

## ウイルス性下痢症研究会 第21回学術集会プログラム

日時：平成21年10月24日（土） 13:00-17:00（受付12:00より）

場所：国立感染症研究所 戸山庁舎 共用第一会議室（東京都新宿区戸山1-23-1）

- I. 平成21年度総会 13:00-13:15
- II. 特別講演 13:15-14:15 座長：遠矢幸伸（日本大学生物資源科学部）  
病理学から感染症学へ ―ノロウイルスとの出会い、興糞と糞戦―  
田中智之 先生（堺市衛生研究所）
- III. 特別企画 14:15-15:15 座長：野田 衛（国立医薬品食品衛生研究所）  
下痢症ウイルスの生き残り戦略  
（1）水環境中のウイルスの挙動  
片山浩之（東京大学大学院工学系研究科）  
（2）豚カリシウイルスの分子疫学：豚サポウイルスで観察される高度な遺伝的多様性  
中村一哉（富山県衛生研究所）  
（3）ノロウイルス GII/4 の変異  
本村和嗣（国立感染症研究所）
- IV. 話題提供 15:30-16:00 座長：片山和彦（国立感染症研究所）  
分子進化遺伝学の基礎 鈴木義幸先生（国立遺伝学研究所）
- V. トピックス 16:00-17:15 座長：葛谷光隆（岡山県環境保健センター）
- ・ 国際学会：第109回アメリカ微生物学会の報告  
北島正章（東京大学大学院工学系研究科）
  - ・ 衛生微生物協議会  
山崎謙治（大阪府立公衆衛生研究所）
  - ・ 日米医学（6、7月ごろ）  
中込 治（長崎大学医学部）
  - ・ ロタウイルスの新知見  
小林宣道（札幌医科大学）
  - ・ カリシウイルスの新知見  
岡智一郎（国立感染症研究所）
  - ・ CaliciWeb について  
三瀬敬治（札幌医科大学）

☆ 情報交換会 17:45-20:00 国立感染症研究所 戸山庁舎1階食堂会費 3,000円

# 抄 録

## 特別講演

「病理学から感染症学へ ―ノロウイルスとの出会い、興糞と糞戦―」

堺市衛生研究所 田中 智之

1974年に和歌山県立医科大学の病理系大学院を修了しました。大学院での研究課題は、日本でも研究が始まっていたB型肝炎ウイルス、当時はオーストラリア抗原と呼ばれていましたが、についてでした。旧型の高倍率の観察ができず解像力の悪い電子顕微鏡との闘いから始まり、血中のウイルス粒子を電顕で追跡・同定することでした。Dane粒子を視た時の感動は忘れられません。病理肝組織でのウイルスの局在、病変との関連性の追求も臨床的情報が必須でした。何とか研究成果をまとめ、さて、言う時に市内の保育所での肝炎が流行の情報が入り、小児科の助教授とともに採血やら疫学調査に走りました。

丁度そのころ、アメリカ NIH から帰国された国立感染症研究所 元副所長 森次保雄先生から Purcell 博士と共同研究の A 型肝炎ウイルス(HAV)抗原を用いて抗体測定が可能である、との連絡を戴き、7名のペア血清をもって感染研武蔵村山分室に飛びました。当時は IAHA 抗体測定でしたが、その結果、ペア血清では見事に抗体価の有意な上昇がみられ、流行した肝炎の集団感染は A 型肝炎であることが実証されました。日本で初めてウイルス血清学的に A 型肝炎として報告された事例でした。この成績を含め血清疫学調査が行われ、日本人の A 型肝炎抗体保有率は、35歳を境にして保有率上昇する、つまり、特に15歳以下はほとんど抗HAV抗体を有していない事が判明しました。森次博士との結論は、受動にしる能動にしる、免疫獲得がなければ、今後日本では A 型肝炎の大流行が起こる可能性が高いことでした。当時 HAV の細胞培養系は成功していませんでしたので森次博士は、とりあえず海外旅行者へのガンマグロブリンの投与等の必要性を厚労省に提言出されました。細胞培養を試みるにしろワクチンを作るにしろ、必要な A 型肝炎の糞便材料の収集は極めて困難でした。HAV は臨床症状がでる前駆期の糞便に排泄されます。しかも、A 型肝炎特有の臨床症状はありません。発熱等の感冒様症状から全身倦怠感、そして黄疸に進展します。

まずはウイルス学的な正確な診断系の構築が重要との判断のもと A 型肝炎の材料を求めて長崎に旅に出ました。しかし、この病院で NICU の看護師さんが調乳の際にロタウイルス汚染があり NICU 患児全員が感染する院内感染事例が発生しました。電顕を使用できるのは私だけでしたので、来る日も来る日も下痢便とのまさしく糞戦の日々でした。その時に、このロタウイルスリッチな糞便を使わない手はない、と発想転換し中央検査部の技師さんと共に糞便中からウイルスの精製、ウサギの免疫血清を使ってロタウイルス抗原測定 ELISA 法を構築致しました。昭和 56 年のことです(臨床とウイルス 9(2):92-105, 1981)。また、ロタウイルスの多数のモノクローナル抗体も作製しました。

その後縁あってベイラー医科大学に留学の機会があり、Estes 博士、Xi Jiang 博士と出会いノロウイルス(NV)の研究が始まりました。Estes 博士は molecular virologist です。Kg, gram の中で育った私には  $\mu\text{g}$ , ng など、どこの世界という感じでしたが、とにかく慣れるのに必死でした。IEM によるボランティア材料の診断、RIA 診断系の確立、GI 生検材料の検討が当初の研究課題でした。一応診断系の確立が終わり帰国の期日に迫られたため、後を XiJiang 博士に申し送り、1990 年に彼が NV clonig に成功しました。ロタウイルスのモノクローナル抗体のことを Estes 博士は知っていましたから、XiJinag 博士の構築したバキュロウイルス発現系で作成される中空粒子、VLPs,を用いたモノクローナル抗体の作製に北元先生と着手し NV の多くの遺伝子型に広範囲に交差反応する非常にすぐれた抗体を作製しました。これを用いて先ず ELISA 診断系を構築し、RT-PCR 法との一致率 81%, 感度 70%, 特異性 98%で、厚労省から対外診断試薬として認可されました。ELISA 法は多検体が同時測定できるという特徴があり、集団検査などには適した方法ですが、診断に要する時間は 2 時間半がかかる難点があります。そこで、イムノクロマトグラフィー(IC)法の構築に挑戦いたしました。IC 法は、RT-PCR 法との一致率が 89%, 感度 81%, 特異性 100%となり、平成 20 年 11 月に体外診断薬として認可されました。この方法の大きな特徴は、僅か 15 分で診断出来ること、10%便乳剤の調整が不必要である点です。従って、ベットサイドで検体を採取し 15 分後にノロウイルスの保有状態が診断され、医療現場での応用は限りなく広くなりました。また様々な抗体を用いた生検材料の免疫染色で NV の増殖部位が人の小腸上皮細胞であることを私どもが初めて確認、報告いたしました。

HAV から始まり NV で診断系の確立を成し遂げました。ノロウイルスのウイルス学的診断から始まる感染予防、食中毒における鑑別診断に役立てることができたと考えています。まだ、NV の培養、ワクチンという課題は残っていますが、今後も鋭意努力していきたいと考えています。

最後に、このような仕事は決して一人で出来るものではなく、以下の先生方のご協力があつたからこそ達成出来ました。互いの信頼と共通目的、研究の基礎と考えます。ここに深謝いたします。

共同研究者：ベイラー医科大学 Estes 博士、Graham 博士。シンシナティールドレンホスピタル Xi Jiang 博士。兵庫県立大学環境人間学科 北元憲利教授。国立感染症研究所ウイルス 2 部前室長 武田直和先生、名取克郎先生。全国地方衛生研究所 NV 研究班の先生方。デンカ生研 鎌田公仁夫博士。堺市衛生研究所、三好達也、内野清子、吉田永祥。

## 水環境中のウイルスの挙動

片山 浩之 (東京大学大学院 工学系研究科)

下水中にウイルスが含まれていることについては 1940 年代から調べられており、以来、ウイルスの感染経路の一つとして、水を対象とする研究が進められてきている。当初は、タンポン法による濃縮、培養法によるウイルス培養という手法でウイルスが検出されており、定量的な議論をすることが難しかった。その後、ウイルス濃縮法の発展、新しいウイルスの発見、PCR 法の発明およびその後の発展などにより、ウイルスの定量的な測定が可能になってきている。

現在の水中ウイルス測定においては、試料水の液量、濃縮後の液量、PCR に用いた液量を計算して、PCR の遺伝子測定値から試料中のウイルス濃度を算出することが可能であるが、濃縮回収、遺伝子抽出および (RT) PCR における阻害に関する検討も重要である。たとえば、試料に濃度既知の Mengo Virus を陽性対照として用いる方法などが提唱されてきている。

PCR 法によるウイルスの定量的な測定法が発達するにつれて、ウイルスの感染価に関する情報が重要であることが改めて認識されてきている。測定対象とする水試料の履歴（たとえば、塩素消毒されたか）などをもとに感染価のあるウイルスの割合を推定するのが現実的な評価方法であると考えられる。

筆者らが行った調査では、都市の未処理下水には  $10^{6+1}/L$ 、下水処理場において 99%以上除去されることなどが明らかになってきている。また、雨天時において未処理下水が環境中に流出されることがあるため、雨天の翌日の東京湾におけるウイルス濃度は高くなることが分かっている。

一方、水道水中のノロウイルスの遺伝子数は 1 個/1000L 以下であり、浄水場において効率的にウイルス粒子が除去されていることがわかってきた。水道においては、塩素消毒が義務付けられているため、ウイルスの塩素消毒耐性に関する情報が強く求められている。

海外における調査において、日本の下水に相当するような都市水路におけるウイルス濃度は日本の下水とほぼ同じであることがわかってきた。このことから、社会の衛生状態と糞便中のウイルス濃度に大きな違いは見られないと考えられ、水中ウイルス粒子の多くは不顕性感染に由来するという可能性を示唆するものである。



## 特別企画 下痢症ウイルスの生き残り戦略

### 豚カリシウイルスの分子疫学：豚サポウイルスで観察される高度な遺伝的多様性

中村一哉、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、倉田毅、滝澤剛則  
(富山県衛生研究所)

豚はノロウイルスやサポウイルスに感受性を示し、これらウイルスの環境循環に相応の役割を担っていることが推定される。豚におけるノロウイルスやサポウイルス分布状況の監視は、これらウイルスの環境中の動向を把握するために、意義をなすものと思われる。そこで、富山県域の肥育豚を対象に、ノロウイルスおよびサポウイルスの浸潤状況を調査した。

県食肉検査所に搬入された出荷齢豚の腸内容物を採材し、乳剤作製に供した。検体数は 20 件/月とし、2008 年 8 月期および 2009 年 1 月期には、任意選定した農場について採取数を増加し、農場ごとの侵淫状況を検討した。便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA について、DNase 処理を行った後、SuperscriptIII 逆転写酵素とランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。ノロウイルス検出は G1SKF/R または G2SKF/R プライマー (Kojima 他, J Virol Methods, 100:107-114, 2002) を用いた PCR 法で行った。ヒトサポウイルス検出に SV-F11、SV-R1、SV-F2、SV-R2 プライマー (Okada 他, Arch Virol, 147: 1445-1451, 2002) を用いた PCR 法、ブタサポウイルス検出に PEC66 と PEC65 プライマー (Wang 他, J Clin Microbiol, 44: 2057-2062, 2006) を用いた PCR 法を実施した。また、カリシウイルスを広範に検出できる p290 と p289 プライマー (Jiang 他, J Virol Methods, 83: 145-154, 1999) を用いた PCR 法も併せて行った。検出されたウイルスについては塩基配列決定後、系統樹解析により遺伝子型の決定を行った。

豚の便からは GII 群ノロウイルスとサポウイルスが毎月検出された。GI 群ノロウイルスは調査期間中において検出されなかった。任意選定した農場を対象に行った調査では、農場によってウイルス検出率に差が観察され、飼養形態とウイルス保有状況の関連が疑われた。豚から検出された GII 群ノロウイルスについて塩基配列決定後、系統樹解析を行った結果、多くは従来豚を宿主としていたノロウイルスであったが、ヒト型ノロウイルスも稀に確認された。しかし、これら豚から検出されたヒト型ノロウイルスは PCR 法によって、増幅産物がわずかに観察されたに過ぎず、豚の体内で活発に増殖している証拠とは考えにくかった。現時点では、ヒト型ノロウイルスが偶発的に豚群に侵入する機会があったとしても、豚体内で優勢に増殖するブタ型ノロウイルスに駆逐される状況だと思われる。ただし、ヒト型ノロウイルスとブタ型ノロウイルスの共感染の存在は、株間組換えによって新規ウイルスが出現する可能性も否定できない。また、今後豚の体内でヒト型ノロウイルスが活発に増殖する徴候を捉えた場合、旧来のウイルス株と比較することで、ノロウイルスの宿主域決定機構解明に向けた知見が得られるかもしれない。

サポウイルスに関しては、旧来より存在していた GIII 群が優勢的な分布を示していたものの、最近新たに報告された GVII および GVIII 群とクラスターを構成する株も検出された。また、これら遺伝子群とは異なるクラスターを形成する株も複数検出された。このような高度な遺伝的多様性は、サポウイルスの豚群における持続的な変化を示唆している。2008 年 5 月期と 12 月期にヒトサポウイルス検出用プライマーで検出される株が存在していた。塩基配列に基づく系統樹解析の結果、この 2 株は GV 群サポウイルスに近縁なものであることが分かった。最近報告された、豚から検出されたヒトサポウイルスに近縁な株とは異なる分岐枝を形成しており、新規の遺伝子群あるいは遺伝子型である可能性も考えられた。このタイプのサポウイルスが、どこから派生してきたのかは現時点では不明である。サポウイルスも、豚における変異や組換えにより、ヒトに対して感染性を有する新たなウイルス出現の可能性に留意する必要があると思われる。





## ノロウイルス GII/4 の変異

本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、  
神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group

【目的と意義】ノロウイルスの遺伝子型 GII/4 は、周期的に、全世界的に、大流行する。本研究では、自然界での GII/4 の進化機序を明らかにすることを目的とし、直近3年間に全国各地で発生した計201の GII/4 感染症例について、ウイルスゲノム全長の配列情報を取得し、ゲノム配列の進化系統、ゲノム構造、およびキャプシドの立体構造を調べた。

【材料と方法】2006年5月～2009年2月の間に全国19カ所の衛生研究所で感染者糞便を収集した。GII/4 ゲノム断片の Long-PCR 産物をシーケンシングし、ゲノムほぼ全長の配列情報（約 7.5kb, n=201）を得た。ゲノム配列の進化系統を近隣接合法により推定した。ゲノム構造を、クローン化断片の bootscanning plots 法、探索的系統分析法、情報部位分析法により解析した。キャプシド構造を、ホモロジーモデリング法により解析した。

【結果】(i) 少なくとも6種の GII/4 単系統群サブグループ（2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2008a, 2008b と命名）を同定した。(ii) 世界的流行株 2006b は、常に優勢なサブグループ（178/201 配列）として全国各地で検出された。(iii) 2007a, 2008a, 2008b ゲノムの ORF2 の前後に推定組換え点が存在した。(iv) 2008b ゲノムは、2006b 由来のキャプシド（ORF2）をコードしていた。(v) 6種のサブグループは、全て、キャプシド表面（P2 ドメイン）に複数の変異を持っていた。(vi) 変異により、キャプシド表面の荷電状態が変化することが予測された。(vii) キャプシド表面の変異の数は、2006b で最多（7カ所）であった。

【考察】国内では、常時、キャプシド表面に複数の特徴的な変異セットをもつウイルスが発生していること、キャプシド表面の変異数が多いと流行規模が大きいこと、キャプシド表面の変異セットはゲノム組換えで獲得した可能性が高いこと、この変異によりキャプシド表面の物理化学的性質が変化しうることが示唆された。GII/4 のヒトでの進化と流行に、キャプシド領域の変異の蓄積、およびゲノム組換えによる複数の変異セットの獲得が関与すると推察される。



## 分子進化遺伝学の基礎

国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター

鈴木 善幸

ウイルス、なかでも特に RNA ウイルスは、われわれ宿主生物の約 100 万倍の速度で進化している。そのためわれわれの生命時間内でその進化を観察することができ、実際に RNA ウイルスの抗原性や病原性の進化がわれわれの健康をおおいに脅かしている。したがって、RNA ウイルスの進化機構や進化史を解明することは、保健衛生学上非常に重要である。

RNA ウイルスの進化機構や進化史は、分子進化遺伝学的解析により研究することができる。分子進化遺伝学的解析は、ウイルス株の塩基配列の決定ならびに国際塩基配列データベースへの登録後、(1) 相同性検索、(2) 多重整列、(3) 進化的距離の推定、(4) 系統樹作成、(5) 系統樹の信頼性の検定、(6) 遺伝子組み換え検出、(7) 自然選択圧検出、といった手順で行われる。

本講演では、(3)、(4)、(5) の手順、より具体的に、「Kimura の 2 パラメーター法で推定した進化的距離をもとに、近隣結合法を用いて系統樹を作成し、ブートストラップ法により系統樹の信頼性を検定する」、という、一般のソフトウェアではデフォルトの設定になっているような作業が、実際にはどのような理論に則り、どのように計算されているのか、また、得られた結果はどう解釈したらよいのか、などについて、30 分間で非常に大雑把に概説する。



## トピックス：国際学会

### 第 109 回 アメリカ微生物学会の報告

北島 正章（東京大学大学院 工学系研究科）

2009年5月17日から21日にかけて、米国ペンシルバニア州フィラデルフィアにて第109回アメリカ微生物学会が開催された。米国を中心に世界各国から数多くの研究者が参加し、様々な分野における微生物に関する研究発表が行われた。本学会の発表形式は、例年口頭発表は全て招待講演、一般公募による発表は全てポスター発表という形をとっている。

今年の本学会では下痢症ウイルスに関する口頭発表セッションは組まれていなかったが、President's Forum のセッションでベイラー医科大の Mary Estes 教授が”Norovirus Gastroenteritis: Transmission by Waterborne, Foodborne and Environmental Contamination”と題してノロウイルス感染症の歴史、疫学、感染経路等に関する基礎的知見について解説した。

ポスター発表セッションでは、下痢症ウイルスに関する多数の発表があったが、今回は以下の発表を中心に数編について紹介することとした。

米国の Straub らは、大腸由来細胞 Caco-2 の立体培養によりノロウイルスの培養を試みた結果を報告した。ウイルス接種から3日後に、顕著な細胞損傷を伴うことなく感染細胞中のノロウイルス核酸濃度が10~100倍上昇した。小腸由来細胞 Intestine 407 の立体培養による彼らの以前の研究結果 (Straub et al. 2007 Emerg Infect Dis) と併せて考察し、「小腸に感染した場合には急性胃腸炎症状を引き起こし、大腸にノロウイルスが感染した場合には不顕性感染となり長期間のウイルス排出を伴うことになる」との仮説を提唱した。さらに、米国 CDC とニュージーランド ESR のグループは、上記 Intestine 407 および Caco-2 の立体培養システムによる細胞へのノロウイルス感染実験の結果、再現性良くノロウイルスの増殖を認めるには至らなかったことを報告した。

また、米国 CDC のグループは既報 (Jothikumar et al. 2005 Appl Environ Microbiol) の GI ノロウイルス検出用の Forward primer および TaqMan probe の配列に改変を加え、理論上さらにノロウイルスに広く反応するリアルタイム PCR 系を報告した。また、同じく米国 CDC のグループは、4種類のウイルス（アデノ、コクサッキー、エコー、マウスノロ）を水中に添加して遊離塩素およびモノクロラミンを用いた塩素消毒による不活化速度を測定したところ、いずれの消毒剤を用いた場合でもマウスノロウイルスの不活化速度が最も大きいという実験結果を示していた。

我々の研究グループは、河川水中から検出されたノロウイルスおよびサポウイルスの遺伝学的多様性および検出される遺伝子型の年間変動について報告した。

なお、次回の本学会は2010年5月23日から27日にかけて米国サンディエゴにて開催される。



## 第 30 回衛生微生物協議会報告

山崎謙治 (大阪府立公衆衛生研究所)

衛生微生物協議会第 30 回研究会は平成 21 年 7 月 9・10 日に堺市 (大阪府) で開催され、腸管ウイルスのシンポジウムとして 4 題の発表がなされた。

### 1. 2006-2008 冬期までに流行したノロウイルス G II/4 株のゲノム解析

木村和嗣 (国立感染症研究所)

2006 年 5 月-2008 年 2 月の間に 19 道府県の衛生研究所で収集した糞便試料 (n=147) から、計 117 の G II/4 株全ゲノム配列情報を得、系統解析、特異的変異解析を行った。我が国では、ゲノムの遺伝的系統が異なる 4 種の G II/4 変異株 (2004/5 株、2006b 株、2006a 株、2007/2008 株) が検出され、キャプシドに特異的変異を複数持つ G II/4 株が常時混在して流行することが明らかになった。また集団食中毒が多発した 2006/2007 秋冬期に主要流行株の交代 (2004/5 株から 2006b 株へ) が起きたことがわかった。新たに発生した 2007/2008 株の動向に注目したい。

### 2. サポウイルスの分子疫学

岡 智一郎 (国立感染症研究所)

サポウイルスは遺伝子系統解析から少なくとも 5 つの genogroup に分類され、ヒト由来には G I, G II, G IV, G V の 4 つのグループが存在する。サポウイルスも virus-like particles を用いた研究によって、複数の抗原性が存在することが明らかになりつつある。サポウイルスの検出は主に RT-PCR、real-time RT-PCR によって行われているが、real-time RT-PCR はスクリーニングや定量的な解析に有用であり、RT-PCR は分子疫学的解析に有用な数百塩基以上の増幅産物が得られる。しかし Pol 領域と VP1 領域で異なるタイプに属する「リコンビナント株」の存在に配慮する必要がある。サポウイルスの検査実施施設は限局されているようなので、発生動向を正確に把握するため、全国レベルでのサポウイルスの検出と遺伝子解析の実施が望まれる。

### 3. 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発

東方美保 (福井県衛生環境研究センター)

食品中に含まれるノロウイルスを簡便に検出するパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) を開発した。方法はノロウイルス (G II/4) を添加した様々な食品の乳剤液に抗血清を加えて抗原・抗体複合体を作らせた後、パンソルビン (黄色ブドウ球菌菌体) のプロテイン A に複合体を吸着させ、RNA 抽出した後、Real-time RT-PCR によりノロウイルスのコピー数を測定するものである。添加ウイルスの回収率は 15~78% であり、PEG 沈殿による濃縮法と比較した場合の検出効率率は 2~1,000 倍高かった。Nested PCR による検出限界は食品 1g あたり 13~44 コピーであった。

### 4. ノロウイルス感染症の診断法の進歩

齋藤博之 (秋田県健康環境センター)

培養系が確立されていないノロウイルスの近年の診断法は遺伝子の増幅を基本原理とするもの (RT-PCR, Real-time PCR, LAMP, TRC, NASBA) と抗原抗体反応を利用するもの (ELISA, イムノクロマト(IC)) の2つのカテゴリーに分けられる。本演題では改良型 IC キット (商品名:「クイックナビーノロ」) を用いた場合の運用について考察した。IC キットによる検査は前処理液に溶解させた糞便液を IC デバイスに滴下し、15 分後に目視判定するもので、他のウイルス簡易検査と同様である。IC デバイスに固層された抗体は G I で 6、G II で 13 の遺伝子型に反応した。102 例の臨床検体を用いた RT-PCR 法との比較検討では、感度 81.0%、特異性 100%、一致率は 89.2%であった。IC キットは機器を一切使わないため現場での判定が可能であり、行政検査の迅速化と効率化に寄与出来ると考えられる。



## トピックス：日米医学

### 第 43 回日米医学ウイルス性疾患専門部会の報告

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座

中込 治

第 43 回日米医学ウイルス性疾患専門部会は、7 月 20 日と 22 日の 2 日半にわたり米国フィラデルフィアにあるウイスター研究所で開催された。ウイルス性胃腸炎のセッションは例年通りスタンフォード大学 Harry Greenberg と長崎大学の中込治が座長を務め、米国側 4 題、日本側 4 題、合計 8 題の発表があり、活発な質疑応答も行われた。内容的にはロタウイルスに関する演題が 7 題（日本 3、米国 4）、ノロウイルスに関する演題は日本からの 1 題のみであった。

米国側の発表：

Greenberg は“Rotavirus innate immunity and host range restriction: the inter play of interferon and dendritic cells”という演題で、I 型 IFN 応答における形質細胞様樹状細胞の役割（RRV がヒト形質細胞様樹状細胞のごく一部のサブセットで増殖すること、形質細胞様樹状細胞の活性化と成熟はウイルスの複製とは独立に起こること、ウイルスの複製ではなく dsRNA と構造タンパク質が形質細胞様樹状細胞からの I 型 IFN 産生を誘導すること）、NSP1 が IRF3 の不活化を介して I 型 IFN 産生を抑制する機構は、ウイルス株と感染細胞の種類で異なり一様ではないことなどを報告した。

Novartis の Dormitzer は“High resolution structure of rotavirus VP4, VP7, and virions: implications for virus entry and neutralization”というロタウイルスの原子構造と生物活性とを解明する構造生物学的演題で、VP7 の結晶構造の解析から、カルシウムがキレートされることにより VP7 の 3 量体構造がこわれることにより脱殻し、中和活性のあるモノクローナル抗体の Fab 断片が VP7 の A と C からなる抗原部位に結合することにより、ロタウイルスの脱殻が阻害されることを報告した。また、昨年 VP4（3 量体）は cleaved の状態で 2 つのサブユニットが安定なスパイク構造をとり、残る 1 つがフレキシブルな状態にあり（クリオ電顕などでは）見えない状態になっていると報告したが、3 つ目のサブユニットが外殻に埋め込まれた状態で存在していると解説した。

NIH の Patton は、“Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genomic constellation”という演題で、G3P[8]ロタウイルスが優勢となった 1976 年と 1991 年の流行期に関し、ワシントン DC の小児病院のロタウイルス保存検体から 51 株を選び全ゲノム解析を行った結果、1976 年には多数のゲノム構成をもつ G3P[8]株が共存して流行していたが、1991 年には 1976 年に流行していた株の 1 つと同じゲノム構成をもつ 1 つの G3P[8]株が流行していたことを明らかにし、このことから同じ遺伝子型のウイルスでも異なるゲノム構成をもつものが共存できること、また、reassortant の多くは時間がたつにつれ 1 つの優勢株へと置換されていく可能性があることを報告した。

インド Vellore の Gagandeep Kang は“Rotavirus infection in a birth cohort in South India”という演題で、452 人の新生児を誕生から 3 歳まで追跡調査し、ロタウイルス下痢症の自然史を観察するというロタウイルスの関する過去最大の birth cohort study を行った結果の概要を報告した。追跡した児の中から、556 回のロタウイルス感染があり、そのうち 292 回が下痢症を伴い、14 回は入院治療が必要であった。もっとも重要な知見として、過去の同様の birth cohort study とは異なり、先行するロタウイルス感染が以降のロタウイルス下痢症の発症を防がないということが報告された。これはアジアの貧困地区におけるロタウイルスワクチンの効果に関して楽観視できない知見である。

日本側の発表：日本側の演者と演題は以下のとおりである。

佐野大輔（北大大学院・工学研究科）Detection of oxidative damages on viral capsid proteins: a new approach to evaluate the infectivity of non-cultivable enteric virus. カプシド表面のタンパク質の傷害の程度を測定することにより、培養できないノロウイルスの感染性測定の代替法として利用する試みについて報告。

中込とよ子（長崎大大学院・医歯薬学総合研究科）Further observation of the impact of the monovalent G1P[8] rotavirus vaccine on severe rotavirus gastroenteritis in Brazil. ほとんどの流行株が G2P[4]となっているブラジルで、単価 G1P[8]ワクチンである Rotarix が効果があることを症例対照研究で明らかにしたことを報告。

浅野正岳（日大・歯学部）A better understanding of the mechanisms by which rotavirus escape the host defense system. ロタウイルスが宿主免疫応答を回避するメカニズムを DNA microarray 解析により探索する試みを報告。

中込治（長崎大大学院・医歯薬学総合研究科）Predicting the impact of rotavirus vaccine in Japan by a computer program based on a stochastic decision tree model. 演者に穴があいたため、急遽、ロタウイルスワクチンの効果予測に関するコンピュータシミュレーションの結果を報告。

## トピックス：ロタウイルス

### ロタウイルスの新知見

札幌医科大学医学部衛生学

小林宣道

ロタウイルスの新知見（研究の現状）について 2008 年 9 月から 2009 年 8 月までの 1 年間に公表された論文の中から代表的なものを抜粋し、以下に記載した。その中から主な論文のみを取り上げ、要点を解説する。

#### 1. ロタウイルス粒子、蛋白の構造解析

- Rotavirus architecture at subnanometer resolution. Li Z et al. *J Virol.* 2009, 83:1754-66.  
クライオEMによる1ナノメートル以下(9.5Å)の解像度によるロタウイルス外殻蛋白の構造解析。VP4の3量体構造に関する解析。
- Effects on sialic acid recognition of amino acid mutations in the carbohydrate-binding cleft of the rotavirus spike protein. Kraschnefski MJ et al. *Glycobiology.* 2009, 19:194-200.  
外殻蛋白 VP4 のトリプシン開裂産物 VP8\*における糖鎖（末端シアル酸等）結合部位が存在し、これを介し宿主細胞を認識する。
- Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. Aoki ST et al. *Science.* 2009, 324:1444-7  
中和モノクローナル抗体が外殻蛋白 VP7 に結合した状態の結晶構造を解析。VP7 は 3 量体として存在、各サブユニットに 2 ヶ所のカルシウム結合部位がある。抗体の Fab 領域はサブユニットの結合部分の表面を覆うように結合。中和抗体は VP7 の 3 量体を安定化させることで脱殻を抑制することにより感染を阻止すると推定された。
- Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, Patton JT, Harrison SC. *Structure.* 2008, 16:1678-88.
- 3D jigsaw puzzle in rotavirus assembly. Shatkin A et al. *Structure.* 2008 Nov 12;16(11):1601-2.  
RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである VP1 の結晶構造解析と、RNA の転写、複製の機序に関する解析。VP1 は、ロタウイルスのプラス鎖 RNA の 3'末端の共通配列 UGUG を認識し、これが RNA のパッケージングに関与する。
- Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. McDonald SM et al. *J Virol.* 2009 83:6135-48.  
A, B, C 群ロタウイルスの VP1 の構造を比較すると、中心部のポリメラーゼ活性部位はアミノ酸配列が高度に保存されているが、表面に露出した部分では多様性が高い。A 群、C 群ロタウイルスの VP1 はともに A 群、C 群ウイルス由来の mRNA テンプレートから 2 本鎖 RNA を複製できるが、RNA ポリメラーゼ活性の発現には同じ群由来の VP2 の存在が必須である。

#### 2. 自然免疫・感染増殖

- Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. Graff JW et al. *PLoS Pathog.* 2009, 5:e1000280.  
NSP1 は  $\beta$ -TrCP をプロテアソーム依存性に分解することで  $I\kappa B\alpha$  の分解を抑制する。これにより  $NF\kappa B$  の活性化が抑えられ、結果的に IFN の誘導を抑制する。

- Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. Holloway G et al. J Virol. 2009, 83:4942-51  
 ロタウイルス感染により STAT1, STAT2, NF $\kappa$ B の核内移行が阻害され、よって I 型 IFN の発現が抑制される。
- Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. Feng N et al. J Virol. 2009 83:6987-94.
- IRF3 Inhibition by Rotavirus NSP1 is Host cell and Viral Strain Dependent but Independent of NSP1 Proteasomal Degradation. Sen A et al., J Virol. 2009 Aug.  
 NSP1 による IFN 発現抑制効果の有無は、感染ウイルス株（由来する動物種）と感染を受ける細胞の種類（由来する動物種）により異なる。
- The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection. Dutta D et al. Virology. 2009, 391:325-33.  
 ロタウイルス感染細胞において、hsp90 はロタウイルスの増殖に対し促進的に作用する。
- Dissecting the role of integrin subunits alpha2 and beta3 in rotavirus cell entry by RNA silencing. Iša P et al., Virus Res. 2009  
 細胞におけるインテグリンの発現量を減少させた状態でのロタウイルスの感染量の測定より、インテグリン $\alpha 2\beta 3$  はロタウイルスの細胞内侵入における主要な役割を担っていないと推定された。

### 3. ワクチン・臨床

- Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. Tate JE et al. Pediatrics. 2009, 124:465-71.  
 ロタウイルスワクチンが導入された米国においては、2007-2008 年のシーズンにおいて、2000-2006 年に比べロタウイルス下痢症発生時期の遅延と、ロタウイルス陽性下痢症例数およびその割合の大幅な減少が見られた。
- Decline in cases of rotavirus gastroenteritis presenting to The Children's Hospital of Philadelphia after introduction of a pentavalent rotavirus vaccine. Clark HF et al. Clin Vaccine Immunol. 2009, 16:382-6  
 米国フィラデルフィア小児病院における 2007-2008 年の疫学調査で、2007-2008 年シーズンではそれ以前に比べロタウイルス市中感染例が大幅に減少した。これはワクチンの使用によるものと考えられ、また herd immunity も寄与したと考えられた。
- Coadministration of RIX4414 oral human rotavirus vaccine does not impact the immune response to antigens contained in routine infant vaccines in the United States. Dennehy PH et al. Pediatrics. 2008, 122:e1062-6.  
 ロタウイルスワクチン(RIX4414, Rotarix)を、米国における他の定期予防接種ワクチン(DTaP-HBV-IPV、PCV7、Hib)と同時に接種しても、それらの免疫応答を低下させることはなかった。
- Concomitant use of the 3-dose oral pentavalent rotavirus vaccine with a 3-dose primary vaccination course of a diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated polio-Haemophilus influenzae type b vaccine: immunogenicity and reactogenicity. Ciarlet M et al. Pediatr Infect Dis J. 2009, 28:177-81.  
 5 価ロタウイルスワクチン(RotaTeq)と 6 価ワクチン(DTaP-HBV-IPV-Hib)を同時に接種しても、各ワクチン成分に対する免疫応答を低下させることはなかった。
- Successful co-administration of a human rotavirus and oral poliovirus vaccines in Bangladeshi infants in a 2-dose schedule at 12 and 16 weeks of age. Zaman K et al. Vaccine. 2009, 27:1333-9.  
 バングラデシュの小児にロタウイルスワクチン RIX4414 と OPV を接種したところ、OPV の免疫応

答は抑制されることなく、ロタウイルスへの免疫原性は保持された。

- Live attenuated human rotavirus vaccine, RIX4414, provides clinical protection in infants against rotavirus strains with and without shared G and P genotypes: integrated analysis of randomized controlled trials. De Vos B et al. *Pediatr Infect Dis J*. 2009, 28:261-6.

1価ロタウイルスワクチン RIX4414(G1P[8])は、G1P[8]以外のG型、P型ロタウイルスによる重症胃腸炎に対しても良好な予防効果を示した。

- Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. Hyser JM, Estes MK. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009, 25:36-43.
- Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. Greenberg HB, Estes MK. *Gastroenterology*. 2009, 136(6):1939-51.

ロタウイルス下痢症は、今や先進国ではワクチンで予防可能な小児のありふれた病気であり、開発途上国でも近い将来、そのようになると考えられる。

- Demographic variability, vaccination, and the spatiotemporal dynamics of rotavirus epidemics. Pitzer VE et al. *Science*. 2009, 325:290-4.

米国におけるロタウイルス下痢症流行の疫学像の変化、ワクチン使用による疫学像の予測。

- Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. Levy K et al. *Int J Epidemiol*. 2008 Dec 4

熱帯地域でロタウイルス下痢症が多く見られるのは、1年のうち、より低温で乾燥した時期である。

#### 4. 分子疫学・遺伝学

- Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. Esona MD et al. *Emerg Infect Dis*. 2009, 15:83-6.

新規遺伝子型 G5P[7]をもつカメルーンのヒトロタウイルス株 6784/2000/ARN は、全遺伝子配列の解析からブタ-ヒトロタウイルス間のリアソータントであることが示唆された。

- Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. Mukherjee A et al. *Arch Virol*. 2009, 154:733-46.

インド東部で検出された G9P[6]ヒトロタウイルス株 mcs/13-07 は、全遺伝子配列の解析からブタからヒトへ伝播し、その後ヒトにおいて分子進化したことが示唆された。

- Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: identification of genes of human and animal rotavirus origin. Ramani S et al. *J Clin Virol*. 2009, 45:237-44.

インドにおける新生児の無症候性感染例より分離された G10P[11]ロタウイルス株 N155 の全遺伝子配列を解析し、このウイルスはヒト-ウシロタウイルスのリアソータントであることが示唆された。

- Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African rotavirus network: relationship to animal rotaviruses. Esona MD et al. *J Med Virol*. 2009, 81:937-51.

アフリカにおける G8P[8]ロタウイルス株の全遺伝子配列の部分を系統解析し、それらはヒト-ウシロタウイルスのリアソータントであることが示唆された。

- Characterization of full-length VP4 genes of OP354-like P[8] human rotavirus strains detected in Bangladesh representing a novel P[8] subtype. Nagashima S et al. *Arch Virol*. 2009, 154:1223-31.

遺伝子型 P[8] の新規な亜型 P[8]b をバングラデシュのヒトロタウイルスにおいて検出、その VP4 遺伝子の全配列を決定し特徴を解析した。

- Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. Jiang S et al. *J Gen Virol*.

2008 89:2622-9.

中国で検出された新種ロタウイルス J19 株 (ADRV-N) の全遺伝子配列の決定と解析。

- Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. Nagashima S et al. J Med Virol. 2008, 80:2023-33.  
バングラデシュで検出された新種ロタウイルス B219 株の全遺伝子配列の決定と解析。
- Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. Paul SK et al. Arch Virol. 2008;153(11):1999-2012.  
2004-2006 年、バングラデシュでは G2P[4]が最多、G9, G12 も検出。成人と小児で遺伝学的に同一のウイルスが検出された。
- Genotypic distribution of rotavirus strains causing severe gastroenteritis in Gyeonggi province, South Korea, from 2003 to 2005. Huh JW et al. Arch Virol. 2009, 154:167-70.  
2003-2005 年、韓国では G4P[6]が最多、G3P[8]と続いた。
- Molecular epidemiology of rotavirus infections among children hospitalized for acute gastroenteritis in Shanghai, China, 2001 through 2005. Xu J et al. J Clin Virol. 2009, 44:58-61.  
2001-2005 年、上海では G3P[8]が継続的に優勢であった。
- Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. Wang YH et al. J Med Virol. 2009, 81:382-9.  
2006-2008 年、中国武漢では G3P[8]が依然として優勢、G9 増加の兆しが見られた。
- Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. Dey SK et al. Infect Genet Evol. 2009, 9:955-61  
2006-2007 年、日本では G1 が最多、G9、G2、G3 と続いた。

## 5. 動物ロタウイルス

- Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. Ursu K et al. Arch Virol. 2009, 154:1365-9.  
新規の G 遺伝子型 G23 を、キジ由来ロタウイルス株 Phea-14246Hun-08 において同定。
- The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. Trojnar E et al. Virology. 2009, 386:325-33.  
ニワトリロタウイルス株 Ch-02V0002G3 の全遺伝子配列を決定。
- Whole genome sequencing of lamb rotavirus and comparative analysis with other mammalian rotaviruses. Chen Y et al. Virus Genes. 2009, 38:302-10.  
ヒツジロタウイルス株 lamb-NT の全遺伝子配列を決定。
- Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. Abe M et al. Virus Res. 2009 May 21.  
ウシロタウイルス株 Azuk-1 に新規遺伝子型 G21P[29]が同定された。この型は日本でウシにおいて広く分布している可能性が示された。
- Detection of Group C Rotavirus in Juvenile Ferrets (*Mustela putorius furo*) with Diarrhea by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: Sequencing and Analysis of the Complete Coding Region of the VP6 Gene. Wise A et al. Vet Pathol. 2009 May 9  
フェレットにおいて初めて検出された C 群ロタウイルスの解析。

## トピックス：カリシウイルス

### カリシウイルスの新知見

国立感染症研究所 ウイルス第二部

岡 智一郎

カリシウイルスは従来4つの属 (Norovirus、Sapovirus、Vesivirus、Lagovirus) に分類されていたが、2009年8月25日、International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)は5つ目の属として、Nebovirusを承認した。Nebovirusには、ウシ由来のNewbury-1 virus、NB/Nebraska virusが含まれる。またサルから分離されたTurane virusを含むRecovirusやブタから検出されたSt-Valérien-like virusを含むValovirusも新たな属として提唱されており、カリシウイルスには今後も新たな属が加わっていくと思われる。

ヒトの下痢症を引き起こすカリシウイルス（ノロウイルス、サポウイルス）はいまだ培養細胞によるウイルス増殖系がないため、その感染、増殖メカニズムは明らかでない。しかし、動物由来のカリシウイルスの中には培養細胞での増殖が可能なものがある。これまでに、ベジウイルス属のネコカリシウイルスについて機能的受容体が同定されている。また、今年になり、同じくベジウイルス属のrabbit vesivirusの受容体候補因子が同定された。また、ここ数年活発に研究が進められているノロウイルス属のマウスノロウイルスについても、結合に重要な受容体候補因子が同定された。今後、ヒト由来のノロウイルス、サポウイルスの研究を加速させるためにも、これらのウイルスが培養細胞で増殖する鍵となる機能的受容体の同定が待たれる。

ノロウイルス、サポウイルスの疫学解析に関しては、従来の糞便からの解析だけでなく、環境水や動物などからの検出報告の蓄積がなされ、その汚染実態が明らかになりつつある。今後は、医学、ウイルス学、農学、都市工学、環境科学など、多分野の研究者が連携することによって、さらなる疫学的な解析の進展が期待される。





## トピックス：CaliciWeb

### CaliciWeb について

三瀬 敬治（札幌医科大学）

カリシウイルス情報共有サイトとして構築した WEB サイト、CaliciWeb (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/>) の展開について報告する。

#### 【カリシウイルス遺伝子データベース】

世界的にカリシウイルスの遺伝子配列データの蓄積は進んでいる。しかしながら、国際的な遺伝子データベース DDBJ、GenBank、EMBL は、ありとあらゆる遺伝子配列が登録されているため、その情報量はあまりに膨大であり、検索を行っても必要な遺伝子配列を見出すことが非常に困難となっている。このため、2008 年 4 月 CaliciWeb のサーバ上に、カリシウイルスに特化した遺伝子データベース (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/>) を作成した。

このデータベースでは Norovirus、Sapovirus、Vesivirus、Lagovirus、SRSV のいずれか、あるいはその全てをキーワードとして、最小配列長 0、100、250、500、1000、2000、3000、5000 のいずれか、最大配列長 250、500、1000、2000、3000、5000、10000 のいずれかで絞り込みを行い、登録された Accession Number、Organism、Host、Taxonomy、Isolate、Country、Strain、CDS region を表形式で一覧表示する。表示されたリストは必要に応じてソートが可能であり、Accession Number をクリックすると、塩基配列を含む全登録データが表示される。

データの更新は自動実行プログラムを作成して、毎日 DDBJ が公開する新着データ (xml ファイルデータで 1 日約 50MB～数 GB) をダウンロードし、その中から Norovirus、Sapovirus、Vesivirus、Lagovirus、SRSV、Calicivirus をキーワードに必要な情報をピックアップして、手元のデータベースを更新している。

2008 年 4 月 8 日の公開時点で 7,369 件だったカリシウイルスデータベースは 2009 年 8 月 29 日現在、10588 件となっている。また利用者数は、昨年 8 月末から 1 年間のサーバのログによると、1700 回余りのアクセスがあった。

#### 【楽しカリシ】

また国立感染症研究所の片山和彦先生、国立医薬品食品衛生研究所の野田衛先生らが中心に、提供された遺伝子配列から系統樹を作成するサービス「楽しカリシ」がスタートした。この試みには CaliciWeb 内のフォーラムで、さらに再登録した限定メンバーのみが閲覧、書き込みが行える「プライベートフォーラム」が利用されている。

#### 【サイトリニューアル】

これまで出来合いの CMS である Xoops を使って構築していた CaliciWeb であるが、出来合いであるがゆえに、使い勝手など改善すべき点が多かった。現在サイトのデザインから再考し、リニューアルに向けて作業を行っている。研究会当日には、新しいデザインや方向性を報告する予定である。

