

23. 大阪府におけるパレコウイルス A3 型遺伝子の分子進化に関する

研究

○中田 恵子 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

本村 和嗣 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

近年、ヒトパレコウイルス 3 型 (HPeV-3) 感染は乳幼児で敗血症、髄膜脳炎、死亡等、成人でも筋痛症を引き起こすことが明らかとなり、再興感染症として注目を集めている。しかし、HPeV-3 感染症を対象としたサーベイランスは実施されておらず、そのウイルス遺伝子変異に関する基礎的な情報が少ない。

そこで、本研究では近縁のウイルスであるエンテロウイルス (EV) 感染症のサーベイランスを目的に収集した検体に対し、後方視的に解析を行い、HPeV-3 遺伝子の進化と抗原性の変化を明らかにする。

【研究の必要性】

HPeV-3 は、ピコルナウイルス科に属し、1 本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つ。流行時期や呼吸器症状や胃腸炎症状を引き起こす点で類似するため、同じ科の EV 属に分類されていた。しかし、ゲノム構造が異なることが明らかとなり、1999 年に独立した属となった¹⁾。2004 年以降、HPeV-3 が乳幼児で敗血症、髄膜脳炎、死亡等の原因となること、特に生後 3 か月未満の新生児で重症化する傾向があることが報告された²⁾³⁾⁴⁾。さらに 2007 年以降、国内で成人に筋痛症を引き起こすことが報告されている⁵⁾⁶⁾。これらのことから、HPeV-3 感染症は小児科領域のみならず、成人神経科領域においても再興感染症として脚光を浴びている。しかし、HPeV-3 型感染症のサーベイランスは国内では実施されておらず、流行ごとのウイルスの遺伝子変異には不明な点が多い。さらに、ウイルス分離が容易ではないため、HPeV-3 の全長ゲノム解析の情報は非常に少ない。流行ごとに HPeV-3 の中和エピトープ (Viral protein 1: VP1) 領域の塩基配列の変異から抗原性の変化を把握すること、また、分離株の全長ゲノム解析を実施することでウイルスの病原性や流行に寄与する変異を明らかにすることは、未だ不明な点が多い HPeV-3 感染症の病態解明の一助となる。

【研究計画】

HPeV-3 感染症患者では、発疹、発熱、無菌性髄膜炎等といった EV 感染症と類似する症状を呈することがある。そのため、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) で定められた EV 感染症 (手足口病、ヘルパンギーナおよび無菌性髄膜炎) 疑患者検体の一部から HPeV-3 が散発的に検出されてきた。しかし、HPeV-3 がそれらの疾患の主原因となるとは考えられてこなかったため系統的には調査されてこなかった。我々は、2010 年以降、感染症法に基づき収集された EV 感染症疑い検体、約 2000 検体を保有している。それらの検体に対し、後方視的に HPeV-3 遺伝子を検出し、中和エピトープである VP1 領域の塩基配列に対し分子系統樹解析およびエントロピー解析を実施

する。また、HPeV-3 は分離培養が容易ではないため、複数の流行期に分離された HPeV-3 の全長ゲノム情報を解析することは困難であった。しかし、我々は複数の培養細胞を用いて継代を繰り返すことによって、複数の流行期に得られた分離した株を保有している。それらのウイルス株に対し、次世代シーケンサーを用いた全長ゲノム解析を実施する。得られた塩基配列からアミノ酸の立体構造を解析することで変異を受けやすい場所を推測する。

【実施内容・結果】

2010年4月より2019年3月までに得られたEV感染症疑患者由来検体（抽出核酸検体として凍結保存）を用いて、Realtime-RT-PCR⁷⁾でパレコウイルスに対するスクリーニングを実施した。陽性検体に対して、ヒトパレコウイルスVP1領域をNested-RT-PCR⁸⁾⁹⁾で増幅し、ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。得られた塩基配列に対し、近隣接合法を用いて分子系統樹解析を実施した。多様性解析には、Shannonのエントロピー解析法を用い¹⁰⁾、各座位における、アミノ酸(20種類)の出現頻度の和を計算し、0.8以上を多様性があると判定した。

上述の期間にRD-A、VeroE6、FL、Caco-2細胞を用いてウイルス分離培養を実施し、得られた分離株からEVであったものを除いて、ヒトパレコウイルスVP1領域をNested-RT-PCR⁹⁾で増幅した。増幅産物に対し、ダイレクトシーケンスを実施し、HPeV-3と型別された株について次世代シーケンサーを用いた全長ゲノム解析を行った。

期間中に得られた2664検体のうち113検体がパレコウイルススクリーニング陽性となった。そのうちHPeV-3のVP1領域が増幅できたのは73検体であった。VP1領域(677nt)の系統樹解析の結果、2018年度の一部の株を除いて、2013年度以前と2014年度以降の検出株の2つのクラスターに分かれた。それぞれのクラスターには複数の年から検出された株が混在し、全ての株で大きな塩基配列の変化は認められなかった(図1)。アミノ酸の多様性解析の結果、VP1蛋白質領域において、ほぼ保存されていることがわかった。しかし、エントロピースコアが0.8以上の箇所が、C末領域に3か所検出された(図2)。

HPeV-3の分離株は2014年度に2株、2016年度に8株、2017年度に2株、2018年度に2株、合計14株得られた。これらの分離株よりウイルスRNAを抽出し、ライブラリーDNAを作成した後にillumina社のMiseqを用いて全長ゲノム解析を実施した。アッセムブリはFilgen社のCLC Genomic Workbenchを用いてMap to Reference法で実施し、全ての株でほぼ全長塩基配列が得られた。得られた塩基配列よりPyMOLを用いて、ウイルスの構造蛋白質をコードする領域であるVP0-VP3-VP1の立体構造解析を実施した結果、VP0では30、272、274、VP3では143、VP1では231、215番目(図内赤色で表示)の残基に変異が集積していた(図3)。

【考察と今後の課題】

我が国では、HPeV-3の近縁のウイルスであるEVが主原因とされる手足口病、ヘルパンギーナおよび無菌性髄膜炎はサーベイランスの対象とされている。それらのEV感染症疑いの患者検体からHPeV-3遺伝子が検出され報告されることから、感染症法に基づいた発生動向調査事業で収集された病原体検出情報から間接的にHPeV-3感染症の流行が把握されてきた。また、サーベイランス対象疾患以外にも新生児の死亡を含む低年齢層の重症化⁴⁾や筋痛症のようにHPeV-3感染症に特徴的と思われる患者が

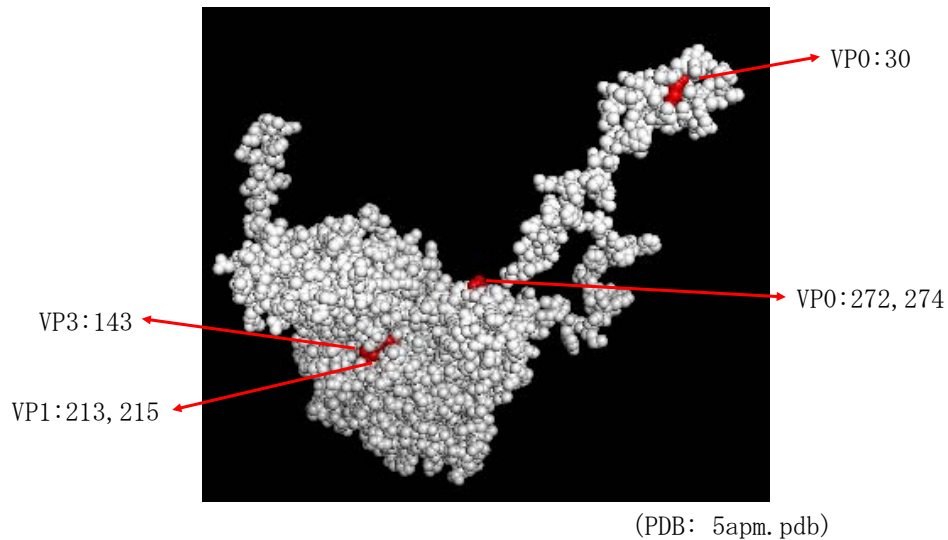


図3. パレコウイルス3型のVP0-VP3-VP1の構造

報告⁵⁾⁶⁾されることから、疫学情報の解析が進められている。しかし、HPeV-3 は分離が容易ではないことや2004年に初めて報告¹¹⁾された比較的新しく認知されたウイルスであることから、ウイルスの分子進化に関する情報が限られていた。

HPeV-3 はゲノムを一本鎖RNAとして持つウイルスであるため、VP1領域の塩基配列は変化に富むと予想された。しかし、分子系統樹解析の結果では、約10年間に渡って塩基配列レベルでは大きな変異の蓄積は認められず、二つに大きく分かれたクラスター内にはそれぞれ複数の年度に検出された株が混在していた(図1)。しかし、アミノ酸レベルではC末端領域にエントロピースコアが高い座位が3か所存在したことから(図2)、中和抗体の選択圧を受けて変異をする箇所は限局していると考えられた。また、分離株を用いた全長ゲノム解析を実施し、VP1領域を含めて抗体との相互関係があると考えられるカプシドタンパク質の構造解析の結果、VP0-VP3-VP1領域に変異が蓄積している座位が複数認められた(図3)。これらの変異箇所は、抗体との直接的な相互関係が推測されることから、抗原エpitep領域の一部の可能性はある。本結果は、未だ存在しないHPeV-3の治療薬やワクチンの開発への足掛かりとなる可能性があると考えられた。

【参考文献】

- 1) Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, N Kalkkinen, P Auvinen, L Kinnunen, G Stanway. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8847-51.
- 2) Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, Kraakman HC, Pajkrt D. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis*. 2008;47:358-63.
- 3) Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *J Infect Dis*. 2009;199:1753-60.
- 4) Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, Kugener B, Billaud G, Floret D, Lina B, Morfin F.

Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008–10: evidence for severe cases. *J Clin Virol.* 2012;54:337–41.

5) Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1787–93.

6) Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Shimizu Y, Ito S, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Kuroda M, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol.* 2013;58:188–93.

7) Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2519–24.

8) Cremer J, Morley U, Pas S, Wolthers K, Vennema H, Duizer E, Benschop K. Highly sensitive parechovirus CODEHOP PCR amplification of the complete VP1 gene for typing directly from clinical specimens and correct typing based on phylogenetic clustering. *J Med Microbiol.* 2019;68(8):1194–1203.

9) Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Maneekarn N, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Diversity of human parechoviruses isolated from stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):115–9.

10) Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science.* 2005. 11;310(5750):1025–8.

11) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol.* 2004. 85(Pt 2):391–398.

12) Domanska A, Flatt JW, Jukonen JJJ, Geraets JA, Butcher SJ. A 2.8-Ångstrom-Resolution Cryo-Electron Microscopy Structure of Human Parechovirus 3 in Complex with Fab from a Neutralizing Antibody. *J Virol.* 2019. 5;93(4):e01597–18.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（オートクレーブ用バケツ、1000 μ L ロングフィルターチップ 交換プレート、核酸抽出チップ・チップホルダーセット）	50,000 円
解析委託費（NGS MiSeq v3 600 Cycle）	250,000 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円