

学 位 論 文 題 名

コクサッキーウイルスA24型の変異株による  
急性出血性結膜炎の分子疫学的研究

—世界における伝播と日本への進入経路—

学位論文内容の要旨

コクサッキーウイルスA24型変異株 (CA24v) は1960年後半にジャワ島で突然発生した急性出血性結膜炎 (Acute hemorrhagic conjunctivitis, AHC) の病原ウイルスであって1970年にシンガポールの流行で初めて患者から分離された。本ウイルスによる AHC の流行はその出現以来、東南アジアとインド亜大陸に限局してほぼ数年間隔で繰り返されてきた。しかし、1985年以降これらの地域で第4次流行が発生すると同時に台湾、日本、中国、ガーナや中央アメリカなどにも伝播し、世界的流行の様相を呈するに至った。

本研究では、1970年以降世界各地で分離された多数の CA24v についてゲノム RNA の 3 C プロテイナーゼ (3 C<sup>pro</sup>) 領域の塩基配列の決定を行なった。次いで各株間の塩基配列を比較して系統樹を作成し、CA24v の出現時期を推定するとともに、本ウイルスの世界的な伝播経路と日本への進入経路を検討した。

まず、1970~1989年の間に世界各地(シンガポール、タイ、台湾、中国、パキスタン、ガーナ)で AHC 患者から分離された28株および日本で分離された4株を用い、ゲノム RNA の 3 C<sup>pro</sup> 領域の全領域549塩基の塩基配列を決定した。すなわち、ウイルス RNA を鋳型に cDNA を合成し、3 C<sup>pro</sup> の全領域を含む674塩基を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によって増幅した。この増幅 DNA 断片をM13mp11ベクターでサブクローニングした後、サンガー法により塩基配列を決定した。その結果、過去20年間に世界各地で分離された32株の 3 C<sup>pro</sup> 領域には塩基の欠損または挿入がまったく見られなかった。また、これらの分離株の塩基配列を最初に分離された1970年の CA24v の塩基配列と比較したところ、1970年以降の株では 3 C<sup>pro</sup> 領域の塩基に総数119座位の置換が認められた。さらにこれらの塩基置換はコドンの第3位で圧倒的に多く、119座位中101座位を占めていた。

一方、アミノ酸置換は総アミノ酸183座位中13座位で認められたのみであった。このようにアミノ酸置換を伴わない塩基置換（同義置換）が多数生じていることから、3 C<sup>pr</sup>領域には極めて強い機能制約が働いていることが示唆された。また、13座位ものアミノ酸置換が認められながらプロテアーゼ活性の発現がまったく損なわれていないことから、これらのアミノ酸置換は3 C<sup>pr</sup>遺伝子がコードする酵素蛋白質の構造や機能を解析する上で有用であると考えられた。

各分離株の系統関係を検討するために、まず特定の分離株（1975年のシンガポール株）からの各分離株の遺伝的距離（ $d_{ij}$ ）と各分離株の分離年月との間で回帰分析を行なって塩基置換速度（進化速度）を求めた。その結果、3 C<sup>pr</sup>領域の置換速度は $3.7 \times 10^{-3}$  / 塩基 / 年と算定され、先に EV70 の VPI 領域の比較によって算定された  $3.8 \times 10^{-3}$  / 塩基 / 年（Takeda et al., 1992）とほぼ等しいことが判明した。

次に分離ウイルス32株のうち同一流行から得られた分離株を除いた25株を用い、 $d_{ij}$ 、分離年月および塩基置換速度をもとに、平均距離法（Unweighted Pairwise Grouping Method of Arithmetic Average, UPGMA）によって系統樹を作成した。その結果、供試されたすべての分離株は共通の祖先株から由来していることが明らかになった。また、本ウイルスの出現時期は1963年11月から±21ヶ月と計算された。系統樹から、これらのウイルスは1970～1971年分離株群、1975年分離株群および1985～1989年分離株群の3群に大別された。さらに、1985～1989年の世界的流行に際して分離された株はすべて1981年頃に同一株から分岐したウイルスであることが明らかとなった。これら1985～1989年分離株群はさらに1985年シンガポール株-1986年中国株群、1985～1986年台湾株-日本株群、1987年ガーナ株群、1986年イスラマバード株群および1987年以降の各地の分離株群の5群に分類された。これらの結果より、1985～1989年のAHCの世界的流行は、流行に先立ち、1981～1983年の間に同一株から順次5群に分岐したCA24vの系統がそれぞれ別々に異なる地域に導入されたことによって引き起こされたことが明らかになった。

CA24vは1985～1986年、1988年および1989年の3回にわたって日本に侵入し、流行した。CA24vの日本への侵入経路と国内伝播について解析するために、日本株16株のうち先に塩基配列の決定された4株を除く12株について3 C<sup>pr</sup>の塩基配列を決定した。日本の各分離株間の塩基配列を比較した結果、同じ流行で分離された日本の分離株間の塩基配列は互いに近似していた。1986年の神奈川株間、1986年の和歌山株と徳島株間、1988年の千葉株間および1989年の千葉株間の塩基配列は同一であった。しかし、分離年度が異なる日本の分離株間の塩基配列は明らかに相違し、むしろ同じ年の国外の分離株に近似していた。系統解析法により、日本の分離株は3群に分類された。すなわち第1群は1985～1986年の沖縄県と他県の散发例からの分離株である。これ

らは同年の台湾での分離株と同じ群に属していた。また、1985年と1986年に2年連続して分離された沖縄の流行株の間では塩基配列の相違はわずか1個所に過ぎなかった。第2群は1988年の千葉県で流行で分離された2株であって、これらは1987年のシンガポール株や1988年の北京株および香港株と同じ群に属していた。第3群は1989年に千葉県の流行で分離された7株である。これらの分離株は1988年の台湾株および1988年のシンガポール株と同じ群に属していた。1989年の千葉株はすべて1988年の台湾-シンガポール株と同一系統であって、1988年の千葉株とは別系統であった。これらの結果から、日本における3回のCA24vの伝播は、ウイルスが日本国内において継代されたものではなく、それぞれ別途に海外から導入された株によることが明らかとなった。

本研究は、CA24vが1963年11月から±21ヶ月に出現し、分離株はすべてこの単一起源のウイルスから進化したものであること、さらに1981年頃に生じた単一株の子孫が1985年以降のAHCの世界的流行を引き起こしたことを明らかにした。また、日本における過去3回のCA24vによるAHCの流行の分子疫学的解析では1985年と1986年の2年間沖縄で連続して発生した流行が同一系統のウイルスによっていたのを除けば、日本国内でのCA24vの伝播は比較的短期間で終わっていたことが判明した。しかし、CA24vは数年毎に流行を繰り返しているため、日本および世界各地に散布されたウイルスがそれぞれ土着し、変異して流行を惹き起す可能性があるために今後の動向が注目される。

CA24vは分離株間の系統関係、疫学的記録や分離株の性状などに関してそれぞれ詳しく報告がなされているので、これらを相互に比較することによって、自然界における分子進化の研究材料として他に例をみないほどの利点を持つ。従って、ここに示した各CA24v分離株の塩基配列の比較とCA24v分子進化に関する知見はエンテロウイルスのみならず、一般のRNAウイルス遺伝子の塩基配列パターンや分子進化の解析のための基礎資料となるものと思われる。さらに、これらの成績は自然界におけるウイルスゲノムの存続と病原性獲得に至る機序を解析するための有用な情報を含んでいるものと考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	橋本	信夫
副査	教授	佐藤	文昭
副査	教授	小沼	操
副査	助教授	喜田	宏

コクサッキーウイルスA24型変異株（CA24v）による急性出血性結膜炎（AHC）は1969年ジャワ島で最初に出現して以来、長く東南アジアとインドで流行が繰り返されてきた。しかし、1985年以降、本病はこれらの地域から台湾、日本、中国、ガーナや中央アメリカなどにも伝播し、世界流行の様相を呈するに至っている。

本論文は、1970年以降世界各地で分離された44株のCA24vについてゲノムRNAの3Cプロテナーゼ（3C<sup>pro</sup>）領域の塩基配列を比較し、CA24vの出現時期と日本への侵入経路を検討したもので邦文76頁からなり、参考論文6編を付している。

まず、CA24vの各分離株間の塩基置換の回帰分析を行って塩基置換速度（進化速度）を求めたところ、3C<sup>pro</sup>領域の置換速度は $3.7 \times 10^{-3}$ ／塩基／年と算定された。また、平均距離法によって作成された系統樹から、CA24vは1963年11月から±21ヶ月に発生した単一の祖先より進化してきたものであり、しかも1985～1989年のAHC世界流行時に各国で分離されたウイルスはすべて1981年頃に派生した単一株の子孫であることが明らかとなった。一方、日本では1985年から1989年までにCA24vによるAHCの流行が3回発生した。国内外の分離株を系統解析した結果、同じ流行から得られた国内の分離株の塩基配列は互いに近似していたが、分離年度の異なる株間では塩基配列が相違し、むしろ同じ年の国外の分離株に近似していた。これらの成績から、日本における3回の流行は、それぞれ別々に海外から導入された株によっていたことが判明した。以上のように、申請者はCA24vによるAHCの流行について分子疫学的解析を行い、多くの新知見をもたらした。これらの成績は、ウイルス学、疫学や公衆衛生学に寄与するところが大きい。よって審査員一同は石古博昭氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。