

ウイルス性下痢症研究会第22回学術集会プログラム

日時：平成22年11月6日（土）13：00～17：00（受付12：00より）

場所：あわぎんホール（徳島県郷土文化会館）

開催世話人：山下育孝先生（愛媛県立衛生環境研究所）

I. 平成22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）

ウイルス性下痢症研究会の歴史と未来（温古知新）

宇田川悦子（国立感染症研究所）

III. 特別企画 14：15～15：15 座長：葛谷光隆（岡山県環境保健センター）

「下痢症ウイルス撃退戦略」

（1）カリシウイルスを中心とした『不活性化剤あらかると』

— これから求められる Virucide とは —

高木弘隆（国立感染症研究所）

（2）生産段階における二枚貝（カキ）のノロウイルス・リスク低減

福田伸治（広島県立総合技術研究所）

（3）ロタウイルスワクチンのわが国への導入における課題

中込とよ子（長崎大学）

IV. 話題提供 15：30～16：00 座長：片山和彦（国立感染症研究所）

「食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への塩基配列情報共有化の応用(楽しカリシとV-Nus Net Japan)」

野田衛（国立医薬品食品衛生研究所）

V. トピックス 座長：斎藤博之（秋田県健康環境センター）

- 第4回国際カリシウイルス会議：ハンスマン グラント（国立感染症研究所）
- 第8回日中ウイルス学会：沖津祥子（藍野学院短期大学）
- 第31回衛生微生物技術協議会：山崎謙治（大阪府立公衆衛生研究所）
- 第44回日米医学ウイルス部会：中込治（長崎大学）
- ロタウイルスの新知見：河本聡志（藤田保健衛生大学）
- カリシウイルスの新知見：岡智一郎（国立感染症研究所）

抄録

ウイルス性下痢症研究会の歴史と未来（温古知新）

国立感染症研究所 宇田川悦子

ウイルス性下痢症研究会は、平成元年に設立された地方衛生研究所、大学、各種研究機関、企業及び国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）との連携により開催されている研究会で、本会の目的は、創設の主要なメンバーである前国立予防衛生研究所山崎修道部長（当時）及び前札幌医科大学浦沢正三教授の次の談話に集約されていると思われまますのでこれを引用させて頂きました。

「本研究会は、

- 1、各大学、及び予研（現感染研）は、地方衛生研究所の研究を補佐する事を主目的とする
- 2、地研だけでなく大学等を含め広く皆の研究成果及び意見が聞ける研究会にする
- 3、毎年研究会を開催して情報の共有化に勤める
- 4、研究会は学会形式ではなく、座談会或はラウンドテーブルディスカッションなど忌憚の無い意見交換が出来る場として研究会を開催するなどの大まかな方針を主眼として会を発足し継続させる事を望む」

昭和 60（1985）年以降、衛生微生物協議会や日本臨床ウイルス学会等の会場で毎年のように有志が集まり発足準備をすすめ、平成元年（1989）大阪において漸く研究会として産声を上げ、第一回研究会発足時には 28 名の研究者が一同に会しました。創設以来、早いもので 22 年が経過しましたが、平成の世になって産声を上げた研究会ですので、平成の世が続く限り同じ年数を数える事になろうとはその時は思いも至りませんでした。現在までに、本研究会に所属した研究者の累積数をみますと、多分内外ともに他に例をみない程の研究者の方々が参加されてこられました。本当に多数の方々の協力のもと本研究会が運営されてきたのだと改めて感じる次第です。また、国内外ともに認められる日本のウイルス性下痢症研究の礎を築いてきた事は、初代事務局として、会規約の創設、日本ウイルス学会に対して研究会として認めてもらう為の運動、運営方法の検討等の下働きをして来た者として大変な誇りです。

今回非力乍ら、今までに収集した資料を基に、いち語り部として本研究会の歴史や我が国に於けるノロウイルスの研究成果等を改めて紐解いていこうと考えています。これまでの経緯をここに記す事により、今まで一緒に築き上げて来た会員諸氏に改めて感謝申し上げますとともに、我が国に於けるこれからの下痢症研究の発展に些かなりとも寄与出来れば幸甚です。

カリシウイルスを中心とした『不活性化剤あらかると』

— これから求められる Virucide とは —

国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室

高木 弘隆

私とカリシウイルスの出会いは遡ること 10 年以上前、Norovirus が SRSV と呼称されていたころでした。当時民間の環境分析研究所に勤務する傍ら、当時の所長の粋な計らいで環境水中の SRSV を調べてみようとして手探りで始めました。その後現職に移り、培養がかなわない SRSV の代替となるものとして Feline calicivirus(FCV)なるものがあり、世界的には 1980 年代からすでに使われてきたことを知りました。

調べて行くと、FCV は「猫風邪」のウイルスであることがわかり、早速大学の先輩や同期・後輩の開業獣医師・代診獣医師などに相談して協力病院からプライベートにサンプル(発症猫の鼻水や口腔内スミア)を集め、手探り状態で分離・プラーク精製をして現在のライブラリーを作って行きました。一方食品衛生関連の伝手から SRSV 不活性化に高い関心が寄せられており、自らの業務として、現在の仕事に手を染めることになりました。

検討を進める間、2003 年に発生した世界的な SARS 渦における感染対策の一環として、ポピュラーな家庭用洗剤が役に立つことを発表し、これがキッカケで医療・ハウス系剤の業界などとの関係ができ始めました。こうした業界でもやはり Norovirus 不活性化に対する関心は強く、いち早く対 Norovirus の Virucide(ウイルス不活性化剤)開発・上市を目指していることも見えてきました。

近年は国内外問わず、様々な不活性化方法あるいは剤の報告がなされてきています。ただし報告の中には「本当に不活性化されている？」と思われるものも散見されており、この多くに評価方法の落とし穴が見受けられます。今回は代替として多く用いられてきた FCV 等による評価の遍歴、近年発見された murine norovirus を含む新たなデータ紹介を行い、評価方法が抱える問題点や今後の展開について皆様と一緒に考察し、これを機に様々な『あらかると』を発展させてゆきたいと考えています。

生産段階における二枚貝（カキ）のノロウイルス・リスク低減

広島県立総合技術研究所保健環境センター
福田 伸 治

ノロウイルスによる食中毒患者数は食中毒の中でもトップを占めている。原因の一つに、二枚貝の生食および不十分な加熱後の摂食が挙げられており、生産段階におけるノロウイルスのリスク管理（リスク低減）が必要と考えられる。その方策として、①養殖漁場のノロウイルスの動態・拡散の解明、②簡便なモニタリング手法の開発と事前予測、③簡易検査法によるモニタリング、④人工浄化処理によるリスク低減、⑤高静水圧処理によるノロウイルスの不活化、⑥低リスク海域へのカキの移動（転地）などが考えられ、これらに関する研究がなされている。

1. ノロウイルスの動態・拡散—広島湾を例として—

2006/07年から2008/09年シーズンの調査から、11月下旬～12月上旬に河口域のカキから検出され始め、シーズンにより差があるが、12月下旬～1月に河口域の陽性率がピークになる傾向を示す。陽性率は河口域からの距離に比例して低くなり、また拡散にも時間を要することが認められている。遺伝子コピー数についても同様の傾向である。また、カキからは多くの遺伝子型が検出されるが、そのシーズンのヒトに特徴的な遺伝子型も認められ、ヒトの排泄したノロウイルスが二枚貝に蓄積していることを証明している。

2. 簡便なモニタリング手法と予測—広島湾—

降水量などの環境要因あるいは感染性胃腸炎患者数などの間接的要因からノロウイルスの動態をモニターできる手法が検討されている。降水量との間には明確な関係は認められていない（FRANEWS, 22, 2010, 水産総合研究センター）が、定点当たりの感染性胃腸炎患者数が5-7を超えると河口域の二枚貝からノロウイルスが検出され、この値を超えた約1ヶ月後に陽性率がピークとなる傾向が認められている。

3. 簡易検査法による生産段階のノロウイルスのモニタリング

(1) 海水のモニタリング

限外ろ過とRT-LAMP法を組み合わせたモニタリング手法が開発され、約3時間半で海水中のノロウイルスの検出が行われている（日本水産学会大会講演要旨集, 春季, 2008, p.202）。モニタリングの結果、ノロウイルスは小型の粒子画分に存在することが判明し、植物プランクトンに付着しているのではなく、ウイルス粒子単体として拡散している可能性が高いことが示されている（日本水産学会誌, 74(1), 99-101, 2008）。

(2) 二枚貝のモニタリング

NASBA法とRT-LAMP法を組み合わせたモニタリング手法（Appl. Environ. Microbiol., 74, 3912-3914, 2008）により、約5-6時間でカキ中のノロウイルスの検出（生産段階）が

行われている。

4. ノロウイルスの浄化および不活化

細菌の陸上での人工浄化は実用化しているが、ノロウイルスについては有効な浄化法が開発されていない。ノロウイルスの浄化に関するある研究では、電解海水（塩素）を用い、水温を 20°C程度とし、高静水圧処理（80Mpa, 40°C, 5分間）を組み合わせることが効果的であると考えられている（かき研究所ニュース, 16, 14-21, 2005）。なお、この方法は、「二枚貝の浄化方法、二枚貝の浄化判定方法及び二枚貝の浄化装置」で特許登録がなされている（特許 2004-112914, 平成 21.10.23）。

ロタウイルスワクチンのわが国への導入における課題

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 とよ子

ロタウイルス下痢症は、発展途上国では 5 歳未満の小児死亡の大きな原因であり、先進工業国では小児下痢症による入院の第一であるという大きな疾病負担があるため、1973 年のウイルス発見直後からワクチンの開発が進められてきた。ワクチン開発は、腸重積症を誘発する疑いなど、さまざまな紆余曲折を経てきたが、有効性と安全性が確立した 2 つのロタウイルスワクチンが 2006 年以来使われるようになった。グラクソスミスクライン社が開発した単価ヒトロタウイルスワクチン Rotarix とメルク社が開発した 5 価ウシ-ヒトロタウイルス再集合体ワクチン RotaTeq の 2 つである。これらのワクチンは、現在、世界 100 ヶ国以上で承認され、少なくとも 20 ヶ国で乳児の定期接種ワクチンとして使われている。わが国でも、臨床試験が終了し、使用承認を申請中であると聞いている。そこで、近く任意接種ワクチンとしての使用が承認されると予想され、遅ればせながら世界の仲間入りができる。

このような現状にかんがみ、わが国にとって、何が課題であり、何を解決すべきかを明らかにすることは、ワクチン導入後における誤解や混乱を避けるために大切なことである。本口演ではこの点に重点をおいて話すつもりである。

第一は、ロタウイルスワクチンの目的を理解することである。すなわち、このワクチンはロタウイルス下痢症がもっとも重症となる生後 6 ヶ月から 2 歳 (あるいは 3 歳) までの乳幼児のロタウイルスに起因する入院を予防することであり、軽症のロタウイルス下痢症や感染そのものを予防することではない。したがって、ワクチン導入後にもロタウイルス下痢症は存続し続ける。そこで、第二に、このワクチンの標的となる疾病負担の大きさを把握することである。すなわち、年間 26,000~78,000 人の 5 歳未満の小児がロタウイルス胃腸炎で入院していること、その 88% が生後 3 ヶ月から 3 歳未満の 2 年 9 ヶ月の期間に集中していること、ロタウイルス胃腸炎入院が全胃腸炎入院の 40~50% を占めていることの 3 点である。第三に、ロタウイルスワクチンの有効性と副反応がモニターされなければならないことである。すなわち、ワクチンの有効性を見るのに、はたして、既存のサーベイランスシステムが機能するのか、また、新たなシステムを構築するとすれば、どのようにすれば重症下痢症例の変動を全国レベルで推定できるようになるのか。一方、副反応の観点からは、わが国における腸重積症の発生率が米国の 3~5 倍の高頻度であることから、ロタウイルスワクチン市販後に、少なからぬまぎれこみ例が出てこないだろうかということである。第四に、ロタウイルスワクチンを既存の定期接種ワクチンとの関連において、いつ接種すればよいか、標準的な接種スケジュールを示すことである。初回接種期間である生後 6~12 週は、従来小児科医が BCG を含めワクチン接種を行ってこなかった時期であること、また、ロタウイ

ルスワクチンが生後 6 ヶ月までに複数回接種が必要な生ワクチンであることから、同時接種を含めた具体的接種スケジュールを勧奨しなければ使用不可能になることである。第五に、ロタウイルス胃腸炎は治療法が確立しており、治癒させることができる病気である。この点が今までのワクチンと大きく異なる点であり、b 型インフルエンザ菌感染症のように重篤な後遺症を残す可能性もほとんどない。いわば、ワクチンによる入院の予防は、quality of life の追求の問題ともいえる。では、それは、医療経済的にみて費用対効果に優れるのかどうか。この点を明らかにしておくことが、特に大きな効果が期待されるロタウイルスワクチン定期接種化をめざすのであれば必須である。

いずれにしても、ロタウイルスワクチンを導入するにあたって、基礎となるウイルス学や疫学のエビデンスに基づいた戦略的アプローチによる政策決定が必要である。

話題提供

食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への塩基配列情報共有化の応用 (楽しカリシと V-Nus Net Japan)

○野田 衛(国立衛研)、片山和彦、石井孝司、岡智一郎、多田有希、山下和予、中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦(感染研)、吉澄志磨(北海道衛研)、植木 洋(宮城県保環セ)、林 志直(東京都健安研セ)、山崎匠子(杉並衛試)、小原真弓(富山県衛研)、吉田徹也(長野県環保研)、小林慎一(愛知県衛研)、中田恵子(大阪府立公衛研)、入谷展弘(大阪市立環科研)、三好龍也(堺市衛研)、阿部勝彦(広島市衛研)、山下育孝(愛媛県立衛環研)、糸数清正(沖縄県衛環研)

【目的】

食品流通の国際化、大規模化、広域化に伴いノロウイルスの広域的散発食中毒事例の発生が危惧されている。その探知には、喫食調査などの疫学調査とともに、株間の異同を知るための塩基配情報が重要であるが、これまで全国で検出されるノロウイルスの塩基配列データを迅速に収集し、比較・解析するシステムはなかった。そこで、我々は全国から報告されるノロウイルス等の塩基配列の共有化を試行的に開始し、その有用性を検証している。さらに、この塩基配列情報の共有化を2010年春季、我が国で多発したA型肝炎の疫学調査に発展的に適応したので、その概要について紹介したい。

【方法】

ノロウイルス、サポウイルスの塩基配列情報の共有化は、13の地方衛生研究所の協力の下、CaliciWeb(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>)上に設置したクローズ環境のプライベートフォーラムにFASTA形式で登録することにより収集し、系統樹解析を行い、得られた系統樹をPDFファイルで同サイト上のオープン環境であるダウンロードページに登録することで還元した。報告番号(株名)は統一の規則に従ったものとした。A型肝炎ウイルスは、厚生労働省通知に従い、全国から収集されたA型肝炎ウイルス株の構造/非構造領域のjunction部分の配列(約230bp)について系統樹解析を行い、厚生労働省食中毒調査支援システム(NESFD)内に新たに設置されたウイルス塩基配列情報共有フォーラム(V-Nus Net Japan: Virus Nucleotide Sequence Network of Japan の略)内に還元した。株名にはNESIDの報告番号を付し、患者情報との一元化を図った。

【結果と考察】

ノロウイルスの塩基配列情報の共有化により、2009年8月初旬に関西で同時多発的に発生した食中毒事例を探知した。詳細なウイルス学的検討の結果、共通の感染源による広域的食中毒事例であると考えられた。A型肝炎ウイルスの系統樹をNISIDの報告番号とともに還元することにより、ウイルスの塩基配列情報と患者情報を一元的に把握するシステムが構築できた。これらのシステムは、広域的食中毒事例の探知など食品媒介ウイルスの疫学調査の精度向上に寄与すると考えられる。

トピックス-1

第4回国際カリシウイルス会議

(2010.10.15-19 Chile)

Hansman., Grant (国立感染症研究所)

Note

第8回中日ウイルス学会報告

藍野大学藍野健康科学センター
沖津祥子

第8回中日ウイルス学会は2010年7月4日～7日、中国のハルビン市で開催された。全演題数は42題でそのうち腸管感染症の演題は9題で日本側4題、中国側5題であった。主として中国側からの演題について報告したい。

1. 2007年7月～2009年6月までの中国武漢の病院でのノロウイルスの検出

(Yuan-Hong Wang: Wuhan Centers for Disease Prevention and Control)

対象は3つの病院から得た全年齢層での下痢の患者から得た1249検体。小児では26.1%、成人では25.9%がRT-PCR法でノロウイルス陽性であった。陽性検体中GIIが90.5%、GIが9.5%であった。流行株はGII-4 2006b株であった。流行時期は小児では2007年7月と2008年6～8月であり、成人では2007年8月と2008年1～2月と異なっていた。

2. 中国北京で下痢のため入院中の小児から得た便検体からの非腸管アデノウイルスの検出

(Li-Ying Liu: Capital Institute of Pediatrics)

2006～2007年に下痢で入院中の小児から得た便検体から、ロタウイルス、ノロウイルス陰性の109検体を対象とした。このうち6検体がPCRにてアデノウイルス陽性でB群(血清型3)3検体、C群(血清型2)2検体、A群(血清型31)1検体で腸管アデノウイルスはなかった。これら6株の陽性患者のうち5人には下痢症状とともに呼吸器症状もあった。この5人のうち3人の鼻咽頭吸引物からアデノウイルス抗原検出を同時に行ったが陰性であった。

3. 2008年の北京での下痢症小児から同定したロタウイルスG9のVP7, VP4, VP6, NSP4, NSP5の解析

(Hui-Jun Dong: Capital Institute of Pediatrics)

2008年北京で下痢症のため入院中の小児の便検体からロタウイルスのGタイピングをした結果、G9が31.7%と最も高率であった。G9は世界で一般的だが、今まで中国本土では一般的ではなかった。2株について調べたところ、P[8]とP[6]であった。G9はlineage IIIであった。VP6、NSP4、NSP5はgenotype II、genogroup B、genotype H1に分類された。

4. 1998～2008年の深圳で検出されたEnterovirus 71のVP1の遺伝子解析

(Ya-Qing He: Shenzhen Center for Disease Control and Prevention)

手足口病の患者1372例から検出された38株のEnterovirus71のVP1領域を解析したところ、subgenotype C4に属していた。1998～2004年の株はC4bが優勢であった。C4aは2003年に初めて見つかри、2004年～2008年では優勢となった。

5. Coxsackievirus B1のvirulenceに対する5' untranslated region pyrimidine-rich tract

の変異の効果

(Wenran Zhao: Harbin Medical University)

Coxsackievirus B1(CVB1)の5'-UTR pyrimidine-rich tract (nt563-573)における変異が感染性と virulence の変化に影響を及ぼすか調べるため、この領域の5つのPyrをプリンに置換した。CPE assayの結果、mutant株(C565A、U567C、U568A、U570A、U572G)の感染性は親株と比べ、小さいが有意差はなかった。プラーク形成能は親株と比べ、低いものの有意差はなかった。複製は親株に比べ有意に遅かった。LD50も有意に高くなっており、親株に比べ、変異株のvirulenceが弱くなっていることがわかった。

日本側

1. イムノクロマト法による下痢症ウイルスの迅速診断

(牛島廣治：藍野大学)

日本、タイ、ベトナムの検体を用いて、ノロウイルス、ロタウイルス、アストロウイルスイムノクロマトキットの評価を行った。この方法は特殊な機械を必要とせず、20分で判定できることから、アジアの国などで分子診断法が活用できないところでの迅速なスクリーニングに有用である。

2. ヒトB群ロタウイルスの全遺伝子分節の全長配列決定による遺伝子解析と分子進化

(小林宣道：札幌医科大学)

インド、バングラデシュ、ミャンマーで発見されたB群ロタウイルス4株の全RNA分節の解析を行ったところ、95%以上一致した。特にVP6とNSP2では98%以上一致した。進化速度を計算すると、 $1.89-2.05 \times 10^{-3}$ nt/年でGAVとほぼ同様であった。

3. タイ、チェンマイでのブタロタウイルスP[23]genotype

(沖津祥子：藍野大学)

タイ、チェンマイ地方のブタの下痢便検体から検出したロタウイルス14検体のG遺伝子型はG9が9、G3が5検体であった。P genotypeは同定できた12検体がすべてP[23]であった。この地域では reassortmentにより、VP4とVP7分節の遺伝子型が変化していることがわかった。

4. ヒトと動物のコブウイルスの分子疫学

(Pattara Khamrin：藍野大学)

コブウイルス属の3つの種であるAichi virus、bovine kobuvirus、porcine kobuvirusの分子疫学を行った。日本、バングラデシュ、ベトナム、タイの小児下痢便検体から、3.1%のAichi virusが検出された。バングラデシュの株はgenotype B、他の国の株はAであった。ウシ下痢便検体からのbovine kobuvirusの検出率は8.3%であった。タイのブタ下痢便検体からのporcine kobuvirusの検出率は99%に達した。一方、日本の健康なブタからは45.4%に検出された。

この学会は2年ごとにそれぞれの国で交代に開催され、2012年には札幌で開催予定である。

衛生微生物技術協議会第 31 回研究会報告

大阪府立公衆衛生研究所
山崎謙治

衛生微生物技術協議会第 31 回研究会は平成 22 年 5 月 25・26 日に鹿児島市で開催され、「原因不明の食中毒」のシンポジウムとして 5 題の発表がなされた。

1. 食中毒調査に係る病因物質不明事例への対応について

田中 誠 (厚生労働省食中毒被害情報管理室)

近年、食後数時間程度で一過性の下痢や嘔吐を呈する有症事例において、患者の共通食として生食用の鮮魚や食肉が提供されている事例が地方自治体から報告されることから、厚労省では各地方自治体の食品衛生部局に対し、情報および食品の残品等の提供の協力を依頼し、状況把握を行っている。また国立研究機関においては原因食品を推定するための疫学的解析や病因物質に係わる基礎的な研究が進められている。

2. 富山県で発生した原因物質不明食中毒について

磯部順子 (富山県衛生研究所)

平成 19～21 年に富山県で発生した原因物質不明食中毒 11 件の解析を行った。発生場所は飲食店が多く、発生時期は季節に関連性がみられなかった。発症までの平均潜伏時間は 6.58 時間であり、最も短かったのが 1.5 時間であった。共通する献立で多かったのはヒラメ、マグロ、甘海老などの鮮魚介類であった。

3. 東京都で発生した原因物質不明下痢症

尾畑浩魅 (東京都健康安全研究センター)

平成 17 年からの 5 年間に東京都で発生した食中毒事例のうち、原因不明のものが毎年 1～9.5%みられた。不明事例の合計 24 事例を発生月別にみると 9、10 月で全体の 54.2%を占めていた。これらの事例の食品メニューには生鮮魚介類が共通に含まれているものが多くみられた。またこれら原因不明下痢症は潜伏時間が 4～8 時間と短く、症状は一般に軽症であり、発症率は比較的高いという共通点が挙げられた。

4. 超高速シークエンサーを用いた病原因子の網羅的検索

大西 真 (国立感染症研究所)

「一過性の下痢、嘔気および嘔吐を主症状とする集団発生であり、既知の病原物質が検出

されない、あるいは検出されても症状等と合致しない有症例。」の症例定義に合致する事例で喫食されたヒラメ残品と市販の対照ヒラメの筋肉組織からゲノム DNA ライブラリーを作成し、超高速シーケンサーを用いて網羅的塩基配列決定を行った。各ライブラリーから取得した 1500 万本の配列の内、残品に特異的な配列が 283 万本抽出された。その中で細菌由来と思われる配列はわずか 783 本(0.03%)であり、その 16.8%は真核細胞由来と推定された。真核細胞由来と推定されたものの 60%以上は粘液胞子虫である *Kudoa* 属由来であった。これまで粘液胞子虫がヒトに対して毒性を持つという報告はなされていないため、本有償事例との関連は明確ではない。現在、粘液胞子虫の 18S rRNA を標的とした検出系の確立が重要であると考えられた。

5. 病原物質究明の試み：毒性試験と細菌学・寄生虫学的検討

鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所）

市販ヒラメ 60 検体の可食部は総菌数、一般細菌数ともに少なく、良好な衛生状態が保たれていた。1 検体の腎臓から *S. parauberis* を検出、別の 1 検体の筋肉部分から粘液胞子虫の 1 種である *Kudoa* 属を分離した。原因不明食中毒事例で患者が喫食したヒラメについて、5 検体からマリントキシンの機器分析検査を行ったが検出されなかった。3 検体から *Kudoa* 属粘液胞子虫を検出した。5 検体を経口投与されたスunksは参考品投与では見られない腹部の運動を示したものの、嘔吐は示さなかった。

本シンポジウム開催中、ヒラメ養殖産地の県職員から「原因が解明されていない状況のなかで、風評被害を出さないように配慮してほしい」という要望が厚労省担当者に出された。

トピックス-4

第44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44回日米医学ウイルス性疾患専門部会は、6月28日～30日の2日半にわたり北海道大学で医学部微生物学講座の有川二郎教授をlocal hostとして開催された。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2題、日本側4題、合計6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4題（日本2、米国2）、ノロウイルスに関する演題は日本からの2題であった。

米国側の発表：

John Patton (NIID/NIH)は、Engineering rotavirus reassortants by reverse geneticsという演題で、リバーシジェネティクスによるロタウイルス遺伝子分節再集合体の新たな作製法に関する報告をした。すなわち、ヘルパーウイルスとRNAiを使い、ロタウイルスの11ある遺伝子分節のうち、単一の遺伝子分節を組み換えるリバーシジェネティクス法を開発した。この方法では、組み換えの標的となる遺伝子分節がRNAiの影響に対して耐性になるようにすることによって組み換えられた遺伝子分節がリコンビナントに入るように設計されている。実際に行ったのはNSP2をコードする第8遺伝子分節を標的として、非常に効率よく1回の選択継代でリコンビナントがとれたという。

Harry Greenberg (Stanford University)はGenetic determinants of systemic and mucosal replication of rotavirus in the mouseという演題で、マウスモデルにおけるロタウイルスの局所増殖と全身伝播を規定する遺伝的因子の解析およびロタウイルスの宿主域についての研究を発表した。すなわち、マウスの胆管はサルロタウイルスRRV株に感受性が高いが（すなわち全身性感染を起こす）、ウシロタウイルスUK株は胆管ではほとんど増殖できない。そこで、RRV×UKの再集合体を作って解析したところ、再集合体がRRVのVP4遺伝子とNSP1遺伝子を持っている場合にのみ胆管でよく増殖したことから、ウイルスの侵入過程とIFN産生への拮抗が、全身に感染が広がる鍵になっていることが示唆された。また、他の実験から宿主域の決定にNSP1が関与していることも示した。

日本側の発表：

Souvik Ghosh (札幌医大・衛生学)はGenetic relatedness of a caprine group A rotavirus strain to human G2, G6, G8 and G12 strainsという演題で、全遺伝子分節解析によりBangladeshで検出されたヤギロタウイルスGO34株がヒトロタウイルスとの関係をみた。

GO34 株 の 各 遺 伝 子 分 節 の genotype は VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 の 順 に 6-P[1]-I2-R2-C2-M2-A11-

N2-T6-E2-H3 であった。Ghosh は、この遺伝子分節構成から、このヤギロタウイルスが反すう動物由来のロタウイルスをバックグラウンドに持ちながら、ヒトロタウイルス G2 および G12 と関連の深い遺伝子分節があることを示した。

佐野大輔 (北海道大学) は、Norovirus-binding bacteria: significance in the environmental dissemination of gastroenteritis viruses という演題で、下水中にノロウイルスのキャリアとなるような細菌 (ヒトの腸管に由来する細菌) を探索し、*Pseudomonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, および *Proteus mirabilis* の 3 菌種を候補として報告した。これらの菌株とノロウイルスの結合定数は 10 の 13 乗と非常に強く、この結合は抗組織血液型抗体で有意に阻止されたという。

浅野正岳 (日大・歯・病理学) は、Rotavirus infection and type III interferon という演題で、ロタウイルス感染が type III IFN を誘導するが、その産生のカイネティクスが type I interferon と異なることを報告した。また、ロタウイルスによる type III IFN を誘導には NF-kB と IRF-3 が関与していることを示した。

片山和彦 (感染研・ウイルス 2 部) The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroups という演題で、新規なヒトノロウイルスである HK229 株の全塩基配列の決定結果を報告した。このウイルスは、マウスノロウイルスがもっているユニークなアミノ酸モチーフを N 末端にもっていた。また、ORF1 と VP2 領域で見ると GII であったが、VP1 でみると新しい genogroup であると判断され、HK229 株は 2 箇所を組み換え切断点をもつリコンビナントウイルスであると考えられた。

ロタウイルスの新知見

藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学

河本 聡志

ロタウイルス (RV) 研究の現状について、昨年の下痢症研究会での報告以後に出版された論文から主要なものを抜粋して報告する。要点は以下の通り。

1. 増殖、複製

- "Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins" by Coutin and Burone et al., J. Gen. Virol. 91:1782-1793, 2010: NSP5/NSP2 または NSP5/VP2 の共発現で viroplasm-like structures (VLS) が形成できる。viroplasm を構成する VP1、VP2、VP3、VP6、NSP2、NSP5 を全て recruitment できるのは NSP5 のみであることから、viroplasm 形成では NSP5 が中心である。
- "Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication" by Cheung and Desselberger et al., J. Virol. 84:6782-6798, 2010: viroplasm 形成に関与する宿主因子の検討。viroplasm は lipids および lipid droplets (LDs) 表面上に存在する蛋白質 (perilipin A、ADRP) と共局在している。薬剤で LDs 形成を阻害すると viroplasm の数と直径は減少し、ウイルス複製は抑制される。
- "Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection" by Martin and Poncet et al., J. Virol. 84:2522-2532, 2010: NSP2 はチューブリンと結合することで微小管の脱重合とネットワーク再編成を引き起こす。チューブリンは viroplasm 内にも取込まれる。
- "Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference" by Ayala-Breton and López et al., J. Virol. 83:8819-8831, 2009: siRNA を用いて、double-layered particles (DLPs) を形成する VP1、VP2、VP3、VP6 を各々ノックダウン実験。VP1 と VP3 は粒子形成に必須ではない (ノックダウンしても空粒子が生成する)。また、新生の DLPs による "second round of transcription" が存在する。
- "VP5* rearranges when rotavirus uncoats" by Yoder and Dormitzer et al., J. Virol.

83:11372-11377, 2009: RV の脱殻の際には VP5*の大きな構造変化 (fold-back rearrangement) が伴う。

- "Effect of mutations in VP5* hydrophobic loops on rotavirus cell entry" by Kim and Harrison et al., J. Virol. 84:6200-6207, 2010: double-layered particles (DLPs) に外殻カプシド VP4 および VP7 を再構成させた感染性粒子 (recoated particles) を用いて、VP4 上の "putative fusion peptides" の重要性を検討。V391D 変異導入で感染性は約 1/10,000 に低下する。"putative fusion peptides" の疎水性は細胞侵入の際に重要。
- "Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis" by Guitiérrez and López et al., J. Virol. 84:9161-9169, 2010: MA104 細胞を用いた RV 侵入様式の検討。細胞侵入の経路 (クラスリンを介したエンドサイトーシス使用の有無) は RV 株による異なる。
- "The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNA independently of its RNA-binding domain" by Keryer-Bibens and Osborne et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 394:398-404, 2010: 組換え NSP3 単独発現による機能解析。NSP3 の RV RNA 結合ドメインと eIF4G 結合ドメインは機能的に独立しており、後者は "translational enhancer" として細胞側 mRNA の翻訳をも亢進し得る。

2. 細胞傷害性

- "Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stage of infection" by Bagchi and Chawla-Sarkar et al., J. Virol. 84:6834-6845, 2010: NSP1 は "prosurvival pathway" である PI3K/Akt 経路および NF- κ B を活性化することで、宿主細胞の早期アポトーシス死を阻害している。これによって産生されるウイルス量が増加する。
- "Increased mitochondria superoxide dismutase expression and lowered production of reactive oxygen species during rotavirus infection" by Gac and Vahlenkamp et al., Virology 404:293-303, 2010: RV 感染 Caco-2 細胞内の redox balance を検討。RV 感染細胞内では、superoxide dismutase (SOD) の発現亢進によって reactive oxygen species 産生は抑制されており、redox balance は安定している。よって、他ウイルスの感染細胞内で見られるような redox balance 不安定化によるアポトーシス誘導は起きていない。
- "Rotavirus induces a biphasic enterotoxic and cytotoxic response in human-derived intestinal enterocytes, which is inhibited by human immunoglobulins" by De

Marco and Guarino et al., J. Infect. Dis. 200:813-819, 2009: Caco-2 細胞を用いて enterocytes 傷害性の検討。RV はまず感染初期 (感染 1-2 時間) に Ca²⁺ 依存性の Cl⁻ 漏出を誘導し、次いでウイルス複製に伴う細胞傷害性を起こす。抗 NSP4 抗体は前者のみを阻害できるが、ヒト血清免疫グロブリンは両者を阻害できる。

3. 免疫応答

- "Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice" by Lopez-Guerrero and Esquivel-Guadarrama et al., J. Virol. 84:1856-1866, 2010: in vivo マウスモデルでパイエルパッチ内樹状細胞の活性化を解析。RV 感染によりパイエルパッチ内の樹状細胞は数が約 2 倍に増加するとともに活性化マーカー (CD40+CD80+CD86+) を発現する。この活性化した樹状細胞は向炎症性サイトカイン (IL-12-23p40、TNF- α 、IFN- β) と制御性サイトカイン (IL-10) を発現する。
- "Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components" by Frias and Gewirtz et al., Mucosal Immunol. 2010: RV に対する小腸上皮細胞の自然免疫応答のうち、タイプ I IFN シグナリングは UV 不活化 RV でも惹起されるが、一方で NF- κ B を介する IL-8 発現の誘導にはウイルス複製が必要である。
- "Rotavirus structural proteins and dsRNA are required for the human primary plasmacytoid dendritic cell IFN α response" by Deal and Greenberg et al., PLoS Pathog. 6:e1000931, 2010: plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (pDC は dsRNA に対して IFN 応答しないと考えられていた) を用いた RV に対する自然免疫の検討。pDCs に RV をかけると IFN α の産生が起こる。IFN α 産生には VP4 and/or VP7 と dsRNA ゲノムを必要とした。即ち pDCs においては、エンドソームを介したウイルス粒子の侵入、崩壊による dsRNA ゲノムの宿主側認識が IFN 応答の発動に必要である。
- "Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection" by Rojas and López et al., J. Virol. 84:10457-10466, 2010: 抗 dsRNA 抗体で RV dsRNA ゲノムが細胞質内 (viroplasm 外) に認められる。この dsRNA は 2 本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) を活性化し、ポリペプチド鎖開始因子 (eIF2 α) がリン酸化されることで宿主の蛋白質合成は阻害される。
- "Rotavirus differentially infects and polyclonally stimulates human B cells depending on their differentiation state and tissue of origin" by Narváez and Greenberg et al., J. Virol. 84:4543-4555, 2010: "circulating B cells (CBC)" と "intestinal B cells (IBC)" を用いた in vitro 感染実験。B cells の RV 感受性、感染による細胞死、細胞活性化など

の程度は由来により異なる。具体的には、(i) IBC は CBC に比べて RV 感受性が 4 倍高い。RV 感染が成立するのは memory B cell subsets に限られ、productive infection が起こる。(ii) RV 感染で CBC はネクローシス死を高率に起こすが、IBC ではその程度は低い、など。

- "The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis" by Inagaki and Kanamaru et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:680-682, 2010: 牛乳中のラクトフォリン C 末側フラグメント (LP16) および PAS6/7 による in vitro および in vivo における抗 RV 活性。

4. ウイルス遺伝子

- "Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions" by Li and Lever et al., *Nucleic Acids Res.* 1-18, 2010: データベース上の 1621 個の全長シーケンス情報を用いて、A 群 RV ゲノム上の "cis-acting sequences" と "structural element" を探索。
- "Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortant with preferred genome constellations" by McDonald and Patton et al., *PLoS Pathog.* 5:e1000634, 2010: ゲノム配列は異なるが同じ血清型 (G/P-type) のウイルスは共存して流行することができる。また、多くの新生リアソータントは、時間とともに 1 つの優勢な株に置換していく可能性。
- "The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins" by Trojnar and Johne et al., *J. Virol.* 84:10254-10265, 2010: トリを宿主とする D 群 RV の全長シーケンシング。D 群由来 11 分節ゲノムの A、B、C 群に対するアミノ酸レベルでの相同性は各々、12.3-51.7%、11.0-23.1%、9.5-46.9%。セグメント 10 (NSP4 をコード) は 2 つ目の ORF を有する。全 11 分節の 5' および 3' 末端配列は A 群と同一であり、A 群とのリアソートメントの可能性？

5. ワクチン株

- "Sibling transmission of vaccine-derived rotavirus (RotaTeq) associated with rotavirus gastroenteritis" by Payne and Gentsch et al., *Pediatrics* 125:438-441, 2010: RotaTeq を投与した 2 ヶ月齢の弟から未投与の 30 ヶ月齢の兄へのワクチン株由来 RV の水平伝播。RotaTeq (P7[5]G1-4、P1A[8]G6) に由来するリアソータント (P1A[8]G1) による急性胃腸炎を発症して入院治療。

- ・ ”Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq” by Matthijnsens and Ciarlet et al., *Virology* 403:111-127, 2010: RotaTeq (P7[5]G1-4、P1A[8]G6)を構成するリアソータント 5 株の全塩基配列とシアル酸依存性を検討。バイアルに封入されるまでに 2 回の増殖過程があるが、全株の遺伝子学的および生物学的特徴は安定している。
- ・ ”Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E” by Rippinger and McDonald et al., *Virology* 405:201-213, 2010: ヒト RV ワクチン株 RV3 および 116E 株の全長シーケンシング。RV 病原性の低下に寄与している可能性のある配列の探索。

6. リバースジェネティクス

- ・ ”Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses” by Troupin and Garbarg-Chenon et al., *J. Virol.* 84:6711-6719, 2010: ヘルパーウイルスを用いる RV リバースジェネティクス系をセグメント 7 (NSP3 をコード) に応用。

7. ウイルス検出

- ・ ”Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy” by Driskell and Tripp et al., *PLoS ONE* 5:e10222, 2010: 表面増強ラマン散乱による迅速で高感度な RV 検出法。

カリシウイルスの新知見

国立感染症研究所 ウイルス第2部

岡 智一郎

ヒト急性胃腸炎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）はいまだに培養細胞での増殖系が確立されていない。しかし、培養細胞での増殖が可能なマウスノロウイルスに関する研究を糸口に、カリシウイルスの世界に新たな研究グループが参入してきた。今後ますます研究が活発化していくと思われる。本年度のカリシウイルス研究トピックスとして、いくつかの論文概要を紹介する。

1. マウスノロウイルスはマクロファージ、樹状細胞での増殖が可能であることから、ヒト由来のマクロファージ、樹状細胞でのノロウイルス増殖が検討された。しかし、ウイルス増殖は認められなかった。ヒト由来ノロウイルス増殖系が確立できれば、基礎研究だけでなく、検出のさらなる高感度化などに道が開けるが、いまだその壁は越えられない。

2. ノロウイルス、サポウイルスでは遺伝子解析によって、非構造タンパク質コード領域と構造タンパク質コード領域間での遺伝子型が異なる株を「リコンビナント株」と呼ぶが、実際に「リコンビネーション」が起こるのかは明らかでなかった。今回培養細胞への2種類のマウスノロウイルス株の共感染によって、実際に「リコンビナント株」が生じることが初めて示された。同様のメカニズムで多様なヒトノロウイルスが感染者体内で生み出されているのかもしれない。

3. ノロウイルスは現在5つの genogroup (GI-GV)に分類されている。ヒトに急性胃腸炎を引き起こすのは主に GI, GII 株であるが、環境水中のノロウイルス核酸の検出によって、GI, GII だけでなく GIV 株が高頻度に検出され、しかも従来想定されていたより多様な GIV 株が存在することが明らかとなった。現時点ではヒト急性胃腸炎患者からの GIV 株の検出は報告が少ないが、環境水中に見いだされた多様な GIV 株が何に由来するのか、ウイルス性下痢症研究会のネットワークを駆使して解明に取り組むことが期待される。