

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591235
 研究課題名（和文） ヒトボカウイルス（パルボウイルス科）感染症の病態解明とウイルス粒子の分離・作成
 研究課題名（英文） Pathophysiological analysis of human bocavirus infection and separation of virus particle
 研究代表者
 石黒 信久（ISHIGURO NOBUHISA）
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号：40168216

研究成果の概要：ヒトボカウイルス（Human bocavirus; HBoV）は2005年にスウェーデンの研究者により発見されたウイルスである。まず最初に本研究ではバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いた抗 HBoV IgG 抗体の測定方法を確立した。4名の呼吸器感染症の小児患者の回復期血清中の抗 HBoV IgG 抗体の上昇を認めるとともに、鼻咽頭ぬぐい液と血清から HBoV ゲノムを検出した。年齢層別の抗 HBoV IgG 抗体陽性率をみると、6-8か月の抗体陽性率は最低であるが、その後上昇して6歳以降のほとんど全ての人が抗 HBoV 抗体を保有していることがわかった。これらのことから、HBoV は呼吸器感染症に関連する重要なウイルスであると推定された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：小児感染症学、ヒトボカウイルス感染症、抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 2005年9月、スウェーデンの呼吸器感染症患者の鼻咽頭液から抽出したDNAを元にヒト・ボカウイルス(HBoV)がクローニングされた。このウイルスはパルボウイルス科パルボウイルス亜科ボカウイルス属に分類され、当初から呼吸器感染症の起因ウイルスであると推定された。
 (2) 従来、パルボウイルス科のウイルスの中で唯一パルボウイルス B19 (B19) がヒトに対して病原性を有するとされてきたが、

HBoVはヒトに病原性を有する第2番目のパルボウイルスとして注目を集めた。

(3) 我々の研究室で、原因ウイルスが不明の気道感染症患者の5.7%からHBoVが検出された(J Clin Microbiol. 2006;44:1132-34)。HBoV検出陽性者は7か月から3歳に集中しており、HBoV感染症は乳幼児に多いことが推定された。

(4) その後、カナダ、韓国、フランス、米国、オーストラリア、ドイツからも同様の報告が相次ぎ、気道感染症の起因ウイルスとしての

HBoV の臨床的重要性が認められてきた。

2. 研究の目的

(1) 血清疫学を通して HBoV 感染症の病態を解明する。

① 抗 HBoV 抗体の測定法を確立する。その過程で、HBoV がコードしている 4 種類の蛋白のどれが抗 HBoV 抗体測定用の抗原として最適であるかを明らかにする。

② HBoV 感染症患者のペア血清を用いて抗 HBoV 抗体上昇の有無を明らかにする。

③ 各年齢層の血清中の抗 HBoV 抗体陽性率を明らかにする。

(2) HBoV 感染症者の血中ゲノム検出を通して HBoV 感染症の病態を解明する。

① real-time PCR 法による高感度 HBoV ゲノム検出法を確立する。

② HBoV 感染症患者の急性期血清中の HBoV ゲノム検出の有無を明らかにする。

(3) 既知の呼吸器ウイルス検出の有無を通して HBoV 感染症の病態を解明する。

① HBoV 感染症患者の鼻咽頭ぬぐい液から既知の呼吸器ウイルスが検出されるか否かを明らかにする。

② HBoV 感染症患者の臨床像と既知の呼吸器ウイルス検出の有無との相関を調査する。

3. 研究の方法

(1) 抗 HBoV 抗体の測定法：HBoV の構造蛋白質 (VP1、VP2) 及び非構造蛋白質 (NP1、NS1) を産生するバキュロウイルスを遺伝子組み換えにより作成し、これらのウイルスを感染させた Tn5 細胞を抗原とする蛍光抗体間接法による血清中の抗 HBoV IgG 抗体測定法を確立した。

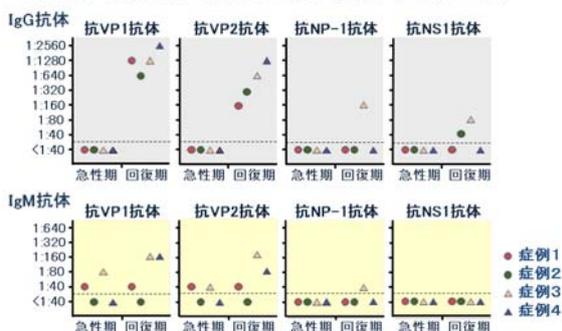
(2) HBoV の NP1 領域に primer と probe を設定した real-time PCR assay 系を確立した。10 コピー/反応の感度で HBoV ゲノムの検出が可能である。

(3) 既知の 11 種類の呼吸器ウイルスを検出するための (RT)-PCR 系を確立した。

4. 研究成果

(1) 鼻咽頭液から HBoV ゲノムが検出された下気道感染症患者のうち、急性期と回復期のペア血清が得られた 4 症例について、血清中の抗 HBoV IgG 抗体価を測定したところ、4 症例全ての回復期血清で抗 HBoV VP1-IgG 及び VP2-IgG 抗体価の上昇が認められ、HBoV 感染は液性免疫反応を引き起こしていることが明らかとなった。

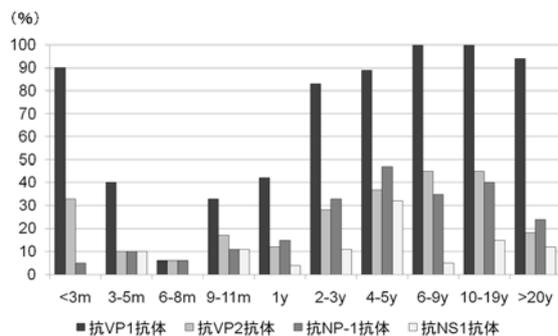
HBoV 検出者の抗 HBoV 抗体価の上昇



(2) 北海道内の各年齢層の血清中の抗 HBoV -IgG 抗体を測定したところ、6 か月から 8 か月の抗体保有率は最も低く、2~3 歳では 80%以上、6 歳以降はほぼ 100%となった。呼吸器感染症患者の鼻咽頭からの HBoV ウイルスゲノムの検出が 7 か月から 3 歳までのあいだに集中していることと合わせると、母親からの移行抗体が消失する 6-7 か月頃から 5 歳までのあいだに多くの小児が HBoV に初感染していると推測された。

(3) HBoV VP1、VP2、NP1 及び NS1 蛋白に対する IgG 抗体測定の結果から、抗 HBoV VP1-IgG 抗体の感度が最も優れており、血清疫学的解析には最適と考えられた。

各年齢層における抗 HBoV IgG 抗体陽性率



(4) (1)に記載した 4 症例について血清中の HBoV ゲノムを検索したところ、全例に HBoV ゲノム血症が観察された。

ペア血清が得られた4症例の血清中HBoVコピー数

症例	急性期血清		回復期血清	
	採血日	HBoVコピー数 (コピー/mL)	採血日	HBoVコピー数 (コピー/mL)
1	発症1日後	7.32×10^4	発症27日後	$<5.0 \times 10^2$
2	発症5日後	3.05×10^5	発症119日後	$<5.0 \times 10^2$
3	発症3日後	2.17×10^5	発症28日後	1.86×10^4
4	発症5日後	1.48×10^5	発症32日後	$<5.0 \times 10^2$

(5) (1)に記載した 4 症例の鼻咽頭ぬぐい液

中の既知の呼吸器ウイルスについて検索したところ、症例1と3からライノウイルスが、症例4からライノウイルスとアデノウイルスが検出された。

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 15 件)

- ① 石黒信久、遠藤理香、【今後留意すべき感染症】ヒトボカウイルス感染症、化学療法の領域、査読無、26 巻、2 号、2010、Page250-257
- ② Shirkoohi, R., R. Endo, N. Ishiguro, S. Teramoto, H. Kikuta and T. Ariga (2010). "Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera." *Clin Vaccine Immunol* 17(1): 190-3. 査読有
- ③ 石黒信久、遠藤理香、ヒトボカウイルス感染症、臨床検査、査読無、53 巻、1 号、2009、Page97-104
- ④ 石黒信久、遠藤理香、菊田英明、【最近注目される微生物 その臨床的意義と検査法(ウイルス)】注目されるウイルス ヒトボカウイルス、臨床と微生物、査読無、36、3 号、2009、Page199-204
- ⑤ 石黒信久、【最前線!ICT が注意すべき微生物対策 10】RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ボカウイルス、INFECTION CONTROL、査読無、18 巻、10 号、2009、Page1007-1011
- ⑥ L. B. Beder, M. Hotomi, M. Ogami, K. Yamauchi, J. Shimada, D. S. Billal, N. Ishiguro and N. Yamanaka (2009). "Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media." *Eur J Pediatr* 168(11): 1365-72. 査読有
- ⑦ Oikawa, J., J. Ogita, N. Ishiwada, T. Okada, R. Endo, N. Ishiguro, K. Ubukata and Y. Kohno (2009). "Human bocavirus DNA detected in a boy with plastic bronchitis." *Pediatr Infect Dis J* 28(11): 1035-6. 査読有
- ⑧ Kikuta, H., C. Sakata, R. Gamo, A. Ishizaka, Y. Koga, M. Konno, Y. Ogasawara, H. Sawada, Y. Taguchi, Y. Takahashi, K. Yasuda, N. Ishiguro, A. Hayashi, H. Ishiko, and K. Kobayashi, 2008. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time reverse transcription-PCR for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 46:928-32. 査読有
- ⑨ Shirogane, Y., M. Takeda, M. Iwasaki, N. Ishiguro, H. Takeuchi, Y. Nakatsu, M. Tahara, H. Kikuta and Y. Yanagi (2008). "Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2." *J Virol* 82(17): 8942-6. 査読有
- ⑩ Endo, R., T. Ebihara, N. Ishiguro, S. Teramoto, T. Ariga, C. Sakata, A. Hayashi, H. Ishiko and H. Kikuta (2008). "Detection of four genetic subgroup-specific antibodies to human metapneumovirus attachment (G) protein in human serum." *J Gen Virol* 89(Pt 8): 1970-7. 査読有
- ⑪ Takada, A., S. Yoshida, M. Kajikawa, Y. Miyatake, U. Tomaru, M. Sakai, H. Chiba, K. Maenaka, D. Kohda, K. Fugo and M. Kasahara(2008). "Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D." *J Immunol* 180(3): 1678-85. 査読有
- ⑫ Endo, R., N. Ishiguro, H. Kikuta, S. Teramoto, R. Shirkoohi, X. Ma, T. Ebihara, H. Ishiko, and T. Ariga, 2007. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol* 45:3218-23. 査読有
- ⑬ Kikuta, H., T. Ebihara, R. Endo, N. Ishiguro, C. Sakata, S. Ochiai, H. Ishiko, R. Gamo, and T. Sato, 2007. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma (Larchmt)* 26:17-21. 査読有
- ⑭ 遠藤理香、石黒信久、日本におけるヒトボカウイルス感染症の臨床像、小児科、査読無、48 巻、6 号、2007、Page957-963
- ⑮ 石黒信久、遠藤理香、有賀正、話題の感染症 ヒトボカウイルス感染症、*Modern Media*、査読無、53 巻、10 号、2007、Page259-266

[学会発表] (計 4 件)

- ① 石黒信久、感染症 update18 「ヒトボカウイルス感染症」(東京)、第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会、2009 年 4 月 23 日～24 日
- ② 石黒信久、進歩するウイルス検査の現状と将来展望、第 20 回日本臨床微生物学会総会シンポジウム (仙台)、2009 年 1 月 31 日～2 月 1 日
- ③ 石黒信久、『最近の小児呼吸器ウイルスの

話題 - ヒトメタニューモウイルスとヒトボカウイルスを中心に』、第5回神奈川小児血液・感染症フォーラム（横浜）特別講演、2008年9月5日（金）

- ④石黒信久、ヒトボカウイルス(HBoV)感染症における血清中のウイルスゲノムの検出と抗HBoV-IgG抗体価の推移、第39回日本小児感染症学会総会（横浜）、2007年11月9日-11日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 信久(ISHIGURO NOBUHISA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：40168216

(2) 研究分担者

遠藤 理香(ENDO RIKA)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30399806

有賀 正(ARIGA TADASHI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60322806

笠原 正典(KASAHARA MASANORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30241318

(3) 連携研究者

なし