

## 22. レオウイルス

### —口タウイルスの多様性とそれに対応した感染防御—

谷口 孝喜

#### 1. はじめに

レオウイルスは、呼吸器および腸管から分離されたが明確な病気との関連が不明であるウイルス、つまり、Respiratory, Enteric, Orphan virusesの頭文字をつなぎあわせた Reovirus にその名の由来がある。レオウイルス科には、このレオウイルスに加え、未分類のアルボウイルスであったオルビウイルスそして、1973年に乳幼児嘔吐下痢症の病原体として発見された口タウイルスを主要メンバーとする。他に、レオウイルス科に属するウイルスは、ヒトを含めた哺乳動物のみならず、鳥類、魚類、昆虫、植物に広く存在し、現在では9属に分類される。ここでは、開発途上国を中心に約87万人の乳幼児の死亡の病原体であり、先進国でもほぼすべての乳幼児が感染・発症し、医療経済的観点からも重視されている口タウイルスについてまとめる。

#### 2. 口タウイルスとは

口タウイルスは、かつて小児仮性コレラ、白痢（米とき汁様の白色の下痢便を呈するため）とも呼ばれた冬季乳幼児嘔吐下痢症の病因ウイルスである。下痢症を起こすウイルスとして、現在ではさまざまな種類のウイルスが報告されているが、口タウイルスが最も主要な下痢症ウイルスである<sup>1)</sup>。最も高頻度に検出され最も重症の下痢を呈する A 群以外に、B 群～F 群が存在する。B 群は、中国、インド、そしてバングラデシュとその分布に拡がりを見せているが、成人に下痢症例が多い。C 群は乳幼児・学童で検出され、集団発生例が多い。E 群はブタで、D、F 群はトリの

みで検出されている。

ウイルス発見以来、約30年が経過しウイルス蛋白質・遺伝子の性状、増殖過程、生態がほぼ明らかにされた。その成果をもとに、ワクチンの開発研究が進行し1998年に世界初のワクチンが米国で認可され、150万ドースの大規模な投与が行われた。しかし、腸重積という重篤な副作用の可能性のためわずか1年足らずで中止となった<sup>2)</sup>。こうして、先進国、開発途上国を問わず、3歳以下の乳幼児のほぼ100%が本ウイルスに感染し発症している現状に変化はない。

#### 2-1. 粒子構造

口タウイルスの名は、車輪の意をもつラテン語 *rota* に由来し、粒子を電子顕微鏡で観察すると、車輪状の形態が特徴的である。正20面体構造で、三層から構成される。最内層のコアは VP 1, VP 2, VP 3 からなり、VP 6 (三量体) が結合して一重殻粒子を形成し、さらに糖蛋白質 VP 7 と VP 4 の外層蛋白質で覆われ二重殻粒子つまり感染性粒子となる。VP 7 (三量体として780個) は平滑な粒子表面を形成し、VP 4 は二量体構造をとり、10~12nm の長さの60個のスパイクを構成し細胞レセプターと結合する<sup>3)</sup>。

#### 2-2. 遺伝子と蛋白質

口タウイルスは11本の分節した2本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして有する。各 RNA セグメントは一部の例外を除きモノシストロニックであり、上述の6種の構造蛋白と5種の非構造蛋白(NSP 1~NSP 5)をコードしている。これまでに、サル由来 SA11株、ヒト由来 KU 株、およびトリ由来 PO-13株のゲノムの全塩基配列が決定され、総塩基数およびコードアミノ酸数は、それぞれ、18522, 18505 および18845塩基対からなる。口タウイルスのゲノムは、ポリアクリルアミド電気泳動法 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) で特徴的な RNA パターンを示すが、各 RNA セグメントの移動度はウイルス株によりかなり異なる。従って、RNA パターンを比較することで、流

藤田保健衛生大学医学部・ウイルス・寄生虫学教室  
(〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98)

Reovirus

Diversity of rotavirus and protection against rotavirus infection

Koki Taniguchi

Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

TEL: 0562-93-2467

行株の同定、伝播経路の特定などの疫学調査が可能である。

ロタウイルスのRNA合成過程は、dsRNAの(-)鎖RNAを鋳型とした(+)鎖mRNAの保存的な合成(転写)とmRNAを鋳型とした(-)鎖RNAの合成を経たdsRNAの生成(複製)の2段階の過程を、前者は一重殻粒子内で、後者はコア内で行っている。転写で合成されたmRNAがウイルス蛋白質の翻訳に供されるとともに、dsRNAの鋳型になる。

### 2-3. 抗原性

VP6はサブグループ特異性を有し、サブグループIとIIがある。VP7とVP4には独立した中和抗原があり、それぞれGタイプ(GlycoproteinのG)とPタイプ(Protease-sensitiveのP)を規定する。VP7の免疫原性ははるかに強く、一般にビリオンの抗原性はGタイプに一致する。これまで15種のGタイプが検出されているが、ヒトではG1~G4が主要である。最近、動物にのみ知られていたGタイプをもつヒトロタウイルスが続々と発見されるにいたりヒトでは10種報告されている。また、G9、G10がインドで、G5がブラジルで、G12がフィリピンそしてタイで検出されるなど、地域特異的な分布もみられる。Pタイプは血清学的分類により13種が報告されているが、血清学的タイピングが技術上困難であるため、塩基配列からの分類(VP4遺伝子型)も併用されており、これまでに21種知られている。後述するリアソートメントにより、GタイプとPタイプの組み合わせは多様であるが、世界的にG1-P1Aの検出頻度が最も高い。表1にロタウイルスの多様な血清型をまとめた。

## 3. ロタウイルス遺伝子の多様性

RNAパターンの解析と塩基配列決定により、ゲノムの多様性が明らかとなっている。この多様性は、同じく分節した遺伝子を有するインフルエンザウイルスなどと同様に、点変異の蓄積、リアソートメント(再集合あるいは組換え)、およびリアレンジメント(再編成)の3種の機構によって生じているものと思われる。

### 3-1. 点変異の蓄積

一流行期間中に分離されたロタウイルス株を経時的に検討すると、点変異が蓄積していく過程が観察される。しかし、*in vitro*でも*in vivo*でもどの程度の頻度で塩基置換が生じているかの精確な算定はいまだなされておらず、中和単クローン抗体存在下で、約 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ の頻度で抵抗性の変異株が得られることから、他のRNAウイルスと同程度の変異であろうと推測されているのみである。抗体による選択圧力がかかる外層蛋白質コード遺伝子の変異率は高く、抗体による選択を受けづらく構造維持に重要な内部蛋白や、増

殖過程での機能を担う非構造蛋白質の変異率は小さいと予想される。SA11株とKU株のアミノ酸配列の比較でも、VP4とVP7は70%台の低い相同性を示し、VP2とVP6は90%以上の高い相同性を、非構造蛋白質は、異常な低値を示すNSP1を除き、80%台の相同性を示した。

### 3-2. リアソートメント

1個の細胞に2株以上のウイルスが同時感染すると、分節RNAの交換(リアソートメント)が起きたさまざまな遺伝子組換え体(リアソータント)が比較的高率に生じる。特に、ウイルス株の遺伝的関連性が高いほどより高率に生じ、組み合わせによっては約50%のウイルスがリアソータントとなる。マウスを用いた感染系でも、感染後12時間で25%が、72-96時間で80-100%がリアソータントとなる。各分節RNAの組換えは、一般にランダムであるが、特定のRNAセグメントについては、常に共になる傾向もある。自然界でも頻度は低いがリアソートメントが起きており、リアソータント株の検出の報告は多い。特に、開発途上国では、栄養不良のため免疫能が弱く、また異種動物間での接触を含めた濃厚な感染もあり、リアソートメントが起きやすいと考えられる。バングラデシュでは、洪水の後、成人も含めロタウイルス感染例が顕著に増加し、複数の異なるロタウイルス株に同時感染したと思われる例が相当数みられた。こうした状況がリアソートメント形成の条件を整えていると考えられる。今後、インフルエンザにみられるように、リアソートメントによってより深刻な大流行を起こす株が出現する可能性は否定できない。代表的なヒトロタウイルスWa株とAU-1株の間のリアソートメントによって生じたと考えられるK8株が小中学校に集団発生を起こしたり、フィリピンで、G12のL26株(由来は不明であるが、リアソータント株である)が主要な流行株になった例もある。同じくリアソータントと思われるG5、タイで新たに検出されたG12のT152株などの各セグメントの由来を調査するのは興味深い。

こうしたリアソートメントは、現在進行形で生じているとともに、これまでの分離株の中には、進化の過程でリアソートメントを起こして形成されたと考えられる株がかなりある。ヒトロタウイルスでいうと、G1-サブグループII-long RNAの組み合わせを有する株はブタロタウイルスと、G2-サブグループI-short RNAの株はウシロタウイルスと、G3-サブグループI-long RNAの株はネコロタウイルスと関連があることが示されている。

### 3-3. リアレンジメント

PAGEを行うと、あるRNAが通常的位置になく、異常に速くあるいは遅く移動する場合がある。最初、こうした例は、immunocompromized な子供の感染例で観察されたが、その後、免疫能が正常なヒト、あるいは、ブタ、ウシ、

表1 ロタウイルスの血清型

VP 4 遺伝子型	ロタウイルス株	G 血清型	P 血清型	宿主
1	NCDV	G 6	P 6	ウシ
	A 5	G 8	*	ウシ
2	SA11 (4 FEM, 4 F, 4 fM)	G 3	P 6	(サル)
	SA11 (4 SEM, TN-L 2, TN-S 1)	G 3	*	サル
3	RRV	G 3	P 5	サル
	K 9, CU-1	G 3	*	イス
	Cat97	G 3	*	ネコ
4	HCR 3	G 3	*	ヒト
	DS-1, RV-5, S 2	G 2	P 1 B	ヒト
5	L26	G12	*	ヒト
	UK, B641	G 6	P 7	ウシ
6	61A	G10	*	ウシ
	M37	G 1	P 2 A	ヒト
	1076	G 2	P 2 A	ヒト
	McN13	G 3	P 2 A	ヒト
	ST-3	G 4	P 2 A	ヒト
7	Gottfried	G 4	P 2 B	ブタ
	OSU	G 5	P 9	ブタ
8	YM	G11	P 9	ブタ
	KU, Wa	G 1	P 1 A	ヒト
	P, YO	G 3	P 1 A	ヒト
	VA70	G 4	P 1 A	ヒト
	IAL28	G 5	P 1 A	ヒト
	WI61	G 9	P 1 A	ヒト
9	K 8	G 1	P 3 A	ヒト
	AU-1	G 3	P 3 A	ヒト
	Cat 2, FRV-1	G 3	*	ネコ
10	69M	G 8	P 4	ヒト
11	B223, A44, KK 3	G10	P 8	ウシ
	116E	G 9	P 8	ヒト
	I321	G10	P 8	ヒト
12	H 2, FI14	G 3	*	ウマ
	FI23	G14	*	ウマ
13	MDR13	G 3	*	ブタ
14	Mc35	G10	P 3 B	ヒト
	PA169	G 6	*	ヒト
	HAL1166	G 8	*	ヒト
15	Lp14	G10	*	ヒツジ
16	EB, EW	G 3	P10	マウス
17	993/83	G 7	*	ウシ
	P 0-13	G 7	*	ハト
18	L338	G13	*	ウマ
19	4 F	G 3	*	ブタ
	Mc345	G 9	P11	ヒト
20	EHP	G 3	*	マウス
21	Hg18	G15	*	ウシ

\*未決定. P 血清型は, 血清学的方法で VP 4 の型別がなされた場合にのみ使用し, VP 4 遺伝子型は, VP 4 のアミノ酸配列の相同性が89%以下の場合に便宜上使用する.

ヒトロタウイルスは太字で示した.

ウサギなどの動物でも検出されている. *in vitro* では, 高い moi で感染させたり, 重感染させると生じやすい. 特に, 非構造蛋白 (なかでも NSP 5) に多く見られる. リアレンジメント (rearrangement) は部分的な ORF の重複や欠失, 由来不明の塩基の挿入によるが, リアレンジメ

ントを起こしたいずれの株でも, 5' および 3' 末端は保存されている. 重複, 挿入の例では, ウイルスの感染性に関係なく, 2000塩基は余分にパッケージされるようである. Rearranged 遺伝子の解析は, ロタウイルスの複製過程の解明, ウイルス蛋白質の機能を探るうえで意義深い<sup>4)</sup>.

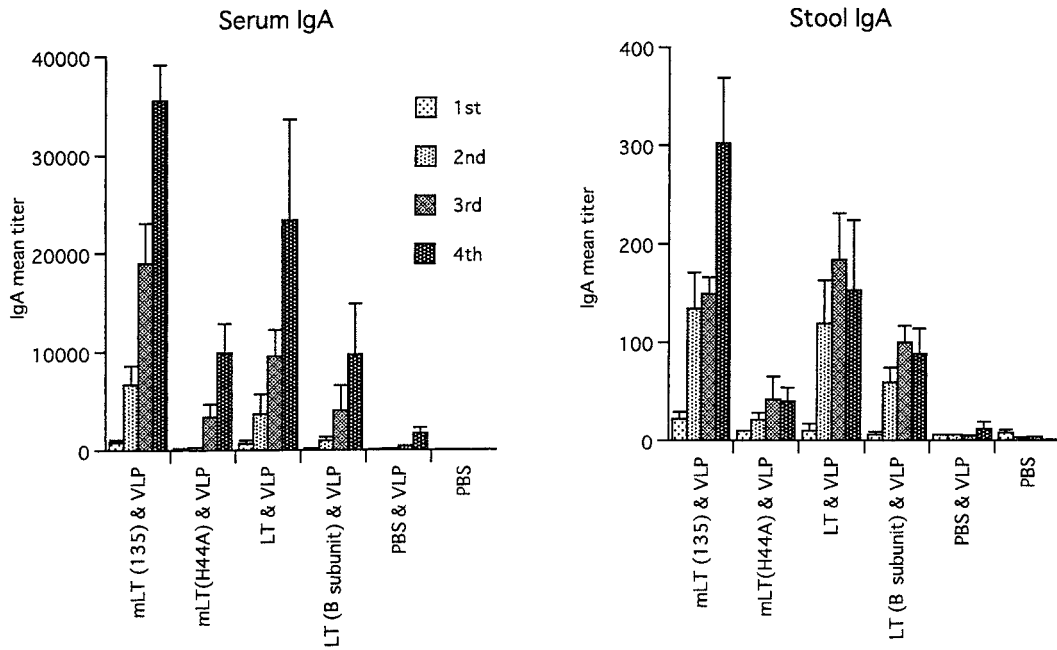


図1 ヒトロタウイルス人工空粒子 (VP 2/6) と各種粘膜アジュバントを鼻腔内免疫したマウスで観察された血中および便中での IgA 産生 (Wu et al: 投稿準備中)

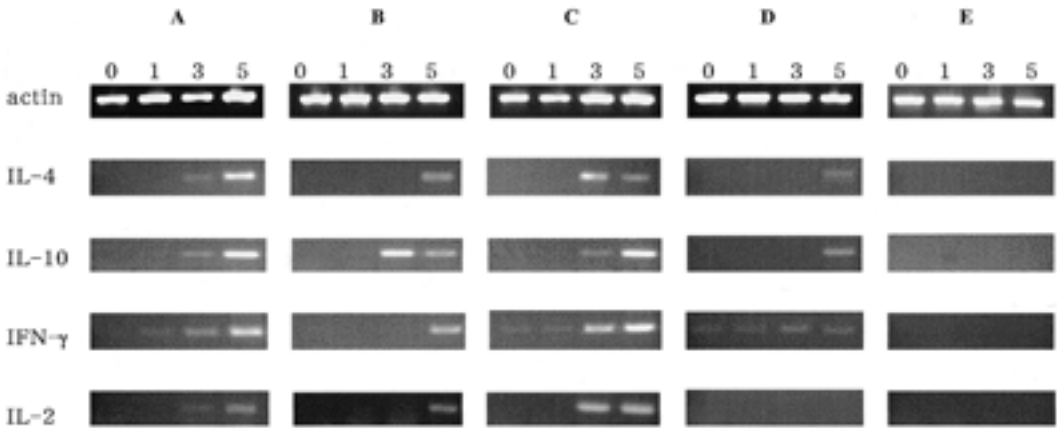


図2 免疫マウス由来脾細胞に対する *in vitro* 再刺激後のサイトカイン mRNA の発現 (Chen et al: 投稿準備中)

経鼻免疫後のマウスより調製した脾細胞をヒトロタウイルス KU 株株で刺激し, 0, 1, 3, 5 日後での Th1 系サイトカイン (IFN-γ, IL-2) と Th2 系サイトカイン (IL-4, IL-10) に対する mRNA を RT-PCR で検出した。

A: VP 2/6-VLPs+LT, B: VP 2/6-VLPs+mLT (H44A), C: VP 2/6-VLPs+mLT (135), D: VP 2/6, and E: PBS.

#### 4. 多様なロタウイルスに対する感染防御

こうして, ロタウイルスは多様であるが, この感染防御はいかに進めるべきであろうか. ワクチンが有効な感染症は一般に血清型も少なく, また抗原変異も少ない. 翻って, 変異しやすく多様な血清 (抗原) 型を有するウイルスに対する防御はむずかしい. インフルエンザウイルス, エイズウイルス, ライノウイルス, C 型肝炎ウイルスなどはその好例である. 一つの戦略は, 交叉反応性のエピトープを利

用する方法である.

##### 4-1. ロタウイルス内部構造蛋白質の発現—人工空粒子の生成

多くの研究室では, 扱いの容易なサルあるいはウシ由来のウイルス株が研究材料として使用されている. しかし, ヒトロタウイルスと動物ロタウイルスの間には, レセプター, 抗原性, 病原性その他に大きな差異がある. 感染免疫, 感染防御の実験には, ヒトロタウイルスを用いて行うこと

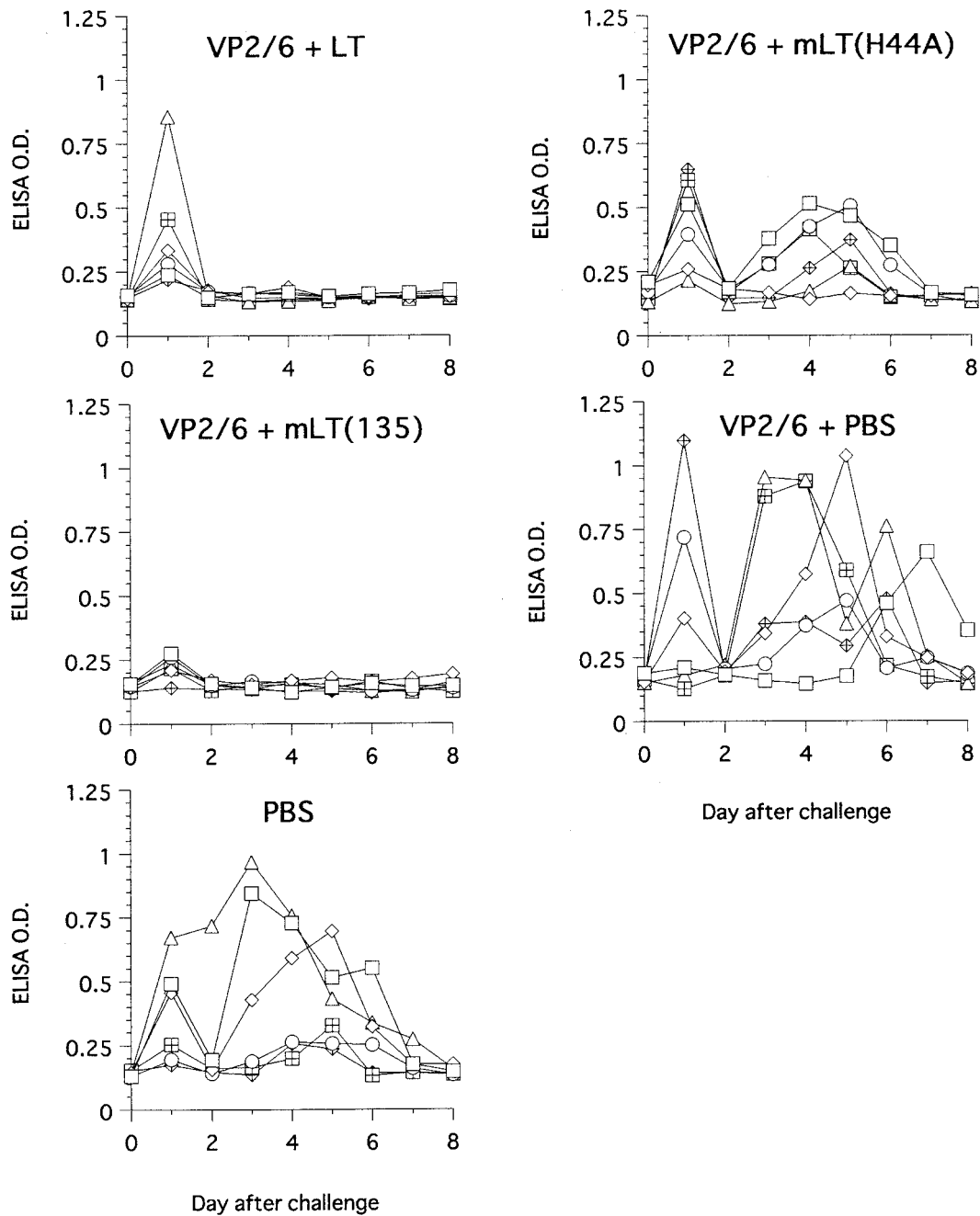


図3 ヒトロタウイルス人工空粒子 (VP2/6) と各種粘膜アジュバントを鼻腔内免疫したマウスにマウスロタウイルス EW 株で攻撃後の便中のロタウイルス排泄量 (Wu et al: 投稿準備中)

が好ましい。そこでヒトロタウイルス KU 株 (G1, P1A) を用いて、すべての構造蛋白質 (VP1~VP4, VP6, VP7) をバキュロウイルス発現系を用いて発現させた。VP2 と VP6 あるいは VP2, VP6 と VP7 の共発現により、1 重殻粒子 (VP2/6) あるいは粒子表面の滑らかな 2 重殻粒子 (VP2/6/7) の人工自己集合空粒子を得た (谷口ら: 投稿準備中)。また、これまでマウス感染実験においては、マウス、サル由来の動物ロタウイルス株ある

いは G3 のヒトロタウイルスを利用して行われてきた。しかし、異なる G 血清型を有する多数のヒトロタウイルスを用いて乳のみマウスの経口感染実験を行った結果、G2 を除き G1, G3, G4, G8, G9, G12 のヒトロタウイルスでも  $DD_{50}$  は高いものの明らかに下痢を誘発することを確認した (Wu et al; 投稿準備中)。こうして、人工空粒子の免疫による乳のみマウスを用いたヒトロタウイルスの感染防御実験が可能となった。

#### 4-2. 粘膜アジュバントの併用による人工空粒子の鼻腔内接種による感染防御

粘膜アジュバントとして、野生型大腸菌易熱性毒素LT, 組み換え型Bサブユニットおよびトキシン活性がほとんどない変異型H44A (Aサブユニットのアミノ酸No. 44のHisがAlaに置換)と変異型135 (Aサブユニットのアミノ酸No. 192-194が欠失)を使用し, 8週齢雌マウスにVP2/6粒子と各アジュバントの混合液を鼻腔内接種した。その結果, 人工粒子VP2/6のみの経鼻接種では免疫原性がきわめて弱かったが, 粘膜アジュバント, 特に変異型135の併用では, 血清および便中のIgG, IgA応答が顕著に高かった(図1, Wu et al:投稿準備中)。さらに, CTL活性も確認した(Chen et al:投稿準備中)。これらを裏付けるようにTh1およびTh2関連のサイトカインmRNAの顕著な増加も確認した(図2)。この免疫マウスに強毒マウスロタウイルスEW株を投与すると, 便中排泄ウイルス量が著減した(図3)。VP2/VP6には中和エピトープは存在しないので, 感染防御の成立は主としてCTLによるものと推測された。人工空粒子を免疫原とした場合, 粘膜アジュバント, 特に毒性のきわめて低い変異型LTの有用性を示した点は, 今後の本アジュバントのヒトへの応用の可能性を示した点で意義がある。一方, 免疫マウスから出生した乳のみマウスに対する動物およびヒト由来ロタウイルスに対する受動免疫は成立しなかった(Wu et al:投稿準備中)。VP2/6/7粒子を免疫原として利用する必要がある。

#### 5. おわりに

莫大な研究費と人員を導入して開発されたロタウイルスワクチンは, 事実上使用不能の結果となったことから判断できるように, ロタウイルスワクチンの開発は困難をきわめている。現在, ウシロタウイルスUK株やWC3株とヒトロタウイルスとのリアソータントワクチン, ジャガイモにVP6を発現した食べるワクチン, DNAワクチンなどが開発途上であるが, 今一度, 感染免疫を含めた基礎的な研究の必要も認識される。ロタウイルスワクチンの開発研究の他に, 今後解明されなければならない課題は多い。ロタウイルスを含めたレオウイルス科に属するウイルスのいずれでもいまだリバースジェネテックスの系が確立されていない<sup>5)</sup>。ただ, 2本あるいは3本の二本鎖RNAをゲ

ノムとしてもつビルナウイルス(birnavirus)あるいはφ6ファージでは確立されているので, その可能性は十分にあり得る<sup>6)</sup>。病態生理についても, SA11-マウス系でみられるエンテロトキシンとしてのNSP4の普遍性やレセプターの性状も混沌としている<sup>7,8)</sup>。また, 下痢や嘔吐といった胃腸炎以外のさまざまな疾患(脳炎, 脳症, 糖尿病, 胆道閉鎖など)とロタウイルス感染との関連も興味ある課題である<sup>9,10)</sup>。

#### 文 献

- 1) 谷口孝喜 (1998) 下痢症ウイルスについて。感染・炎症・免疫 **28**, 216-226.
- 2) 谷口孝喜 (1999) ロタウイルスとロタウイルスワクチン。臨床とウイルス **27**, 271-282.
- 3) Prasad, B. V. B., Burns, J. W., Marietta, E., Estes, M. K. and Chiu, W. (1990) Localization of VP 4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* **343**, 476-479.
- 4) Desselbeger, U. (1996) Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* **46**, 69-95.
- 5) Chen, D., Zheng, Q.-Y., Wentz, M., Gorziglia, M., Estes, M. K. and Ramig, R. F. (1994) Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* **68**, 7030-7039.
- 6) Qiao, X., Qiao, J. and Mindich, L. (1997) Stoichiometric packaging of the three genomic segments of double-stranded RNA bacteriophage φ6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4074-4079.
- 7) Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q. Y., Morris, A. P., Estes, M. K. (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272**, 101-104.
- 8) Hoshino, Y., Saif, L. J., Kang, S. Y., Sereno, M. M., Chen, W. K. and Kapikian, A. Z. (1995) Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* **209**, 274-280.
- 9) Honeyman, M. C., Stone, N. L. and Harrison, L. C. (1998) T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol. Med.* **4**, 231-239.
- 10) Petersen C, Grasshoff S, and Luciano L. (1998) Diverse morphology of biliary atresia in an animal model. *J. Hepatol.* **28**, 603-607