

倍に希釈された血清が示す OD 値の合計が 4 を超える場合を陽性とした。

C. 研究結果 抗体保有率

34 検体中 3 検体(約 9%)が陽性を呈した。ただし、陽性と判定された 3 検体において、400 倍に希釈された血清が示した OD 値が 0.274(ID No. 15)、0.525(ID No. 25)、0.234(ID No. 32)と、基準の 0.200 を若干上回る値であった。

D. 考察

エボラ出血熱の原因ウイルスとして、アフリカにおいては 4 亜種(ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、アイボリーコーストエボラウイルス)が知られている。エボラ出血熱患者は、コンゴ民主共和国、スーダン、ウガンダ、ガボン、コンゴ、アイボリーコーストで報告されている。アフリカの一部の地域(コンゴ民主共和国やガボンの国立公園)では、エボラ出血熱の流行により生息するゴリラやチンパンジーが絶滅する危険性が指摘されている。このことはエボラウイルス感染症の疫学を調査する上で、霊長類におけるエボラウイルス感染症の実態を明らかにすることの重要性を示している。

本研究では、ガボンやカメルーン(カメルーンではエボラ出血熱の流行は確認されていない)に地理的に近いナイジェリア西部の国立公園に生息するサル血清 34 検体について、エボラウイルスに対する抗体保有状況について検討した。3 検体(約 9%)が陽性と判定されたが、陽性を呈した血清が 400 倍希釈された時の OD 値が、基準を若

干上回る程度であり、真にエボラウイルス抗体が陽性とは言い切れない。しかし、1 検体(ID No. 25)は、比較的高い OD 値を示しており、エボラウイルス抗体陽性である可能性がある。

本研究で用いられた血清は 34 検体と少なく、この研究成績からは結論を導くことはできない。今後、検体数を増やしたり、他の地域に生息する霊長類の個体について検討したりして、エボラ出血熱の流行についてより詳細に検討することが重要であると考えられた。

E. 結論

イジェリア国西部の国立公園内に生息する霊長類(サル)の血清中のエボラウイルスに対する抗体保有状況を調査し、3 検体(約 9%)が陽性を呈した。同国におけるエボラウイルス感染症の疫学について明らかにするためには、更なる調査が必要であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushi, S., Nakauchi, M., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies *Journal of Virological Methods* (in press)
- 2) Kennedy, J.S., Gurwith, M., Kenner, J., Morikawa, S., Saijo, M., Yokote, H., Edwards, K., Dekker, C.L., Frey, S., Rogge, P.T., Damon, I., Greenberg, R.N.: LC16m8, an

- attenuated smallpox vaccine, demonstrates comparable and vaccinia variola immune response to Dryvax in a Phase I/III vaccinia-naive adult trial. *Journal of Infectious Diseases* 204:1395-1402, 2011
- 3) Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J.S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H., Ishii, Y., Mizutani, T., Fukushima, S., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: Reston ebolavirus antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 17:1559-1560, 2011
- 4) 西條政幸: バイオテロリズムに用いられる可能性のある病原体と国立感染症研究所における対応: 出血熱ウイルスと痘瘡ワクチン. *日本犯罪学会雑誌* 77:63-66, 2011
2. 学会発表
- 1) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Yoshikawa (Iwata), N., Hasegawa, H., Fukushima, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 2) Lim, C.K., Ami, Y., Fujii, Y., Moi, M.L., Kitaura, K., Kotaki, A., Morikawa, S., Saijo, M., Suzuki, R., Kurane, I., Takasaki, T.: Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 3) Sayama, Y., Fukushi, S., Saito, M., Taniguchi, S., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Saijo, M.: A serological survey of *reston ebolavirus* infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 4) Taniguchi, S., Watanabe, S., Iha, K., Fukushima, S., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: The detection of reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））
分担研究報告書

ノロウイルス性下痢症の疫学およびその病原性に関する研究

下痢症ウイルスの病原性解析

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究協力者 ハンスマン・グラント 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：ヒト・ノロウイルスは組織血液型抗原（HBGAs）に粒子上の突出したP領域で結合することで細胞に侵入すると考えられている。我々はX線結晶学と飽和転送差核磁気共鳴（STD NMR）によって GII ノロウイルスとクエン酸塩の相互作用を分析した。その結果、クエン酸は、HBGA のフコース（HBGAs と GII ノロウイルスの結合の中心となる糖）とほぼ同等の結合様式を示して結合した。クエン酸塩と水分子は、フコースのピラノシド環を模倣した環状構造を形成した。STD NMR は、突出している領域がクエン酸塩（460M）に対する弱い親和性を持つことを示した。しかしながら、この親和性はフコース（460M）と H 2 型三糖（390M）のために突出している領域と類似していた。STD NMR を用いて、クエン酸塩と HBGA の競合阻害を行ったところ、HBGA の代わりにクエン酸がノロウイルスに結合した。クエン酸はノロウイルスがヒト細胞に結合する際に用いる HBGA との結合を阻害する可能性がある。ノロウイルスの感染阻害剤として用いることができるかもしれない。

A. 研究目的

ヒトノロウイルス（HuNoV）は、発見以来40年以上が経過するが、未だ、増殖させることが可能な株化培養細胞が見いだされず、基礎的な研究が遅れている。HuNoVの構造タンパク質コード領域（ORF2 からゲノム末端まで）をバキュロウイルスに組み込み、昆虫細胞を用いて発現すると、ミリグラムオーダーのウイルス様中空粒子（VLP）が得られる。HuNoV-VLP は、感染性 HuNoV とほぼ同様の粒子構造、ほぼ同等の

抗原性を有すると考えられており、HuNoV の研究に用いられてきた。さらに、HuNoV-VLP の構造が、結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡で構造決定されると、粒子表面に突出する突起部分（P ドメイン）の構造タンパク質遺伝子上のコード領域が P 領域として同定された。この P 領域のみを大腸菌で発現すると、突起部分の構造を維持した P タンパク質、その 2 量体（P-dimer）を作出できることが明らかになった。HuNoV の粒子構造の研究は、ウイルス様中空粒子

(VLP) を用いて行われてきたが、P タンパク質、P-dimer は VLP に比べ、容易に結晶化が可能であることから、X-ray 構造解析に適しており、最近では、P タンパク質が主に構造解析に用いられている。

HuNoV はゲノムの塩基配列が多様性に富んでいるため、多様な抗原性を示すことが知られている。しかし、HuNoV の他種類の VLP を用いた研究から、HuNoV は組織血液型抗原 (HBGA : 血液型を決定している糖鎖であり、細胞表面に発現している) に結合することが見いだされ、HBGA が HuNoV の受容体候補として注目されている。我々は、X-ray 構造解析を用いて HBGA と HuNoV の結合様式を解析した結果、genogroup II (GII) NoV では、HBGA の Fucose が NoV の P 領域上部に存在する結合ポケットにはまり込むことで、結合することが明らかになった。本研究では、HBGA と HuNoV の結合機構の研究遂行中に、偶然見いだした結合阻害物質候補について報告する。

B. 研究方法

1. 材料と方法

<タンパク質発現、精製とノロウイルス P 領域の解析>

ノロウイルス Vietnam026 GII.10 P 領域 (AF504671) を大腸菌で発現し、精製した。精製した P 領域は、クエン酸トリアンモニウム (0.66M [pH 6.5]) とイソプロパノール (1.65% [vol/vol]) を含む溶液中で、懸滴蒸気拡散によって結晶化した。

<データ収集、構造再構築>

Advanced Photon Source、アルゴンヌ国

立研究所、Collaborative Access チーム (SERCAT) beamline 22-BM によって、1.000-Å 波長の X 線回折データを得た。回折データは、HKL2000 で処理し再構築した。

<STD NMR 解析>

NMR データは、NMR スペクトロメータと超低温 z シールド勾配プローブを備えた Bruker Avance を用いて、298deg.K で記録した。検体は、pH 6.8 で 50mM の塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸バッファーで調整した。

NMR データは、Topspin 2.1 で処理し、分析した。HBGAs、H 2 型二糖 [-L-フコース-(1-2) - Dgalactose] と H 2 型三糖 [-L-フコース-(1-2) -D-ガラクトース-(1-4) -2-N-アセチル - D-グルコサミン]、L-フコースは市販の合成物質を購入して用いた。クエン酸塩の結合解析には、クエン酸ナトリウム二水和物を用いた。

クエン酸塩ドッキングモデルの分析は、アングイラアグルチニン (PDB#1K12PDB)、オーランシア・レクチン (PDB#1IUC)、肺炎レンサ球菌毒性因 (PDB#SpGH98)、緑膿菌 PAIIL レクチン (PDB#2JDH)、パラインフルエンザウイルス 5 hemagglutininneuraminidase (PDB#1Z4X) と豚アデノウイルス 4 型ガレクチン領域 (PDB#2WSV) の 6 つの異なるサッカリド-結合蛋白質を用いて行った。

クエン酸塩分子は、デフォルト・パラメータ (ga_pop_size 150 、 ga_num_evals 2,500,000 と ga_run 50) を用いた 3 つの構造に分割し、ドッキングモデルに用いた。

それぞれの構造ごとに、最も低いと推定さ

れた自由エネルギーによるドッキングモデルを予測し、結合状態を決定した。クエン酸塩結合性の GII. 10 P 領域の原子座標と構造因子は、PDB#3RY8 として Protein Data Bank に登録した。

C. 研究結果

1. クエン酸塩と GII. 10 P 領域の X 線結晶構造解析

GII. 10 P 領域タンパク質を大腸菌で 2mg/リットルの濃度で発現させ、結晶化に用いた。

GII. 10 P 領域-クエン酸塩複合体は、GII. 10 P 領域-HBGA 複合体の結晶化条件を用いて、結晶化を行って作出した。GII. 10 P domain-citrate 複合体は矩形の板状結晶を形成した。X 線回折データは P21 (既報の GII. 10 P 領域-HBGA 複合体とほぼ同様) の空間群を現した、そして、分子置換による 1.4 の A. Structure 溶液に対する強い回折は非対称の単位 (図 1A) 当たり 1 つのダイマーが得られた。HBGA 結合部位には、一分子のクエン酸塩分子が、P ダイマーとは明らかに区別された電子密度のデータとして観察された (図 1B)。1.4-A 解像度で、クエン酸塩と P 領域の間の詳細な相互作用の解析結果が得られた。P 領域の 7 つのアミノ酸残基は、クエン酸塩 (図 1B と C) との水素結合相互作用に関係している。これらは、Tyr452 と 1P 領域サブユニットならびに側鎖 Arg356 と Asp385 から Gly451 の主鎖の側鎖と第 2 の P 領域サブユニットの Asn355 の主鎖を含んでいた。Asn342 と Ser387 の側

鎖はクエン酸塩の C5 C0 群とともに水によって媒介される水素結合を形成していた。クエン酸塩の結合は、クエン酸塩相互作用による GII. 10 P 領域にコンフォメーション変化などの影響を与えないことも明らかになった。

2. GII. 10 P 領域へのクエン酸塩結合様式と HBGA 結合様式の比較

HBGAs が P 領域に結合する際、フコースを中心とした結合を行う。GII. 10 P 領域へのクエン酸塩結合様式と HBGA 結合様式を比較した結果、クエン酸塩は、フコースを模倣した結合様式を示すことが明らかになった (図 2)。

加えて、水分子 (クエン酸塩結合性の構造に存在するが、HBGA に結び付いた構造には無い) は、フコースの C2 水酸基の部位を占め、フコースのピラノシド環を模倣していた (図 2)。

3. STD NMR による GII. 10 P 領域に対するフコースとクエン酸の競合的結合解析

クエン酸塩が、HBGA のフコースを模倣することは明らかになったが、実際に液相条件下で、フコースと競合し、HBGA の P 領域への結合を阻害し得るかどうかを NMR によって調べた。クエン酸塩のメチレン陽子は、P 領域の非常に近傍に近接した状態で存在していた。結晶構造において、これらの水素は、Ala354 (図 1C) のメチルのヴァンデルヴァールス接触の範囲内に相当する距離であった。さらに、我々は、NMR によって、クエン酸塩のアフィニティ、H 2 型三糖と二糖、そして、GII. 10 P 領域に対する L-

フコースのアフィニティを比較検討した。クエン酸塩の P 領域に対するアフィニティは、ForHtype 2 三糖に比較して、十分に強ことが明らかになった。

4. HBGA とクエン酸の GII.10P 領域への競合反応

クエン酸と H 2 型配位子のフコースの P 領域に対する結合競合反応を確認するため、P 領域にクエン酸塩を滴定している間に、L-fucopyranose と H 2 型三糖の ASTD 値をモニターした。また、クエン酸塩存在かにおいても L-fucopyranose と H 2 型三糖を滴定し、ASTD 値をモニターした。P 領域-H 2 型三糖の試料へのクエン酸塩の追加は濃度依存的に三糖 ASTD 値を減弱させた。同じ効果は、L-フコースの STD 競争実験で観察された。

逆方向の滴定実験では、HBGAs が P 領域と結合しているクエン酸塩の ASTD 値を低下させることが示された。以上から、クエン酸塩はフコースの分子擬態を行い、P 領域への HBGAs 結合を、液相条件下で競合阻害できることが明らかになった。

D. 結論

本研究は HuNoV の粒子表面の突起 P 領域に存在する HBGA 結合部位には、HBGAs 以外の多数の合成物が結合できることを明らかにした。特にクエン酸塩分子は、フコースと構造が異なるにもかかわらず、液相反応系において、非常に効率よくフコースの結合を競合阻害できることが明らかになった。

我々は、本研究で得られた PDB ファイル

を利用し、4つの異なるフコース-結合蛋白質アングレラアグルチニン、オーランシア・レクチン、肺炎レンサ球菌毒性因子 SpGH98 と緑膿菌 PAIIL レクチン、さらに、2つの他のサッカリド-結合蛋白質（パラインフルエンザウイルス 5 血球凝集素-ノイラミニダーゼと豚アデノウイルス 4 型ガレクチン領域）を用いて *in silico* スクリーニングによって、フコースまたは他のサッカリド結合の解析を行った。*in silico* ドッキングモデル分析では、フコースの C5/C4/C3/O5/O4/O3 原子との結合が予測され、NoV の P 領域に対するフコースの結合様式とほぼ同じアミノ酸残基とのセットで水素結合を築くことが予測された。つまり、クエン酸塩は、他の糖タンパク質由来のフコースにも、同様に競合的結合阻害作用を持つと予測された。つまり、本研究において明らかにされたクエン酸塩とフコース結合の間の競合的結合阻害は、他のフコース-結合蛋白質結合にも有効であり、普遍的な性質であることが示唆された。クエン酸塩は、HuNoV 以外にも、サッカリド相互作用を利用して宿主に感染している病原体の感染阻害剤を開発するために、最小骨格として用いることができると考えられた。ZINC データベースを検索したところ、3000 以上の合成物がクエン酸塩に少なくとも 50% の類似性を示すことが明らかになった。

近年、天然合成物、例えばレモンやライムジュース、クランベリージュースが、ノロウイルス感染症予防に効果があるとする報告がなされている。古くから、生牡蠣に

はレモンやスダチなどを搾って食する習慣があるが、これは、牡蠣に高頻度に含まれる HuNoV の感染防止に効果があったのかもしれない。

我々の研究成果を評価するためには、HuNoV のボランティアによる感染実験を行って、クエン酸の感染阻害効果を実際に示す必要があるが、それは難しい。いずれにせよ、P 領域を用いた結晶構造解析により、様々な化合物と P 領域の PDB ファイルを得ること、*in silico* ドッキングモデルによるスクリーニングなどの付加的な合成スクリーニングは、HuNoV 感染抑制に用いる薬剤を開発する上で、極めて効果的な研究である。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

1. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *Journal of virology* 2011 in press.
2. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding

domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.

3. Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology*. Vol. 52, 181-4, 2011.
4. Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol*. Vol. 55, 108-14. 2011.
5. Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., Katayama, K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Res.* vol.90, 9-16, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

Figure 1

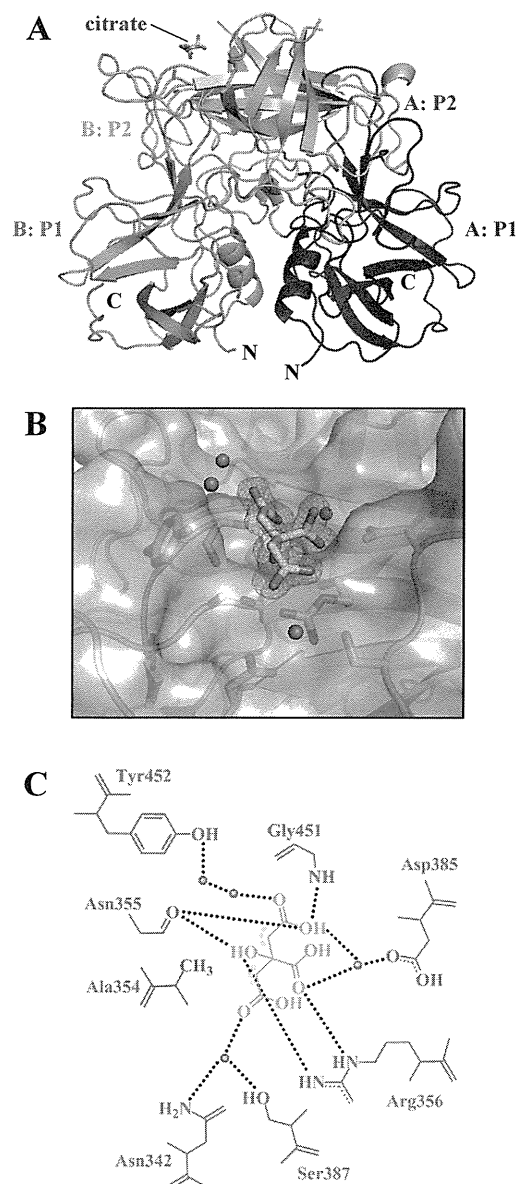


Figure 1. Citrate binding to the GII.10 P domain and superposition of citrate and HBGAs. (A) The X-ray crystal structure of the GII.10 P domain dimer (ribbon structure) and the bound citrate (green sticks), where each P subdomain is colored differently i.e., chain A: P1 (blue), chain A: P2 (lightblue), chain B: P1 (violet), and chain B: P2 (salmon). (B) Surface representation the GII.10 P domain (colored as in Fig. 1A) showing the residues (sticks) and water molecules (red spheres) interacting with the citrate molecule (green sticks). The $2F_o - F_c$ density was contoured at 1.0 sigma. (C) Residues interacting with the citrate molecule were contributed by both monomers (colored as in Fig. 1A), where the black dotted lines represented the hydrogen bonds, the cyan dots near the citrate represented the hydrophobic interactions with Ala354, and the red spheres represented water molecules. For simplicity, only the backbone was shown for residues that were backbone-mediated. Hydrogen bond distances were less than 3.12 Å, though the majority were ~2.8 Å.

Figure 2

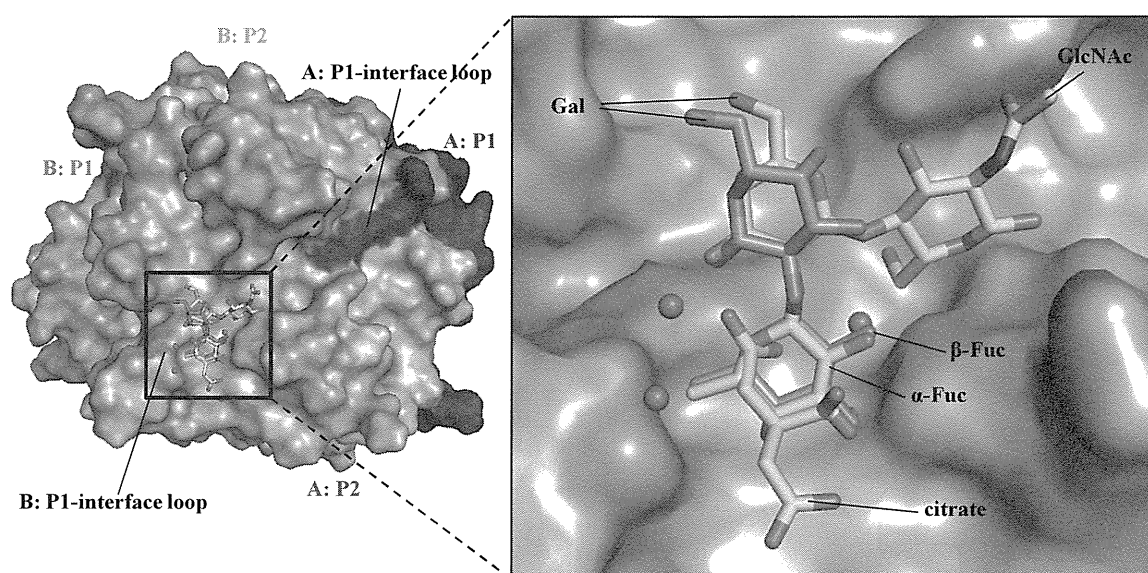


Figure 2. The HBGA and citrate binding site overlapped on the top of the GII.10 P domain. (A) The citrate molecule (green sticks) bound at the HBGA binding site, shown here are the bound H type-2 di- and trisaccharides (orange and cyan sticks, respectively). (B) Close-up of the black square in figure 2A, showing the H type-2 disaccharide [α -L-fucose-(1-2)- β -D-galactose] and H type-2 trisaccharide [β -L-fucose-(1-2)- β -D-galactose-(1-4)-2-N-acetyl- β -D-glucosamine].

ロタウイルスの分子疫学に関する研究

全遺伝子配列にもとづく G2 ヒトロタウイルスの系統遺伝学的解析

研究分担者 小林宣道 札幌医科大学医学部衛生学講座 教授

研究要旨

ロタウイルスは小児下痢症の主要な原因ウイルスであり、南アジア地域を中心とする開発途上国では多くの乳幼児死亡を起こしていると推定されている。本研究では2006-2008年にバングラデシュ・マイメンシン市の調査で主要遺伝子型であったG2P[4]株の全遺伝子配列を決定し、その特徴を明らかにすることを目的とした。2005年に分離されたG2P[4]株2株（MMC6、MMC88）の11本の遺伝子分節の配列を決定し、既知のロタウイルス遺伝子配列とともに系統解析を行った。MMC6、MMC88株の各遺伝子は、G2ヒトロタウイルスのプロトタイプDS-1株の遺伝子型に属していた。ただし各遺伝子分節の配列は、MMC88株のVP3遺伝子を除き、DS-1株よりもより新しいG2ロタウイルス株のそれに近いことが分かった。MMC88株のVP3遺伝子は、遺伝子型M2であったが、系統解析ではバングラデシュで分離・報告されたヤギロタウイルスGO34株にきわめて近く、同じ地域内でヤギロタウイルスからのリアソートメント（遺伝子再集合）によりヒトロタウイルスに入ってきた遺伝子分節であることが推定された。G2P[4]のようなヒトロタウイルスで高頻度に見られる遺伝子型の株であっても、動物ロタウイルスとの間で遺伝子分節のリアソートメントが起こり得ることが示唆され、本ウイルスの生態・病原性獲得の解明において全遺伝子配列解析が有用であることが示された。

A. 研究目的

ロタウイルス（A群）は5歳未満の小児における重症下痢症の主要な原因ウイルスであり、先進国、発展途上国を問わず世界中に広く分布している。ロタウイルスはレオウイルス科の一員であり、11本の分節化した2本鎖RNAをゲノムとして有する。ウイルス粒子の最外層を構成する2種の構造蛋白VP7、VP4の遺伝子配列により遺伝子型（各々G型、P型）が区別され、ヒトではG1-G4、P[4]、P[6]、P[8]が普遍的に多いことが知られる。また2008年以降、ロタウイルスの11本の全遺伝子分節に基づく遺伝子型別が提唱された。これにより、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5の各遺伝子に対応する各々の遺伝子型を合わせたG-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H遺伝子型として

ロタウイルス株の遺伝子学的性状が表記されることとなった。

ロタウイルスの疫学的調査には、G型、P型が主に用いられているが、VP7、VP4遺伝子に基づく系統解析や、全遺伝子分節の配列解析なども徐々に取り入れられてきている。経口生ワクチンであるロタウイルスワクチンは現在世界中で導入されつつあり、野外流行株の遺伝子解析はより重要となってきた。従来は非定型的なヒトロタウイルス株の遺伝学的研究が多く見られたが、近年はワクチンの普及とともに主流株の解析の重要性も認識されるようになった。ロタウイルスは稀に異なる動物種間で感染・伝播することがあり、ヒト、動物個体における混合感染により遺伝子分節のリアソートメント（遺伝子再集合）を起こすことがある。VP7、VP4遺伝子の動物・ヒトロ

タウイルス間におけるリアソートメントについては多数の報告があるが、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。そのようなリアソートメントの様態を明らかにするには全遺伝子配列の解析が必要である。

本研究では小児におけるロタウイルス下痢症対策が重要とされるバングラデシュにおいて、ロタウイルスの主流株の性状とリアソートメントを含む遺伝子変異の状況を把握することを目的として、全遺伝子配列の決定と解析を行った。

B. 研究方法

我々は2004-2006年にバングラデシュ・マイメンシン医科大学との共同で、当地における小児、成人からのロタウイルスに関する分子疫学的調査を行った (Arch Virol, 153:1999-2012)。その中でこの時期には調査したウイルス検体の約半数をG2が占め、最も流行していたことが判明した。今回の研究では、主流型G2ロタウイルスの中から2株、MMC6、MMC88を選び研究対象とした。これらは2005年(各々9月と1月)にマイメンシン医科大学病院小児科で採取された検体である。

ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA mini kitにより抽出した。各ロタウイルス遺伝子はRT-PCRにより遺伝子全長を、または互いに重複する末端配列を有し全長をカバーする複数の部分配列を増幅した。RT-PCR産物はWizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製し、BigDye Terminator ver.3.1 cycle sequencing kitを用いてダイデオキシ法によるシーケンス反応を行い、配列をABI Prism 3100 genetic analyzerにより決定した。得られた遺伝子配列は、GenBankに登録されている代表的なG型、P型ヒトロタウイルス株、動物ロタウイルスの配列情報と比較し、Genetyx-Win ver.5.1を用いて、2つの遺伝子配列の一致率の計算を行い、MEGA ver.4.1を用いて多数の遺伝子配列からの系統解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

本研究はバングラデシュ・マイメンシン医科大学との共同研究として実施された。

ウイルス検出はマイメンシン医科大学において行ない、ロタウイルスより抽出精製されたRNA検体のみを用いて札幌医科大学で遺伝子型別および遺伝子解析を実施した。

C. 研究結果

- (1) MMC6、MMC88 株は G2P[4]に属し、ほぼ同一の RNA パターンを示した。これら 2 株の間の遺伝子配列の一致率は、VP3 遺伝子を除き、97.2-99.3%と高かった。VP3 遺伝子のみ、一致率は 88.1%とやや低かった。
- (2) MMC6、MMC88 株のゲノム全長は 18612 塩基であった。各遺伝子配列について既知の型の株との一致率を調べた結果、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 遺伝子の遺伝子型は、G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H3 と判定された。この遺伝子型構成は G2 ロタウイルスのプロトタイプである DS-1 株のそれと同じであった。
- (3) MMC6、MMC88 株の各遺伝子分節を系統遺伝学的に解析し、配列の一致率を調べた結果、MMC88 株の VP3 遺伝子を除き、古い G2 ロタウイルス株 (DS-1, KUN, TB-Chen 等) よりも 2000 年代に検出、報告された新しい G2 ロタウイルスに近いことが分かった。
- (4) MMC6 株の VP3 遺伝子は、系統樹では DS-1 と同じクラスターで G2, G12 等のヒトロタウイルスと近い関係にあった。ところが MMC88 株の VP3 遺伝子は、バングラデシュのヤギロタウイルス GO34 と 97.4%の一致率を示し、それと同じクラスターに属していたが、DS-1 を含むクラスター (動物ロタウイルス、ヒト non-G2 ロタウイルスを含む) とは異なっていた。
- (5) MMC6、MMC88 株の VP7 遺伝子は lineage 5 に属していた。VP7 の主要抗原部位 (アミノ酸 87-100) のアミノ酸配列を見ると、MMC6、MMC88 株は 2005-2006 年の G2 ロタウイルス株 LB2744, LB2764, LB2772 とともにアミノ酸 87、96 番目に各々 T および N を有していた。これらは 2000 年以前

に分離された G2 ロタウイルス株および 5 価ロタウイルスワクチン G2 成分の VP7 におけるアミノ酸とは異なる (各々 A, D) ことが判明した。

D. 考察

本研究ではバングラデシュにおける主流株である G2 ロタウイルス株の全遺伝子配列を決定し、系統遺伝学的・分子疫学的解析を行った。解析された 2 株はいずれも G2 のプロトタイプ DS-1 株と同じ遺伝子型 (全遺伝子分節) を示したが、遺伝子配列の一致率および系統解析では G2 ヒトロタウイルスの中で特徴的な所見が得られた。すなわち、DS-1 株(1976)、KUN 株(1982)、TB-Chen 株 (1996) のような古い G2 ロタウイルス株に比し、MMC6、MMC88 株は 2000 年以降に検出された新しい G2 ロタウイルスに遺伝的に近いということであった。このことは時間の経過とともにロタウイルスの全遺伝子分節にわたり点変異が蓄積し、遺伝子学的に多様な集団へと変化してゆくことを意味している。現行のロタウイルスワクチンは抗原、遺伝子配列とも固定されたものとなっているため、野外株の遺伝子進化については注意深く観察する必要があると思われる。そのためには主流株の全遺伝子配列の解析は継続的に行う必要があるであろう。

G2 ロタウイルスの VP7 遺伝子は、系統遺伝学的には 5 つの系統に分けられ、DS-1、RotaTeq の G2 成分はそれぞれ lineage 1, 2 に分類される。ところが 2000 年以降に報告された G2 ロタウイルスの多くは、MMC6、MMC88 株も含め lineage 5 に属していた。しかも主要中和抗原部位では、2 ヶ所で古い株とは異なるアミノ酸の置換が見られた。このことはロタウイルス野外株が、生体における中和抗体の作用を回避しながら変異を起し、そのような変異株が野外で選択されてきたことを示唆する。従ってロタウイルスワクチンの有効性を予測する上でも、特に VP7 の変異に関しては特に留意して解析を進める必要がある。

今回の研究で興味深かったのは、MMC88 株の VP3 が、この株が検出された場所と同じマイメンシン市で分離報告されたヤギロタウイルス GO34 株のそれにきわめて近か

ったことである。MMC6 株の VP3 遺伝子はヒト G2 株のそれと近かったことから、MMC88 株の VP3 遺伝子は MMC6 株とは由来を異にすると考えられた。すなわち MMC88 株の VP3 遺伝子はヤギロタウイルスに由来することが示唆され、G2 ヒトロタウイルスとヤギロタウイルスの混合感染により起きたリアソートメントにより生じたことが推測された。VP7、VP4 遺伝子の動物・ヒトロタウイルス間におけるリアソートメントについては多くの報告があるが、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。今回は全遺伝子配列の解析により、そのようなリアソートメントの生起が示唆されたものであり、今後全遺伝子配列のデータの蓄積により、ロタウイルス遺伝子分節の自然界での動態がさらに明らかになるものと期待される。リアソートメントによる動物ロタウイルス遺伝子のヒトロタウイルスへの導入は、病原性の変化やワクチンの有効性にも影響を与える可能性があるため、主流株を対象とした継続的な解析が重要であると思われる。

E. 結論

バングラデシュの主流型 G2 ロタウイルス 2 株の全遺伝子配列を決定し、各遺伝子分節について系統遺伝学的・分子疫学的に解析した。その結果、ともに全遺伝子分節にわたりプロトタイプ株 (DS-1) と同じ遺伝子型に属するものの、古い株に比して遺伝子変異が蓄積されていることが判明した。また 1 株はヤギロタウイルスに由来すると思われる VP3 遺伝子を有し、動物・ヒトロタウイルス間でリアソートメントが起きていたことが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of a G8P[1] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-

- to-human interspecies transmission event. *J Med Virol*, 2011, 83:367-376.
- 2) Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full Genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant : identification of novel VP1, VP6, and NSP4 genotype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:57-63.
 - 3) Ghosh S, Paul SK, Hossain MA, Alam MM, Ahmed MU, Kobayashi N. Full genomic analyses of two human G2P[4] rotavirus strains isolated in 2005 : Identification of caprine-like VP3 gene. *J Gen Virol.*, 2011, 92:1222-1227.
 - 4) Ghosh S, Paul SK, Yamamoto D, Nagashima S, Kobayashi N. Full Genomic analysis of human rotavirus strains possessing the rare P[8]b VP4 subtype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:1481-1486.
 - 5) Ghosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Yamamoto D, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains. *J Gen Virol*, 2011, 92:2201-2208.
2. 学会発表
- 1) Kobayashi N, Ghosh S, Paul SK, Nagashima S. Full-genomic analysis of human rotavirus strains which have VP4 genes belonging to a rare P[8] subtype (P[8]B). 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
 - 2) Gosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of human G2P[4] rotavirus strains from Africa. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
 - 3) Yamamoto D, Kawaguchiya M, Ghosh S, Ichikawa M, Numazaki K, Kobayashi N. Full genomic analysis of rare G6P[9] human rotavirus detected in Japan. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））
分担研究報告書

ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究
わが国におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担とその評価

研究代表者 中込 治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座 教授

研究要旨

世界 120 か国以上で承認され、発展途上国を含め 120 か国以上で定期接種に導入されているロタウイルスワクチンがわが国でも使用され始めた。ワクチンの効果を評価するに当たって、ロタウイルス胃腸炎入院例の実態把握は急務である。しかし、ロタウイルス胃腸炎入院発生率に関する疫学研究は少なく、また、報告による変動幅が大きい。そこで、京都府中央部にある公立南丹病院の急性胃腸炎入院症例を解析し、わが国の中央部でのロタウイルス胃腸炎入院発生率を評価した。この結果、ロタウイルス胃腸炎入院発生率は 5.3/1000 人・年となり、5 歳までに 37 人に 1 人はロタウイルス胃腸炎で入院したことが示された。また、ロタウイルス陽性例の入院にかかる直接医療費(個室料除く)は平均 221,000 円だった。本研究結果をわが国のバースコホート全体に外挿すると、年間 3 万人のロタウイルス胃腸炎入院患者(5 歳未満)が発生し、その直接医療費は約 66 億円と推定され、わが国にはワクチンを定期接種に導入している諸外国と同様の疾病負担があると考えられる。

A. 研究目的

世界保健機関(WHO)が全世界でロタウイルスワクチンを定期接種に導入するよう勧奨してから2年が経過した今年(2011年)、厚生労働省はロタウイルスワクチンに対して初めての製造販売承認を与えた。国際連合加盟国190か国あまりのうち、ロタウイルスワクチンを承認している国はすでに120か国を超えている。ロタウイルスはどこにでも存在するウイルスであり、生後3~5歳に達するまでに世界中の小児が感染する。ベッドサイドでもできる簡便な抗原検査法の普及により、ロタウイルスが起こす胃腸

炎の多くが軽症に経過することがわかった。しかし、2~3%の症例で強い脱水症のため、入院して点滴補液をする必要がある。実際、ロタウイルスは入院加療が必要な小児の急性胃腸炎の約40%を占めている。

国際連合はミレニアム開発目標4 (Millennium Development Goal 4: MDG4) の中で、2015年までに5歳未満児の死亡率を1990年の水準の3分の1にまで引き下げることが掲げている。5歳未満児の死亡原因は、その18%が下痢症である。さらにその半数近くがロタウイルスに起因する。このためWHOは、ロタウイルスワクチ

ンの開発と導入を優先課題として推進してきた。ロタウイルスワクチンは、アメリカ合衆国、中南米(ブラジル、メキシコ、ニカラグアなど)、ヨーロッパ(ベルギー、ルクセンブルグ、オーストリア、フィンランド)、オーストラリア、イスラエルなど約30か国で定期予防接種に組み入れられており、年間の接種対象乳児数は1000万人を超えている。このような状況下で、ロタウイルスワクチンがわが国でも使用され始めた。ワクチンの効果を評価するに当たって、ロタウイルス胃腸炎入院例の実態把握は急務である。しかし、ロタウイルス胃腸炎入院発生率に関する疫学研究は少なく、また、報告による変動幅が大きい。そこで、京都府中央部にある公立南丹病院の急性胃腸炎入院症例を解析し、わが国の中央部でのロタウイルス胃腸炎入院発生率を評価した。

B. 研究方法

2008年9月1日から2010年8月31日の2年間に公立南丹病院小児科に急性胃腸炎の診断で入院した患児を対象に、電子カルテにて後方視的に検討した。ロタウイルス抗原は入院時採取の便検体をELISA法(Rotaclone)で測定した。

C. 研究結果

急性胃腸炎入院例147例中、5歳未満症例は103例でロタウイルス流行期(1~6月)に83例(84%)、非流行期(7~12月)に20名(16%)入院していた。ロタウイルス抗原検査は流行期には83例中65例(78%)に施行され78%が陽性、非流行期には20例中12名に行われ17%が陽性だった。そこで、未検査の26例に各時期のロタウイルス陽性率を適用すると13例がロタウイルス陽性

例と推測され、当医療圏で2年間にロタウイルス胃腸炎で入院した5歳未満の5院例をほぼ全て管理している。このことから、2005年度国勢調査による5歳未満人口を分母とすると、ロタウイルス胃腸炎入院発生率は5.3/1000人・年となり、5歳までに37人に1人はロタウイルス胃腸炎で入院したことが示された。また、ロタウイルス陽性例の入院にかかる直接医療費(個室料除く)は平均221,000円だった。

5歳未満のロタウイルス陽性46例中6か月未満の症例はなく、34例(74%)は6~35か月児だった。一方、15歳未満の全胃腸炎入院例147例中ロタウイルス陽性患者は53例で、19例(36%)は3歳以上だった。

D. 考察

本研究の結果をわが国のバースコホート約110万人に外挿すると、年間3万人のロタウイルス胃腸炎入院患者(5歳未満)が発生し、その直接医療費は約66億円と推定された。このバースコホートを5歳まで追跡したときどれだけの児がロタウイルス胃腸炎を発症し、医療機関を受診するかという推定値が、ロタウイルスワクチンをとりまく公衆衛生政策上必要な情報である。ここでは、これが5歳未満の小児約550万人を母集団とする年間の患者数と一致すると前提して議論を進める。本研究で得られたデータをふまえると、ロタウイルス下痢症による外来受診者数は年間約80万人、入院患者数は年間30,000~78,000人、死亡例は年間約10人と推定される。ロタウイルスワクチンの目的はロタウイルス胃腸炎による入院患者数の減少であるので、もっとも重要なのは年間入院患者数をできるだけ正確に推定することである。このために、全国規模での研

究が必要である。

また、5歳未満のロタウイルス胃腸炎入院例は諸報告と同様6～35ヶ月児が主体だが、全年齢では3歳以上の症例が1/3以上で、ロタウイルスワクチンによる免疫の持続の問題を含め今後の予防戦略策定上の課題と考えられた。

E. 結論

わが国にはロタウイルスワクチンの第一の標的となるロタウイルス胃腸炎入院に関し、このワクチンを定期接種に導入している諸外国と同様の疾病負担がある。同時にワクチンのインパクトの評価のために全国規模での研究が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato T, Nakagomi T, Nakagomi O. Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(4):277-83.

2) Abugalia M, Cuevas L, Kirby A, Dove W, Nakagomi O, Nakagomi T, Kara M, Gweder R, Smeo M, Cunliffe NA. Clinical features and molecular epidemiology of rotavirus and norovirus infections in Libyan children. *J Med Virol* 2011;83(10):1849-56.

3) Ito H, Otabe O, Katsumi Y, Matsui F, Kidowaki S, Mibayashi A, Nakagomi T, Nakagomi O. The incidence and direct medical cost of hospitalization due to rotavirus gastroenteritis in Kyoto, Japan, as estimated from a retrospective hospital study. *Vaccine* 2011 29(44):7807-10

4) Kaplan NM, Kirby A, Abd-Eldayem SA, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cunliffe NA. Detection and molecular characterisation of rotavirus and norovirus infections in Jordanian children with acute gastroenteritis. *Arch Virol* 2011;156(8):1477-80

5) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. *Arch Virol* 2011 156(11):1969-78

6) 中込 治 : 序—感染性胃腸炎の診断と治療へのアプローチ— : 化学療法の領域 27(4): 716-722, 2011

7) 中込 治、中込とよ子 : ロタウイルス胃腸炎とロタウイルスワクチン : 化学療法の領域 27(8): 1789-1799, 2011

8) 中込とよ子、中込 治 : ロタウイルス感染症 : 最新医学 66(12): 2641-2648, 2011

9) 中込 治、中込とよ子 : 我が国におけるロタウイルス感染症の現状とロタウイルス

ワクチン：日本医事新報 4572：73-79, 2011

10) 中込とよ子、中込 治：初承認されたロタウイルスワクチン（ロタリックス）の接種時期に関する添付文書の懸念：日本医事新報 4572：30-33, 2011

11) 中込とよ子、中込 治、野口篤子、高橋 勉：ロタウイルスワクチン：総合臨床 60(11)：2283-2292, 2011

2. 学会発表

1) Hoa TNT, Nakagomi T, Cunliffe NA, Dove W, Yokoo M, Pandey BD, Sherchand JB, Cuevas L, Nakagomi O. Molecular Epidemiology of Acute Gastroenteritis due to rotavirus and norovirus among children than 5 years of age in Nepal: XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September, 2011

2) Bhattachan P, Nakagomi T, Cunliffe NA, Yokoo M, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Successive replacement of G12P[6] rotavirus stains over 2 years in Nepal: XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September, 2011

3) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Possible implication of amino acid substitution D96N in the VP7 gene of G2P[4] strains emerging in Nepal and elsewhere in the context of the evolution of G2 strains: XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September, 2011

4) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Steele AD, Neuzil KM, Han HH, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi: XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September, 2011

5) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011

6) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011

7) 中込とよ子、長内理大、Doan YH、中込 治、中根明夫：ロタウイルスのマウス脳内接種による増殖：第 65 回日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成 23 年 8 月 18-19 日

8) 中込 治、Doan YH、中込とよ子：地球規模で見たロタウイルス G2 株の 34 年間にわたる分子進化的変遷：第 65 回 日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成 23 年 8 月 18-19 日

9) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O.
The evolution and global distribution of
G2VP7genes over the last 34 years: 第 48
回日本ウイルス学会九州支部総会、北九州
市、平成 23 年 8 月 26-27 日

10) 伊藤陽里、中込とよ子、中込 治 : 京
都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎
入院に起因する疾病負担とその評価 : 第 52
回日本臨床ウイルス学会、津市、平成 23 年
6 月 11-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
(地球規模保健課題推進研究事業 (国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

ロタウイルス感染症の病態機序に関する研究

研究分担者 中根 明夫
弘前大学大学院医学研究科教授

研究要旨

ロタウイルスは経口感染により腸管症状を引き起こす他に、高い頻度で脳症を引き起こすことが知られている。本研究では、ロタウイルスによる脳症発症の機序を解明する目的で、マウス感染モデルを用い、脳内にロタウイルスを直接接種しウイルスの挙動ならびに病理組織学的所見を解析した。その結果、病理学的所見は観察されなかったものの RRV の脳内での増殖が示唆された。

A. 研究目的

ロタウイルス感染による脳症の発症機序を解明する。

B. 研究方法

ロタウイルス RRV 株を 7-14 日齢マウスに脳内接種し、ウイルスの挙動・増殖をウイルス特異的プライマーを用いた Real-Time RT-PCR により定量的に解析した。接種量は残存ウイルスの検出を抑えるため 1×10^4 PFU/mouse とした。同時に、脳ならびに他の臓器 (脾臓、肝臓、腸管) について病理組織学的所見を解析した。対照として UV で不活化した RRV 株ならびに脳内で増殖しない SA11 株を用いて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験は弘前大学動物実験規程に基づき行った。

C. 研究結果

RRV 株接種マウスでは、1、3、5、7 日目の脳で、ロタウイルスゲノムを検出した。接種 1 日目と比較して 1 週間後には、検出されたゲノム量は約 100 分の 1 に減少した。また、UV で不活化した RRV 株を接種したマウスでは検出されなかった。SA11 株の接種マウスでは、5、7 日目の脳に 33% の割合で検出した。しかし、RRV 株接種個体と比較して、SA11 株接種個体での検出ゲノム量は、約 10 分の 1 であった。他の臓器では、RRV 接種群で脾臓において RRV ゲノム量が 3 日から 5 日かけてピークを示した。いずれのウイルスを接種した脳にも病

理組織学的変化はみられなかった。

D. 考察

接種 RRV 量を 1×10^4 PFU/mouse とし残存ウイルスを検出する可能性を抑え、また、UV 不活化ウイルスと SA11 株を対照としても、RRV 接種の脳内には、単純な残存ウイルスでは説明がつかないウイルスゲノムが存在したことから RRV 株が脳内で増殖する可能性が示唆された。また、脾臓での増殖が見られたことから、マクロファージ系の細胞に取り込まれ増殖する可能性が示唆された。病理組織学的所見は得られなかったことからウイルスがどの細胞で増殖するかさらに検索する必要がある。

E. 結論

ロタウイルス RRV 株は脳内で増殖することが示唆された。

G. 研究発表

論文発表
該当なし

学会発表

ロタウイルスのマウス脳内接種による増殖 中込とよ子、長内理大、Doan Hai Yen、中込 治、中根明夫 第 65 回 日本細菌学会東北支部会総会 2011 年 8 月 20 日 山形

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

狂犬病の疫学と神経病原性に関する研究

マウスモデルを用いた狂犬病ウイルスの体内動態の解析とその病態形成に関する考察

研究分担者:伊藤直人 岐阜大学 応用生物科学部・准教授

研究要旨:狂犬病の病態機序を解明するため、狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株を筋肉内接種したマウスをモデルとして、中枢神経系および全身の諸臓器におけるウイルスの体内動態を経時的・網羅的に解析した。その結果、接種後 5 日目の発症マウスにおいて、脳における感染細胞の増加・分布拡大、ならびに軽度な神経細胞壊死・炎症反応が観察された。さらに、発症マウスの肺、腎臓、心臓などの諸臓器において、RT-PCR 法によりウイルス遺伝子が検出された。潜伏期のマウスではこのような所見は認められないことから、中枢神経系および諸臓器におけるウイルスの分布拡大、ならびに中枢神経系における病変が狂犬病の病態形成に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

狂犬病は、約 100%の致死率を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。その病原体である狂犬病ウイルスは、感染動物の咬傷を介して創傷感染し、末梢神経に感染する。その後、神経回路に依存して脊髄・脳に感染を拡大し、結果として、興奮、痙攣、麻痺などの重篤な神経症状を引き起こす。このような狂犬病ウイルスの高い神経親和性から、狂犬病の病態に関する以前の研究は、主に中枢神経系を対象に行われてきた。

一方で、狂犬病患者の非神経系諸臓器にもウイルスが分布することが知られている。これまで、狂犬病患者の心筋および副腎髄質にウイルス抗原が検出される例や(Tobiume et al, Pathol. Int., 2009)、狂犬病患者の臓器を移植されたレシピエントが本病を発症する事故が報告されている

(Srinivasan et al., N. Engl. J. Med., 2005)。以上のように、中枢神経系に存在するウイルスだけでなく、全身の諸臓器に分布するウイルスも狂犬病の病態に関与している可能性が考えられる。しかし、非神経系諸臓器におけるウイルス分布の報告は、狂犬病患者の剖検例で報告があるのみで、実験動物モデルにおける情報はほとんど存在しない。このような情報の欠如により、狂犬病ウイルスの体内動態と本病の病態の関連性は十分に理解されておらず、本ウイルスの致死性の機序解明の大きな障壁となっている。

そこで本研究では、狂犬病の病態機序を解明することを目標として、狂犬病ウイルス感染マウスの中枢神経系および全身の諸臓器におけるウイルスの体内動態を経時的・網羅的に解析し、病態との関連性を考察した。