

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：83201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2017

課題番号：23791212

研究課題名(和文) 手足口病の原因ウイルスの抗原性状変化と周期的流行に関する分子疫学的研究

研究課題名(英文) Molecular and serological epidemiology of causative viruses of hand, foot, and mouth disease

研究代表者

板持 雅恵 (ITAMOCHI, Masae)

富山県衛生研究所・ウイルス部・主任研究員

研究者番号：70393080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：手足口病の流行様式を解明するため、コクサッキーウイルスA6型(CA6)、A16型(CA16)とエンテロウイルス71型(EV71)の抗原性状の変化や富山県民の抗体保有状況を調べた。1981～2015年に分離されたCA16とEV71のカプシド蛋白質全862アミノ酸のうち、分離株間のバリエーションはそれぞれ35か所、34か所でみられ、抗原決定基の近くにも存在した。1995年と2007年のCA16分離株のウサギ免疫血清に対する中和抗体価は1981～2012年の分離株間ではほぼ同等であった。CA6の流行前の抗体保有状況は流行後と比較して0～6歳で低く、流行要因の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Molecular and serological epidemiology of coxsackievirus A6 (CA6), A16 (CA16), and enterovirus 71 (EV71) were investigated to clarify the prevalence of hand, foot, and mouth disease in Toyama Prefecture, Japan. The numbers of substitution sites of amino acids among capsid region (862 amino acids) of CA16 and EV71 isolates in 1981 to 2015 were 35 and 34, respectively, and some of the variations of amino acids were observed near the antigenic sites. Anti-CA16 rabbit serum raised to isolates in 1995 and 2007 showed almost the same neutralizing antibody titer against eleven CA16 isolates in 1981 to 2012. The positive rate of neutralizing antibody against CA6 in 2011 made an upturn in children aged 0 to 6 years old, compared to that in 2009. One of the factors of CA6 prevalence in 2010 to 2011 was thought to be the increase of susceptibility in the young generation.

研究分野：ウイルス学、公衆衛生学

キーワード：手足口病 エンテロウイルス71型 コクサッキーウイルスA6型 コクサッキーウイルスA16型

## 1. 研究開始当初の背景

手足口病は、毎年夏季に小児を中心に流行し、手足や口腔粘膜に生じる水疱性の発疹を特徴とする。原因となるウイルスは、主にコクサッキーウイルス A16 型 (CA16) とエンテロウイルス 71 型 (EV71) であるが、流行規模や流行する血清型は年ごとに異なる。EV71 は CA16 と同じ受容体を介するが、CA16 よりも中枢神経合併症や死亡例が多いことが報告されている。しかしながら、両ウイルスの流行とウイルスの抗原性状の変化、及び病原性の違いについては不明な点が多い。特に CA16 については、研究開始当時(平成 23 年) 抗原性状解析を含め、ほとんど報告はなかった。その後、CA16 は VP1、VP3 領域に中和エпитープ(抗原決定基)が存在することが報告された (Chong ら 2012, Shi ら 2013, Ren ら 2015, Zhang ら 2016)。

我々は、先行研究で 1981~2007 年に分離した CA16 と EV71 のカプシド蛋白質 VP1 領域のアミノ酸配列を比較し、CA16 では一旦出現したアミノ酸変異が蓄積せず元に戻ってしまうのに対し、EV71 では経年的にアミノ酸変異が蓄積することを報告してきた (Iwai ら 2008)。他のエンテロウイルスでは VP1 領域以外の VP2 領域や VP3 領域にも抗原決定基が存在することから、CA16 や EV71 でも、VP1 領域以外にもアミノ酸変異が出現し、ウイルスの抗原性状に変化が生じている可能性が考えられた。また、ウイルスの抗原性状の変化が地域流行に及ぼす影響については不明であったため、過去約 30 年にわたって手足口病患者から分離されたウイルスの継時的な抗原性状の変化を明らかにすることは流行機序の解明に役立つものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、手足口病ウイルスについて、カプシド蛋白質全領域 (VP1~VP4) のアミノ酸配列を比較するとともに、分離株の抗原性状解析や血清疫学調査を行うことにより、ウイルスにそれぞれ特徴的に認められる抗原性状の変化、あるいは集団免疫と、地域流行との関連を明らかにし、手足口病の流行様式を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 手足口病患者発生状況

手足口病患者数は、感染症発生動向調査として富山県内の 29 小児科定点医療機関から毎週報告される報告数を集計した。

### (2) 手足口病ウイルスの検出と遺伝子解析

1981 年から 2017 年に、富山県内の医療機関を受診し協力の得られた手足口病症例の糞便、鼻腔または咽頭拭い液、水疱内容物、

爪甲、髄液等を対象に Vero, MA104, RD, LLCMK2 細胞を用いてウイルス分離を行った。分離されたウイルスは、抗エンテロウイルスプール血清 (国立感染症研究所分与およびデンカ生研)、エンテロウイルス単味抗血清 (デンカ生研) を用いた中和試験により同定した。

検体または分離株について、ウイルスの RNA を抽出し、カプシド領域遺伝子を対象とした PCR を行った。得られた PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。分離株の塩基配列は、標準株及び国内外のウイルスの塩基配列、およびアミノ酸配列と比較した。また、進化距離を Kimura-2-parameter 法を用いて計算し、Neighbor-joining 法により分子系統樹を作成した。

### (3) ウサギ免疫血清の作製

1995 年と 2007 年の分離株に対するウサギ免疫血清を作製し、分離株間の中和抗体価を比較した。ウサギ免疫血清の作製は富山大学動物実験委員会の承認を得た (第医-34 号)。

### (4) 血清疫学調査 (住民の血清中の CA6、CA16 に対する中和抗体の測定)

CA6 の血清疫学調査では、2007 年、2009 年、2011 年、2013 年のそれぞれ 189 名、224 名、250 名、299 名、合計 962 名 (0~91 歳) の血清を対象とした。CA16 の調査では、2007 年、2009 年、2016 年のそれぞれ 294 名、357 名、262 名 (0~88 歳) を対象とした。

血清は感染症流行予測調査事業により採血後保存されたものであり、調査内容は富山県衛生研究所倫理審査委員会により承認を受けた (承認番号:H22-2)。

血清を Eagle-MEM で 4 倍希釈し、56 30 分間非働化した後、その 25  $\mu$ L を 96 穴マイクロプレート上で 2 段階希釈した。希釈血清それぞれに、100TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L のウイルスを 25  $\mu$ L 加えてよく混和し、37 3 時間の中和反応を行った。中和後、RD 細胞の浮遊液 (1~2  $\times 10^5$  細胞/mL) を 100  $\mu$ L ずつ加え、37、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。1 週間観察し、50%の細胞変性効果を示した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とし、中和抗体価 4 倍以上を陽性とした。各血清は同時に 2 回ずつ測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 手足口病ウイルスの流行

1995 年と 2008 年に富山県では、CA16 が主な原因と考えられる手足口病の大きな流行がみられた (週別定点あたり患者数は最大でそれぞれ 16.2 人、9.6 人)。EV71 は、1983 年、1991 年、1997 年、2006 年に多く検出された。CA6 は、2010 年以降に手足口病患者から検出頻度が高くなり、2011 年、2015 年における手足口病の流行 (週別定点あたり患者数は最大でそれぞれ 8.7 人、10.3 人) の主な原因と

考えられた(図1)。

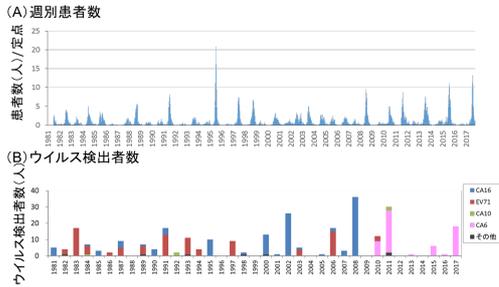
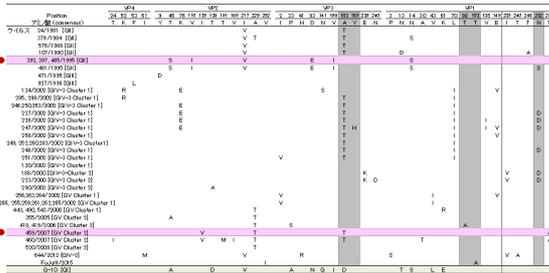


図1.手足口病の患者発生状況(富山県)

(2) CA16の分子疫学

1981~2015年に富山県において分離された50株のCA16について、カプシド蛋白質全領域(VP1~VP4領域)の塩基配列、及びアミノ酸配列を比較した。その結果、カプシド蛋白質全領域862アミノ酸のうち、分離株間のバリエーションは35か所でみられ、分離年別に分類された(表1)。しかしながら、アミノ酸変異は経年的には蓄積せず、元に戻るが多かった。一方、抗原決定基の領域近くにもバリエーションがみられた(図2)。

表1. CA16分離株のカプシド蛋白質のアミノ酸配列のバリエーション



:ウサギ免疫血清を作製したウイルス  
灰色の領域:抗原決定基(引用文献、~)

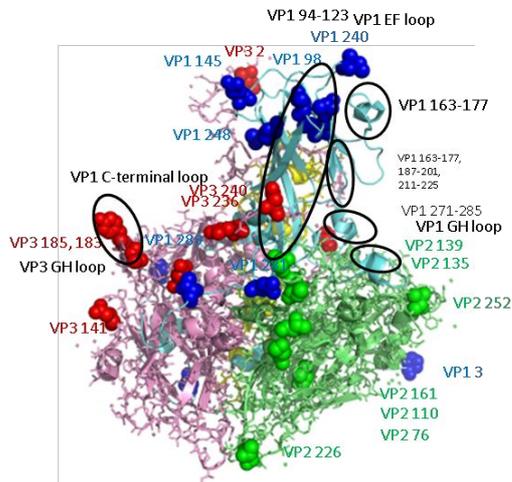


図2. CA16分離株のアミノ酸配列のバリエーションの部位。立体構造はRCSB no.5C4Wによる。VP1:青、VP2:緑、VP3:赤、VP4:黄、黒:抗原決定基。(引用文献、~)

(3) CA16の抗原性状解析

1995年と2007年のCA16分離株2株について、それらのウサギ免疫血清(ポリクローナル抗体)と標準抗血清G-10(国立感染症研究所分与)に対する中和抗体価を比較したところ、分離株間ではほぼ同等であったが、G-10とこれらの分離株とは4倍以上のずれがあった(表2)。したがって、抗原性状は分離株間では類似しており、G-10とこれらの分離株とは比較的異なる可能性が考えられた。

表2. CA16分離株の各抗血清による中和抗体価

	抗血清			
	G-10 (20U)	392/1995	457/2007	
ウイルス	G-10	128	4	8
	24/1981	1	32	64
	379/1984	4	64	256
	576/1988	2	32	256
	107/1990	2	32	64
	392/1995	2	64	128
	249/2002	2	64	128
	120/2003	2	64	256
	355/2005	2	16	256
	459/2007	2	32	512
	443/2008	2	64	512
	644/2012	2	64	256

(4) CA16の血清疫学

2008年にCA16による手足口病が流行した。流行前後の年(2007年、2009年)と近年(2016年)におけるCA16の血清疫学調査を実施した(計913名(0~88歳))ところ、抗体保有率は、2007年では0~1歳が21.4%、2~3歳が25.0%、4~6歳が64.3%、2009年では0~1歳が10.0%、2~3歳が28.6%、4~6歳が61.5%であり、流行前後の年で手足口病の好発年齢である0~6歳の抗体保有率に大きな差はみられなかった。一方、2016年では、0~1歳が59.1%、2~3歳が45.5%、4~6歳が61.9%であり、0~3歳で抗体保有率が高かったことから、富山県ではCA16は伝播を繰り返し、常在していることが推察された(図3)。

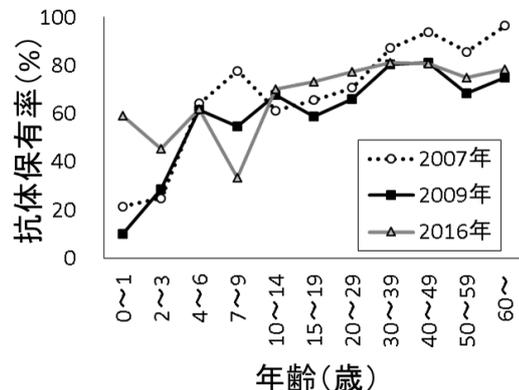


図3. CA16に対する中和抗体保有率



Zeng Y. Phage Display-Derived Cross-Reactive Neutralizing Antibody against Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. Jpn J Infect Dis. 2016, 69, 66-74.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

下水流入水中の腸管系ウイルスの次世代シーケンサーと細胞培養法による検出 (2011-2013 年).

板持雅恵, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 米田哲也, 佐賀由美子, 滝澤剛則, 小淵正次. 富山県衛生研究所年報 (平成 28 年度), 2017, 40, 110-115. (査読なし)

非典型的な発疹症状を呈する手足口病を起こしたコクサッキーウイルス A6 型の分子疫学および血清疫学.

板持雅恵, 稲畑良, 稲崎倫子, 名古屋真弓, 佐賀由美子, 小淵正次, 滝澤剛則. 富山県衛生研究所年報 (平成 27 年度), 2016, 39, 53-60. (査読なし)

Development of real-time PCR to detect oral vaccine-like poliovirus and its application to environmental surveillance.

Iwai-Itamochi M, Yoshida H, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Kurata T, Takizawa T. J Virol Methods, 2014, 195, 148-155. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

富山県における過去 35 年間の手足口病の流行とコクサッキーウイルス A16 型の分子疫学.

板持雅恵, 稲崎倫子, 名古屋真弓, 米田哲也, 佐賀由美子, 滝澤剛則, 小淵正次. 第 65 回日本ウイルス学会, 平成 29.10.24-26, 大阪市

2017 年の手足口病の流行と原因ウイルスに対する抗体保有状況.

板持雅恵, 稲崎倫子, 名古屋真弓, 米田哲也, 佐賀由美子, 滝澤剛則, 小淵正次. 第 19 回富山県薬学会年会, 平成 29.10.21, 富山市

細胞培養法と次世代シーケンサーにより下水流入水から検出される腸管系ウイルスの比較.

板持雅恵, 名古屋真弓, 稲崎倫子, 稲畑良, 佐賀由美子, 米田哲也, 滝澤剛則, 小淵正次. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 28.10.23-25, 札幌市

富山県における手足口病の流行とコクサッキーウイルス A6 型の血清疫学.

板持雅恵, 稲畑良, 稲崎倫子, 名古屋真弓, 小淵正次, 佐賀由美子, 滝澤剛則.

第 50 回富山県公衆衛生学会 平成 28.2.9, 富山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

手足口病の流行と原因ウイルスの疫学的研究.

板持雅恵.

平成 29 年度富山県衛生研究所研究成果発表会, 平成 29.11.9, 富山市

富山県における手足口病の原因ウイルスと血清疫学.

板持雅恵.

富山県立中央病院第 108 回病診連携会, 平成 29.8.24, 富山市

今年流行した手足口病.

板持雅恵.

平成 23 年度富山県衛生研究所研究成果発表会, 平成 23.11.25, 富山市

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

板持 雅恵 (ITAMOCHI, Masae)

富山県衛生研究所・ウイルス部・主任研究員

研究者番号: 70393080

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし