

3) ヒトパルボウイルスによる造血障害

新潟大学医学部第一内科 高橋 益 広

Inhibition of Hematopoiesis by Human Parvovirus

Masuhiro TAKAHASHI

*First Department of Internal Medicine Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

Aplastic phase serum from a patient with aplastic crisis of hereditary spherocytosis, which was demonstrated to contain human parvovirus, inhibited in vitro erythroid colony formation almost completely and granulocyte-macrophage colony growth mildly. The suppressive effect of the serum was absolutely abrogated by adding convalescent phase serum from aplastic crisis, some normal sera, and human immunoglobulin products. Myeloid cell line KU-812, which is established from a patient with chronic myelogenous leukemia and possesses the ability of erythroid differentiation, was suppressed to form colonies by human parvovirus. These findings suggest that human parvovirus causing aplastic crisis of hemolytic anemia could be prevented or treated with human immunoglobulin products and that KU-812 might have the receptor for human parvovirus and could be a unique cell line in which parvoviruses replicate.

Key words: human parvovirus, erythropoiesis, inhibition, immunoglobulin product, KU-812

ヒトパルボウイルス、赤芽球造血、抑制作用、免疫グロブリン製剤、KU-812

はじめに

従来、造血障害を来すウイルスとしては、肝炎ウイルス（主に non-A, non-B）、EB ウィルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等が知られていたが、最近ヒトパルボウイルスがウイルスによる造血障害のモデルとして注目されている。

1975年、イギリスの Cossart らは、健康供血者の血清中にウイルス様粒子を見出し、これを parvovirus-like antigen と呼び、その1つを B19 と名づけて標準

抗原粒子とした¹⁾。これは現在 human parvovirus B19 と命名され、ウイルスそのものであることが確認されている。

HUMAN PARVOVIRUS B19 の性状と関連疾患

human parvovirus B19 は球状で、envelope を欠き、5.4kb の線状1本鎖 DNA ウィルスである。増殖にヘルパーウィルスを必要としない autonomous virus で、直径 20~25nm とヒトの病気を起こす最小の DNA ウィルスである。

human parvovirus が原因と考えられる疾患は、sickle cell anemia²⁾、hereditary spherocytosis³⁾、pyruvate

Reprint requests to: Masuhiro TAKAHASHI,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asahimach-Dori 1-754, Niigata, City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科

高橋 益 広

kinase deficiency⁴⁾, thalassemia intermedia⁵⁾, autoimmune hemolytic anemia⁶⁾ 等の通常造血が盛んな状態にある慢性の溶血性貧血を基礎に持つ人に起こる aplastic crisis の他に、最近、急性リンパ性白血病⁷⁾, 複合免疫不全症⁸⁾ に合併する持続性貧血の原因ともなりうる事が報告されている。また基礎疾患が無い場合でも、後述する伝染性紅斑様疾患に続発し、本ウイルスが原因と考えられた重症再生不良性貧血例が報告されている⁹⁾。そのほか血小板減少性紫斑病の一部に human parvovirus B19 に起因するものも存在するとされている¹⁰⁾。その他、伝染性紅斑の起因ウイルスと同定されており¹¹⁾, 多発性関節炎¹²⁾, vascular purpura¹³⁾, 妊婦の感染による胎児水腫、流産¹⁴⁾ 等との関連性が示されている。

PARVOVIRUS による造血抑制を来した自験例

〔症例 1〕 10才, 男子, 遺伝性球状赤血球症。

現病歴: 1981年6月2日 39.7℃の発熱。6月8日倦怠感、傾眠傾向出現のため新潟市民病院に入院。

現 症: 顔面蒼白, 脾腫 (肋骨弓下 4cm)。

検査成績: 赤血球数 $1.52 \times 10^{12}/1$, 球状赤血球 (+), Hb 4.4g/dl, 網赤血球 0.1%, 白血球数 $8.2 \times 10^9/1$, 血小板数 $35 \times 10^9/1$ 。

入院後経過: 貧血と血小板減少症は、発熱後9日目より急速に回復。入院12日目に、掻痒感を伴う斑状丘疹が全身に出現したが、3日で消失。

〔症例 2〕 34才, 女性, 症例 1 の母。

既往歴: 小児期よりの貧血と黄疸 (放置)。

現病歴: 1981年6月11日症例 1 の看病をしていて、38.6℃の発熱、頭痛、関節痛あり。6月14日倦怠感、めまい増強し、新潟市民病院に入院。

現 症: 傾眠傾向、眼瞼結膜貧血著明、眼球結膜軽度黄疸。脾腫 (肋骨弓下 1cm)。

検査成績: 赤血球数 $1.13 \times 10^{12}/1$, 球状赤血球 (+), Hb 3.8g/dl, 網赤血球 1.2%, 白血球数 $5.0 \times 10^9/1$, 血小板数 $149 \times 10^9/1$, 浸透圧脆弱性試験 (+), 自己溶血試験 (+)

入院後経過: 遺伝性球状赤血球症の aplastic crisis と診断されたが、網赤血球は発熱後10日目より急速に回復。発熱後14日目に、顔面、体幹を中心に、小斑状丘疹が出現したが、7日で消失。

〔症例 3〕 9才, 遺伝性球状赤血球症。

現病歴: 1982年3月2日 38.9℃の発熱があり、3日間持続。赤血球数 $1.56 \times 10^{12}/1$, Hb 5.8g/dl, 白血球数 $8.2 \times 10^9/1$, 3月8日新潟市民病院に入院。

現 症: 顔面蒼白, 脾腫 (肋骨弓下 1cm)

入院後経過: 貧血は、自然に回復。

〔症例 4〕 13才, 男子, 遺伝性球状赤血球症。

現病歴: 1981年12月30日 38.5℃の発熱。1982年1月7日高度の貧血のため新潟大学第一内科に入院。

検査成績: 赤血球数 $1.34 \times 10^{12}/1$, 球状赤血球 (+), 網赤血球 9.4%, 白血球数 $36.7 \times 10^9/1$, 血小板数 $72.6 \times 10^9/1$ 。

入院後経過: 入院後貧血は速やかに改善し、白血球、血小板増多も正常化した。

〔ウイルス学的検索〕 症例 2 と症例 3 の血清について、countercurrent immunoelectrophoresis (CIE), radioimmunoassay (RIA), 及び電子顕微鏡で human parvovirus B19 抗原と抗体の検索を行った。症例 2 においては、発熱後 3, 4, 5 日目の血清中にパルボウイルス抗原が認められたが、同時に微量の IgM, IgG 抗体も認められた。一方、症例 3 の発熱後 9, 13 日目の血清中には、RIA で IgM 抗体が、それぞれ 31.0 units, 37.0 units, IgG 抗体がそれぞれ 10.5 units, 28.0 units と経時的な増加を示したが、パルボウイルス抗原は検出できなかった。

パルボウイルスの造血抑制に関する in vitro の検討

〔目的〕 1) human parvovirus B19 の存在が確認された血清は、in vitro で赤芽球及び、顆粒球造血を抑制するか?

2) その抑制作用は、56℃, 30分の熱処理に安定か?

3) その抑制作用は、aplastic crisis 患者の回復期血清により中和されるか?

4) 中和能を有する正常人血清はどれくらいあるか?

5) 免疫グロブリン製剤には、中和能があるか?

6) 赤芽球系に分化能を有する細胞株の中で、パルボウイルスに感受性のあるものはあるか?

以上の点を明らかにするために、以下の実験を行った。

〔方法〕 正常人骨髓単核球 $5 \times 10^6/ml$ に human parvovirus B19 が証明された症例の 2 の血清を等量加え、4℃で4時間放置した後、0.8%メチルセルローズ法で赤芽球系前駆細胞の培養を、0.3%軟寒天法で顆粒球系前駆細胞の培養を行った。

〔結果〕 被験血清は、1,000倍までの希釈で、骨髓単核球浮遊液と等量加えた場合、CFU-E 由来コロニーの形成を完全に抑制した。10,000倍と100,000倍希釈では、正常血清を同様に加えて形成された CFU-E 由来コロニー数に比し、それぞれ 73.2%, 40.5%のコロニー形

成が抑制された¹⁵⁾。

被験血清は、BFU-E に対しても強い抑制作用が認められたが、抑制の程度は CFU-E より軽度であった¹⁵⁾。すなわち 1,000倍以下の希釈血清を加えた場合でも正常血清コントロールに比し 2.5~9.6%の BUF-E 由来コロニーの形成が認められた。

CFU-C 由来コロニーは、10倍希釈被験血清で、39.8%抑制されたが、赤芽球系前駆細胞に比しその程度は極めて軽度であった¹⁵⁾。

1,000倍希釈した被験血清を、56℃、30分間熱処理した後での抑制能についての検討では、処理により抑制活性は弱まるものの、処理後においても CFU-E、BFU-E 由来コロニーは、それぞれ 79.2%、51.2%が抑制された¹⁵⁾。

症例4の発熱から13日目の回復期血清を用いて中和実験を行った。1,000倍希釈した症例2の急性期血清に認められた CFU-E、および BFU-E に対する抑制活性は、症例4の回復期血清により完全に中和された¹⁵⁾。

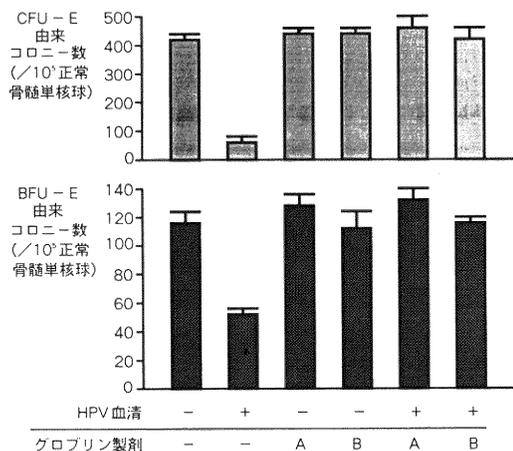


図1 human parvovirus B19の赤芽球造血抑制に対するグロブリン製剤の中和能

human parvovirus B19含有血清に 1/10量の人免疫グロブリン製剤(50mg/ml)を加えて1時間室温で反応させ、血清と等量の 5×10^6 /ml に調整した正常人骨髄単核細胞浮遊液を加えて 4℃、4時間放置した後、赤芽球系前駆細胞の培養を行った。免疫グロブリン製剤の代わりに培養液を加えたコントロールによる抑制に対するグロブリン製剤を加えたことによるその解除をグロブリン製剤の中和能として評価した。

A: アルキル化免疫グロブリン (Polyglobin)
B: 乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン (Venoglobulin-I)

正常人血清を用いた中和実験では、9人の正常血清のうち3検体において、症例2の急性期血清による CFU-E の抑制に対する中和能が認められた。BFU-E に対する抑制活性に対しても、少なくとも3人の正常血清において中和能が認められた¹⁵⁾。

human parvovirus B19の赤芽球造血に対するグロブリン製剤の中和能に関する同様な検討では、アルキル化免疫グロブリンと乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンの両者において、CFU-E と BFU-E に対する抑制の解除が認められた(図1)。

赤芽球系に分化し得る株細胞である HEL, K562, それに KU-812¹⁶⁾¹⁷⁾ のコロニー形成に対する human parvovirus B19の影響を検討した所、KU-812においてのみ、10%のウィルス含有血清を添加した場合におい

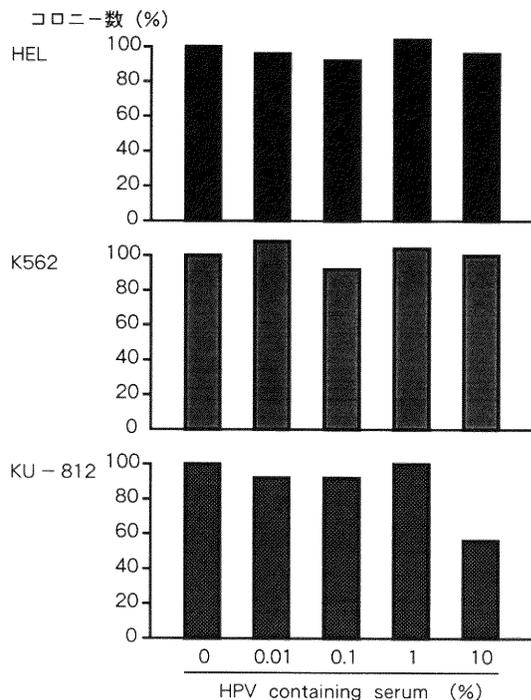


図2 赤芽球系に分化し得る人株細胞(HEL, K562, KU-812)に対する human parvovirus B19の影響

human parvovirus B19含有血清を種々の濃度で in vitro colony assay 系に加えその抑制の程度を検討した。 5×10^4 個の株細胞を 15% FBS を加えた 0.3% 軟寒天培養を行うことにより、HEL では 1684 ± 68 (mean \pm SD), K562 では 1636 ± 24 , KU-812 では 1344 ± 120 個のコロニー形成が認められた。

てのみ、50%のコロニー形成に対する抑制作用が認められた(図2)。

HUMAN PARVOVIRUS B19 の造血障害についての考察

自験例および正常人ボランティアへのウイルス感染実験の報告¹⁸⁾より、human parvovirus B19 感染後の経過を以下に考察する。抗体を持たない人に human parvovirus B19 が感染すると、感染後6~13日目位の短期間に、ウイルス血症が認められ、同時期に咽頭にウイルスが証明される。しかし、尿や便には証明されないことより、気道感染が強く疑われる。血中からウイルスが消失すると同時に、IgM、次いで IgG 抗体が増加する。ウイルス血症出現後、網赤血球が7~10日間消失する。これにより正常人では、1~2g/dl のヘモグロビンの減少を認めるのみであるが、慢性溶血性貧血を基礎疾患として有する患者においては、自験例のごとく極めて高度の貧血を呈する。またウイルス血症と時を同じくして発熱を来し、その後7~10日位して斑状丘疹、関節痛等の症状が出現する場合がある。

また赤芽球系の過形成を示す溶血性貧血患者の骨髓細胞を human parvovirus B19 を含む血清とともにエリスロポエチンを加えて培養すると、赤芽球が減少すると共に、ウイルスが感染したと思われる特徴的な巨大前赤芽球が出現する(図3)。一方、今回の検討で、human parvovirus B19 は、BFU-E に比し、CFU-E をより強く抑制することが明らかとなり、human parvovirus B19 の標的細胞は、CFU-E から前赤芽球にかけての成

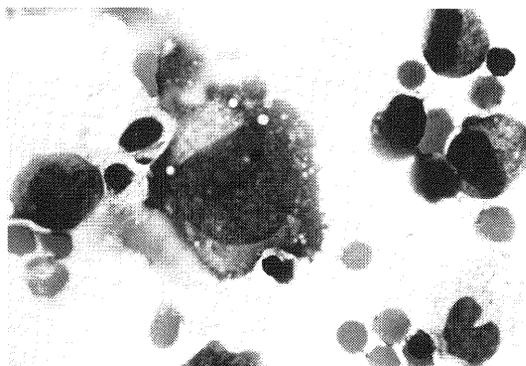


図3 human parvovirus B19 が感染したと考えられる巨大前赤芽球

赤芽球過形成のある遺伝性球状赤血球症患者の骨髓細胞に human parvovirus B19 含有血清と erythropoietin μ l/ml を加え、7日間液体培養した後に認められた巨大前赤芽球。

熟段階の細胞と考えられた。又、臨床例及び in vitro での検討の結果、human parvovirus B19 は、赤芽球系のみならず、顆粒球系、血小板系に対しても抑制作用を有するものと思われたが、その程度には、強い個人差が存在した。

また今回の in vitro の検討より、human parvovirus B19 に対する緊急時の予防と治療において人免疫グロブリン製剤がある程度の有効性が期待できるものと思われた。

現在の所、human parvovirus B19 の増殖系については、赤芽球系過形成を示す人骨髓細胞との培養のみが有効であるとされているが¹⁹⁾、今回の検討で、KU-812 が human parvovirus B19 による抑制を受けたことより、この細胞株がウイルスの新たな増殖系となり得る可能性が示唆された。

おわりに

自験例は、溶血性貧血に合併した human parvovirus B19 感染により一過性の造血障害を来した症例であるが、今後は、さまざまな原因による免疫不全状態での human parvovirus B19 の持続感染による長期にわたる骨髓不全が大きな問題になってくるものと思われる。又最近、第VIII因子製剤、第IX因子製剤等の凝固因子製剤に human parvovirus B19 が混在し、その輸注により感染が成立すること、また加熱処理が有効であること等²⁰⁾が指摘されており、血友病患者に合併する AIDS の免疫不全状態での human parvovirus B19 の持続感染による造血障害にも十分注意する必要があるものと思われる。

参考文献

- 1) Cossart, Y.E., Field, A.M., Cant, B. and Widdows, D.: Parvovirus-like particles in human sera, *Lancet*, **I**: 72~73, 1975.
- 2) Pattison, J.R., Jones, S.E., Hodgson, J., Davis, L.R., White, J.M., Stroud, C.E. and Murtaza, L.: Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle cell anemia, *Lancet*, **I**: 664~665, 1981.
- 3) Kelleher, J.F., Luban, N.L.C., Mortimer, P.P. and Kamimura, T.: Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis, *J. Pediatr.*, **102**: 720~722, 1983.
- 4) Davis, L.R.: Aplastic crises in haemolytic

- anaemias: The role of a parvovirus-like agent, *Br. J. Haematol.*, **55**: 391~393, 1983.
- 5) **Rao, K.R.P., Patel, A.R., Anderson, M.J., Hodgson, J., Jones, S.E. and Pattison, J.R.:** Infection with parvovirus-like virus and aplastic crisis in chronic hemolytic anemia, *Ann. Intern. Med.*, **98**: 930~932, 1983.
 - 6) **Bertrand, Y., Lefrere, J.J., Leverger, G., Courouce, A.M., Feo, C., Clark, M., Schaison, G. and Soulier, J.P.:** Autoimmune haemolytic anaemia revealed by human parvovirus linked erythroblastopenia, *Lancet*, **II**: 382~384, 1985.
 - 7) **van Horn, D.K., Mortimer, P.P., Young, N. and Hanson, G.R.:** Human parvovirus-associated red cell aplasia in the absence of underlying hemolytic anemia, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **8**: 235~239, 1986.
 - 8) **Kurtzman, G.J., Ozawa, K., Cohen, B., Hanson, G., Oseas, R. and Young, N.S.:** chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection., **317**: 287~294, 1987.
 - 9) **Hamon, M.D., Newland, A.C. and Anderson, M.J.:** Severe aplastic anaemia after parvovirus infection in the absence of underlying haemolytic anaemia, *J. Clin. Pathol.*, **41**: 1241~1246, 1988.
 - 10) **Lefrere, J.J., Courouce, A.M. and Kaplan, C.:** Parvovirus and idiopathic thrombocytopenic purpura, *Lance*, **I**: 279, 1989.
 - 11) **Anderson, M.J., Lewis, E., Kidd, I.M., Hall, S.M. and Cohen, B.:** An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg.*, **93**: 85~93, 1984.
 - 12) **White, D.G., Woolf, A.D., Mortimer, P.P., Cohen, B.J., Blake, D.R. and Bacon, P.A.:** Human parvovirus arthropathy, *Lancet*, **I**: 419~421, 1985.
 - 13) **Lefrere, J.J., Courouce, A.M., Muller, J.Y., Clark, M. and Soulier, J.P.:** Human parvovirus and purpura, *Lancet*, **II**: 730, 1985.
 - 14) **Rodis, J.F., Hovick, Jr, T.J., Quinn, D.L., Rosengren, S.S. and Tattersall, P.:** Human parvovirus infection in pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, **72**: 733~738, 1988.
 - 15) **Takahashi, M., Koike, T., Moriyama, Y., Shibata, A., Koike, Y., Sanada, M. and Tsukada, T.:** Inhibition of erythropoiesis by human parvovirus-containing serum from a patient with hereditary spherocytosis in aplastic crisis, *Scand. J. Haematol.*, **37**: 118~124, 1986.
 - 16) **Kisih, K.:** A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors, *Leuk. Res.*, **9**: 381~390, 1985.
 - 17) **Nakazawa, M., Mitjavila, M.T., Debili, N., Casadevall, N., Mayeux, P., Rouyer-Fessard, P., Dubart, A., Romeo, P.H., Beuzard, Y., Kishi, K., Breton-Goorius, J. and Vainchenker, W.:** KU821: A pluripotent human cell line with spontaneous erythroid terminal maturation, *Blood*, **73**: 2003~2013, 1989.
 - 18) **Anderson, M.J., Higgins, P.G., Davis, L.R., Williams, J.S., Jones, S.E., Kidd, I.M., Pattison, J.R. and Tyrrell, D.A.J.:** Experimental parvovirus infection in humans, *J. Infect. Dis.*, **152**: 257~265, 1985.
 - 19) **Ozawa, K., Kurtzman, G. and Young, N.:** Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures, *Science*, **233**: 883~886, 1986.
 - 20) **Bartolomei Corsi, O., Azzi, A., Morfini, M., Fanci, R. and Ferrini, R.:** Human parvovirus infection in haemophiliacs first infused with treated clotting factor concentrates, *J. Med. Virol.*, **25**: 165~170, 1988.

司会 有難うございました。病原性ヒト・パルボウイルスにつきましては以前から存在が予想されながらなかなか実体が分かりませんでした。先程のお話の様に当初、輸血用の血液の中に特定の抗原活性を与えるウイルス様粒子として発見されました(1975年)が、後程それがりんご病、伝染性紅斑の起原である事が血清学的に証明されました(1983年)。別にジャマイカで、溶血性貧血の患者を多く扱っている病院で aplastic crisis が outcome として、血液を調べたところ、同じパルボウイルスの存在が明かとなり(1980年)、造血組織を侵襲する可能性が示唆されました。実は、動物ではパルボウイルスが造血組織、胎児組織を侵すことは随分前から知られていたのです。それがこうやってヒトでも類似の病気を起こすという事がはっきりしてきたわけです。第一内科の先生方

のご発表は造血系細胞の colony formation system を使われて、ヒト・パルボウイルスが colony 抑制を起こすこと、つまりその場でのウイルス増殖の可能性を示されたわけです。あるジャーナルでそのご報告を拝見致

しまして、今回特にご講演をお願いしたというわけですね。後でご質問を受けさせていただきます。では第四席に移らせていただきます。B型肝炎ウイルスの複製機構、第三内科、小方先生お願い致します。

4) B型肝炎ウイルスの複製・増殖機構

新潟大学医学部第三内科学教室（主任：朝倉 均教授）

小方 則夫

A Molecular Mechanism of Replication of Hepatitis B Virus Genome

Norio OGATA

*Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)*

Replication process of hepatitis B virus (HBV) genome contains a step of reverse transcription from pregenome RNA of 3.6 kb in length. To obtain further insights into the replication mechanism of HBV genome, we examined liver tissue specimens obtained from patients of HBV carrier for the molecular structures of the viral DNA using Southern blot hybridization technique. In the active replication phase of the virus genome, extrachromosomal viral DNAs in the forms of relaxed circle, partially double strand and single strand, were observed. In contrast, the inactive replication phase of the virus genome was characterized by the existence of supercoiled circular form and relaxed circular form. As for the integrated forms of HBV DNA into cellular DNA, head-to-tail tandemly repeated form was detected in both active and inactive replication phases in some patients.

Results described were discussed from a viewpoint of possible structures of the "proviral" HBV DNA for the production of the pregenome RNA.

Key words: hepatitis B virus (HBV) carrier, HBV genome replication, extrachromosomal HBV DNA, integrated HBV DNA

B型肝炎ウイルスキャリア、HBウイルス遺伝子増殖、染色体外性HBウイルスDNA、組込型HBウイルスDNA

Reprints requests to: Norio OGATA,
Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asashimachi-Dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室

小方 則夫