

2. カリシウイルス

中田 修二

1. カリシウイルスの特徴

1) カリシウイルスの形態, 大きさ, 遺伝子, 構造蛋白質

カリシウイルスは直径27-35nmの正20面体の小型ウイルスでエンベロープはなく, ゲノムはその3'末端に poly A tail をもつ約7.7kbのプラス鎖の一本鎖RNAである. 構造蛋白質は一種類で分子量は59-62Kdの範囲にある. 電子顕微鏡による観察では, 粒子表面に32個のカップ状の凹みを持ち「ダビデの星」と形容される特徴的な表面構造 (図1:B)が見られるものと, 特徴的なカップ状の凹みが見られないものがある (図1:A).

2) 遺伝子構造 (図2)

カリシウイルス科の中の *Vesivirus* 属と“Norwalk-like viruses”属では遺伝子上に3つの open reading frame (ORF) が存在し, 5'側の ORF 1 上にはウイルスの複製に関与する RNA ポリメラーゼをはじめとする各種非構造蛋白質を code する領域が, 3'側の ORF 2 上には構造蛋白質を code する領域がある. ORF 3 の機能は不明である. 一方, *Lagovirus* 属と“Sapporo-like viruses”属では ORF 1 と ORF 2 が連続して大きな ORF を形成し, 遺伝子上には2つの ORF が存在している.

2. 歴史的背景

1) カリシウイルスと獣医学

カリシウイルス科に属するウイルスは, 1940年代から獣医学の領域で研究が行われてきており, 最近までのプロトタイプはブタ水疱疹ウイルス (Vesicular exanthema of swine virus: VESV) であった. 疾患は水疱疹, 脳炎, 心筋炎, 下痢, 流産などで経済的な問題を引き起こした. その後アシカ (San Miguel sealion virus: SMSV) に皮膚炎,

ネコ (Feline calicivirus: FCV) に気道感染症, 白血球減少症, 下痢, ウサギ (Rabbit hemorrhagic disease virus: RHDV) に全身の出血性病変と肝壊死を引き起こすことが報告されてきた. RHDV 以外は組織培養が可能である.

2) ヒトから検出されるカリシウイルス

1972年に, 米国の小学校における急性胃腸炎の流行からノーウォーク因子が発見され, その後, 数多くの似たような形態を持った粒子が, 電子顕微鏡により世界各地から検出された. それらウイルス様粒子は, ノーウォーク様ウイルスとか small round structured virus (SRSV) などと呼ばれ, 成人・学童の非細菌性食中毒の原因と考えられてきた. 一方, 1974年に, 英国で流行した冬季嘔吐症の患者から発見された古典的カリシウイルスは, 「ダビデの星」と呼ばれる特徴的な表面構造をもつためヒトカリシウイルスとも呼ばれ, 小児期の急性胃腸炎や冬季嘔吐症の原因と考えられてきた. 両者ともに組織培養によるウイルス分離ができないウイルスである.

現在ではそれら2つのウイルスは, それぞれウイルス学的にノーウォークウイルス Norwalk virus (NV) およびサッポロウイルス Sapporo virus (SV) と命名された. また, NV は非細菌性食中毒のみならず乳幼児から成人まで幅広い年齢層における急性胃腸炎の原因でもあることが判明した.

3. カリシウイルス科の分類と遺伝的多様性

1) カリシウイルスの新しい国際分類

1990年に米国の X. Jiang と M. K. Estes らが NV の gene cloning に成功し, RT-PCR 法による遺伝子検出法が確立された. これを契機に, 多くのウイルス株が全遺伝子~部分遺伝子クローニングされ, それまでノーウォーク様ウイルスとか SRSV 呼ばれてきたものの大部分はカリシウイルス科に属し, 遺伝学的にも近縁のウイルス群を形成することが明らかとなった. 一方, 「ダビデの星」と表現されるカリシウイルスに特徴的な表面構造を持ち, 古典的カリシウイルスと呼ばれてきたウイルス群のいくつかの株も遺伝子クローニングされ, カリシウイルス科に属するものの NV とは形態学的のみならず遺伝学的にも異なることが示

札幌医科大学医学部小児科 (〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目)

Calicivirus

Shuji Nakata

Department of Pediatrics, Sapporo Medical University

School of Medicine

S. 1 W. 16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan

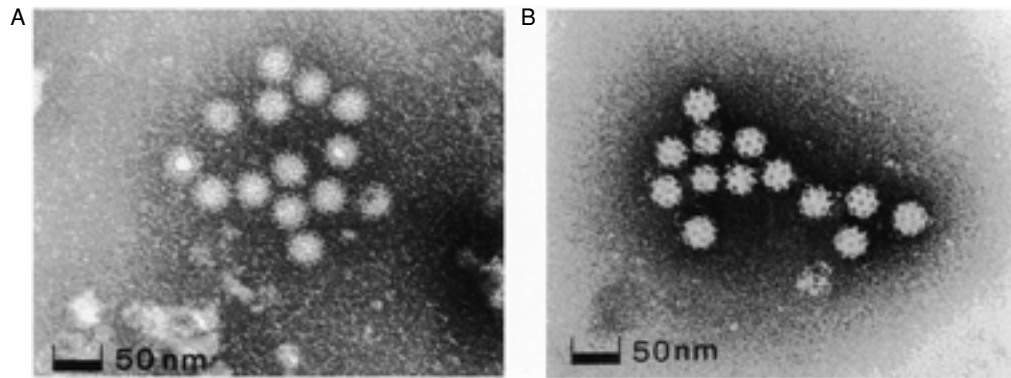


図1 胃腸炎ウイルスの電顕像。

1%PTA (リンタンクステン酸), pH7.0にてネガティブ染色。A: ノーウォークウイルス, 表面構造は不明瞭で“SRSV”(小型球形ウイルス)とも呼ばれてきた, B: サッポロウイルス, “ダビデの星”と形容される典型的な表面構造を示す。

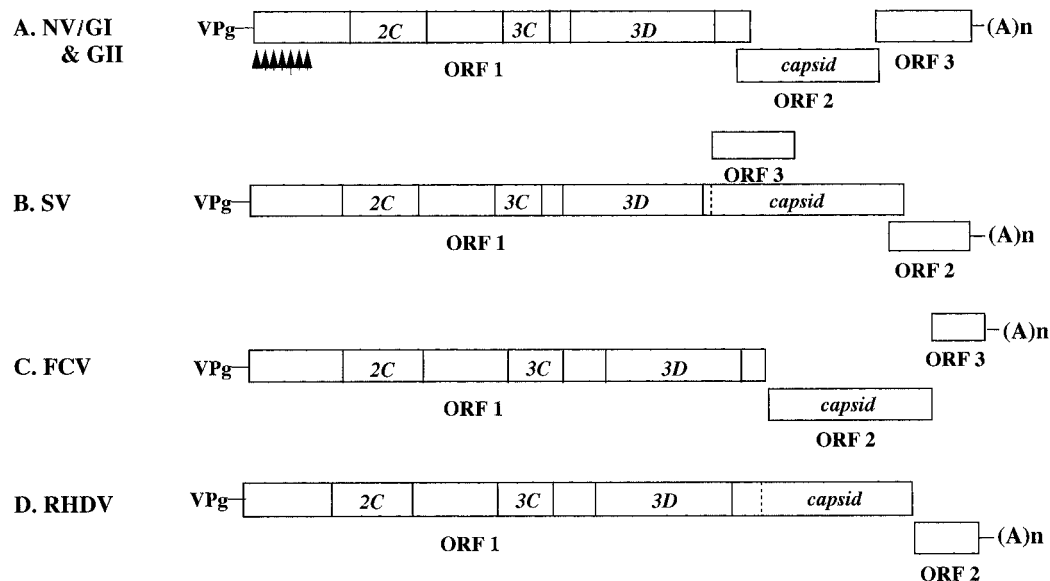


図2 カリシウイルス科に属するウイルスの4つの属の遺伝子構造。

A: Genus NLV は3つのORFからなり, 5'末端側からVPg, 非翻訳領域, ORF 1, ORF 2, ORF 3, 非翻訳領域, ポリ(A)という構造をもつ。ORF 1上には非構造蛋白である2C (helicase), 3C (cysteine protease), 3D (RNA dependent RNA polymerase)が, ORF 2上には構造蛋白を翻訳する領域がある。B: Genus SLVの基本構造はNLVと同じであるが, 2C, 3C, 3D, 構造蛋白が大きなORF 1上にある。ORF 2はNLVのORF 3に相当する。C, D: ネコカリシウイルス (FCV; Genus *Vesivirus*) とウサギカリシウイルス (RHDV; Genus *Lagovirus*) の遺伝子構造。

された。この間、動物由来の多くのカリシウイルスについても遺伝情報が蓄積されてきたことから、カリシウイルス科に所属するウイルスを新たに分類し直すこととなった。

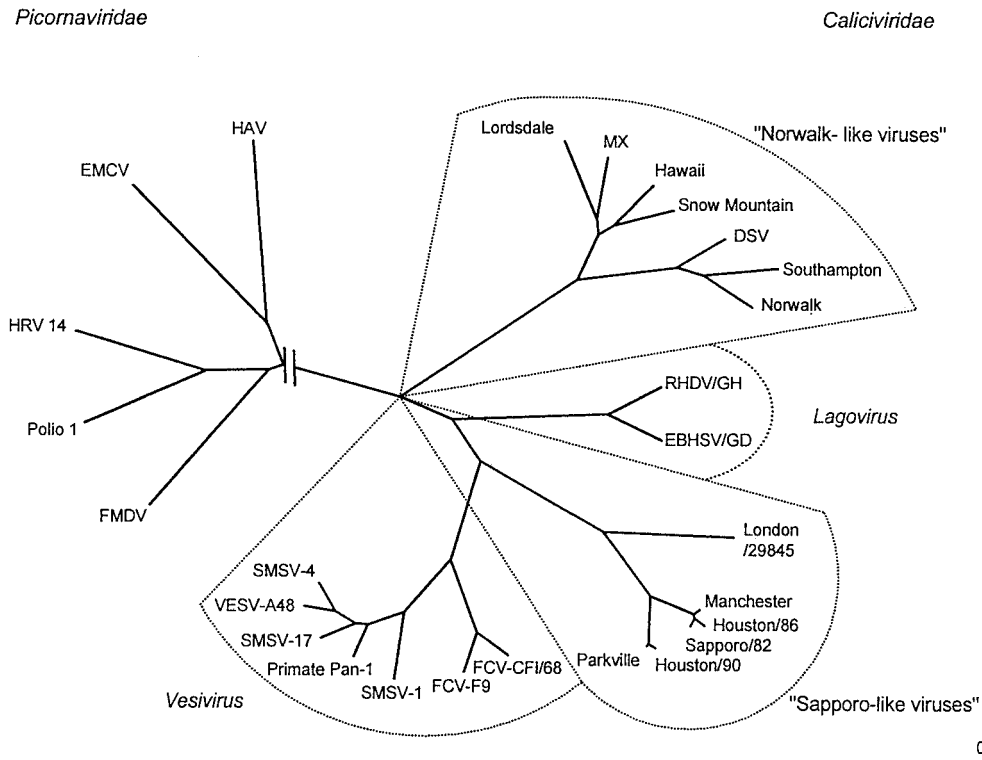
2) 遺伝子レベルで4つの属に分類する

遺伝情報の蓄積にともなって明らかになってきた互いの遺伝学的距離の違いから、カリシウイルス科に所属するウイルスを4つの属に分類することが提案され、1999年8月にシドニーにおいて開催された第11回国際ウイルス学会に

おいて承認された(表1)。すなわち, Family *Caliciviridae* に属するウイルスは, Genus *Vesivirus* (Type species: *Vesicular exanthema of swine virus*), Genus *Lagovirus* (Type species: *Rabbit hemorrhagic disease virus*), “Genus Norwalk-like viruses” (Type species: *Norwalk virus*) と “Genus Sapporo-like viruses” (Type species: *Sapporo virus*) の合計4属に分類されることとなった。ウイルス表記に関する一般的な取り決めでは、種名まではイタリック体で表わし、またそれぞれのウイルス名の略称が決められた。

表1 Taxonomic Structure of the Family (カリシウイルス科の分類)

	Type species (模式種)	
Family (科)	<i>Caliciviridae</i>	
Genus (属)	<i>Lagovirus</i>	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i>
Genus (属)	"Norwalk-like viruses"	<i>Norwalk virus</i>
Genus (属)	"Sapporo-like viruses"	<i>Sapporo virus</i>
Genus (属)	<i>Vesivirus</i>	<i>Vesicular exanthema of swine virus</i>



0.2

図3 構造蛋白質領域の分子系統樹。

カリシウイルスはピコルナウイルスとは大きく異なる。カリシウイルス科は遺伝学的に4つの属に分かれるが、遺伝子レベルで非常に多様性に富むため、それぞれさらにいくつかの遺伝的グループに分かれ、その下に多くの cluster が存在している。(Berke T et al. J Med Virol 52: 419-424, 1997より引用)

0.1

3) どの属においても遺伝学的に多様性に富む (図3)

カリシウイルスは、遺伝学的に異なる4つの属に分かれるため、各ウイルス間の抗原性は大きく異なり、免疫学的な交叉反応も見られない。また、それぞれの属には1つもしくは2つのウイルス種があるが、その中でも抗原性に違いがみられ、免疫学的にも種々の程度の反応性の差がみられる。さらに、遺伝子レベルでも同様に非常に多様性に富み、各ウイルスはそれぞれさらにいくつかの遺伝的 group に分かれ、その下に多くの cluster が存在している。

4. 感度の高いウイルス検出法-1

NV および SV は、組織培養によるウイルス分離法が確立されておらず、また、抗原的に多様性に富むため ELISA 法などの免疫学的方法では検出が難しい。現在、世界的に

広く用いられている検出方法は、NV および SV 遺伝子の一部 (主に RNA ポリメラーゼ領域) を増幅し、その産物を Southern hybridization 法または sequence 解析により同定するものである (図4)。しかし、遺伝的にも多様性に富むため、一組の primer と probe のみでは検出効率は低く、検出感度を上げるためにはいくつかの primer と probe を組み合わせて使用していく必要がある。最近、我が国において構造蛋白質領域を増幅できる primer が作成され、多くの NV が検出可能であることが報告された。

5. 感度の高いウイルス検出法-2

SV は3~4つの genetic group に分かれるが、既存の primer でも3つの genetic group を検出できる。最近、新たに作成した primer を用いた、semi-nested PCR 法によ

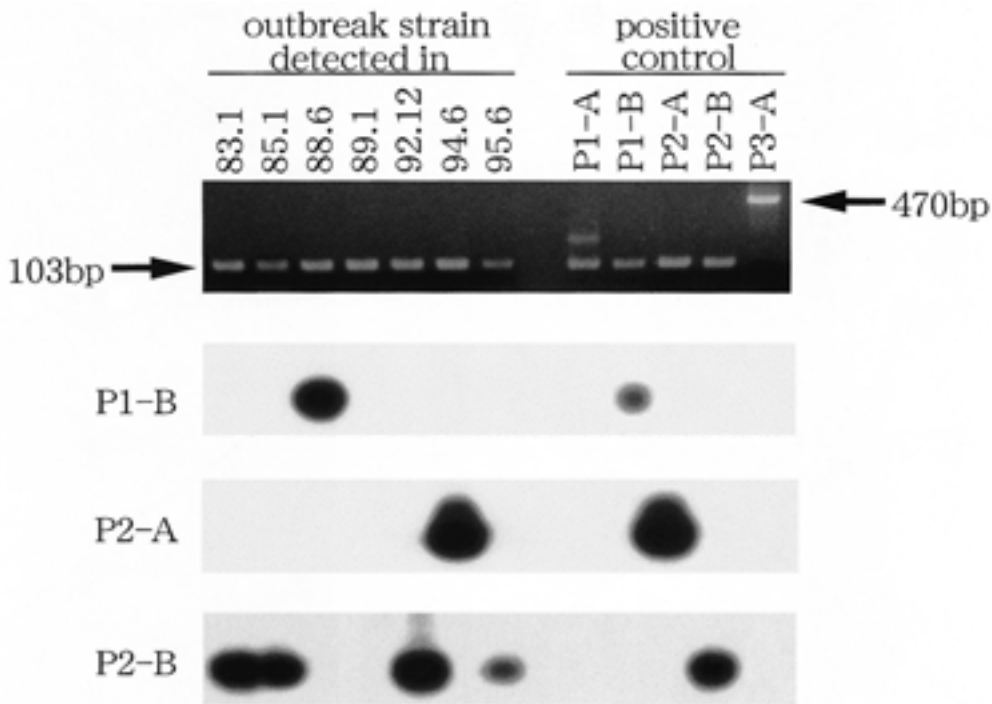


図4 RT-PCR法とSouthern hybridization法によるノーウォークウイルスの検出。
 北海道立中央乳児院における流行例
 1；1983年1月，2；1985年1月，3；1988年6月，4；1989年1月，5；1992年12月，6；1994年6月，7；1995年6月，陽性対照8；P1-A，9；P1-B，10；P2-A，11；P2-B，12；P3-A

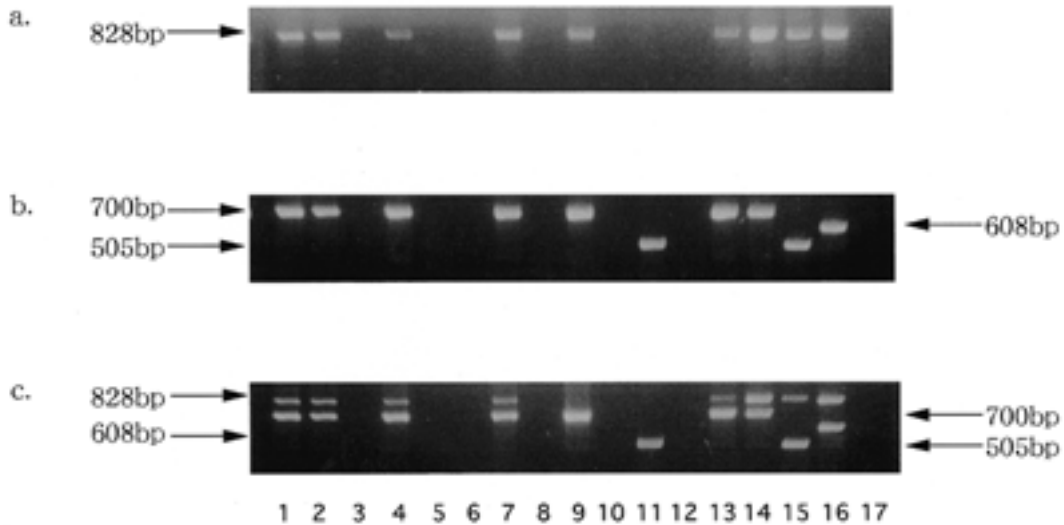


図5 a. RT-PCR法，b. nested PCR法とc. booster nested PCR法によるサッポロウイルスの検出。
 1981年から1995年までの北海道立中央乳児院における流行例。
 1；1981年10月(SV/SV82)，2；1982年10月(SV/SV82)，3；1983年1月(NV/GII/P2B)，4；1985年1月(SV/SV82)，5；1988年6月(NV/GII/P1B)，6；1989年1月(NV/GII/?)，7；1990年11月(SV/SV82)，8；1992年12月(NV/GII/P2B)，9；1993年7月(SV/SV82)，10；1994年6月(NV/GII/P2B)，11；1994年9月(SV/Lond 92)，12；1995年6月(NV/GII/P2A)，13；1995年7月(SV/SV82)，陽性対照14；original SV(SV/SV82)，15；Ta55 strain(SV/Lond 92)，16；Hou/90 strain(SV/PV)，陰性対照17；蒸留水

る高感度のSV検出・同定法が開発された。PCR産物のサイズで遺伝型別ができるため，感度が高いだけでなく判定が容易でもある(図5)。

Southern hybridization法またはsequence解析には，多くの時間も費用もかかるという問題がある。これを解決する方法として，96穴のmicrotiter plateを用いてPCR産

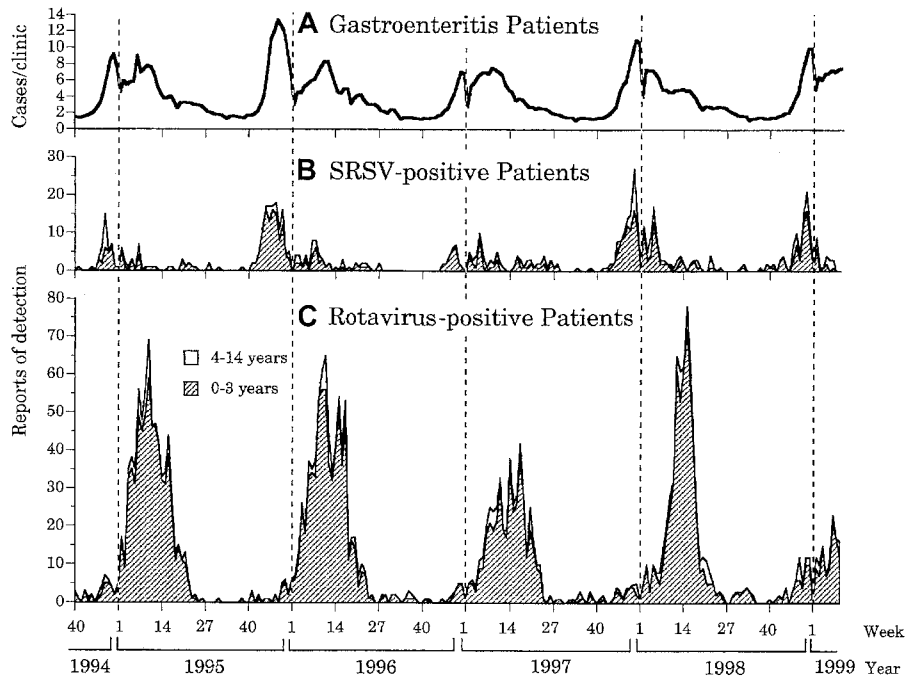


図6 1994年秋から1999年冬にかけての日本におけるウイルス性胃腸炎の発生状況。
A：小児科定点からの胃腸炎の報告数，B：小児科定点からのSRSV≡ノーウォークウイルスの検出数，C：小児科定点からのロタウイルスの検出。(Inouye S et al. J Infect Dis 181 (Suppl. 2) : S270-274, 2000より引用)

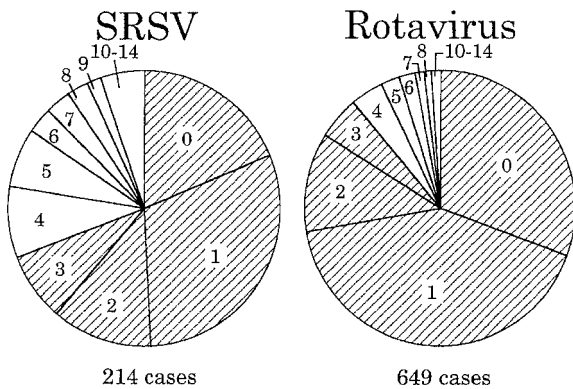


図7 1997年秋から1998年春のシーズンにおけるウイルス性胃腸炎患者の年齢分布。
SRSV≡ノーウォークウイルス。(Inouye S et al. J Infect Dis 181 (Suppl. 2) : S270-274, 2000より引用)

物を同定するPCR-ELISA法が開発された。基本的には、biotin化したprobeまたはPCR産物を、Digoxigeninで標識したPCR産物またはprobeと反応させ、avidinでコーティングしたplateに加え、酵素標識した抗Digoxigenin抗体を反応させ、最後に基質を加えて発色させるものである。その基本原理はhybridization法であり、感度も従来のSouthern hybridization法と変わらないが、多数の検体を短時間で検出・同定するという利点がある。また、従来のSouthern hybridization法は主にPCR産物の見られ

た検体を対象に行っているが、PCR-ELISA法はPCR産物の有無に係わらず全検体を対象にするため、実際の臨床検体を検査していくと検出頻度が高まる。

6. 日本におけるNV胃腸炎の発生動向

NVおよびSVは、かつてはその検出頻度は低くまた臨床的重要性もそれほど高くないと考えられてきた。しかし、近年、前述のような感度の高い分子生物学的検出法が導入されたことにより、医療レベルのみならず公衆衛生レベルでの重要性が明らかとなってきた。

季節性で見ると、11～12月と2～3月に急性胃腸炎患者の発生のピークが見られるが、前者が主にNV、後者が主にロタウイルスによるものと考えられている(図6)。これらは食中毒ではなく、ヒト-ヒト感染による散発性の急性胃腸炎と考えられる。NVは年長児～学童に見られるウイルス性胃腸炎の主要原因であるが、3才までの乳幼児においてもロタウイルスに次いで多く検出される(図7)。SV胃腸炎は主に乳幼児に見られるが、成人にも食中毒関連で見られることがある。特別な遺伝型のものに関与しているのか、今後の検索が必要である。

7. ウイルス性胃腸炎の集団発生の大部分はNVが原因

日本の国立感染症研究所と各地の衛生研究所の共同で、日本全国の食品媒介非細菌性胃腸炎(ウイルス性食中毒)の原因ウイルス調査が行われた。その原因の大部分はNV

表2 Immunogenicity of recombinant Norwalk virus (rNV) administered orally to mice and humans.

Immunogen	Given to	Route	Dose (μ g)	Adjuvant	% positive responders	
					Serum antibody	Fecal IgA
rNV from baculovirus	Mice	Oral gavage	≥ 200	None	100	40
rNV from baculovirus	Mice	Oral gavage	≥ 200	CT	100	88
rNV from baculovirus	Mice	Intranasal	25	None	100	100
rNV from baculovirus	Mice	Intranasal	25	LT	100	100
rNV from potato	Mice	Oral as food	50	None	40	10
rNV from potato	Mice	Oral as food	45	CT	70	0
rNV from baculovirus	Humans	Oral in water	>200	None	100	Rarely detected

NOTE. CT = cholera toxin, LT = *Escherichia coli* heat labile toxin.

Estes MK et al. J Infect Dis 181 (Suppl. 2) : S367-373, 2000より引用

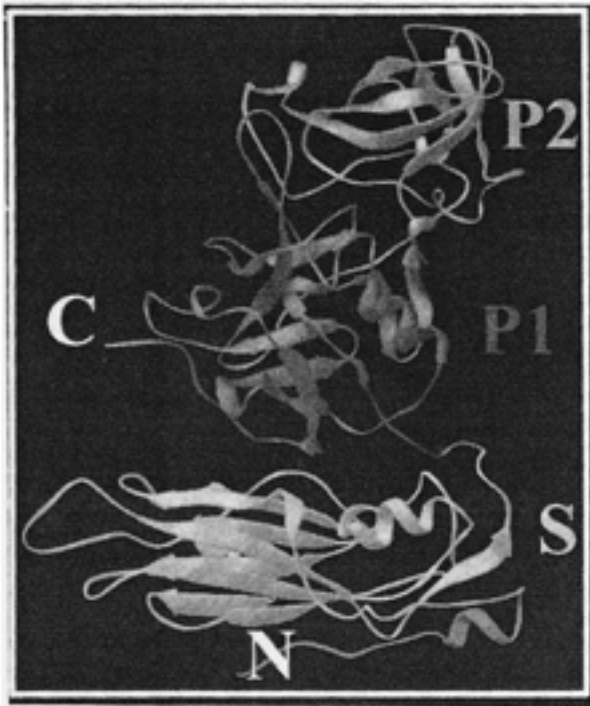


図8 rNV 構造蛋白質の X 線結晶構造解析.

構造蛋白質は、粒子表面を構成する a shell (S) domain と突起を構成する a protruding (P) domain に分かれ、P domain は P 1 subdomain と P 2 subdomain から成る。(Prasad BVV et al. J Infect Dis 181 (Suppl. 2) : S317-321, 2000より引用)

によるものと考えられている。好発季節は11月から3月にかけての秋～冬である。原因食品は生カキの生食が最も多く、他に魚介類、給食、仕出し弁当などが報告されている。患者が50人以上の大規模な集団発生のほとんどは学校、レストラン、パンケット、幼児施設、老人施設で発生し、種々の食品と関連するとされる。学校や施設においては食中毒ではなくヒト-ヒト感染による場合もある。一方、患者が20人未満の小規模な集団発生のほとんどはレストランで発生し、多くは生カキの生食と関連するとされる。

8. Baculovirus 蛋白発現系による rNVLP の作成： サブユニットワクチン

バキュロウイルス蛋白発現系を用いて NV の構造蛋白を発現させ濃縮して、直径38nm の中空のウイルス粒子を形成した (recombinant Norwalk virus-like particles : rNVLPs)。実際の NV の empty particle と形態学的のみならず、物理化学的性質も同様で強酸にも抵抗性であった。この rNVLPs をマウスに経口投与すると、血清抗体のみならず腸管の局所免疫も産生するという結果が得られた (表2)。ヒトの志願者試験では血清ならびに腸管免疫を獲得することが判明している。今後、ヒトの志願者試験においてその感染防御効果が明らかになることと思われる。

NV の構造蛋白をコードする遺伝子を、ポテトやタバコなどの植物に取り込ませて形質転換を行った (Transgenic plants による食物ワクチン)。この方法の利点は、日々の食事をおとして自然に免疫を獲得させうることと、ワクチンの温度管理や接種率を高める必要がなくなることである。rNVLPs ポテトを投与された志願者では、血清中の NV 特異的 IgG 抗体と IgM 抗体が併せて35%に見られた。糞便中の NV 特異的 IgA 抗体も30%に見られ、かつ95%が NV 特異的 IgA 抗体分泌細胞の増加を示したことから、その感染防御効果が期待される。

9. rNVLP の結晶化と X 線結晶構造解析

Baculovirus 蛋白発現系により rNVLP および rSVLP が作成され、種々の研究に応用されている。特に、rNVLP は結晶化され結晶構造解析がなされている。即ち、rNVLP の構造蛋白質は、粒子表面を構成する a shell (S) domain と突起を構成する a protruding (P) domain に分かれ、後者は S domain に近い部位である P 1 subdomain と最外側の P 2 subdomain から成る (図8)。P 2 subdomain は highly variable region であり、そこにウイルスの中和 epitope が存在すると考えられており、また、host specificity と関連

する可能性が示唆されている。こういった研究成果は、今後行われるであろうウイルスの構造と機能の関連を検討しうる変異解析の基礎となるものである。

10. NV, SV 研究の問題点と将来の展望

1) 問題点

NV および SV 研究の問題点としては、組織培養によるウイルス分離法が確立されていないこと、動物モデルがないため感染防御機構の解明が難しいこと、抗原的にも遺伝

的にも多様性に富むため簡便なウイルス検出系がないこと、などが挙げられる。

2) 将来の展望

将来の展望としては、分子生物学的手法による様々な機能解析、ウイルスレセプターの解明および培養系の確立と感染防御機構の解明が重要課題であり、それらの結果を基に、ワクチン開発や抗ウイルス剤の開発が進められるであろう。