

## 学位論文題名

# 小児呼吸器感染症領域における新興ウイルス感染症 ～KI, WUポリオーマウイルスを中心として～

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

ポリオーマウイルス(PyV)はエンベロープを持たない二本鎖 DNA ウイルスで、2007年、呼吸器感染症に罹患した小児の鼻咽頭ぬぐい液から KI ポリオーマウイルス(KIPyV)と WU ポリオーマウイルス(WUPyV)が発見された。KIPyV と WUPyV は呼吸器系の検体から発見されたウイルスではあるが、実際に呼吸器感染症の原因病原体となっているかは不明である。本研究ではこれを明らかにすることが第一の目的である。さらに、正常肺組織と肺腺癌組織中の KIPyV と WUPyV の有無を検索することで両ウイルスが肺組織に潜伏感染している可能性及び肺腺癌の病態に関連している可能性について検討することが第二の目的である。

### 【材料と方法】

1. 材料：(1) 2005年6月～2007年5月の期間に道内4施設の小児科で採取した0ヶ月～7歳(平均19ヶ月)の呼吸器感染症患者219名(男115名, 女104名)の鼻咽頭拭い液232検体を用いた。(2) 鼻咽頭拭い液から WUPyV が検出された1名の患者の急性期及び回復期血清と各年齢層(0～41歳)のヒト血清273検体を用意した。(3) コントロール群として1～7歳の健常小児20名の鼻咽頭拭い液20検体と、1ヶ月～10歳の気道感染症以外の疾患(急性胃腸炎他)27名の鼻咽頭拭い液27検体の合計47検体を用意した。(4) 富山大学附属病院で採取した30名分(男20名, 女10名, 45-77歳, 平均61.7歳)の肺腺癌組織とその近傍の正常肺組織から抽出したDNAを用意した(高野康雄博士より分与を受けた)。
2. KIPyV 及び WUPyV の検出：呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液及び正常肺組織、腫瘍組織から抽出されたDNAを鋳型に Real-time PCR 法を用いて KIPyV 及び WUPyV の検出を行なった。
3. 既知の呼吸器感染ウイルスの検出：呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液から抽出したDNAあるいは合成したcDNAを鋳型として、ヒトメタニューモウイルス(hMPV), コロナウイルス(HCoV), ヒトボカウイルス(HBoV), RS ウイルス(RSV), ライノウイルス(HRV), エンテロウイルス(HEV), アデノウイルス(AdV), A型及びB型インフルエンザウイルス(InfVA, B), パラインフルエンザウイルス 1-3型(PIV1-3)を(RT-)PCR法にて検出した。
4. 塩基配列の決定：呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液から抽出されたDNAを鋳型にPCR法(KIPyVはnested PCR法)を用いて検出されたKIPyV及びWUPyVの塩基配列の決定を行ない、既知の塩基配列との相同性を検討した。
5. 蛍光抗体間接法によるIgG抗体価測定：パキキュロウイルス系を用いてKIPyV及びWUPyVのVP1蛋白を発現させたSf9細胞を用意した。

### 【結果】

1. 小児呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液における KIPyV 及び WUPyV の検出：呼吸器感染症患者群では、KIPyV は 232 検体中 7 検体 (3.0%) から、WUPyV は 232 検体中 38 検体 (16.4%) から検出された。1 検体からは KIPyV と WUPyV が同時に検

出された。コントロール群からは KIPyV 及び WUPyV は検出されなかった。塩基配列の解析が可能であった KIPyV 7 検体については既知の KIPyV 株の塩基配列と完全に一致した。塩基配列の解析が可能であった WUPyV 13 検体のうち 10 検体の塩基配列は既知の WUPyV 株と完全に一致し、残りの 3 検体については 1bp の置換を認めた。

KIPyV 陽性患者の年齢は 3 ヶ月～2 歳 11 ヶ月で、WUPyV 陽性患者の年齢は 1 ヶ月～4 歳 11 ヶ月であった。KIPyV 陽性患者 7 名全員(100%)と WUPyV 陽性患者 38 名中 34 名(89.5%)は入院治療を受けており、入院期間は 3～11 日間(平均 5.6 日間)であった。KIPyV 単独陽性者 3 名全員、WUPyV 単独陽性者 20 名中 17 名が入院治療を必要とした。

KIPyV 及び WUPyV 陽性患者のうち、単独陽性者との重複感染を認めた者との間に臨床像の有意差はみられなかった。KIPyV 及び WUPyV 単独陽性患者と、他の呼吸器感染症ウイルス 5 種類 (RSV, hMPV, HRV, HBoV, PIV1) の単独陽性者との間に臨床像の有意差はみられなかった。

2. 血清中の WUPyV と抗 WUPyV VP1 蛋白抗体の検出：鼻咽頭拭い液から WUPyV と RSV が同時検出された気管支炎患者 1 名の急性期血清から WUPyV が検出されたが、回復期の血清からは WUPyV は検出されなかった。急性期の血清中の抗 WUPyV VP1 蛋白に対する IgG 抗体価は <1:10 であったが、回復期には 1:40 と上昇していた。各年齢層のヒト血清からは抗 WUPyV VP1 蛋白 IgG 抗体を測定したが、全て測定感度以下 (<1:10) であった。

3. 正常肺組織と肺腺癌組織からの KIPyV 及び WUPyV の検出：正常肺組織 30 検体中 1 検体(3.3%)から KIPyV が検出された。WUPyV はどの検体からも検出されなかった。肺腺癌組織 30 検体からは KIPyV 及び WUPyV は検出されなかった。

#### 【考察】

1. KIPyV 及び WUPyV と呼吸器感染症に関する考察：本研究では KIPyV 及び WUPyV が小児呼吸器疾患患者から検出されることが判明したが、知り得る限り、本邦初の報告である。KIPyV の検出頻度は 3.0% で、既知のデータと一致する。WUPyV の検出頻度は 16.4% と既知のデータよりも検出頻度が高いが、本研究では real-time PCR 法を用いたためと考えられる。両ウイルスの塩基配列は既知の塩基配列と良く一致しており、両ウイルスの塩基配列は世界的に良く保たれていることを示している。

本研究では、コントロール群 47 検体より、他の呼吸器感染症ウイルス 12 種類を含め、KIPyV 及び WUPyV は一切検出されなかった。従って、KIPyV 及び WUPyV が呼吸感染症の原因病原体になっている可能性や臨床経過に何らかの影響を与えている可能性があると言える。今後、コントロール群の数を増やして検討を加える必要がある。

2. 血清中から WUPyV が検出された意義：KIPyV 及び WUPyV が鼻咽頭拭い液から検出された場合、これが bystander か実際に感染を起こしているかが問題となる。WUPyV が鼻咽頭拭い液から検出された患者の急性期血清中から WUPyV が検出され、回復期に抗体価の上昇を伴ったことから、WUPyV については実際にヒトに感染することが示された。

3. 肺への潜伏感染と肺腺癌との関連に関する考察：KIPyV が正常肺組織 30 検体中 1 件より検出された。但し、KIPyV のコピー数は少ないので活動的な病変を起こしているとは考えにくく、潜伏感染の可能性はある。

#### 【結論】

KIPyV 及び WUPyV が呼吸感染症の原因病原体になっている可能性あるいは臨床経過に何らかの影響を与えている可能性がある。WUPyV は bystander ではなく、実際にヒトに感染を起こしていることを示している。KIPyV が肺組織に潜伏感染している可能性が示唆された。KIPyV 及び WUPyV と肺腺癌との関連は見出せなかった。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	有川二郎
副査	教授	西村正治
副査	教授	有賀正
副査	教授	佐藤典宏
副査	教授	志田壽利

## 学位論文題名

### 小児呼吸器感染症領域における新興ウイルス感染症 ～KI, WUポリオーマウイルスを中心として～

KIポリオーマウイルス(KIPyV)とWUポリオーマウイルス(WUPyV)は呼吸器系の検体から発見されたが、実際に呼吸器感染症の原因病原体となっているかは不明であり、申請者は日本人小児の罹患状況の把握と呼吸器感染の病原体になりうるのかについての研究を行った。また両ウイルスは腫瘍との関係が指摘される属のウイルスであることから、申請者は正常肺組織と肺腺がん組織についても検討した。道内で採取した0ヶ月～7歳の呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液232検体からReal-time PCR法で両ウイルスの検出を行ない、KIPyVは3.0%(7検体)、WUPyVは16.4%(38検体)で検出された。これらは1ヶ月～5歳の検体だった。他の呼吸器感染症ウイルス12種類についても検査し、KIPyV及びWUPyV陽性患者のうち単独陽性者その他のウイルスとの重複感染を認めた者との間に臨床像の差が無く、またKIPyV及びWUPyV単独陽性患者と他の呼吸器感染症ウイルスの単独陽性者との間にも臨床症状の差がないことが示された。コントロール群の1ヶ月～10歳の鼻咽頭拭い液47検体も同様に検査し、呼吸器感染症ウイルス12種類とKIPyV及びWUPyVは一切検出されなかった。塩基配列の解析で両ウイルスの塩基配列は世界的に良く保たれていることが示された。鼻咽頭拭い液からWUPyVが検出された1名の患者の急性期血清中からWUPyVゲノムが検出され、回復期には抗体価の上昇を伴い、WUPyVがヒトに感染することが示された。各年齢層(0-41歳)のヒト血清273検体では抗体価の上昇を認めず抗体価の上昇は一過性でかつ低値に留まることが推察された。腫瘍原性との関係性では30名(45-77歳)の肺腺癌組織とその近傍の正常肺組織のDNAが用いられた。正常肺組織30検体中1件より検出されたKIPyVのコピー数は少なく、潜伏感染の可能性が考えられた。肺腺がん組織からは両ウイルスともに検出されず肺腺がんとの関連性は見出されなかった。KIPyVとWUPyVが呼吸器感染症の原因であるか否かの考察でコッホの原則の変法を用いて現時点では可能性は否定も肯定もできないことが示された。

この研究結果に対して西村教授より呼吸器感染症群検体を経時的に追跡して回復期にコピー数が減少する様子を確認できたのであれば病原性の証明にあたり一層良かったとの指摘があった。成人の検出状況についての質問には、他国の報告では高齢になると検出されていると回答した。

有賀教授からは他のウイルスとの重複感染するのは KIPyV と WUPyV の特徴なのかと質問があり、他のウイルスにも同様にみられることであると答えた。検出コピー数と患者の重症度との相関についての質問には、相関がみられなかったと返答した。母からの移行抗体についての質問には、他国の臍帯血での検査で移行抗体は検出されなかった報告があると答えた。

佐藤教授からは研究計画（経時的な検体採取など）について指導された。コッホの原則の変法は KIPyV と WUPyV の病原性の証明には厳しすぎるのではないかとの質問に対しては、他の病原体では年月が経って同法を満たすことができた例もあるので、現時点で同法を本研究に用いることは妥当と考えていると答えた。

志田教授からは免疫不全患者から KIPyV と WUPyV が偶然見つかった場合に、これを真の病原体と誤ってしまう可能性があるので、コッホの原則の変法では不十分ではないかとの指摘があった。これに対して、免疫不全モデル動物での研究や免疫不全のヒトの検体を経時的に扱う研究が必要と答えた。さらに、ウイルス分離ができていないことが再確認された。

有川教授からは抗体価の検査についてはバキュロウイルス系だけではなく VLP 等による立体的な構造での検査が必要と指導された。小児期に集中して感染することについての考察を求められ、初期感染をしたのちの抗体が高齢では低下して再感染するのか、あるいは潜伏状態で免疫低下に伴い再発症しているのではないかと述べた。感染経路についての質問には、都市の下水等の環境中に KIPyV や WUPyV が存在しているとの外国の報告を基に、両ウイルスは環境中に存在しており何らかの経路で気道や口腔内に侵入する可能性を述べた。

いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。

この論文は、日本人小児における初めての KIPyV と WUPyV の検出の報告でありその病原性への考察も含めて新興感染症への取り組みとしての研究として高く評価され、今後のさらなる病原性の解明の礎の研究として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。