



Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013

Ogi, Miki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6966号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006966>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013

1999～2013 年に兵庫県において検出された
コクサッキーウイルス A6 のゲノム配列と臨床病態の検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
感染病理学

(指導教員：林 祥剛 教授)

荻 美 貴

[はじめに]

エンテロウイルスはピコornaウイルス科エンテロウイルス属に属する 1 本鎖 RNA ウィルスで、5'非翻訳領域(5'UTR)、3'非翻訳領域(3'UTR)及び P1 (VP4,VP2,VP3,VP1), P2 (2A,2B,2C), P3 (3A,3B,3C,3D)の 3 つのコード領域より構成されている。A～D 種がヒトに感染し、多彩な臨床像を呈する。手足口病は小児の代表的なエンテロウイルス感染症で、口腔粘膜および四肢末端に現れる水疱を主症状とし、日本では夏から初秋に流行する。手足口病の主な原因ウィルスは A 種のエンテロウイルス 71 型とコクサッキーウイルス A16 で、同じ A 種のコクサッキーウイルス A6 (CV-A6) は口腔粘膜に水疱性発疹が出現するヘルパンギーナの起因ウィルスとして知られている。しかし、2008 年にフィンランドで初めて CV-A6 による手足口病が流行し、その後 2010 年に台湾、2011 年にスペイン、2012 年にタイ、2013 年に中国等で CV-A6 による手足口病が相次いで報告された。CV-A6 による手足口病は、従来の手足口病より皮膚症状が重篤で、回復後に爪甲脱落が認められることがある。兵庫県では、2011 年に CV-A6 による手足口病が大流行し、熱性けいれん等他の症状を呈する患者からも CV-A6 が検出された。本研究では、CV-A6 感染による臨床症状とウィルスゲノムとの関連性について解明するため、兵庫県で 1999～2013 年に検出された CV-A6 の全ゲノム解析を行った。

[材料と方法]

兵庫県の感染症発生動向調査において、1999～2013 年に、発熱、発疹、上気道炎、下痢等によりエンテロウイルス感染が疑われる小児 5,612 名から採取された咽頭ぬぐい液、便、髄液等 6,915 検体が供試された。検体から抽出したウィルス RNA について、エンテロウイルスの VP4 領域を PCR 法で増幅し塩基配列から CV-A6 を同定した。CV-A6 陽性検体のうち、ヘルパンギーナ、手足口病、発疹症、熱性けいれんの患者から異なる年に採取された検体を選び CV-A6 の全塩基配列の解析を行った。GenBank に登録されている台湾株と静岡株の塩基配列から自作した 8 組のプライマーセットを用いて、サンガーシーケンシングにより CV-A6 の全ゲノム配列を決定した。次に、ソフトウェア MEGA6 を用いて、最尤法で VP1、3D、5'UTR 領域及び全ゲノムの系統樹解析とアミノ酸置換の検索を行い、SimPlot 解析と Bootscan 解析により兵庫株の組換えの有無を調べた。

[結果]

5,612 名中 127 名 (平均年齢 2.4 ± 2.3 歳) から CV-A6 が検出された。兵庫県では CV-A6 は 1999 年から 2009 年まで隔年で夏季に検出されていたが、2010 年 10 月と 12 月にも検出され、2011 年は CV-A6 による手足口病の大流行により CV-A6 が全エンテロウイルスの 46.4%を占めるに至った。1999～2009 年に CV-A6 が検出された 20 名のうち 70%がヘルパンギーナ、20%が発疹症、10%が手足口病であったが、2010～2013 年になると 107 名中、51%が手足口病、16%がヘルパンギーナ、33%が発疹症や熱性けいれん等の症状を呈した。

1999 年、2003 年、2007 年、2009 年、2011 年のヘルパンギーナ患者 9 名、2009 年、2010 年、2011 年、2013 年の手足口病患者 8 名、2013 年の熱性けいれん患者 3 名、2009 年の発疹症患者 2 名から検出された 22 株の CV-A6 について全ゲノム解析を行った。VP1 領域での系統樹解析の結果、1999～2009 年の株（クラスター I）と 2009～2013 年の株（クラスター II）に大別された。2009 年に検出された 4 株中、発疹症患者から検出された株(Hyogo4604/2009/EXT)はクラスター I、他の 3 株(Hyogo4658/2009/EXT, Hyogo4672/2009/HPN, Hyogo4667/2009/HFMD)はクラスター II に属していた。5'UTR 領域では 2007 年と 2009 年の 3 株 (Hyogo3818/2007/HPN, Hyogo3895/2007/HPN, Hyogo4604/2009/EXT) は他の株と異なるグループに、3D 領域では 1999～2003 年、2007～2009 年、2009～2013 年の 3 グループに分類された。クラスター II に属する株は 3D 領域でもすべて同じグループに属し、3D 領域の分類は全ゲノムによる分類とほぼ一致していた。クラスター I の株の多くはヘルパンギーナ患者から検出されており、2011～2013 年に検出されたクラスター II の株は手足口病のアウトブレイクに関連する株であった。

1999 年と 2007 年に検出されたクラスター I の 2 株 (Hyogo1283/1999/HPN, Hyogo3895/2007/HPN) と 2009 年と 2013 年のクラスター II の 2 株(Hyogo4658/2009/EXT, Hyogo9205/2013/CV)を用いて行った Simplot 及び Bootscan 解析では、2C 領域の一部分と 3A、3B 領域でクラスター間の塩基配列が大きく異なっていたが、組換えは確認できなかった。クラスター間のアミノ酸の相同性は $97.7 \pm 0.28\%$ で、P1 と P2 領域と比較して P3 領域の相同性 ($96.4 \pm 0.57\%$) が低かった。22 株の CV-A6 のアミノ酸配列を比較すると、2,201 残基中 132 か所で変異が見られた。そのうちクラスター I と II で明確に異なるアミノ酸は 17 残基あり、P3 領域での変異が半数以上を占めた。ウイルス RNA 合成に関与する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである 3D タンパクでは 6 か所のアミノ酸置換が確認された。

【考察】

本研究は、兵庫県における 1999～2013 年の CV-A6 の流行を解析し、CV-A6 感染患者の症状と塩基配列の関連を把握する目的で行った。その結果、2009 年以降 CV-A6 による手足口病が増加しており、塩基配列が変化していることが明らかになった。2015 年に Gaunt らは 3D 領域に基づく分類によって手足口病との関連が強く示唆される特定のクラスターを報告している。3D 領域に基づく解析では、兵庫県で検出されたクラスター II に属する株はすべて、そのグループに属していた。兵庫株のクラスター I と II を比較すると、P3 領域、特に 3D 領域において、多くの変異が検出されており、この領域の変異と臨床症状との関連性が示唆された。

CV-A6 による手足口病の皮膚症状は重篤であるが、中枢神経症状は稀であると報告されている。兵庫県のサーベイランスにおいても、2012 年までは熱性けいれん患者から CV-A6 は検出されていないが、2013 年に 6 名の熱性けいれん患者から CV-A6 が検出された。今回そのうちの 3 名につい

て全ゲノム配列の解析を行ったが、共通した変異は見られなかった。エンテロウイルスは型内や型間で組換えを起こすことが知られており、上海で検出された CV-A6 は 2C 領域で CV-A4 との組換えが起こっており、組換え CV-A6 では皮膚症状が広範囲に広がっていることが報告されている。本研究では特定のアミノ酸置換や組換えは同定されておらず、重症化に関与する因子は依然として不明である。CV-A6 の進化とその症状を監視するため、さらに病理学的なサーベイランスが必要である。

近年、日本では CV-A6 による手足口病のアウトブレイクが頻繁に起きている。過去 14 年間に CV-A6 は 3D 領域で多くの変異を伴っており、その変異の蓄積が臨床症状の変化を起こしていると考えられる。

【結語】

1999～2013 年に兵庫県において検出された CV-A6 の全ゲノム配列を解析した。臨床像は 2009 年にヘルパンギーナから手足口病や熱性けいれんなどへ変化が見られた。2009 年前後でクラスターが変化し、3D 領域において多くのアミノ酸変異が検出され、これらの変異が臨床症状に関連した可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2696号	氏 名	荻 美貴
論文題目 Title of Dissertation	Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013 1999～2013年に兵庫県において検出されたコクサッキーウイルス A6 の ゲノム配列と臨床病態の検討		
審査委員 Examiner	主 査 勝 = 郁夫 Chief Examiner 副 査 岩田健太郎 Vice-examiner 副 査 森岡 一朗 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景と目的】 エンテロウイルスはピコornaウイルス科エンテロウイルス属に属する 1 本鎖 RNA ウィルスで、5' 非翻訳領域 (5'UTR)、3' 非翻訳領域 (3'UTR) 及び P1 (VP4, VP2, VP3, VP1), P2 (2A, 2B, 2C), P3 (3A, 3B, 3C, 3D) の3つのコード領域より構成されている。A～D 種がヒトに感染し、多彩な臨床像を呈する。手足口病は小児の代表的なエンテロウイルス感染症で、口腔粘膜および四肢末端に現れる水疱を主症状とし、日本では夏から初秋に流行する。手足口病の主な原因ウィルスは A 種のエンテロウイルス 71 型とコクサッキーウイルス A16 で、同じ A 種のコクサッキーウイルス A6 (CV-A6) は口腔粘膜に水疱性発疹が出現するヘルパンギーナの起因ウィルスとして知られている。しかし、2008 年にフィンランドで初めて CV-A6 による手足口病が流行し、その後 2010 年に台湾、2011 年にスペイン、2012 年にタイ、2013 年に中国等で CV-A6 による手足口病が相次いで報告された。CV-A6 による手足口病は、従来の手足口病より皮膚症状が重篤で、回復後に爪甲脱落が認められることがある。兵庫県では、2011 年に CV-A6 による手足口病が大流行し、熱性けいれん等他の症状を呈する患者からも CV-A6 が検出された。本研究では、CV-A6 感染による臨床症状とウィルスゲノムとの関連性について解明するため、兵庫県で 1999～2013 年に検出された CV-A6 の全ゲノム解析を行った。

【方法】 兵庫県の感染症発生動向調査において、1999～2013 年に、発熱、発疹、上気道炎、下痢等によりエンテロウイルス感染が疑われる小児 5,612 名から採取された咽頭ぬぐい液、便、髄液等 6,915 検体が供試された。検体から抽出したウィルス RNA について、エンテロウイルスの VP4 領域を PCR 法で増幅し塩基配列から CV-A6 を同定した。CV-A6 陽性検体のうち、ヘルパンギーナ、手足口病、発疹症、熱性けいれんの患者から異なる年に採取された検体を選び CV-A6 の全塩基配列の解析を行った。GenBank に登録されている台湾株と静岡株の塩基配列から自作した 8 組のプライマーセットを用いて、サンガーシーケンスにより CV-A6 の全ゲノム配列を決定した。次に、ソフトウェア MEGA6 を用いて、最尤法で VP1、3D、5'UTR 領域及び全ゲノムの系統樹解析とアミノ酸置換の検索を行い、SimPlot 解析と Bootscan 解析により兵庫株の組換えの有無を調べた。

【結果】

5,612 名中 127 名 (平均年齢 2.4±2.3 歳) から CV-A6 が検出された。兵庫県では CV-A6 は 1999 年から 2009 年まで隔年で夏季に検出されていたが、2010 年 10 月と 12 月にも検出され、2011 年は CV-A6 による手足口病の大流行により CV-A6 が全エンテロウイルスの 46.4% を占めるに至った。1999～2009 年に CV-A6 が検出された 20 名のうち 70% がヘルパンギーナ、20% が発疹症、10% が手足口病であったが、2010～2013 年になると 107 名中、51% が手足口病、16% がヘルパンギーナ、33% が発疹症や熱性けいれん等の症状を呈した。

1999 年、2003 年、2007 年、2009 年、2011 年のヘルパンギーナ患者 9 名、2009 年、2010 年、2011 年、2013 年の手足口病患者 8 名、2013 年の熱性けいれん患者 3 名、2009 年の発疹症患者 2 名から検出された 22 株の CV-A6 について全ゲノム解析を行った。VP1 領域での系統樹解析の結果、1999～2009 年の株（クラスター I）と 2009～2013 年の株（クラスター II）に大別された。2009 年に検出された 4 株中、発疹症患者から検出された株（Hyogo4604/2009/EXT）はクラスター I、他の 3 株（Hyogo4658/2009/EXT, Hyogo4672/2009/HPN, Hyogo4667/2009/HFMD）はクラスター II に属していた。5'UTR 領域では 2007 年と 2009 年の 3 株（Hyogo3818/2007/HPN, Hyogo3895/2007/HPN, Hyogo4604/2009/EXT）は他の株と異なるグループに、3D 領域では 1999～2003 年、2007～2009 年、2009～2013 年の 3 グループに分類された。クラスター II に属する株は 3D 領域でもすべて同じグループに属し、3D 領域の分類は全ゲノムによる分類とほぼ一致していた。クラスター I の株の多くはヘルパンギーナ患者から検出されており、2011～2013 年に検出されたクラスター II の株は手足口病のアウトブレイクに関連する株であった。

1999 年と 2007 年に検出されたクラスター I の 2 株（Hyogo1283/1999/HPN, Hyogo3895/2007/HPN）と 2009 年と 2013 年のクラスター II の 2 株（Hyogo4658/2009/EXT, Hyogo9205/2013/CV）を用いて行った Simplot 及び Bootscan 解析では、2C 領域の一部分と 3A、3B 領域でクラスター間の塩基配列が大きく異なっていたが、組換えは確認できなかった。クラスター間のアミノ酸の相同性は $97.7 \pm 0.28\%$ で、P1 と P2 領域と比較して P3 領域の相同性（ $96.4 \pm 0.57\%$ ）が低かった。22 株の CV-A6 のアミノ酸配列を比較すると、2,201 残基中 132 か所で変異が見られた。そのうちクラスター I と II で明確に異なるアミノ酸は 17 残基あり、P3 領域での変異が半数以上を占めた。ウイルス RNA 合成に関与する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである 3D タンパクでは 6 か所のアミノ酸置換が確認された。

【結論】1999～2013 年に兵庫県において検出された CV-A6 の全ゲノム配列を解析した。臨床像は 2009 年にヘルパンギーナから手足口病や熱性けいれんなどへ変化が見られた。2009 年前後でクラスターが変化し、3D 領域において多くのアミノ酸変異が検出され、これらの変異が臨床症状に関連した可能性が示唆された。

本研究は兵庫県において検出された CV-A6 ウイルスのゲノム配列と臨床像の関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。