

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07881

研究課題名(和文) ヒトパルボウイルスB19感染症における病態多様性とウイルスゲノム変異との関連性

研究課題名(英文) The association between the pathological variety and the genome variation in the human parvovirus infection.

研究代表者

要藤 裕孝 (Yoto, Yuko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10404659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：北海道におけるヒトパルボウイルスB19 DNAの変異を検索した結果、1981-1987年に主流であった株(A1、A2)は、次の1991年の流行期には駆逐されており、全世界的な標準株(B2)に劇的に変化していることが判明した。A2株の配列の違いのうち、標準株Bと異なっている特定部分の変異が、感染力または複製能力において劣る要因を有しており、外来種と推定されるB株に一齐に置き換われたことが示唆された。また、年度ごとのダイナミックな変異以外にも20%以上において個々のB19ウイルスに点変異(突然変異)がみられた。これらの変異が感染様式に大きな影響を与える要因となっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム変異の違いが多様な病態発現と何らかの関連性があるかに関してはこれまで研究や報告がなされてきたことがない。ゲノムのわずかな違いで感染様式が変化し、最終的に臨床症状の違いに結びついていく可能性が示唆されるため、第一段階としてウイルスゲノム変異が転写にどのような影響を与えるかを検討した。すべての病態がゲノム変異で説明がつくことはないと思われるが、一部の病態や通常ではない持続感染が特別なゲノム変異と関連していることが判明する可能性があるウイルス自体の問題が臨床的な違いに結びつくことを明らかにすることは、今後のウイルス学や小児感染症学にとって重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：There have been no long-term systematic analyses of the molecular epidemiology of human parvovirus B19 (B19V). We investigated the variations of nucleotide sequences of B19V strains collected in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008. In that period, six outbreaks of erythema infectiosum occurred regularly at 5-year intervals. The B19V strains collected successively, regardless of the outbreak, were analyzed for nucleotide variation in the subgenomic NS1-VP1u junction. The isolated strains can be classified into 10 subgroups. Two patterns of change of endemic strains were observed. One was a dynamic replacement of strains that occurred almost every 10 years, and the other was a gradual change consisting of an accumulation of point mutations

研究分野：小児感染症学

キーワード：ヒトパルボウイルスB19 伝染性紅斑 ウイルスゲノム変異 トランスフェクション 胎児水腫 持続感染 慢性骨髄不全 DNAウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトパルボウイルス B19 は 5,596 塩基よりなる 1 本鎖 DNA ウイルスであり、骨髄中の赤血球系前駆細胞 (CFU-E、BFU-E) から赤芽球までの CD36 陽性細胞のみを感染許容細胞とすることが知られている。受容体は血液型の 1 種である P 抗原であるが、P 抗原は赤血球前駆細胞以外にも心筋細胞、肝細胞、血管内皮細胞の表面に存在しており、それにもかかわらずこれらの細胞内でのウイルス増殖は認められていないことより、B19 の感染が成立するには細胞内部の厳しく複雑な条件を満たすことが必要である。短いウイルスゲノムの転写は非常に複雑で、1 つの promoter から複数の splicing を利用し、Open reading frame の 3 つすべてを使用し、主要なものだけで 9 つの mRNA を転写する。これらの mRNA の比率が感染許容細胞と非許容細胞では異なることが報告されている。意図的にゲノムを変異させたプラスミドをトランスフェクションさせて、mRNA の比率を分析する研究は筆者が報告している。

臨床的には B19 感染による病態は非常に多彩である。B19 感染症の病態としては、慢性溶血性貧血患者の無形成発作 (Aplastic Crisis) が最初に報告され、次いで小児の伝染性紅斑の原因であることが判明した。前者はウイルスの 1 次的な宿主細胞への直接的侵襲が原因と考えられ、後者は免疫複合体による 2 次的な病態であると考えられている。その後、B19 感染に伴う疾患として、免疫不全患者の慢性骨髄不全 (主に赤芽球系)、母体への感染による胎児水腫、紫斑を伴う皮膚疾患 (Papular-purpura gloves and socks syndrome、IgA 血管炎、血小板減少性紫斑病)、脳炎・脳症や横断性脊髄炎を含む神経疾患、急性肝炎などの肝疾患、急性関節症など多彩な報告がなされてきた。当講座においても、B19 DNA の後方視的スクリーニングを行い、B19 感染に様々な病態が伴うことを報告してきた。また、通常は一過性に終わる B19 感染が長期にわたる症例や再活性化を示すような症例も存在することがわかってきた (要藤ら; 未報告)。

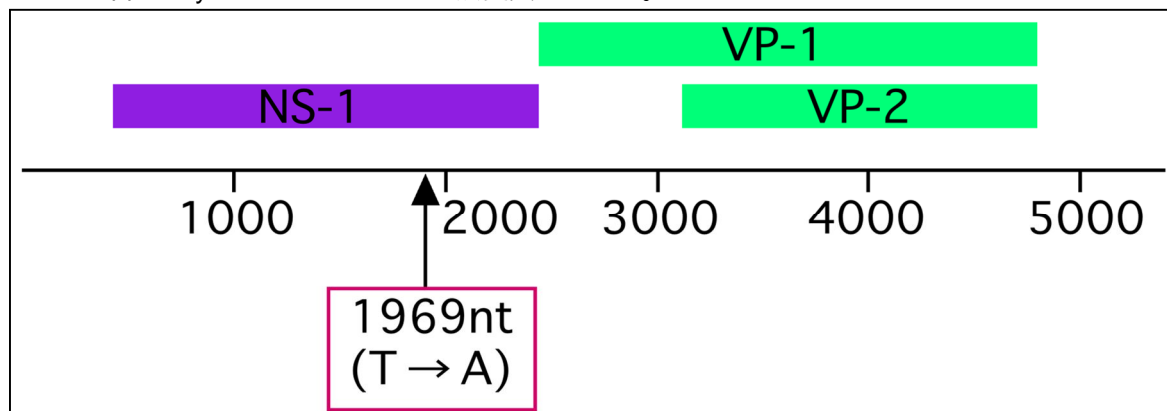
### 2. 研究の目的

日本国内において B19 の流行は、伝染性紅斑の定点サーベイランスにより 1981 年よりおよそ 5 年おきにみられている。札幌における B19 DNA の変異を検索した結果は報告した。w 年度ごとのダイナミックな変異以外にも 20% 以上において個々の B19 ウイルスに点変異 (突然変異) がみられた。興味深い点変異の例として、当科で経験した再活性化症例では第 1969 塩基目の Adenine が Thymidine に点変異していることが確認された。この株は全症例の中でも、唯一の特異的な変異であった。第 1969 番目は B19 ゲノムにとって重要な中央部の Polyadenylation site に影響を与えうる近くの上流部分に位置するため、この変異が感染様式に大きな影響を与え、潜伏 (持続) 感染を生じさせる要因となっている可能性が示唆される。この他にも、特殊な変異をおこしている株が 50 以上見いだされた。

変異をおこしている株において、通常とは異なる感染状況 (例えば、ウイルス DNA 量が時間が経過してもなかなか低下してこない等) を示している症例との関連性がないか検討し、可能性のある変異に関しては in vitro において B19 標準ゲノムを含むプラスミドに人工的に変異を導入し、トランスフェクションさせた細胞中の転写物の割合 (構造タンパクの mRNA と調節タンパクの mRNA の比) やその時間的変化を分析することで、点変異がウイルス複製にどのように影響しているかを分析することが本研究の目的である。また、典型的な伝染性紅斑とは異なる皮膚疾患や脳炎・脳症、急性肝炎等のまれな病態にいずれかの点変異が関与していないかについても検索したいと考えている。

### 3. 研究の方法

まず、最初に通常では見られないほど長期に感染した症例に関して分析する。この症例では第 1969 塩基目の Thymidine が Adenine に点変異していた。



ヒトパルボウイルス B19 の標準的なゲノムを含むプラスミド pC1B19 にそれぞれ変異のある株の塩基配列を導入する。これには Overlapping PCR を用いる (Yoto Y et al. 論文の方法)。このプラスミドは SV40 ori を持ち、COS7 細胞に感染させるとゲノム複製、転写物作製、タンパク発現を生じさせることができる。pC1B19 変異プラスミドをリポフェクタミンを用いて COS7 細胞にトランスフェクトする。その後、時間を追って (24 時間後および 48 時間後、および時間的変化が顕著であればその間の時間にも) 細胞を回収していき、RNA を抽出する (Qiagen のキットを使用)。Real time PCR により NS1 領域、VP1 領域、VP2 領域を各領域を区別できるプライマーを用いて定量する。調節タンパク NS-1 をコードする mRNA は Donor1 と Acceptor1-1, 1-2 の間で splicing しないのに対して、構造タンパク VP をコードする mRNA は同部位にて splicing するため、イントロン内と外にプライマーを設定することにより両 mRNA を定量的に比較することが可能となる。この方法で症例ごとに転写物の時間的推移、量的な比較することが可能である。論文 13 では RNA 分析を RNase protection assay にて行っているが、Real-time PCR によっても、同様に RNA ごとの定量が可能である。

この症例以外にも、特異的な経過をとった症例のゲノム変異を pC1B19 プラスミドに導入して (Overlapping PCR を応用できないほど変異が多い場合は血清サンプルを PCR で増幅して制限酵素を用いて pC1B19 に組み込んで)、同様にトランスフェクション、RNA 抽出、Real-time PCR による定量を行っていく。

以上の研究が完遂した後、株の相違と感染性 (mRNA レベルの調節タンパクの比較より検討) の関連性を引き続き行っていく。塩基配列を分析し、splicing の位置 (Donor1, Acceptor1-1, Acceptor1-2, Donor2, Acceptor2-1, Acceptor2-2) の切断位置前後にある signal (CAG, AAG 等) に変異がある株がないか確認する。また、中央の polyadenylation site (ATTAAG) の上流因子および下流因子内に変異がある株がないかを確認する。A2 株に関しては、数力所ある B 株との違いが上記の位置に存在するものがないかを検索する。

本研究では、臨床症状が通常の経過と異なる症例のウイルスゲノムをプラスミドに導入して、in vitro にて RNA の転写の時間的経過や構造タンパク領域と調節タンパク領域の割合 (比率) が通常の株とどのように相違があるかを明らかにすることが具体的な目的である。これにより、両者に違いがあることが明らかとなれば、臨床症状の違いがウイルス自体のゲノム変異により生じていることを示すことができる。すべての病態多様性がウイルス側の要因により決定されるわけではないと考えられるが、少なくとも部分的にはあれ、本研究によりヒトパルボウイルス B19 が多彩な病態を引き起こすことの要因の一部が解明されることになる。

#### 4. 研究成果

日本国内において B19 の流行は、伝染性紅斑の定点サーベイランスにより 1981 年より正確に 5 年おきにみられており、1981-1982 年、1986-1987 年、1991-1992 年、1996-1997 年、2001-2002 年、2006-2007 年の 6 回の全国的流行が知られている。2 年の流行期中、最初の年が小流行であり、次いでその翌年に大流行が生ずる現象が共通してみられている。間欠期は 3 年であり、その期間は散発的にのみ B19 感染症例があることが、後方視的検索により確認されている。

1981-1987 年に主流であった株 (A1 および A2) は、次の 1991 年の流行期には駆逐されており、全世界的な標準株 (B) に劇的に変化している。この後は、部分的に変異を積み重ね B から C への以降株 (BC) 1996 年の流行から主流となった C 株へと以降し、2001 年からは新たな変化を生じた D1、D2 株へと変化している。特に注目すべきは A2 株が急速に消滅した点である。A2 株の配列の違いのうち、標準株 B と異なっている特定部分の変異が、感染力または複製能力において劣る要因を有しており、外来種と推定される B 株に一斉に置き換わられたことが示唆された。年度ごとのダイナミックな変異以外にも 20% 以上において個々の B19 ウイルスに点変異 (突然変異) がみられた。興味深い点変異の例として、当科で経験した再活性化症例では第 1969 塩基目の Adenine が Thymidine に点変異していることが確認された。この株は全症例の中でも、唯一の特異的な変異であった。第 1969 番目は B19 ゲノムにとって重要な中央部の Polyadenylation site に影響を与えうる近くの上流部分に位置するため、この変異が感染様式に大きな影響を与え、潜伏 (持続) 感染を生じさせる要因となっている可能性が示唆された。

引き続き、これらの変異部位を導入したプラスミドによる転写産物の定量結果をまとめていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 50
2. 論文標題 パルボウイルスB19感染症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 【小児内科】小児疾患の診断治療基準第5版	6. 最初と最後の頁 342-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 81
2. 論文標題 3. 感染症 パルボウイルスB19感染症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 【小児科診療】小児の治療指針	6. 最初と最後の頁 203-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 46
2. 論文標題 話題のウイルス感染症 伝染性紅斑	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 679-684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 87
2. 論文標題 第4章女性医学分野 15. 伝染性紅斑	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 【産科と婦人科】産科婦人科検査マスターブック	6. 最初と最後の頁 370-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 52
2. 論文標題 VI 感染症 3 1. 伝染性紅斑	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 【小児内科】病態生理 1・改訂第6版	6. 最初と最後の頁 975-979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 51
2. 論文標題 新生児編 V 新生児 疾患 210 ヒトパルボウイルス感染症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 【周産期医学】2021年51巻増刊号 周産期医学必修知識 第9版	6. 最初と最後の頁 723-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 要藤裕孝	4. 巻 86
2. 論文標題 3. 感染症 各論 パルボウイルスB19感染症	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 【小児科診療】小児の治療指針	6. 最初と最後の頁 230-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 要藤裕孝
2. 発表標題 【教育後援】ヒトパルボウイルスB19感染における基礎と臨床
3. 学会等名 第51回日本小児感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 要藤裕孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 春恒社	5. 総ページ数 392
3. 書名 ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き	

1. 著者名 要藤裕孝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 904
3. 書名 今日の処方改訂第6版	

1. 著者名 要藤裕孝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 408
3. 書名 プライマリケアにおけるこどもの皮膚疾患	

1. 著者名 要藤裕孝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 392
3. 書名 【産科婦人科臨床】3. 分娩・産褥期の正常と異常 / 周産期感染症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------