

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591393

研究課題名（和文）ヒトパルボウイルス B19 のゲノム変異が感染様式または病態に与える影響

研究課題名（英文）Influence on the mode of infection by the variation of the human parvovirus B19 genome.

研究代表者

要藤 裕孝 (YOTO YUKO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10404659

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株に一斉に置き換わら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

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：パルボウイルス・B19V・ゲノム変異・転写・伝染性紅斑

## 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 陽性細胞が感染許容細胞であることが知られている。感染を介する受容体は血液型の 1 種である P 抗原であることが報告された。しかしながら、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、P 抗原を有することは感染許容の必要条件ではあっても十分条件ではないといえる。B19 の感染が成立するには細胞内部の複雑な状況が必要であり、それが感染宿主細胞の極端な限定性に結びついているといえる。

一方で、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、1981 年にまず慢性溶血性貧血患者の無形成発作 (Aplastic Crisis) が、次いで 1983 年に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、血管性紫斑病、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など多彩な報告がなされてきた。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。

## 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。北海道における B19 DNA の変異を検索したところ、1981-1987 年に主流であった株は、次の 1991 年の流行期には駆逐されており、全世界的な標準株に劇的に変化している。注目すべきは 1981-1987 年株が急速に消滅した点である。これらの株の配列の違いのうち、1991 年株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 1991 年株に一斉に

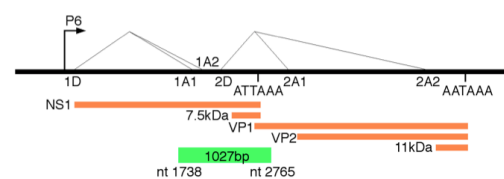
置き換わられたことが示唆される。この変異点を解析することにより、B19 ウイルスの感染様式に重要なポイントが明らかになると考えられる。また、年度ごとのダイナミックな変異以外にも 20%以上において個々の B19 ウイルスに点変異 (突然変異) がみられた。通常とは異なる感染状況 (例えば、ウイルス DNA 量が時間が経過してもなかなか低下してこない等) を示している症例との関連性がないか検討し、可能性のある変異に関しては点変異がウイルス複製にどのように影響しているかを検討する。また、典型的な伝染性紅斑とは異なる皮膚疾患 (例えば Papular-purpura gloves and socks syndrome など) 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する。

B19 ウイルスは 5,596 塩基という非常に短いゲノムを 3 つの open reading frame により (部分的にオーバーラップさせつつ) 最大限に利用し、1 つの promotor と 2 つの polyadenylation site のみで転写を調節している。このように非常に許容範囲の狭いゲノムと考えられるが、実際は DNA ウイルスとして、これほど点変異 (突然変異) を認めるウイルスはまれであると考えられる。また、B19 ほど多彩な病態に関連しているウイルスは他にはない。この点に関して、ゲノム変異が感染様式および病態へどのように関連しているかを解明していくことを研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

札幌医科大学附属病院において患者様より臨床検査を行う際に、保存用血清を採取する。あらかじめ書面により研究のため使用する可能性があることを同意していただいた上で行っている。同意を得られなかった場合は臨床検査に必要な分以外の血液採取は行わず、研究用に使用したり保存したりすることはない。また、報告時に個人特定ができないように配慮している (使用するサンプルはヒトゲノムではなく、ウイルス DNA であるため、個人特定に結びつくような結論が得られることはまれではある)。

ウイルス DNA を抽出し、Nested PCR により下記の図の部位を増幅した後、塩基配列を分析する。



変異点の中で、塩基配列上 splicing また

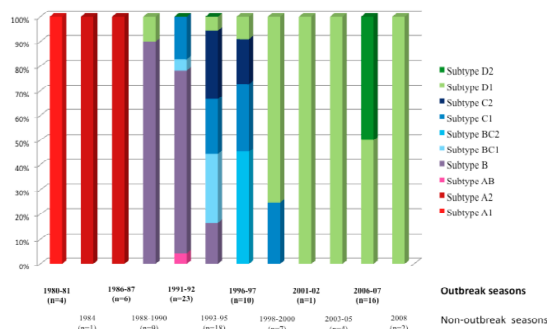
は polyadenylation に影響を与える可能性の高い変異を pYYC1 plasmid に導入した後、COS7 細胞に transfect し 24 時間後および 48 時間後に (必要であればその間も) mRNA を回収し、real-time PCR 法にて NS-1 の mRNA と VP-1, 2 の mRNA の量を比較する。

また、点変異 (突然変異) に関して、持続感染症例および潜伏感染後再活性化したと考えられる症例における B19 株に関して、同様に pYYC1 プラスミドにそれぞれの変異を導入し、mRNA を測定する。また、通常と異なる病態に関しても点変異を人工的に導入し検討する。

B19 ウイルスの複製においては、調節タンパク NS-1 と構造タンパク VP-1、VP-2 (後者の方が前者より重要) の割合がキープポイントとなる。最初期に NS-1 が優位で、追って VP-1, 2 が優位になることが必要とされる。NS-1 の割合が多いとウイルス複製に悪影響が出ることを示唆されている。一方で、ウイルス DNA ゲノム変異が感染様式に影響を与えるならば、mRNA からタンパクへの翻訳段階よりもゲノムから mRNA への転写段階の方が重要であると推測される。双方のタンパクをコードする mRNA の時間的比率の変化を標準株と変異株の間で比較することにより、変異が転写段階で何らかの影響を与えていることを確認する。

#### 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。北海道における B19 DNA の変異を検索した結果を図に示す。



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っ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

(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 20 件)

- Human cytomegalovirus UL97 D605E polymorphism has a high prevalence in immunocompetent Japanese infants and children. Tanaka K, Hori T, Yoto Y, Hatakeyama N, Suzuki N, Tsutsumi H. Microbiology and Immunology. Vol. 55:328-330 (2011) 査読有
- 堤裕幸、要藤裕孝. RS ウイルス感染症の病態解明とその制圧に向けて. 小児科 2011;52:1145-1152. 査読無
- Fosfomycin suppresses RS-virus-induced streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. Yokota S, Okabayashi T, Yoto Y, Hori T, Tsutsumi H, Fujii N. 査読有 FEMS Microbiology Vol. 310: 84-90 (2010)
- 要藤裕孝. 小児の治療指針ーパルボウイルス B19 感染症. 小児科診療 2010;73 増刊号:189-190. 査読無
- 要藤裕孝. ウイルスの今日的意味ーヒト

パルボウイルス B19 感染症のさまざまな病態。化学療法の領域 2010;26:1557-1562. 査読無

6. 堤裕幸、要藤裕孝。新時代のワクチン戦略について考える—RSV—世界の開発状況。臨床検査 2010;54:1422-1428. 査読無

7. 堤裕幸、要藤裕孝。血液・尿化学検査—ウイルス感染症—RS ウイルス。日本臨床 2010;68:402-405. 査読無

8. Analysis of nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome reveals two different modes of evolution, a gradual alteration and a sudden replacement: a retrospective study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008.

Suzuki M, Yoto Y, Ishikawa A, Tsutsumi H. Journal of Virology. Vol. 83: 10975-10980 (2009) 査読有

9. Occurrence of the African subgroup (1a) of BK polyomavirus in younger Japanese children.

Tanaka K, Hori T, Hatakeyama N, Yamamoto M, Takayama R, Yoto Y, Suzuki N, Hayashi T, Ikeda Y, Ikeda H, Ishida T, Tsutsumi H. Microbiology and Immunology. Vol. 53: 319-322 (2009) 査読有

10. Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan.

Nakanishi K, Tsugawa T, Nakata S, Tatsumi M, Yoto Y, Tsutsumi H. Journal of Clinical Virology. Vol. 46: 94-97 (2009) 査読有

11. Fosfomycin suppresses chemokine induction in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus.

Okabayashi T, Yokota S, Yoto Y, Tsutsumi H, Fujii N. Clinical Vaccine Immunology. Vol. 16: 859-865 (2009) 査読有

12. 要藤裕孝。小児疾患診療のための病態生理 VII. 感染症—伝染性紅斑。小児内科 2009;40 増刊号:1120-1124. 査読無

13. 要藤裕孝。ヒトパルボウイルス B19 感染に関連する多様な疾患。臨床小児医学 2009;57:41-45. 査読無

14. 堤裕幸、要藤裕孝、永井和重。RS ウイルス感染症の診断法。日本医事新報 2009;4425:112-113. 査読無

15. 堤裕幸、要藤裕孝。感染免疫から見た、親と子、そして社会の絆。小児保健研究 2009;68:137-140. 査読無

16. 堤裕幸、要藤裕孝。RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトボカウイルスによる下気道炎の病態と治療。小児科臨床

2009;62:2133-2139. 査読無

17. 堤裕幸、要藤裕孝、永井和重。呼吸器感染症の原因となるウイルス (RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトボカウイルス)。化学療法の領域 2009;25:1066-1072. 査読無

18. 堤裕幸、永井和重、要藤裕孝。RS ウイルス感染症と喘鳴・喘息。日本医事新報 2009;4421:62-66. 査読無

19. 堤裕幸、永井和重、要藤裕孝。RS ウイルスワクチン。化学療法の領域 2009;25:1503-1508. 査読無

20. 堤裕幸、永井和重、要藤裕孝。RS ウイルス。臨床検査。2009;53:1413-1417 査読無

[学会発表] (計 10 件)

1. 要藤裕孝、堤裕幸 (札幌医大小児科)。ヒトパルボウイルス B19 の麻疹抗体測定に与える影響。第 52 回日本臨床ウイルス学会学術集会 (2011.6.11-12. 津)

2. 要藤裕孝 (札幌医大小児科)。伝染性紅斑と手足口病の臨床的話題。小樽市医師会小児科部会 (2011.3.18. 小樽)

3. 和田芳雅、要藤裕孝、鈴木将史、堤裕幸 (札幌医大小児科)。ヒトパルボウイルス B19 の遺伝子変異についての検討。第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2010.11.27-28. 仙台)

4. 和田芳雅、要藤裕孝、鈴木将史、堤裕幸 (札幌医大小児科)。ヒトパルボウイルス B19 の遺伝子の多様性、経年変化について。第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010.11.7-9. 徳島)

5. Yoto Y, Wada Y, Suzuki M, Tsutsumi H (Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine). Analysis of changing nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome in Sapporo, Japan. The XIIIth International Parvovirus Workshop (2010.6.20-25. Helsinki, Finland)

6. 鈴木将史、要藤裕孝、石川亜貴、堤裕幸 (札幌医科大学小児科)。1980-2008 年におけるヒトパルボウイルス B19 の遺伝的経年変化についての検討。第 41 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2009.11.14-15. 福井)

7. 要藤裕孝、鈴木将史、堤裕幸 (札幌医科大学小児科)。ヒトパルボウイルス B19 感染における臨床疾患と血中ウイルス DNA 量の相関に関する検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009.10.25-27. 東京)

8. 平川賢史、永井和重、要藤裕孝、堤裕幸 (札幌医科大学小児科)、岡林環樹、横田伸一、藤井暢弘 (札幌医科大学微生物学)。RS ウイルス感染がヒト鼻粘膜上皮細胞のタイト結合に与える影響 ~ hTERT 遺伝子導入ヒ

ト鼻粘膜上皮細胞を用いた解析～. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009. 10. 25-27. 東京)

9. 平川賢史、永井和重、要藤裕孝、堤裕幸 (札幌医科大学小児科)、岡林環樹、横田伸一、藤井暢弘 (札幌医科大学微生物学). hTERT 遺伝子導入ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いた RS ウイルス感染症モデルの作成. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009. 10. 25-27. 東京)

10. 岡林環樹、横田伸一、藤井暢弘 (札幌医科大学微生物学) 要藤裕孝、堤裕幸 (札幌医科大学小児科)、RS ウイルスによるケモカイン産生および細菌接着増強に対するホスホマイシンの抑制効果. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009. 10. 25-27. 東京)

[図書] (計 7 件)

1. 要藤裕孝. ワクチン接種不相当者と接種要注意者は同じなの? 欧米は日本よりワクチンの数が多いようだけど、海外のワクチンは接種できないの? 尾内一信編. 小児の感染症の落とし穴. 東京: 南光堂; 2011. pp.190-195.

2. 要藤裕孝. ウイルス感染症と疫学・臨床像: 伝染性紅斑. 五十嵐隆編. 小児科臨床ピクシス. 小児科臨床ピクシス 25 小児感染症-最新カレンダー&マップ. 東京: 中山書店; 2011. pp.136-139.

3. 要藤裕孝. ウイルス感染症各論: パルボウイルス B19. 岡部信彦編. 小児感染症学. 東京: 診断と治療社; 2011. pp.377-381.

4. 堤裕幸、要藤裕孝. よく見る子どもの感染症 Q&A: 呼吸器感染症に対するアプローチ. 細矢光亮編. 小児科学レクチャー. 東京: 総合医学社; 2011. pp.227-232.

5. 堤裕幸、要藤裕孝. 感染症. 佐地勉編. ナースの小児科学. 東京: 中外医学社; 2011. pp.318-339.

6. 要藤裕孝、堤裕幸. 個々のウイルスの基礎と臨床: パルボウイルス科. 高田賢蔵編. 医科ウイルス学. 東京: 南光堂; 2009. pp.330-331.

7. 要藤裕孝. インフルエンザ. 五十嵐隆編. 小児科臨床ピクシス 11 抗菌薬・抗ウイルス薬の使い方. 東京: 中山書店; 2009. pp.243-247.

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

要藤 裕孝 (YOTO YUKO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 1 0 4 0 4 6 5 9

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: