した。また、(3) アデノウイルスの潜伏感染の可能性については現在明確な回答が得られていないため、今後の検討課題であること、(4) 血清型による中和抗体保有率の差については、血清型により 5% から 70% 程度まで差があると回答した。また、主査大野重昭教授から(1) 散発例と院内感染例のコピー数の分布の違いについて質問があり、対象の違いと、散発例は何らかの自覚症状を持った例だが、院内感染例は感染予防の観点から発症早期の例や、極めて軽症な例も検討しているためと回答した。また、(2) 重症例でコピー数が多いのに、重症になる血清型で差がみられないのはなぜかという質問については、重症度は血清型だけの問題ではなく、生体側の問題も関与していると回答した。

この論文は、real-time PCR 法を用い、HAdV 結膜炎の病態の解明を試みた初めての報告である点で高く評価され、今後臨床への応用や HAdV 結膜炎のさらなる病態の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。