

最終講義

国際保健としての感染症および母子保健

牛島廣治

平成19年3月9日

東京大学医学部本館大講堂

「‡:このマークが付してある著作物は、第三者が有する著作物ですので、同著作物の再使用、同著作物の二次的著作物の創作等については、著作権者より直接使用許諾を得る必要があります。引用情報のない図版は、講演者の有する著作物の中から引用されたものです。」

学生時代

・駒場 (1965-1967、昭和40-42)

・本郷 (1967-1972、昭和42-47)

臨床医として と 同時に 研究 (1972-1987)

・東京大学 附属病院 小児科 神経、免疫

・東京都 築地産院 新生児科 新生児、免疫

・東京通信病院 小児科 感染症

・帝京大学病院 小児科 感染症(ウイルス)、免疫、神経
東京厚生年金病院

(1)ビリルビンの細胞毒性についてー中枢神経細胞と末梢白血球の形態、機能の変化の相関性についてー (論文博士)1977
新生児の核黄疸の予知を目的として、市販のビリルビンを用いて末梢血の好中球のviabilityやphagocytosisの機能を顕微鏡下で見た。また培養神経細胞でもviabilityを観察し、相関性を見た。

(2) Disorder of Subpopulation of lymphocytes in Prader-Willi Syndrome -5症例のまとめ- 1978

- a. 相対的なT細胞の減少 (5%-33%)と相対的なB細胞の増加
- b. 上記の傾向が強いほど、易感染の傾向と発達の遅滞が見られた。
- c. 免疫グロブリン値はむしろ高い
- d. 9ヶ月の症例はインフルエンザBに感染し、Reye症候群で死亡した。

(3)The progress of adrenoleukodystrophy as revealed by auditory evoked responses and brainstem history 1980

聴性誘発反応、聴覚脳幹反応:聴覚からの刺激反応で脳幹部まで病変をみた。
2年間の経過を見ると、末梢から中枢へ病変が進んでいるのが継時的に記録された。

米国アラバマ大学微生物学部 ブニヤウイルス (1979–1981)

国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所) 1987–1993

外来性ウイルス室、エイズウイルス室、腸内ウイルス室

国際感染症ウイルス、エイズウイルス、ポリオウイルス、

下痢症ウイルスの研究

国立公衆衛生院衛生微生物学部 1993–1995

研修、下痢症ウイルスの研究

東京大学医学部健康科学・看護学科 1995–2007

東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻

国際生物医学講座発達医科学分野

教育、ウイルス性下痢症、エイズ他、国際母子保健学

米国留学中で、、、、、

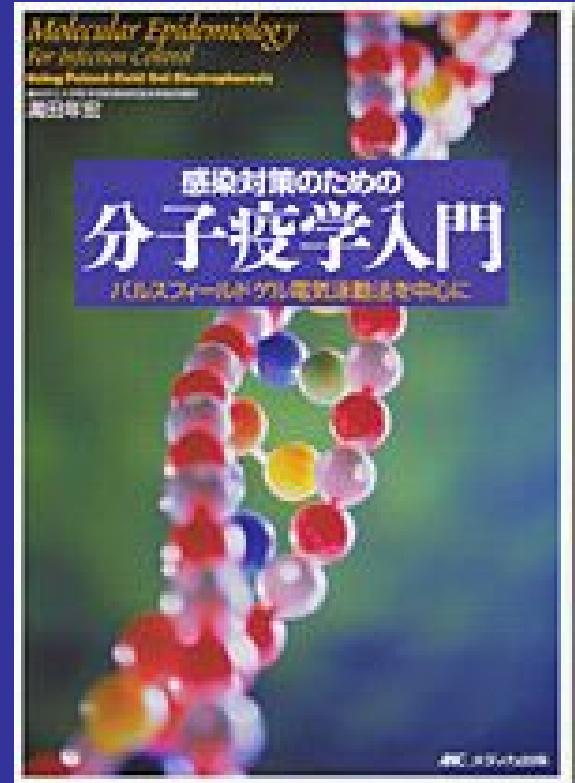
- ・ 分子疫学的手法を用いたウイルスの研究
- ・ 多民族社会としての米国
- ・ 米国における少数民族としての日本人
- ・ 日本社会を振り返る

分子疫学とは？

分子レベルで疫学を調べる。
病原微生物、癌、代謝性疾患など

ウイルス感染症の分子疫学は
なぜ必要か

分類(特に近縁)、流行疫学、変異証明
診断・ワクチン・治療薬の開発
国際協力



† 感染対策のための分子疫学入門
著:満田年宏 発行:メディカ出版

近年の新興感染症や耐性ウイルスにも
分子疫学が重要

ウイルスの遺伝・進化

1. 突然変異 mutation

DNAウイルス $10^{-8} \sim 10^{-11}$ /塩基/複製サイクル

(DNA依存性DNAポリメラーゼ、校正機構)

RNAウイルス $10^{-3} \sim 10^{-6}$ /塩基/複製サイクル

(RNA依存性RNAポリメラーゼ)

逆転写ウイルス $10^{-4} \sim 10^{-5}$ /塩基/複製サイクル

RNAウイルスは擬似種 quasi-speciesの集団

人為的にも変異が誘発される

亜硝酸、ニトログアニジンなどの薬剤

紫外線、X線、5-fluorouracil、5-bromodeoxyuridine

特異的変異導入法 site-directed mutagenesis

混合感染におけるウイルス間の相互作用

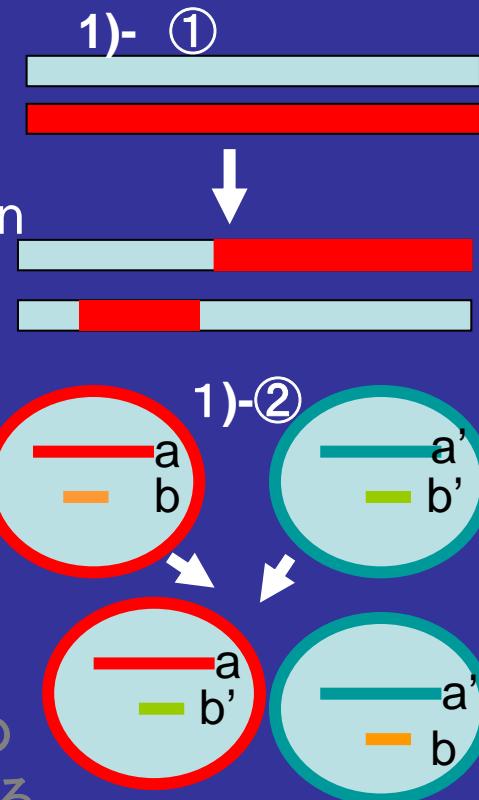
2種あるいはそれ以上の近縁ウイルスが1つの細胞に同時感染すると、それぞれの遺伝子間で、または遺伝子産物(蛋白質)間で作用しあう。

1. 遺伝子間での相互作用

1) 遺伝的組み換え genetic recombination

① 分子内組み換え intramolecular recombination

② 遺伝子再集合 genetic reassortment



2) 遺伝的再活性化 genetic reactivation

① 多重感染再活性化 multiplicity reactivation

致死的ウイルス同士が感染すると補いあい

上記の相互作用で再活性化する。

② マーカー救済 marker rescue 感染性ウイルスのマーカーに非感染性ウイルスのマーカーが組み換えて入る

2. 遺伝子産物間の相互作用

本日取り上げるウイルス

ブニヤウイルス (米国で)

下痢症ウイルス (帰国後)

ロタウイルス

アデノウイルス

ノロウイルス

アストロウイルス

サポウイルス

アイチウイルス

A,B ,C,E型肝炎ウイルス

HIV

サイトメガロウイルス

ブニヤウイルス科 Bunyaviridae

Classification
Gene, Function
Reassortant virus
Non structural protein

ブニヤウイルス科 **Bunyaviridae**

ブニヤウイルス属 **Genus: Bunyavirus**

LA Crosse(カリфорニア脳炎)

アカバネウイルス

ハンタウイルス属 **Genus: Hantaanvirus**

主なウイルス:ハンタウイルス

ムエルト キャニオンウイルス

ナイロウイルス属 **Genus: Nairovirus**

主なウイルス:クリミア コンゴ出血熱ウイルス

フレボウイルス属 **Genus: Phlebovirus**

主なウイルス:リフトバレー出血熱ウイルス

トスボウイルス属 **Genus: Tospovirus**

主なウイルス:トマト黄化えそウイルス

・感染と病気

動物、植物

多くはカやダニを中間宿主

ハンタウイルスはげっ歯目の動物(ネズミなど)を自然宿主(尿からヒトへ)

・粒子構造

約100nm エンベロープ

・遺伝子

L、M、Sの分節 一本鎖(一)RNA遺伝子、それぞれカプシドを作つて粒子中に存在

フレボウイルスのS RNAはアンビセンス

What is Crimean-Congo hemorrhagic fever virus?

- Prevalence: Africa, Eastern Europe, Middle East, Central and Southern Asia
- Reservoir, Vector: Mammals (sheep, cow, rabbit, etc) and Ticks (genus *Hyalomma* and *Ixodes*)



写真提供:西條政幸(国立感染症研究所)

A patient with CCHF



Tang Q, et al.: Clin Diagn Lab Immunol.10:489–91, 2003

写真提供:西條政幸(国立感染症研究所)

ブニヤウイルスの分子診断、分類

Am J Trop Med Hyg. 1980 Nov;29(6):1441-52.

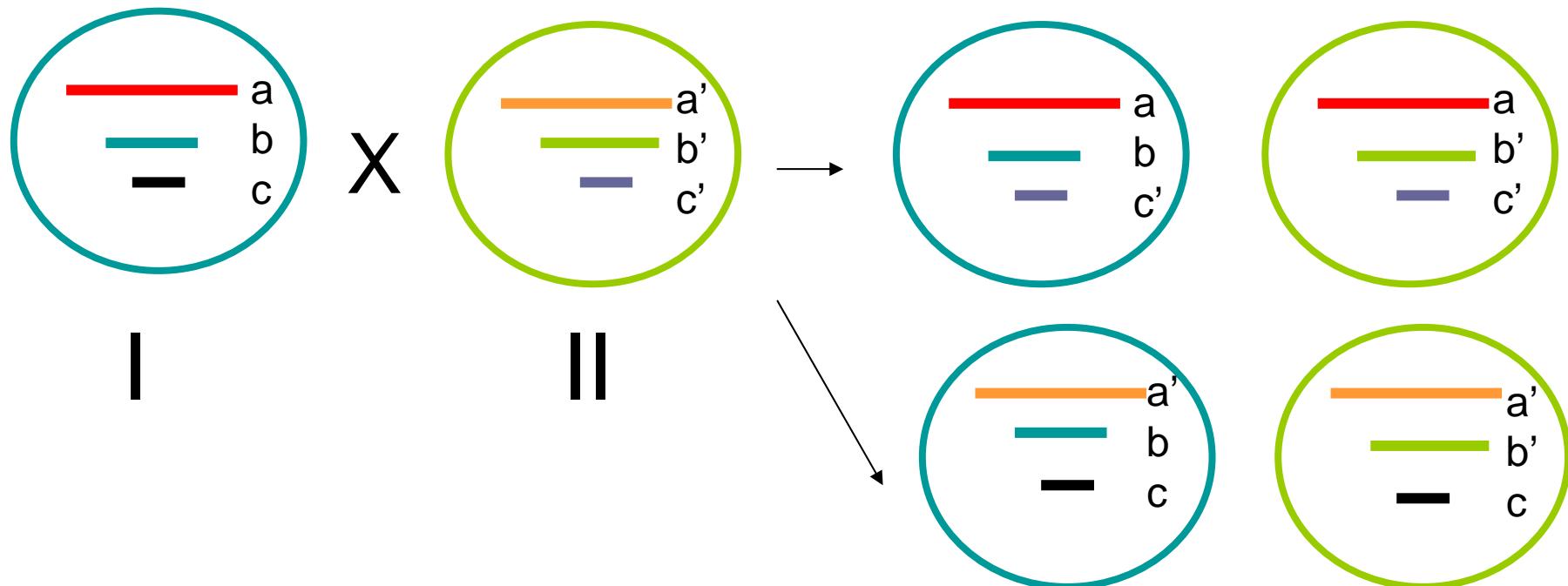
Ushijima H, Klimas R, Kim S, Cash P, Bishop DH.

Characterization of the viral ribonucleic acids and structural polypeptides of Anopheles A, Bunyamwera, Group C, California, Capim, Guama, Patois, and Simbu bunyaviruses.

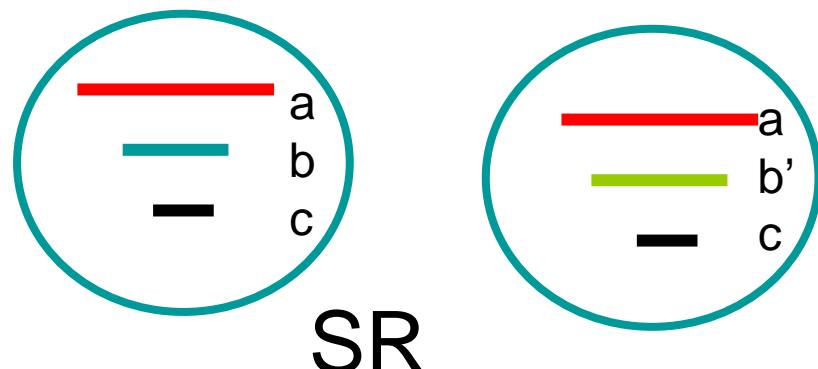
ブニヤウイルス科のブニヤウイルス属はハンタウイルス属、ナイロウイルス属、フレボウイルス属とはLMN遺伝子、構成蛋白の分子量が異なる。

フィンガープリントも応用(遺伝子解析の前段階)

In vitro reassortant virus

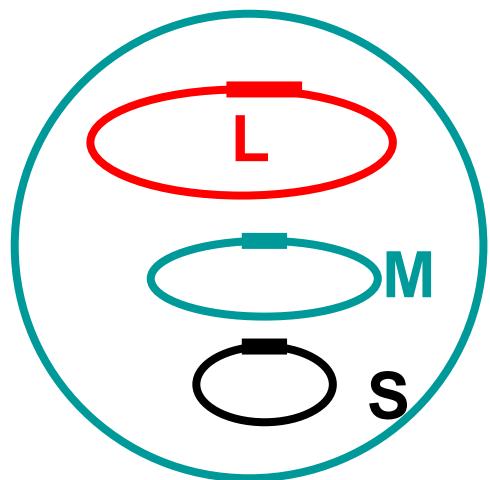


Naturally occurring reassortant virus

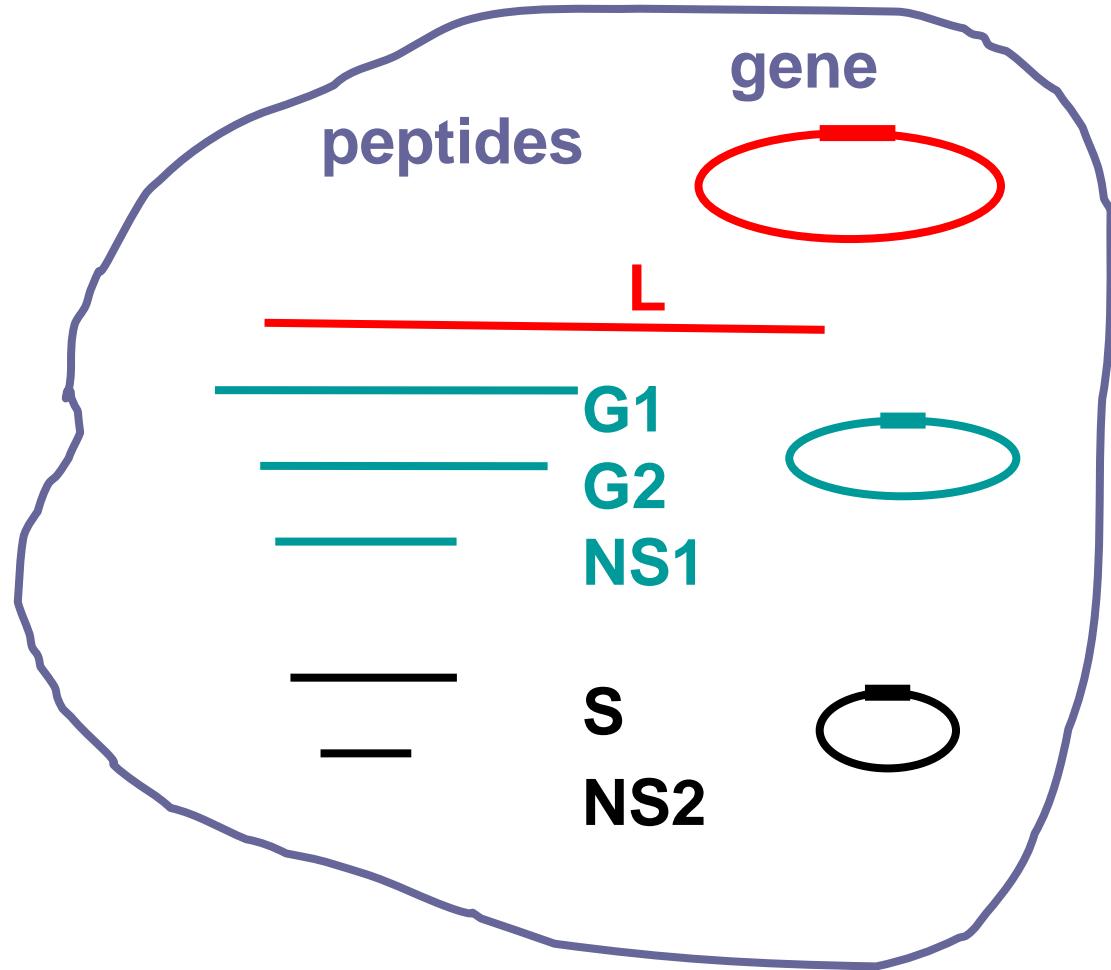


Function
Neutralization
different

— CF same



virion



infected cell

ブニヤウイルスの自然界での遺伝子再集合 と非構造(NS)蛋白

Virology. 1981 Apr 30;110(2):318-32.

Ushijima H, Clerx-van Haaster M, Bishop DH.

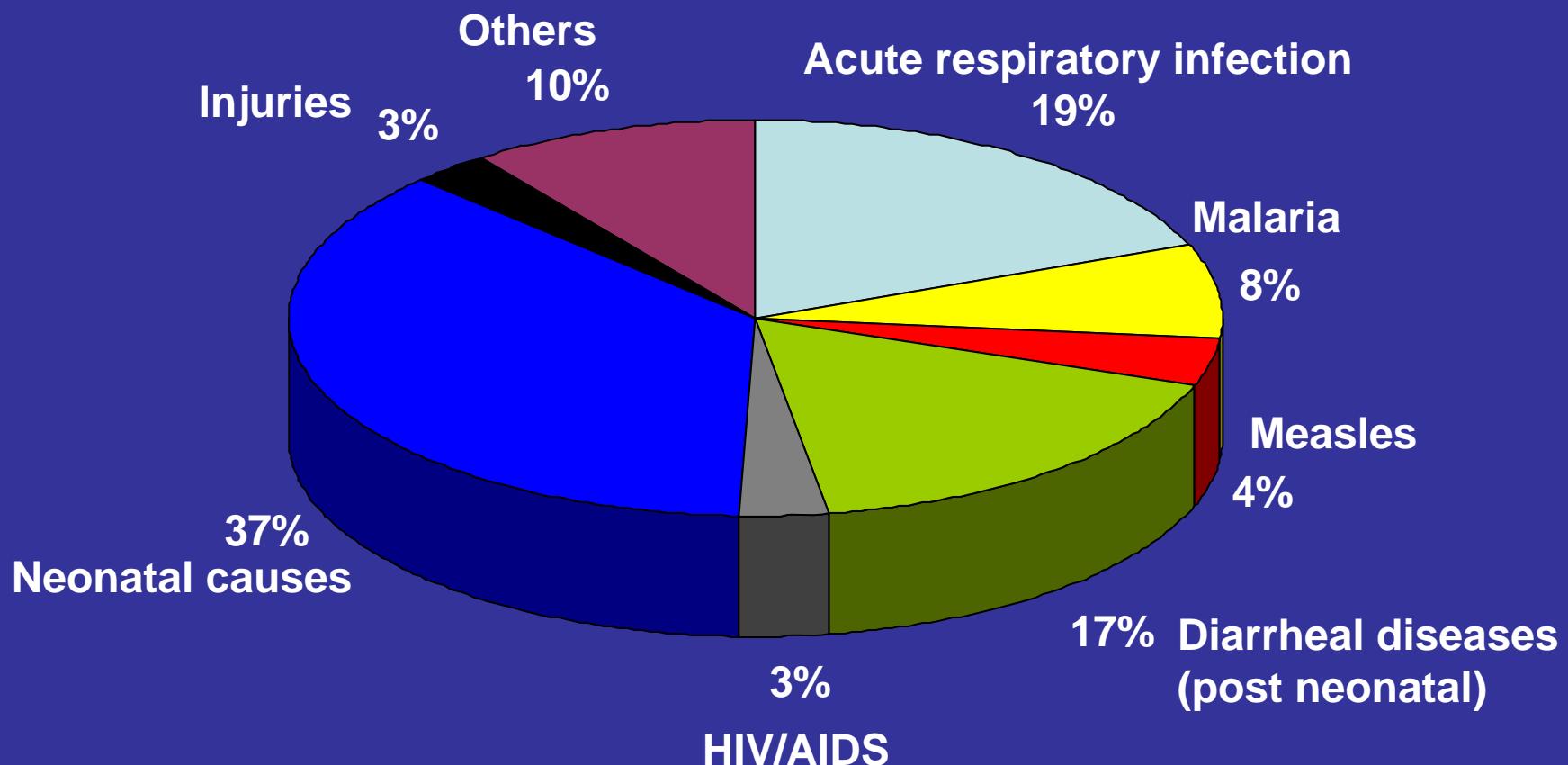
Analyses of Patois group Bunyaviruses: evidence for naturally occurring recombinant Bunyaviruses and existence of immune precipitable and nonprecipitable nonvirion proteins induced in Burnyavirus-infected cells.

ブニヤウイルス属のSRとPAHはL,S遺伝子が類似するが
M遺伝子は異なる。Mが自然界で組み換えが起きたと考えられる。
M遺伝子が異なると中和反応は異なるが、CF反応は同じ。
M遺伝子が中和、S遺伝子がCFを司ることが確認された。
また、細胞内には、ウイルス粒子の抗体で染まらない非構造ウイルス蛋白の存在が確認された。

下痢症ウイルスの分子疫学

口タウイルスとノロウイルスを中心に

Major causes of death of children under five, 2000-2003

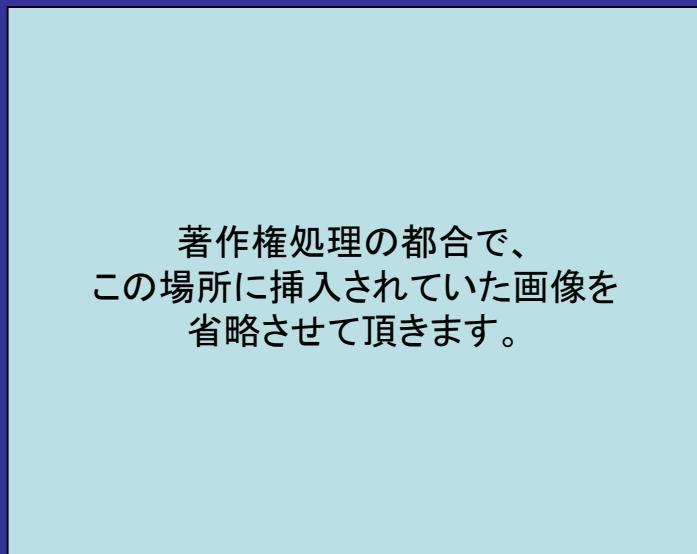
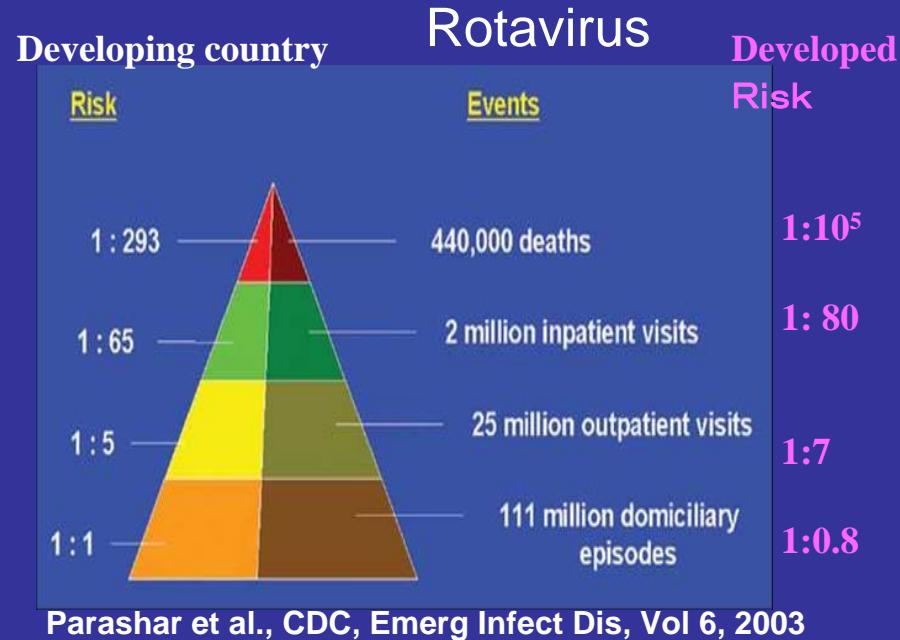


‡ Source: *The world health report 2005 – make every mother and child count (WHO)*

DIARRHEA, OVERVIEW

Rotavirus

- One of the most **common** illnesses in human worldwide and it has a great **impact** on people, particularly in children
- **Burden** with high mortality and morbidity worldwide
- **Democratic disease**
 - especially rotavirus infection



Diarrheal Viruses

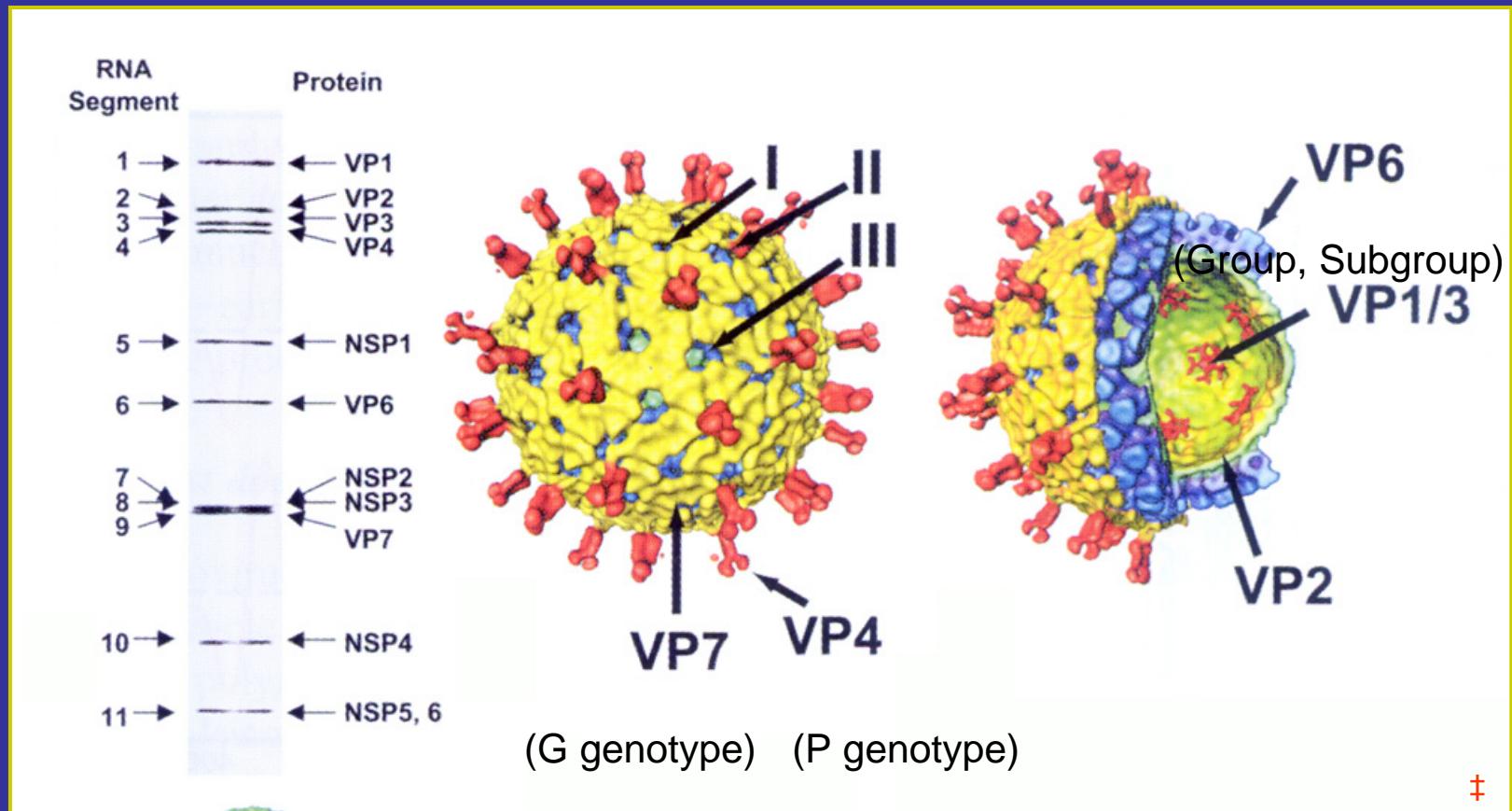
わが国 外来

- Rotavirus 25-30% 日本では冬季乳幼児下痢症、
どの子どもも罹患
- Adenovirus 5-10% 一般に全身罹患、
下痢の血清型もあり
- Astrovirus 3-5%
- Norovirus 15-20% 乳幼児の下痢症、
食中毒の原因
- Sapovirus 3-5%

各々に血清型／遺伝子型がある。

さらに亜型、 最終的には株に分かれる
診断は可能となつたが、 予防、 治療はこれから

Rotavirus genome structure



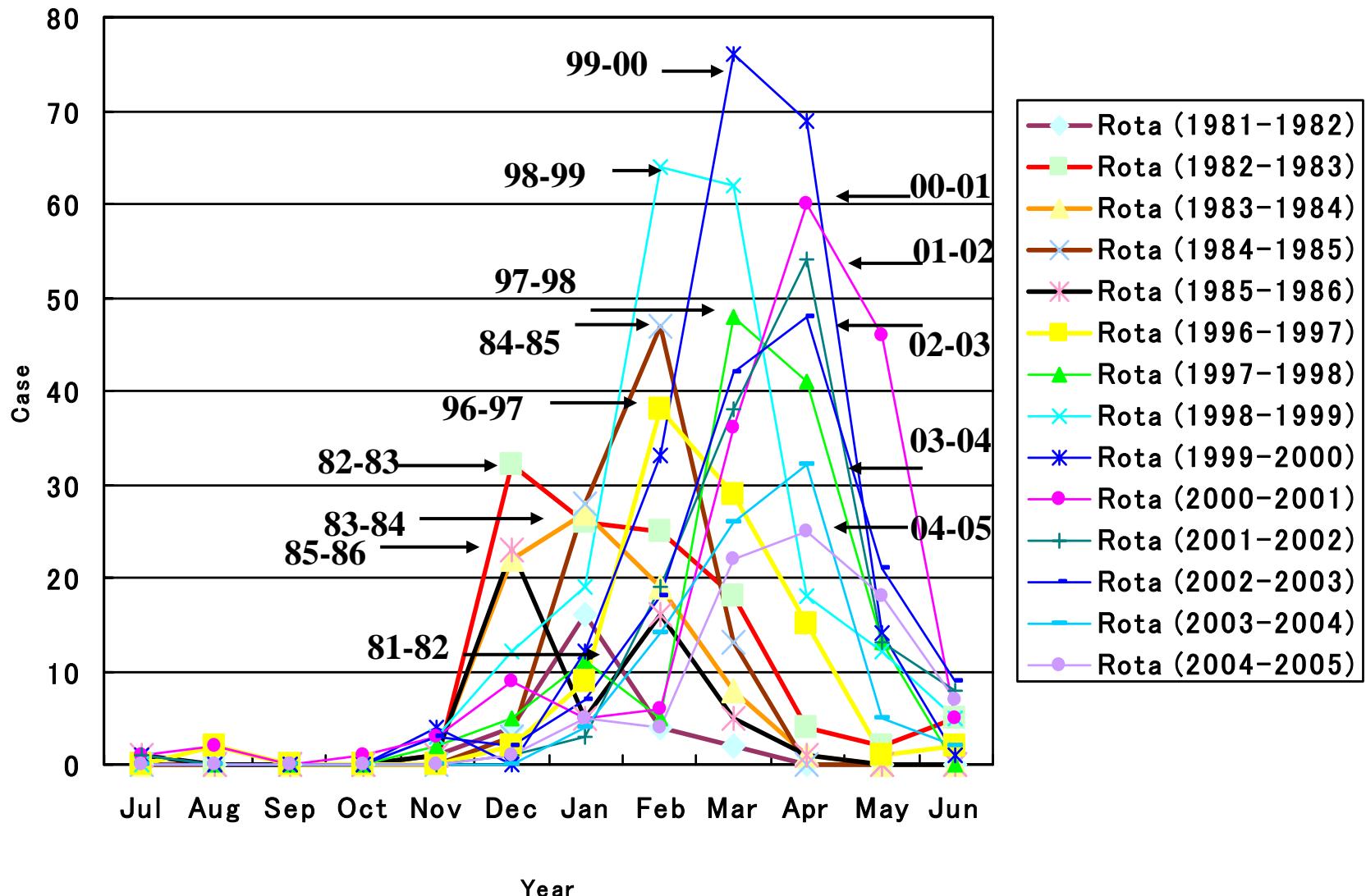
This article was published in Elsevier Science, Viral gastroenteritis, U. Desselberger , p.115-128, Copyright Elsevier 2003.

Group A VP7 gene ; G-genotype ; 15 G-genotypes (G1 to G15) → P[27]
P[28]

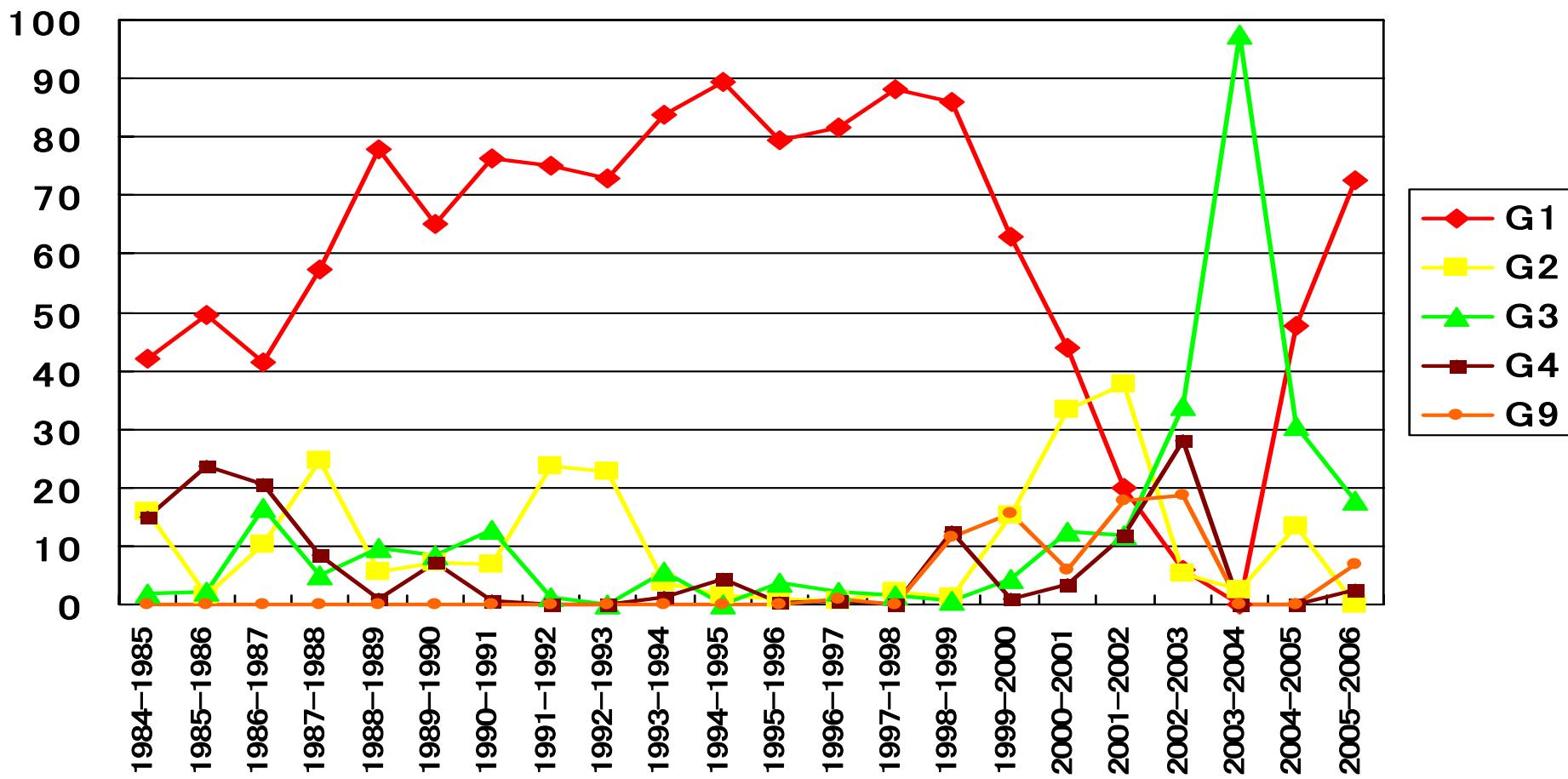
VP4 gene ; P-genotype ; 26 P-genotypes (P[1] to P[26])

NSP4 gene ; NSP4-genotype ; 5 NSP4-genotypes (A to E)

Seasonality of rotavirus infection in Japan



Changing distribution of rotavirus G-types



3/. Rotavirus G3

PHYLOGENETIC TREE OF VP7 NUCLEOTIDE SEQUENCES OF G3 STRAINS.

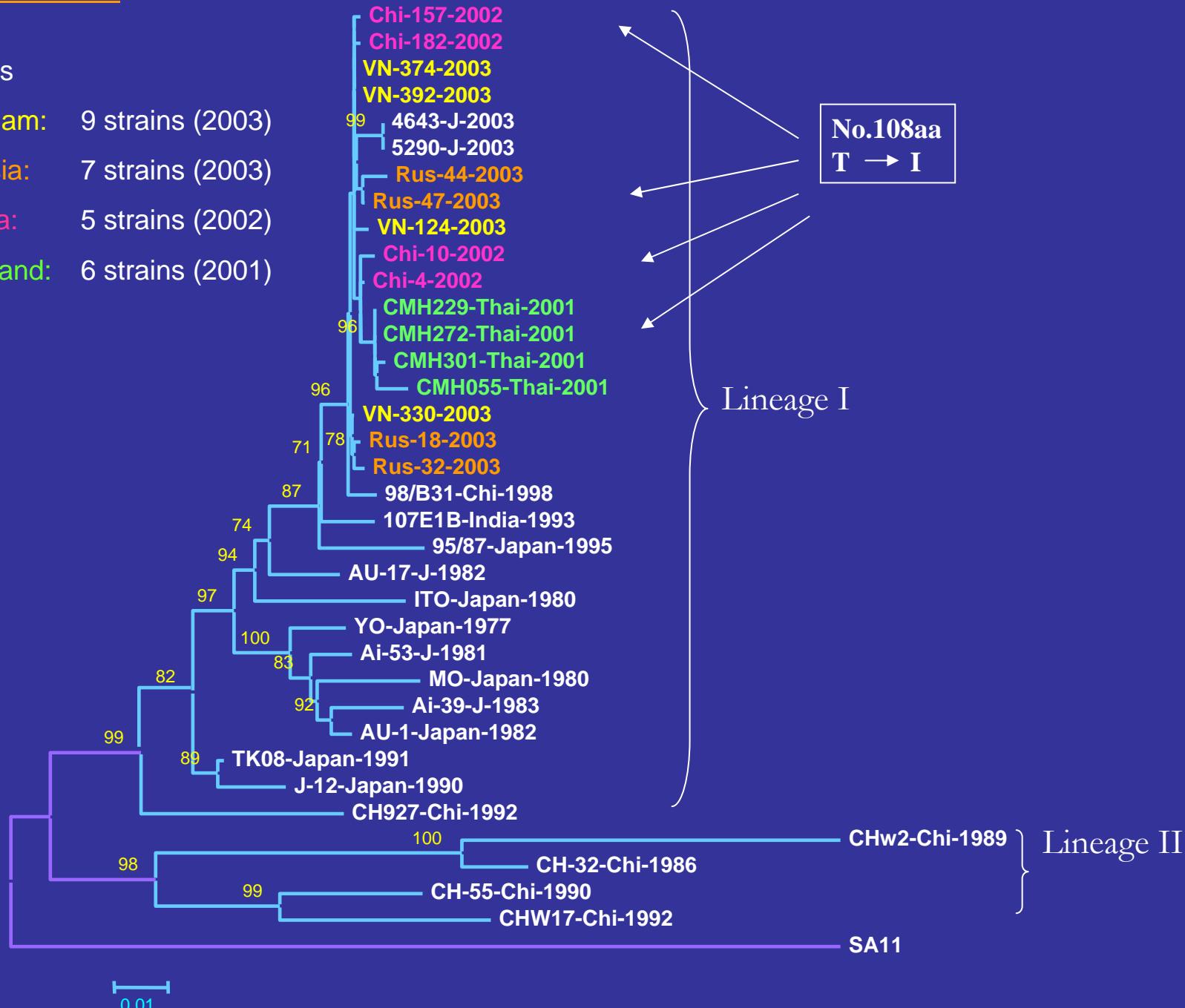
27 G3 strains

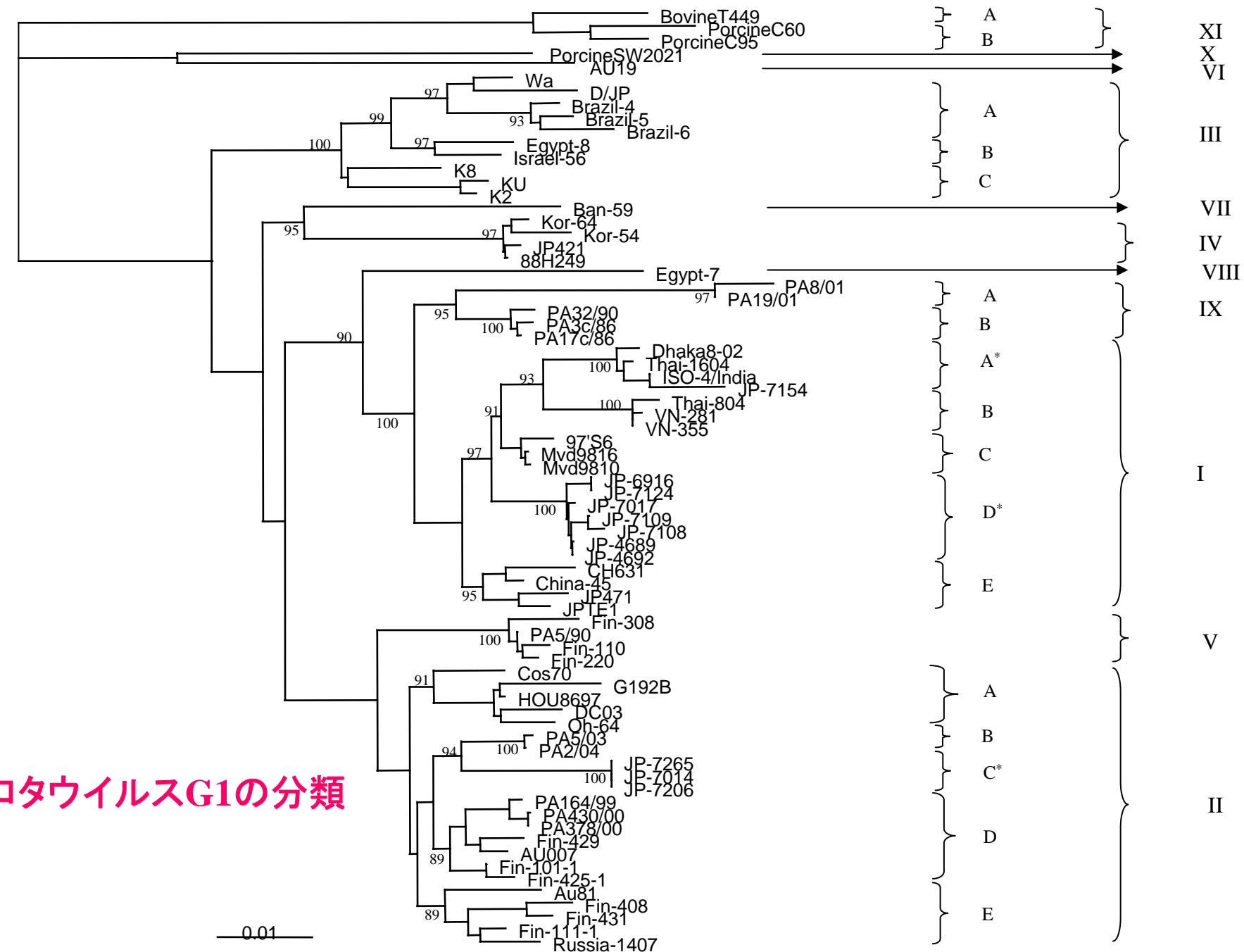
Vietnam: 9 strains (2003)

Russia: 7 strains (2003)

China: 5 strains (2002)

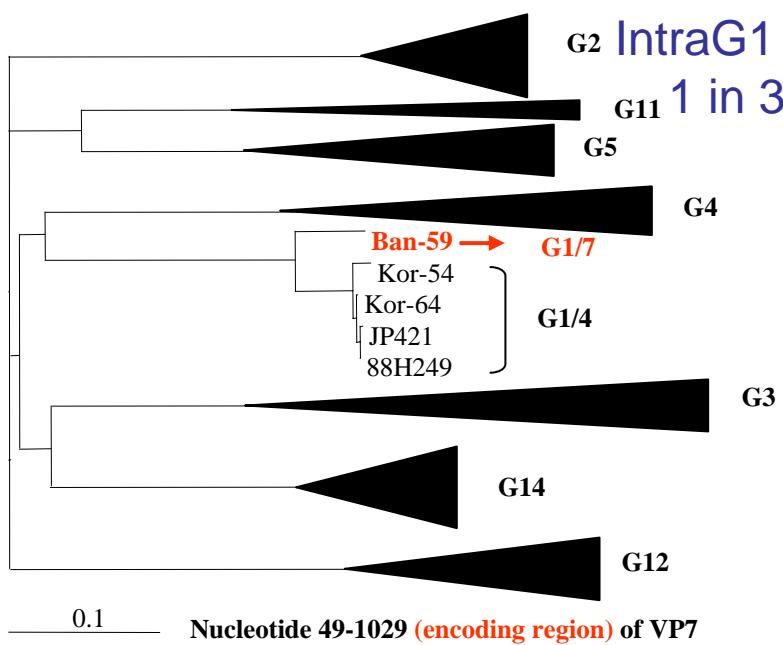
Thailand: 6 strains (2001)



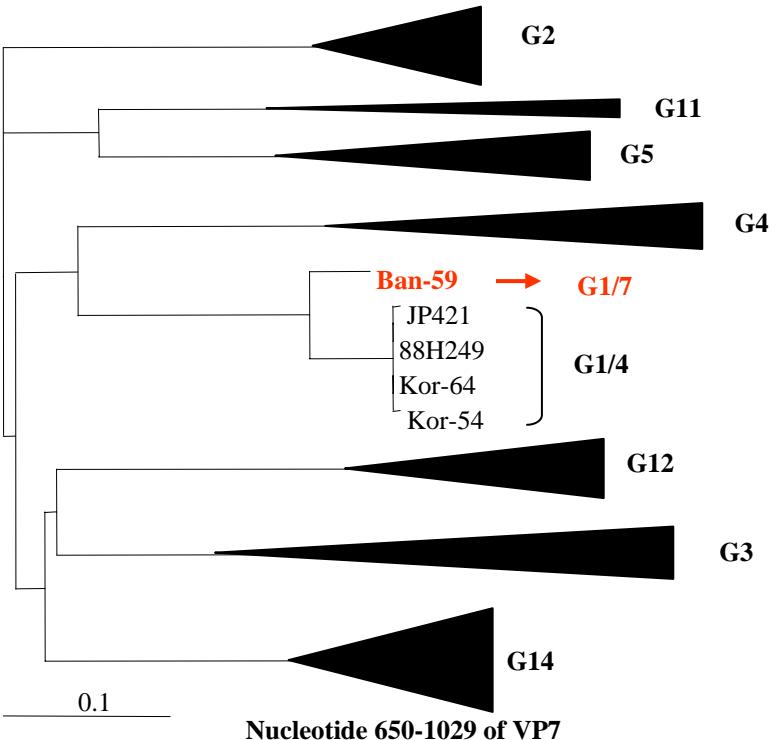
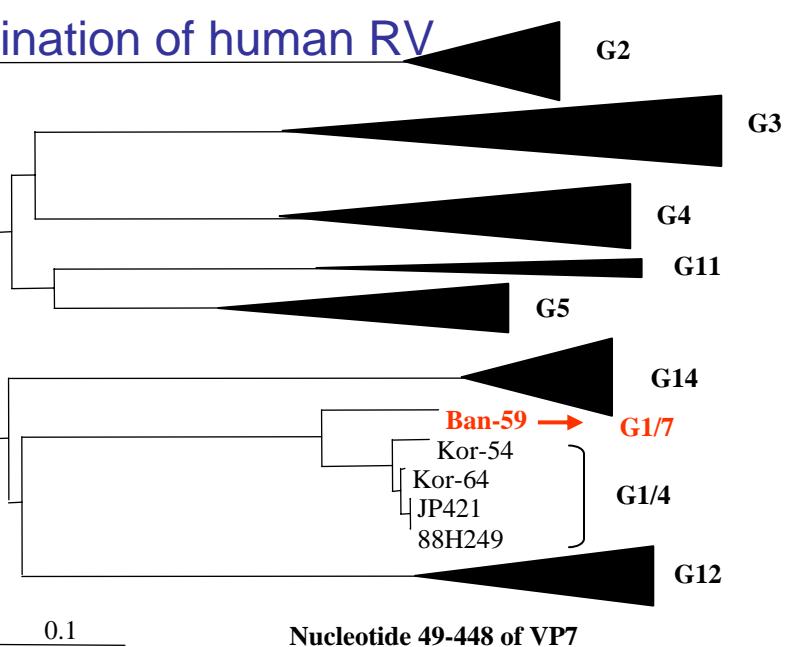
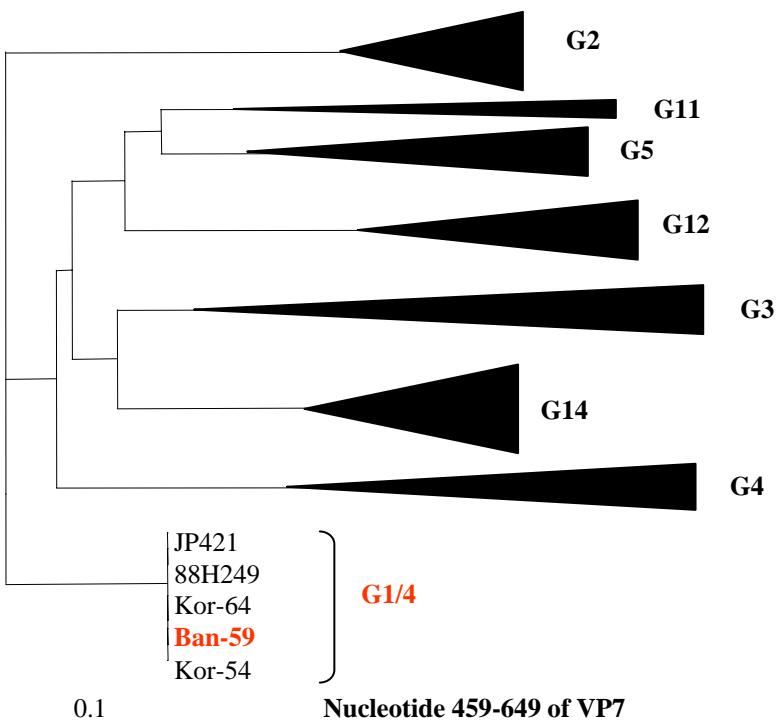


口タウイルスG1の分類

Fig.Phan

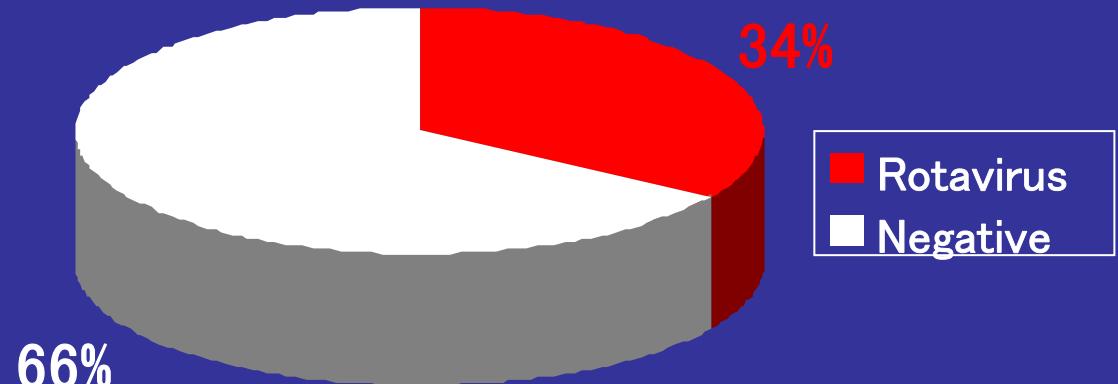


G2 IntraG1 recombination of human RV
1 in 3 cases



Emergence of rotavirus G9, Thailand

■ Total: 315 fecal specimens



■ Time: 2000-2001

■ Place: Chiang Mai, Thailand

■ Source: Children with diarrhea

Unusually G3P[3], 2001, 2 yrs old

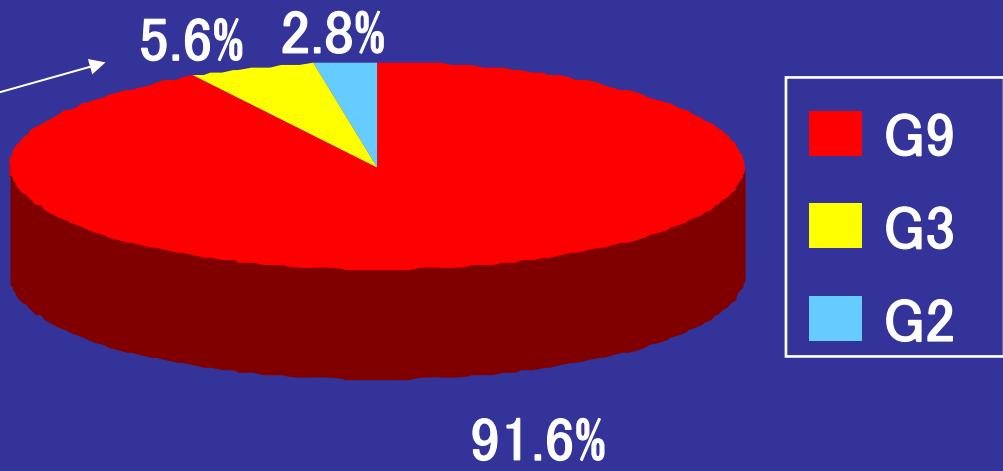
G3, simian like gene

P[3], goat like gene

G6, simian like gene

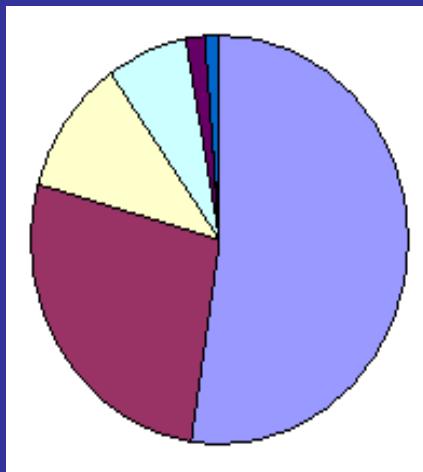
NSP4, goat like gene

Evidence of multiple human-animal interspecies transmission.

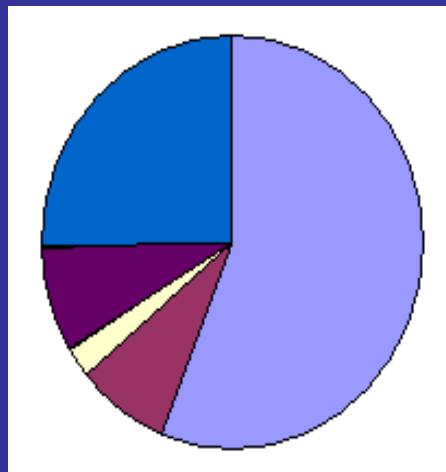


Viral etiologies of acute gastroenteritis in children under 5-year of age

Japan

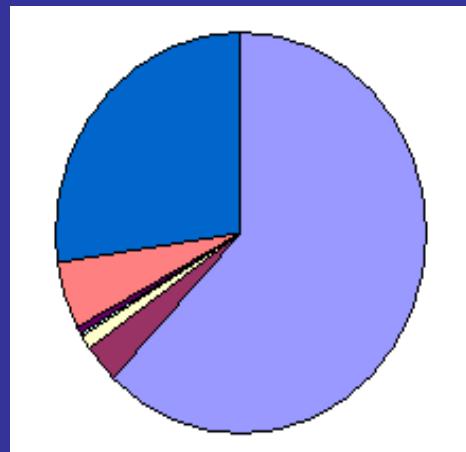


China

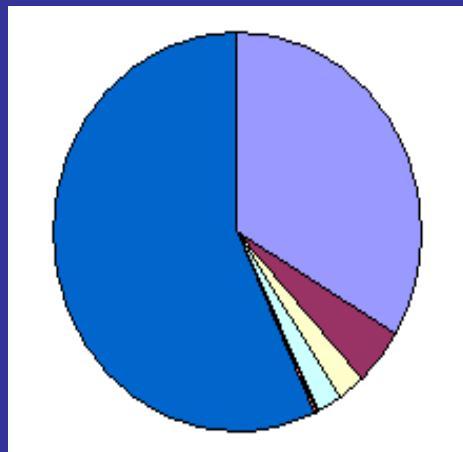


- Rotavirus A
- Norovirus G II
- Adenovirus
- Sapovirus
- Astrovirus
- Other
- Negative

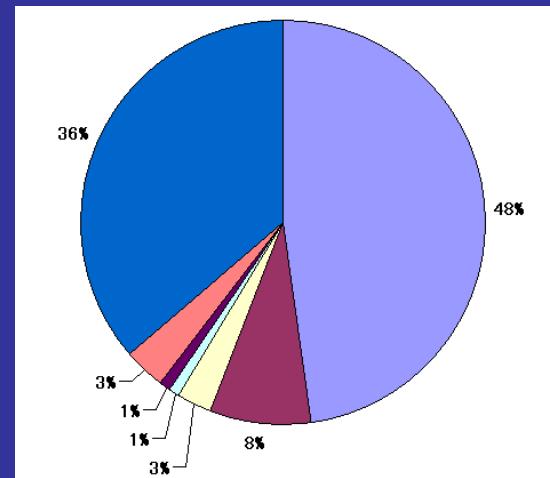
Vietnam



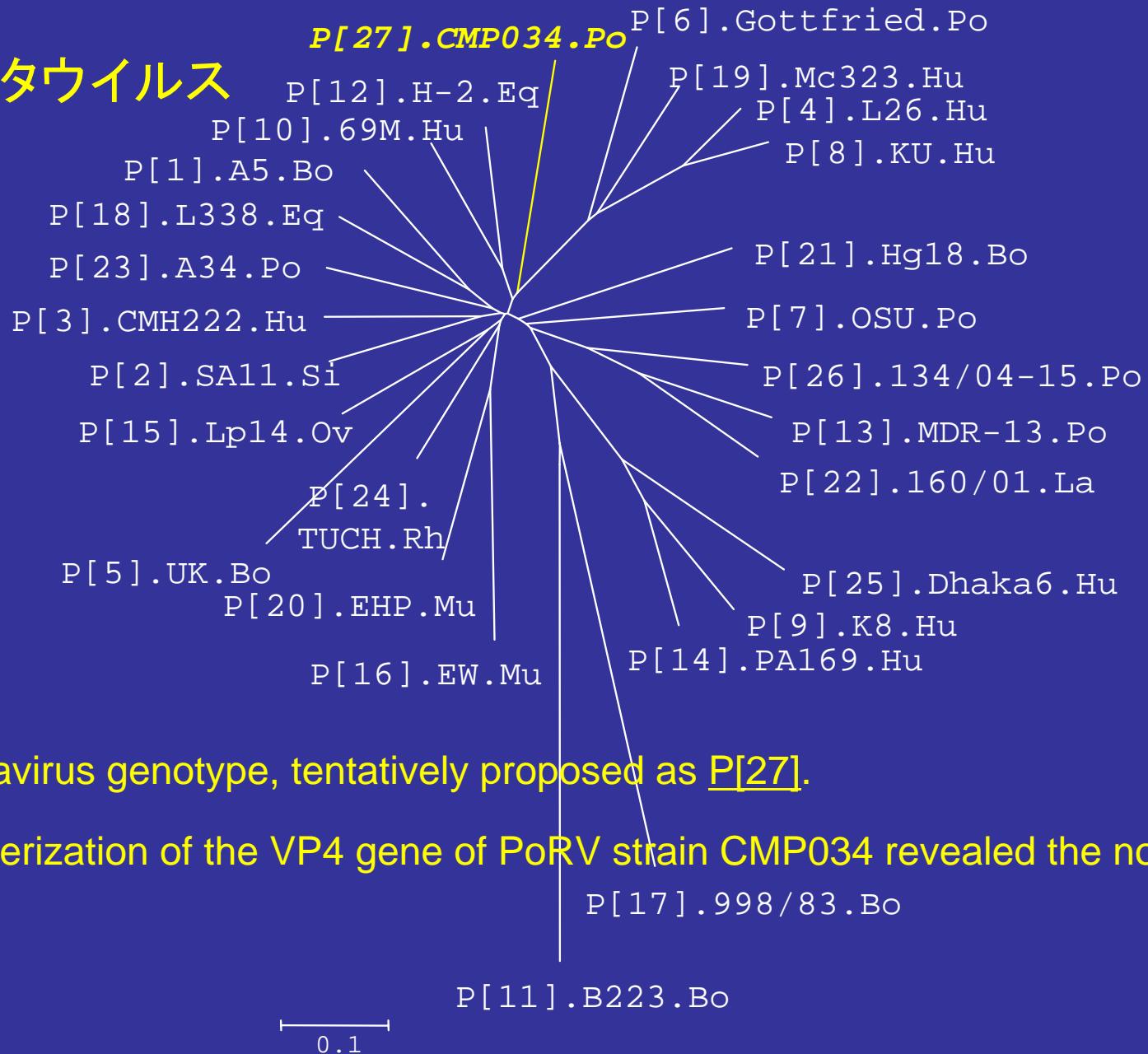
Bangladesh



Sri Lanka



ブタの口タウイルス



VP4 rotavirus genotype, tentatively proposed as P[27].

- Characterization of the VP4 gene of PoRV strain CMP034 revealed the novel

(VP7, NP6 and NSP4 of CMP034 are G2-like gene, subgroup1 and genotype B, respectively.)

口タウイルス感染症と臨床

(1) Suspected rotavirus encephalitis 1986

口タウイルス感染症で重症の脳炎(脳症)が見られる。後遺症として点頭てんかん、発達遅滞がみられた。血清、便、髄液中の口タウイルスの特異抗体を調べたところ、回復期の血清中で抗体価が上昇し、髄液中の口タウイルス抗体価が優位に上昇していることがわかった。

(2) Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR 1994

口タウイルス胃腸炎患児およびそれにけいれんを伴う児の便、血清、髄液、咽頭ぬぐい液中から口タウイルスRNAを調べた。
10例を調べたところ、7例の髄液中に、2例の血清中に口タウイルスRNAを検出した。また、けいれんのない7例の咽頭ぬぐい液中にも口タウイルス遺伝子を検出した。

多彩な口タウイルスの合併症
検査依頼

口タウイルスの分子疫学における教室の成果のまとめ

- 1) 新しいP型、P[27]とP[28]をタイのブタ口タウイルスから見出した。
- 2) ヒトにおける主要なG遺伝子型(G1,G2,G3,G4,G9)遺伝子型を20年間追跡した。G1、G3に大きな変動があった。
- 3) 遺伝子型はさらに亜遺伝子型、場合によってはさらに下部の分け方が可能であり、年、地域によって異なる群として見られることがあった。
- 4) ブタ、サルなどの動物ウイルスとヒトのウイルスの間でG,P,VP6, NSP4遺伝子型の再集合を発見した。
- 5) 同じ遺伝子型(血清型)内の亜遺伝子型でリコンビナントあった。
- 6) A群口タウイルス以外のC群、B群についても検討した。
- 7) わが国では口タウイルス、ノロウイルスの子どもでの発症頻度はほぼ同じであるが、アジアの入院検体ではほとんどが口タウイルスであった。
- 8) 血清中にウイルス遺伝子、抗原を再度確認した。
脳症患者髄液検体でウイルス遺伝子を再度確認した。

NOROVIRUS, OVERVIEW

Genome characteristics:

Known as “Norwalk-like virus”

The family *Caliciviridae*

Non-enveloped ssRNA

Three ORFs (1, 2 and 3)

Prototype strain:

Hu/NV/Norwalk virus/1968/US

(Outbreak, Elementary school)

Human:

Genogroup I (15genotypes) → 16

Genogroup II (18genotypes) → 23

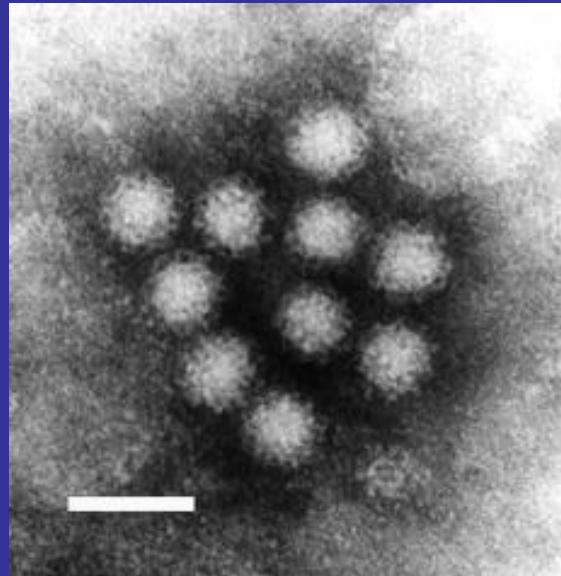
Infectious dose of 10-100 virus particles

Viral shedding of 3 weeks or more

Limited (few months) immunity

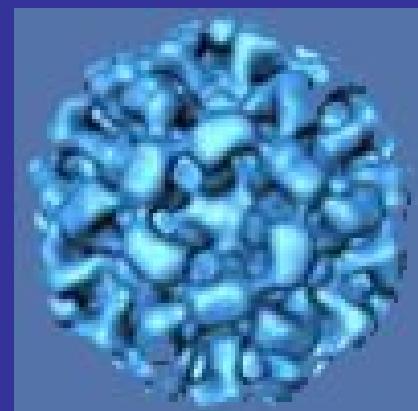
Uncultivable

Replication cycle not clear



Wikipediaより引用

<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%8E%E3%83%AD%E3%82%A6%E3%82%A4%E3%83%AB%E3%82%B9>

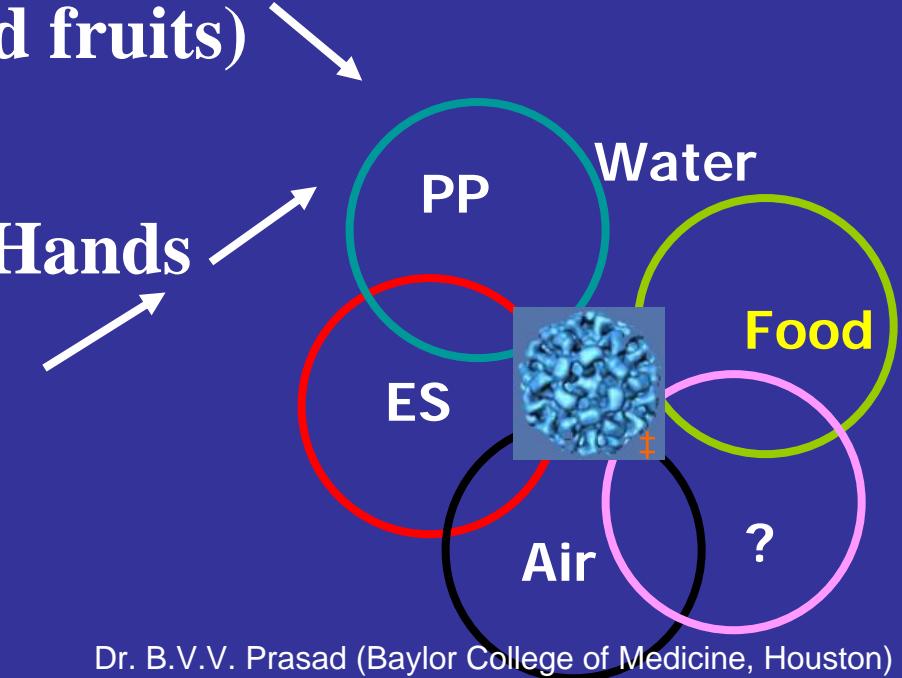


‡

Dr. B.V.V. Prasad (Baylor College of Medicine, Houston)

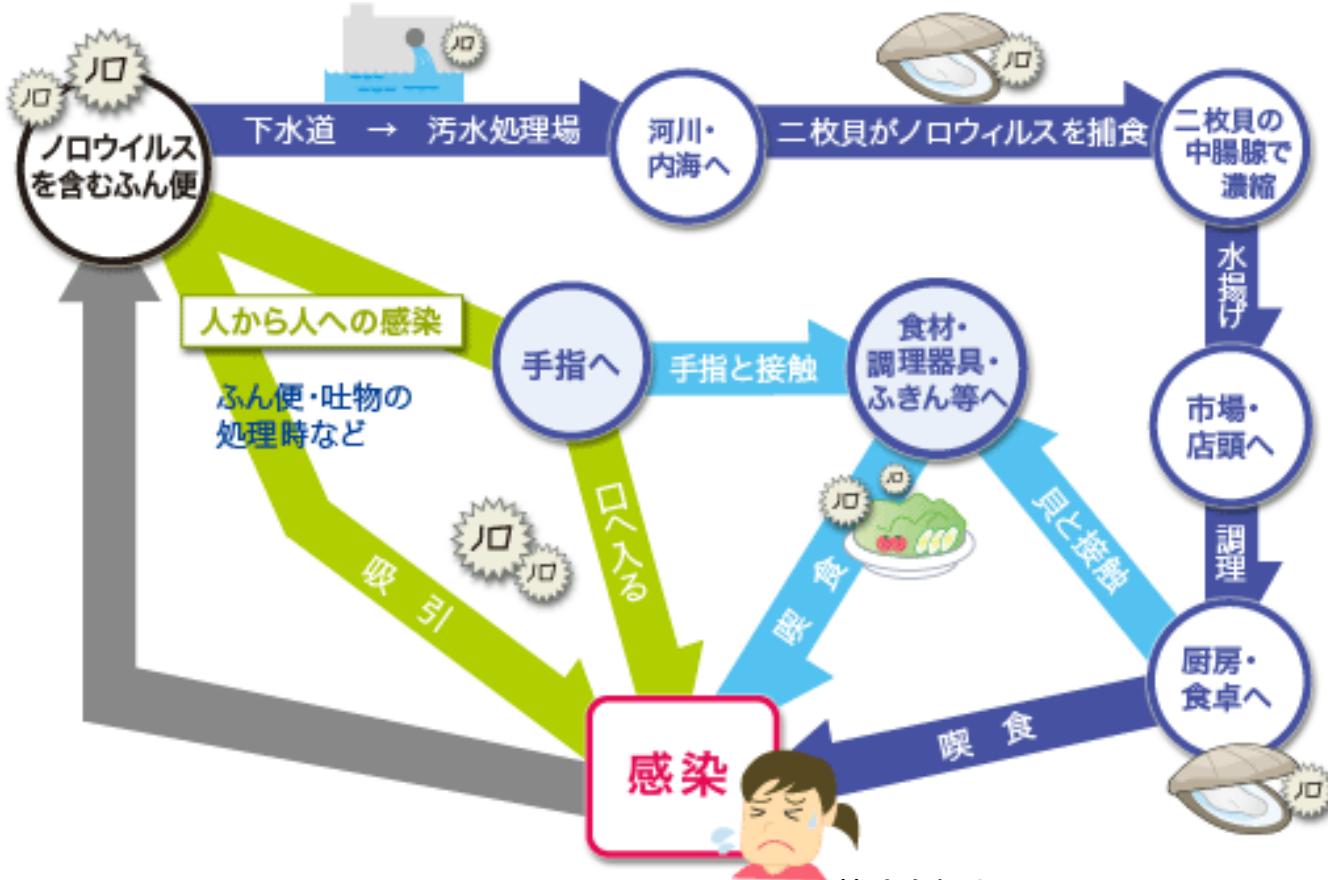
NOROVIRUS TRANSMISSION

- “Oral-fecal” route
- Air-borne: aerosolization with vomitus
- Food-borne: Shellfish (oysters, clams, mussels) and others (salads, peeled fruits)
- Water-borne
- Person-person contact: Hands
- Environmental surfaces
- Unknown



北風、寒くなる

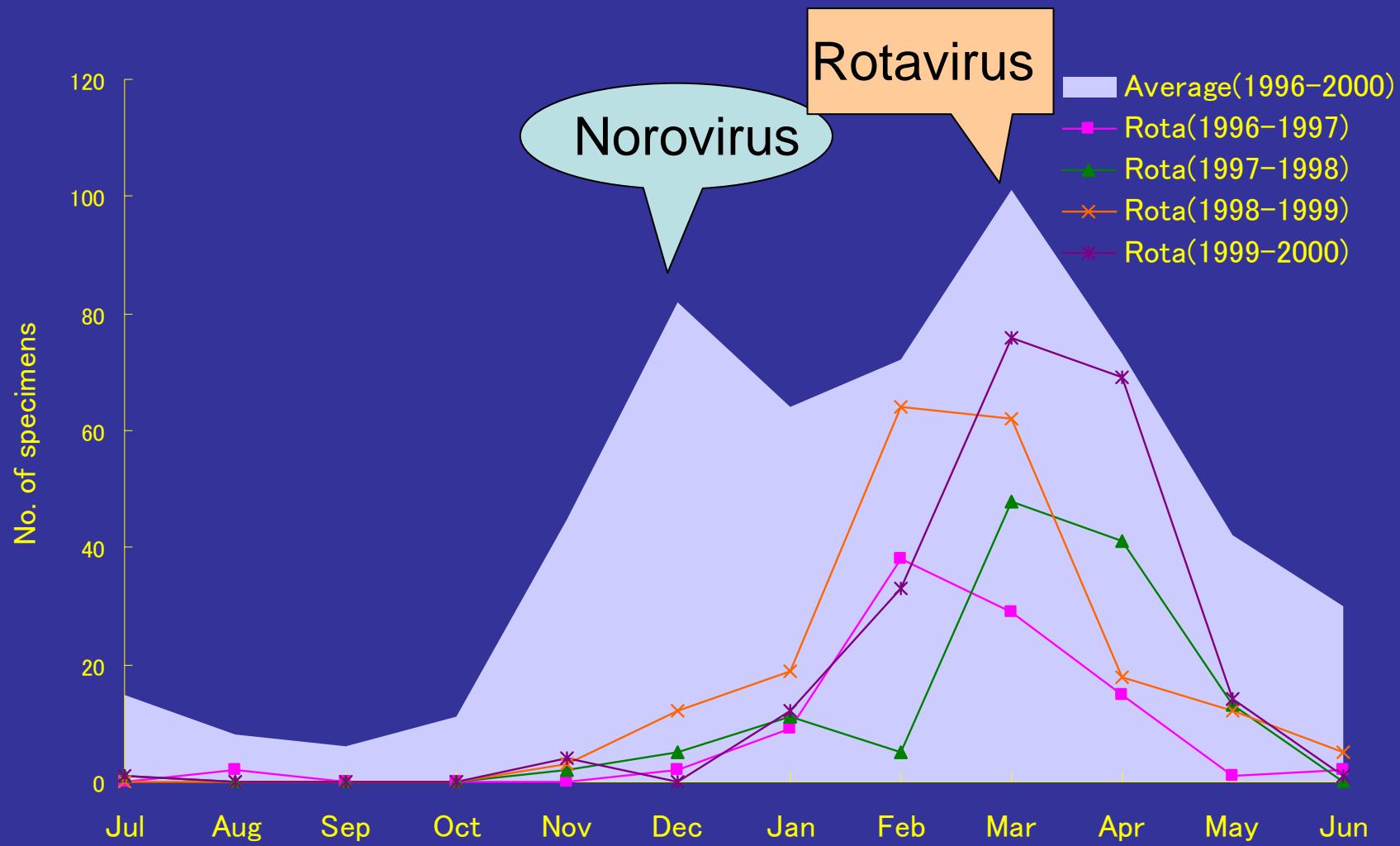
最初に子ども
に見られる。
原因は不明



株式会社オーヤラックスHP
<http://www.oyalox.co.jp/c/c05.html>

ノロウイルス感染はヒト-ヒト、食品・水、空気感染などがある

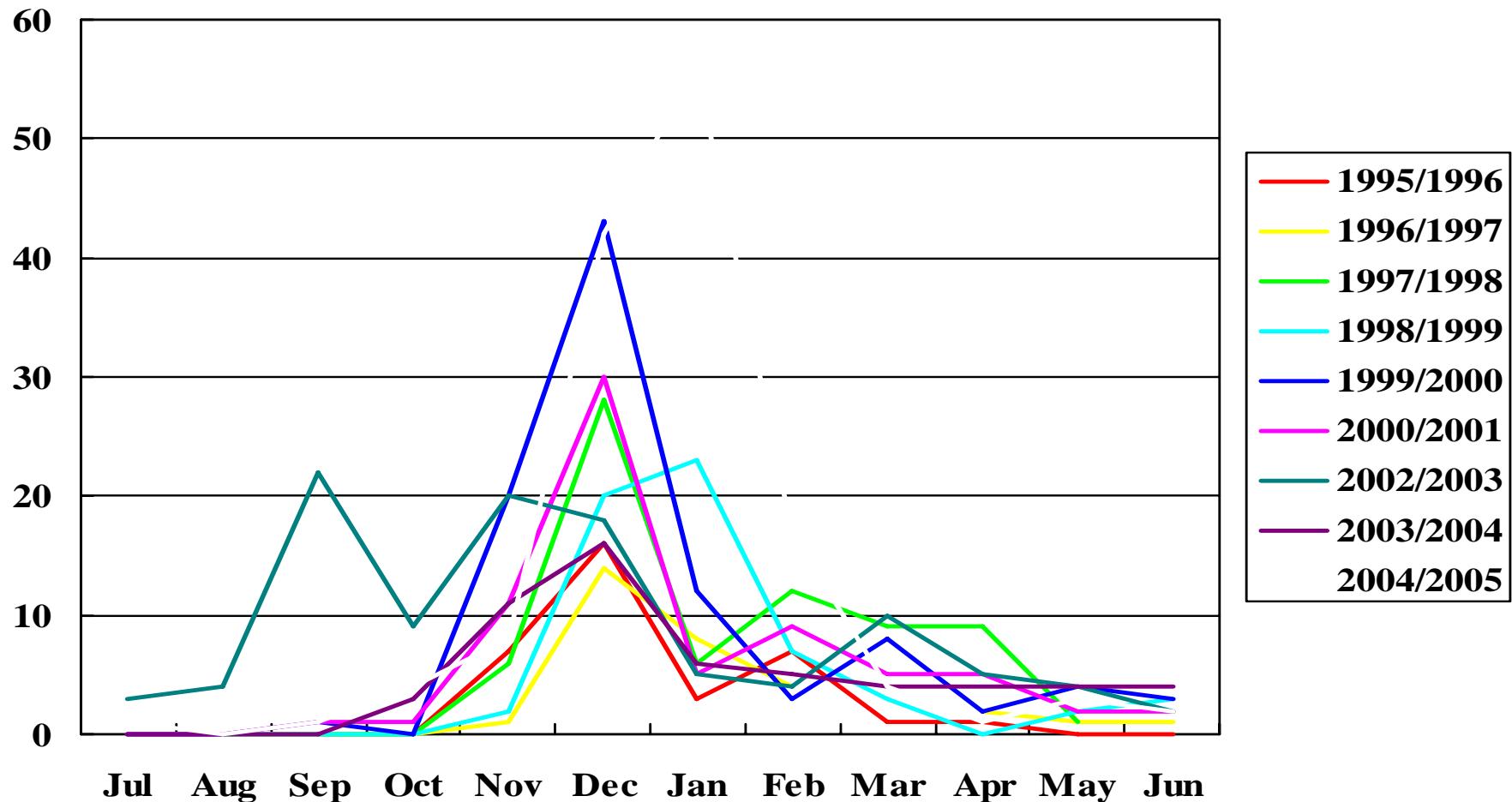
乳幼児下痢症の発生頻度と季節性



日本では初冬にNV、晩冬にRVの流行がある。 RVのピークは次第に遅れている

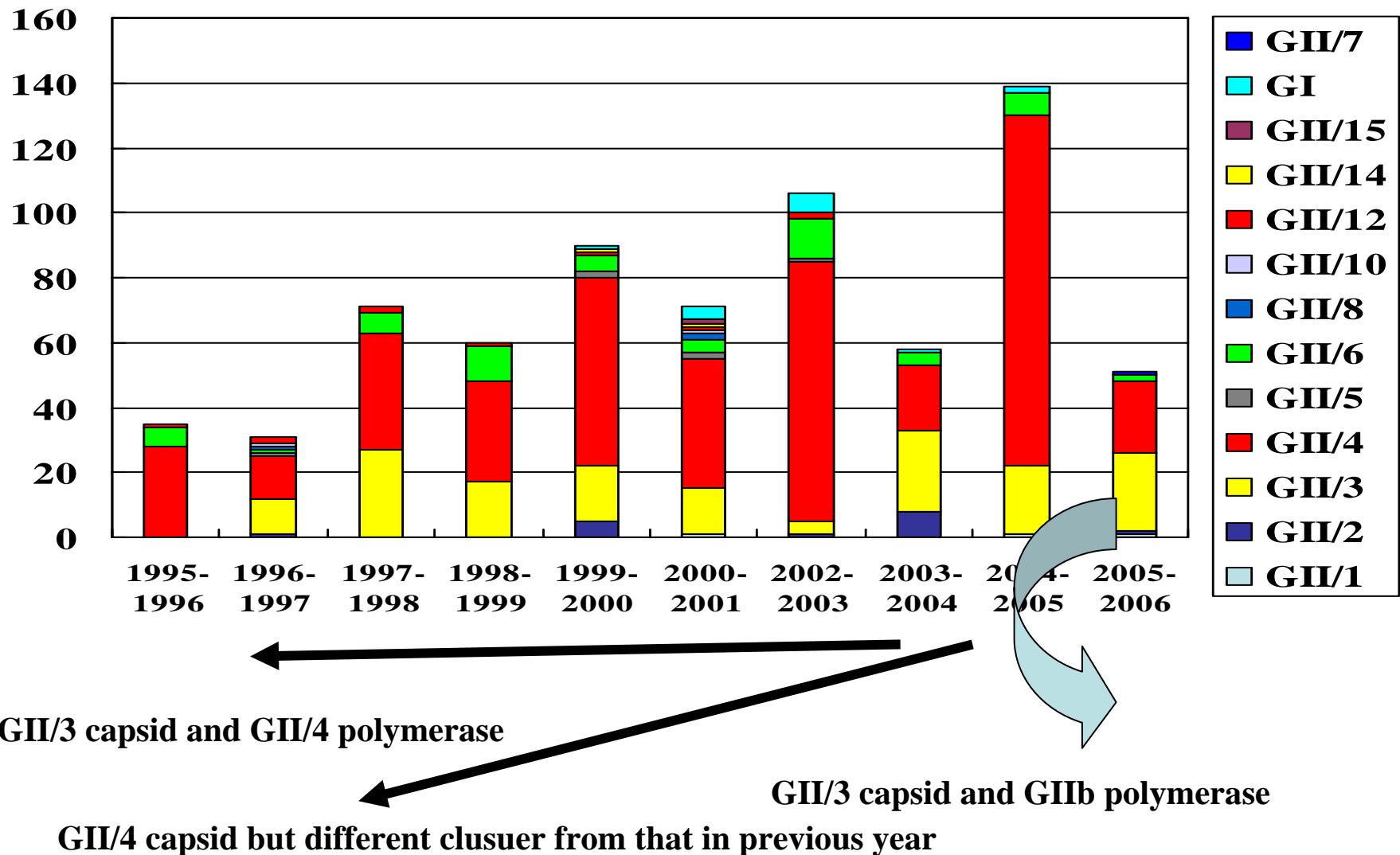
Seasonality of norovirus infection in Japan

Case

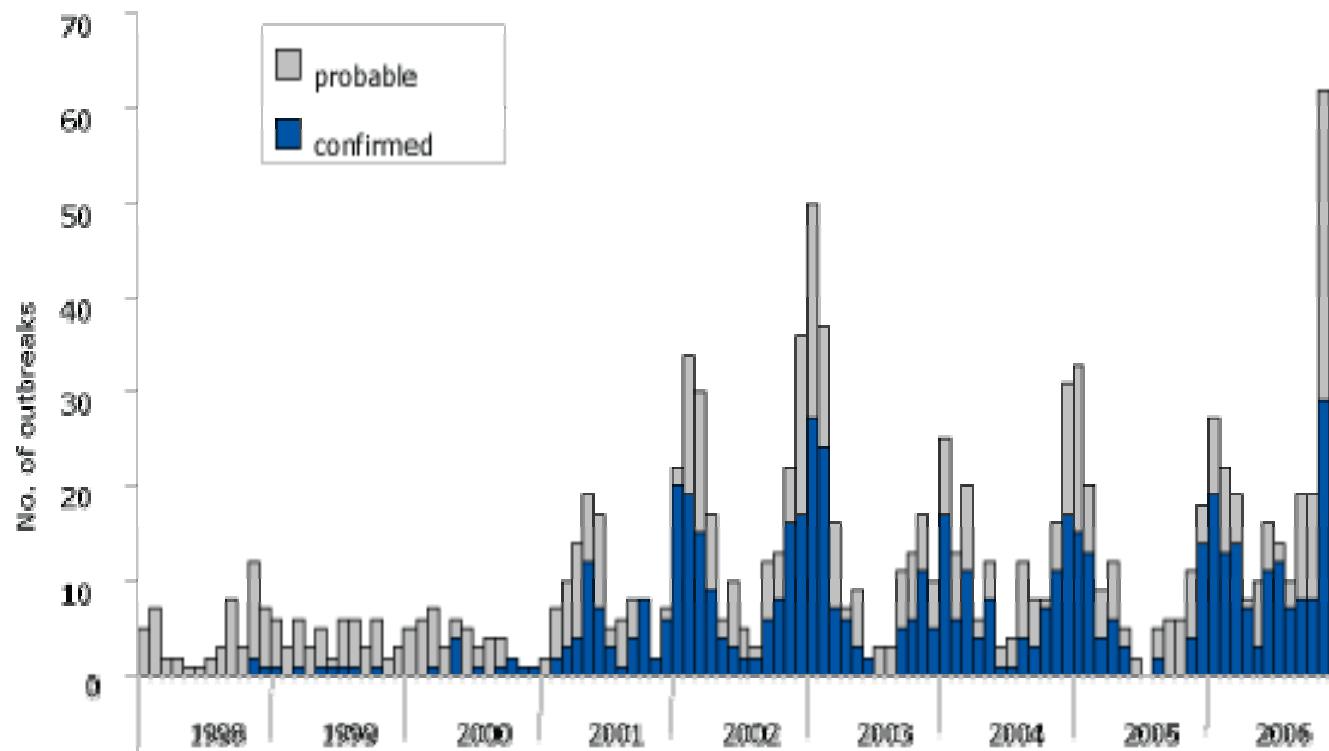


DIVERSITY OF NOROVIRUS GENOTYPES IN JAPAN

Cases

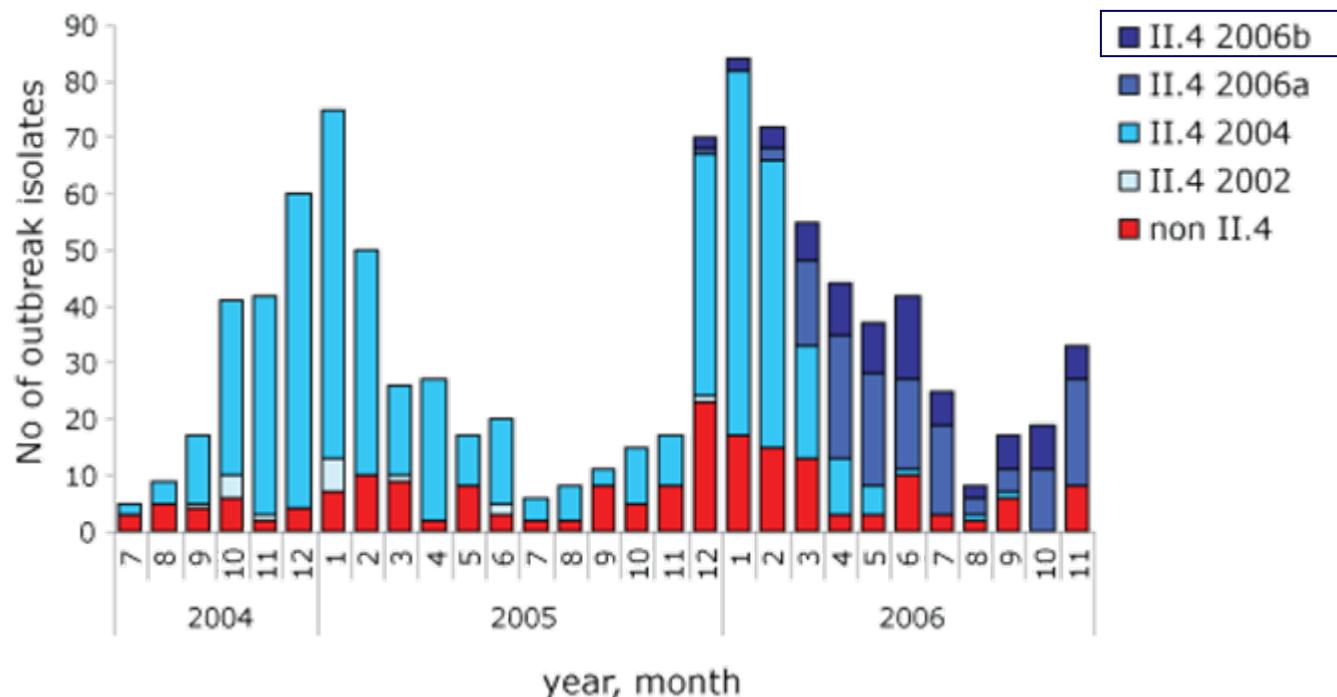


Increase in norovirus outbreaks, Hungary

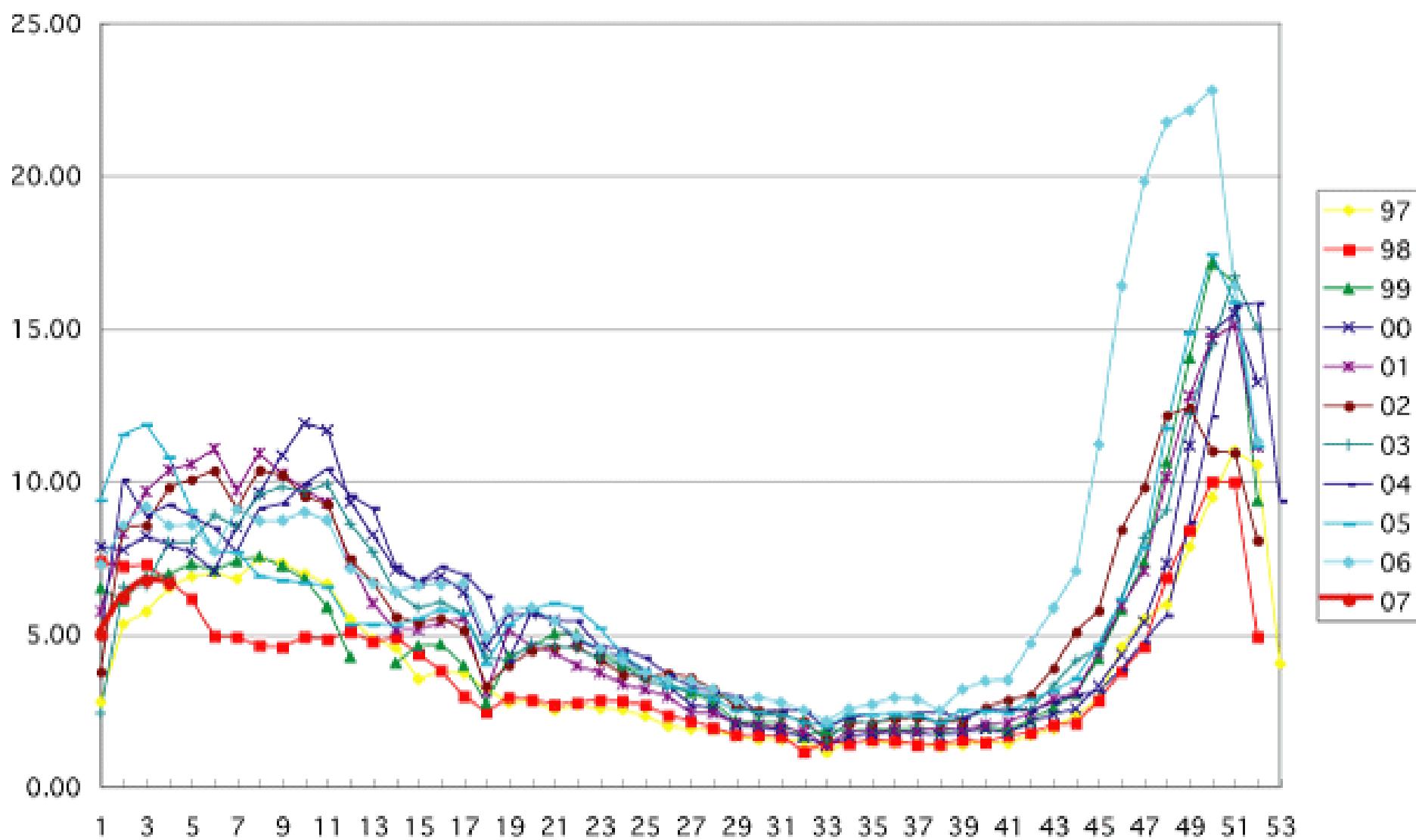


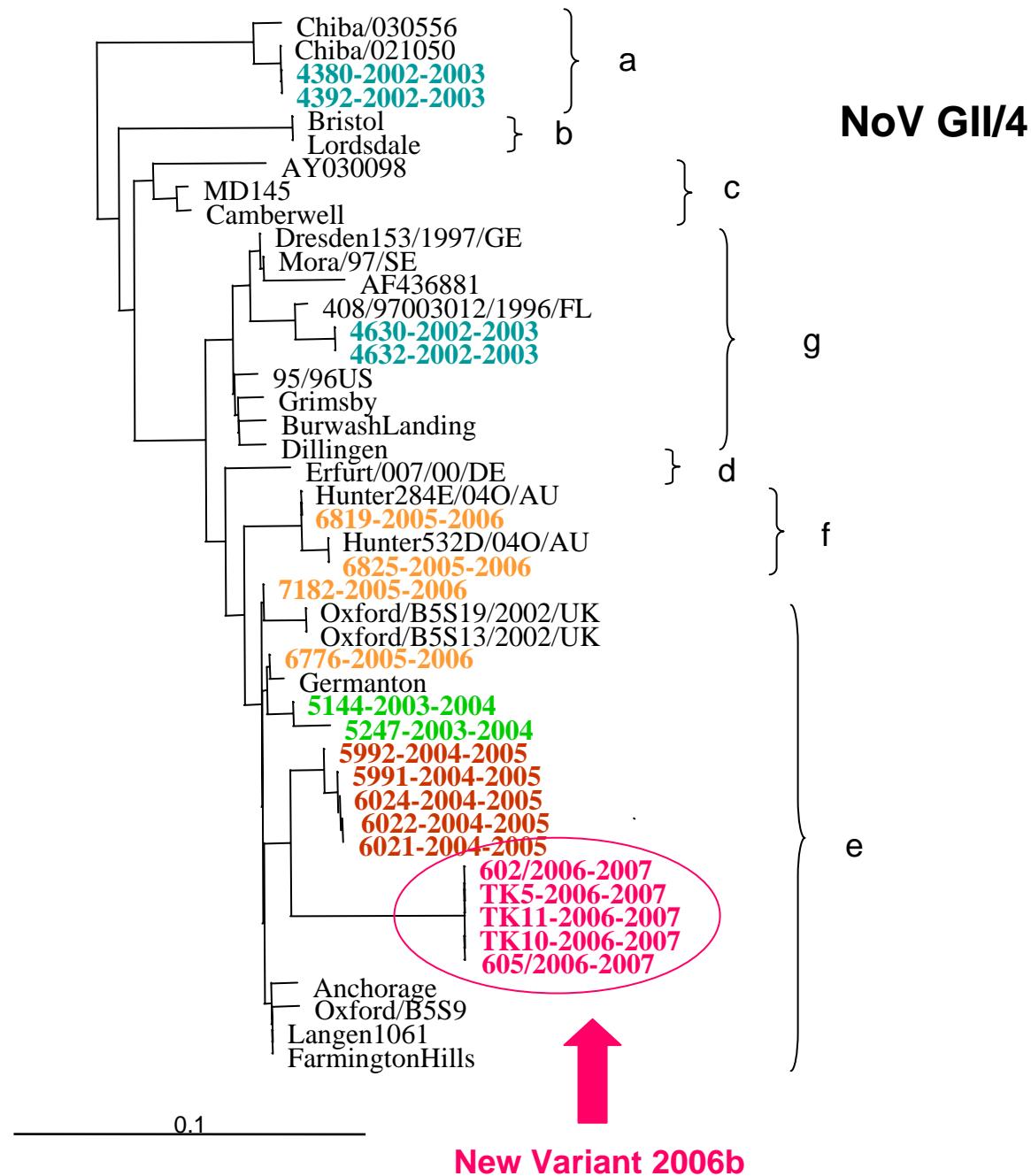
ヨーロッパでの年別流行の図

Genetic analysis of norovirus infection in Europe

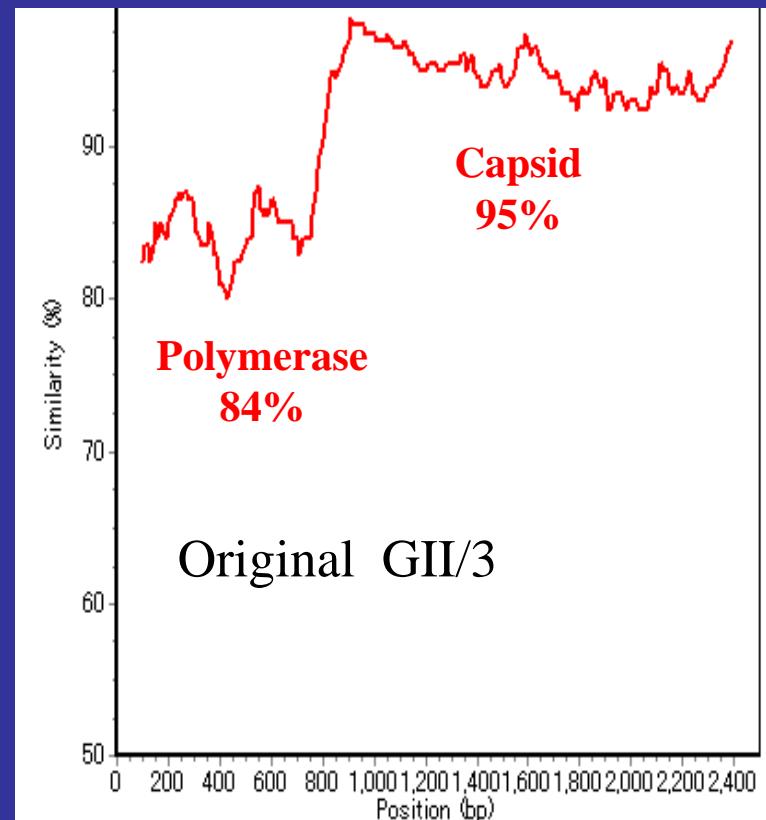
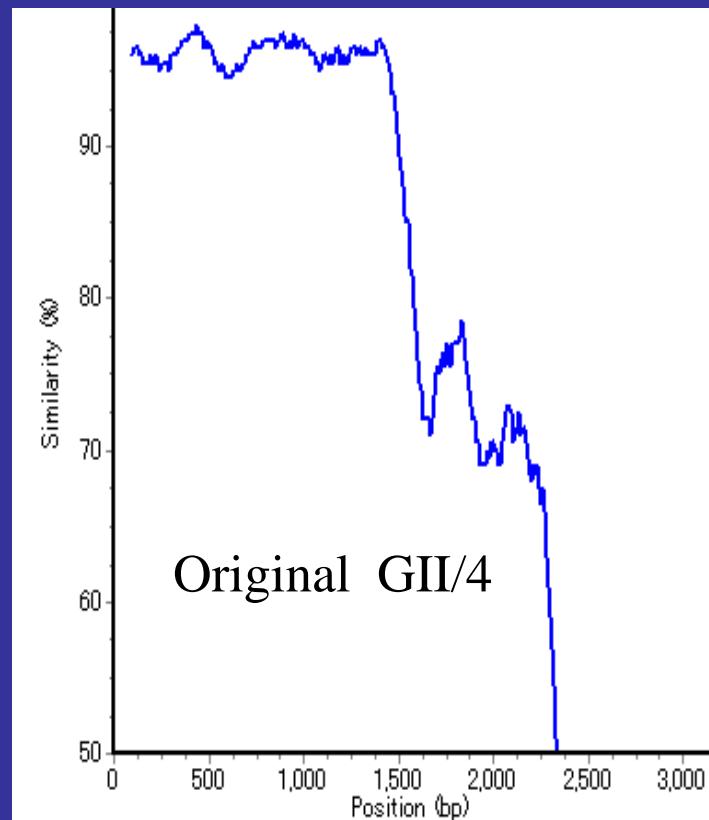


Weekly report of infectious gastroenteritis in pediatric sentinel (case/clinic/week)



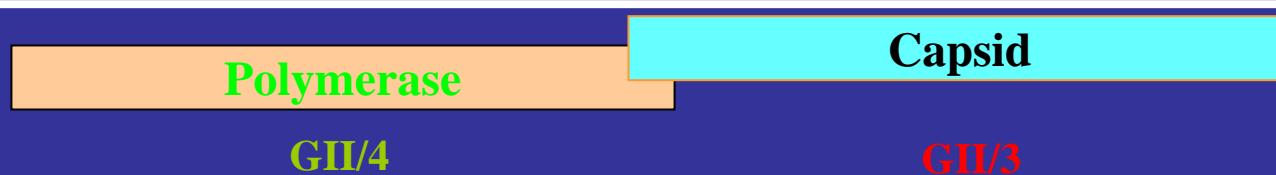


EMERGENCE OF NOVEL RECOMBINANT JAPAN, 2003-2004



5'

3'



NEW LORDSDALE VARIANT IN MAIZURU, JAPAN, 2003-2004

Lopman et al., Lancet 363:682-688

Before June 2002: GII/4 with **AACTTG** motif in the polymerase starting at position 4820 (referring to Norwalk virus M87661)

After August 2002: GII/4 with unseen **AATCTG, AACCTG, AATTG, AAACTG**: Outbreak → New Lordsdale Variant

5247/04Maizuru/JP

CCAATGGAACTCCATCGCCCCTGGCTTCACTCTCT

GTGCGCTCTGAAGTTACA **AATCTG** TCCCCCTGACAT

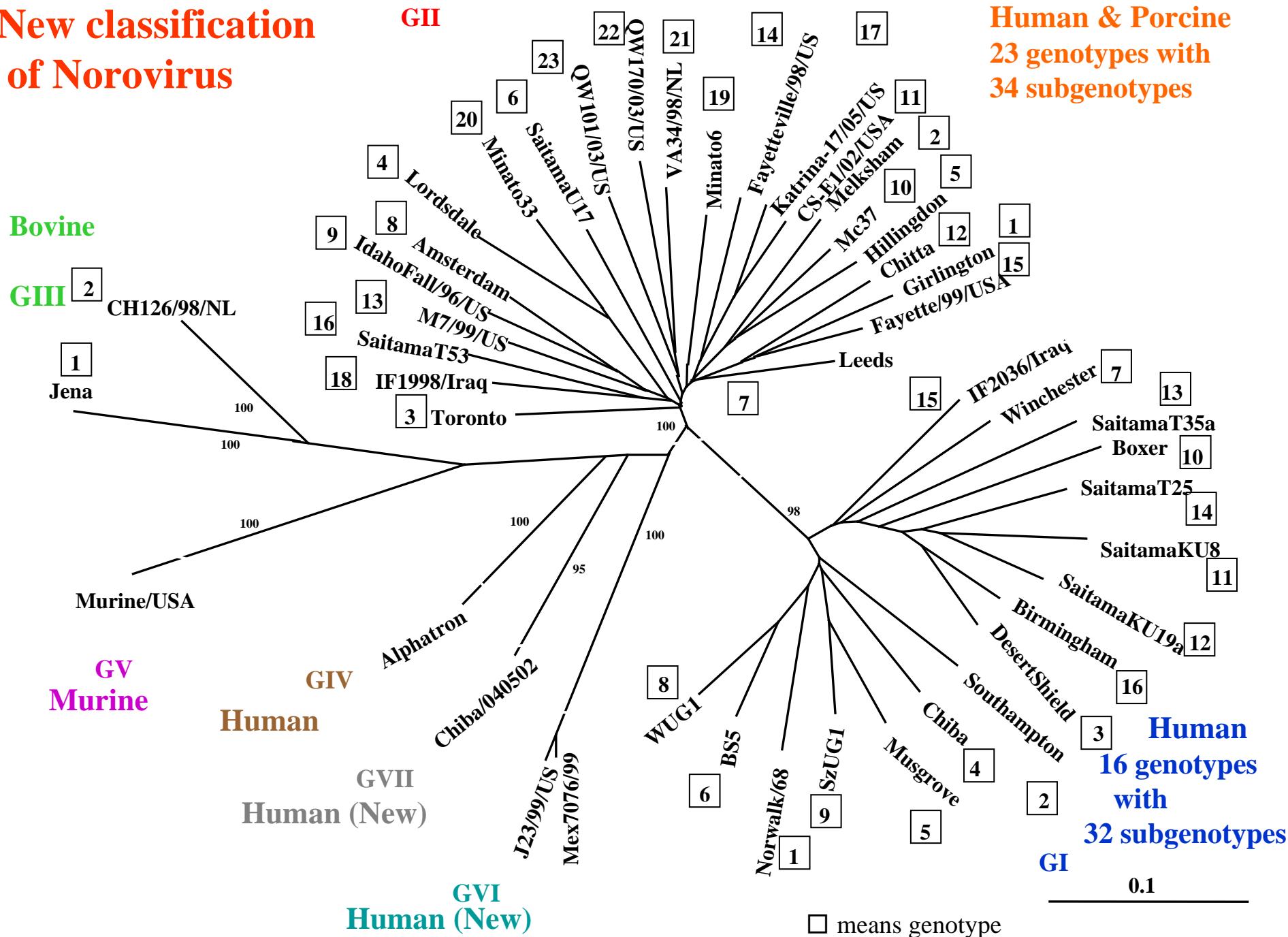
CTACAGGCTAATTCCCTCTTCTCCTTATGGTGATGAT



increase, 2004-2005

New classification of Norovirus

**Human & Porcine
23 genotypes with
34 subgenotypes**



アジアの国でのノロウイルス感染(糞便より)

日本	2002–2003 外来患児	GII 21. 0% (GII/4 81%、GII/3 7%他)
ベトナム	2002–2003 入院患児	GII 5. 5% (GII/4 82%、 GII/3 18%)
バングラデシュ	2004–2005 外来患児	GII 5. 0% (GII/4 100%)
タイ	2002–2004 外来・入院患児	GII 12. 5% (GII/4 62. 8%、GII/3 20%他)
中国雲南	2004 外来・入院患児	GII 7. 0% (GII/4 90%、GII/7 10%)

季節

ベトナムではJul-Oct にやや多く見られた

タイ(チェンマイ)では季節性はっきりしない

バングラデシュでは11月–3月、8月–9月にやや多い

アジアの国ではロタウイルスの感染症が多く(省略)、ノロウイルスは少ない。

中国・日本の貝からのノロウイルスの検出

材料

中国産貝 130個(福建省) 日本産貝95個 計225個

2005年10月～2006年9月に約1/2W購入, 1袋5個の貝各々

方法 RT-PCR (nested)

結果

中国産

ノロウイルス(NV)G II 型陽性: 19/130サンプル(15%)

ロタウイルス(RV)陽性: 6/130サンプル(5%)

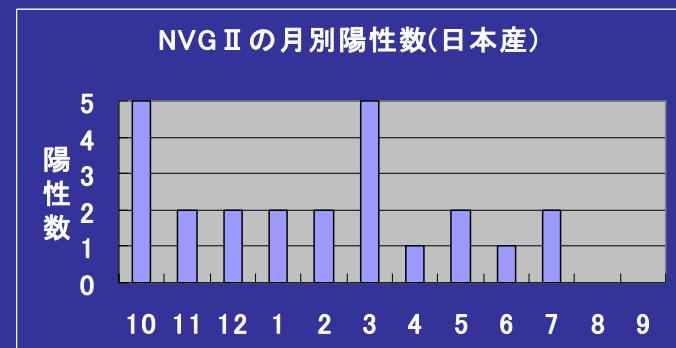
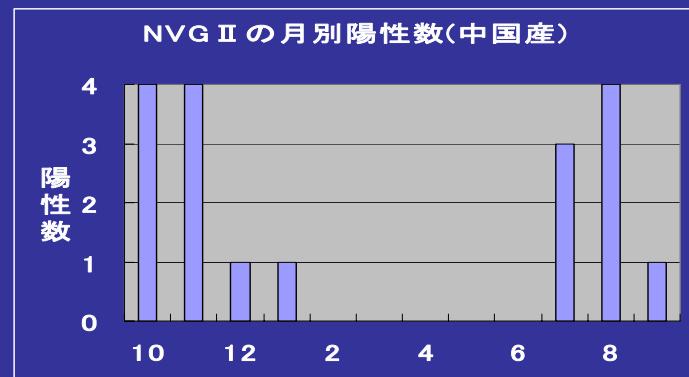
日本産

NVG II 陽性: 24/95サンプル(25%)

RV陽性: 2/95サンプル(2%)

NVG I 陽性となったサンプルはなし

GII/3とGII/4 両国とも似た群



下痢症ウイルスと免疫

- ・免疫の持続は数ヶ月
 - ・口タウイルスは遺伝子型が多いが、どれかにかかるとその免疫が他の型の感染防止にある程度効果ある。
 - ・ノロウイルスは型別の反応が強く他の型とは感染防御に効果なし。
 - ・ABOおよび分泌型/非分泌型が関係する。
(ノロウイルスの型によって違う)
- さらに口タウイルス、ノロウイルスは変異するが、特にノロウイルスは変異が大きい、新しく流行する可能性がある。

ノロウイルスの分子疫学における教室の成果

- 1) タイ、ベトナム、バングラデシュ、スリランカ、中国で初めて報告をした。
- 2) わが国で子どもの流行疫学を継 yearly に追跡した。
- 3) ゲノグループIIのなかで分子内組み換え(ゲノグループ内、ゲノタイプ内)および突然変異を見出した。
即ち、年ごとの主流な株は新しい組換えウイルスであった。
- 4) 新しいゲノグループを提唱した。
- 5) わが国の主流な株は、世界の主流な株と類似していた。
- 6) ノロウイルスはわが国では多いがアジアではむしろロタウイルスの頻度が多かった。
- 7) 中国産の二枚貝からも見出した。
- 8) ノロウイルス感染で胃腸炎以外の症状がある。ウイルス遺伝子を血清中に確認した。

診断法の開発

ロタウイルスとノロウイルスについて

Examination for Rotavirus

- 1) EM
- 2) RNA-PAGE
- 3) Enzyme Immunoassay
- 4) Latex agglutination
- 5) RT-PCR (multiplex)
- 6) Immunochromatography
- 7) Sequence analysis

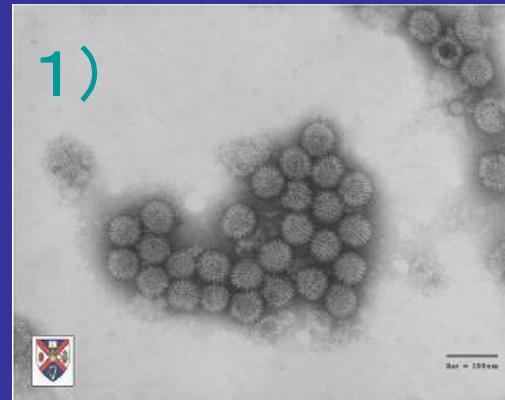


† 競走馬総合研究所 “馬口タウイルス感染症”
<http://www.equinst.go.jp/JP/book/kansenS/RTV.html>

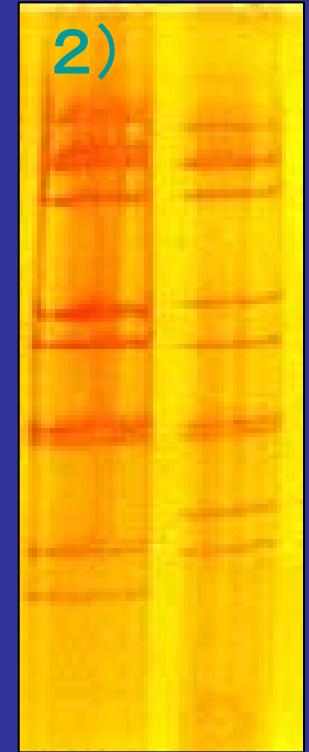


† 中央農業総合研究センター

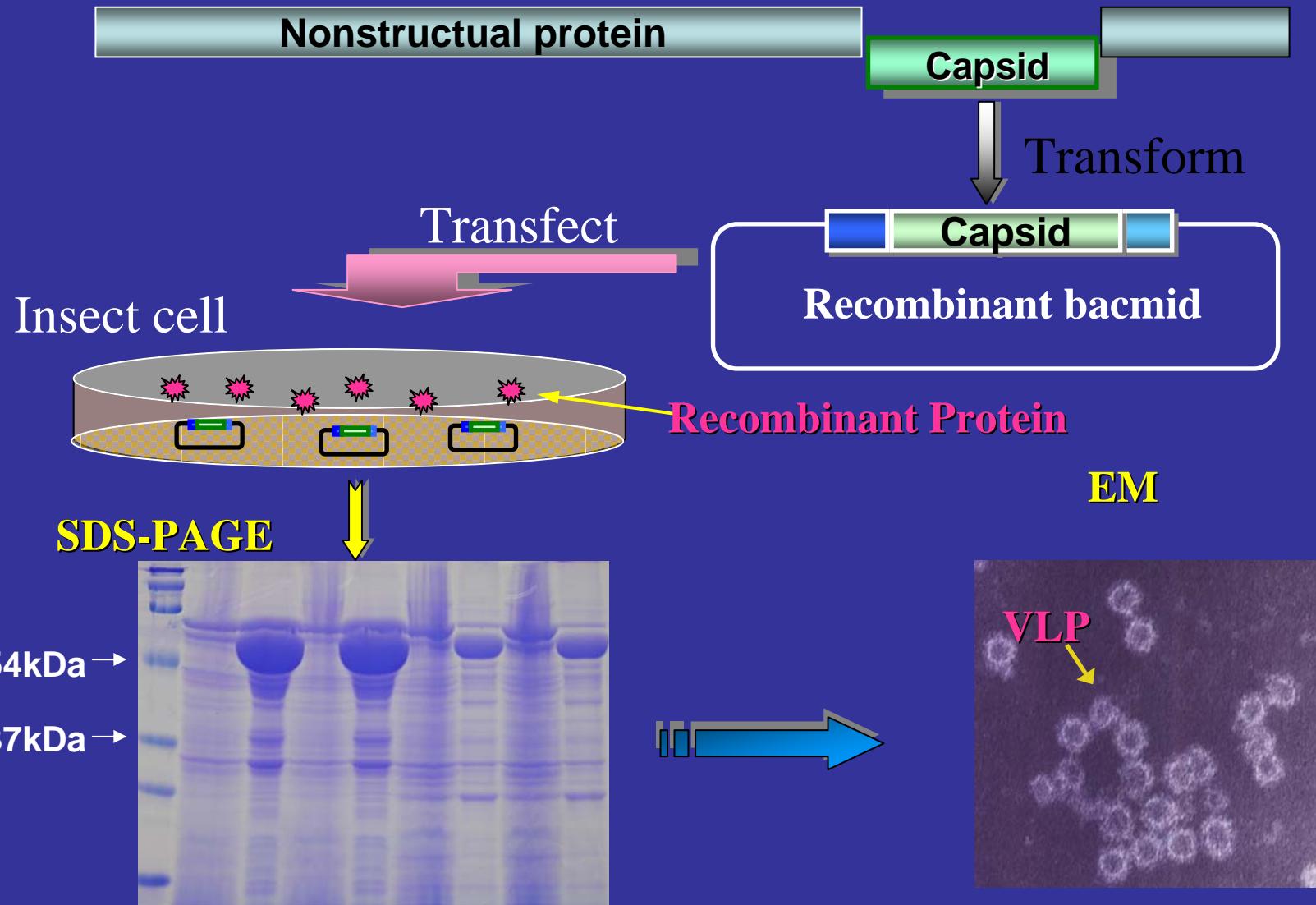
<http://narc.naro.affrc.go.jp/openlabo/kankyo.htm>



† Veterinary Sciences at Queen's (Brian Meehan)
<http://www.qub.ac.uk/afs/vs/vsd6b.html>



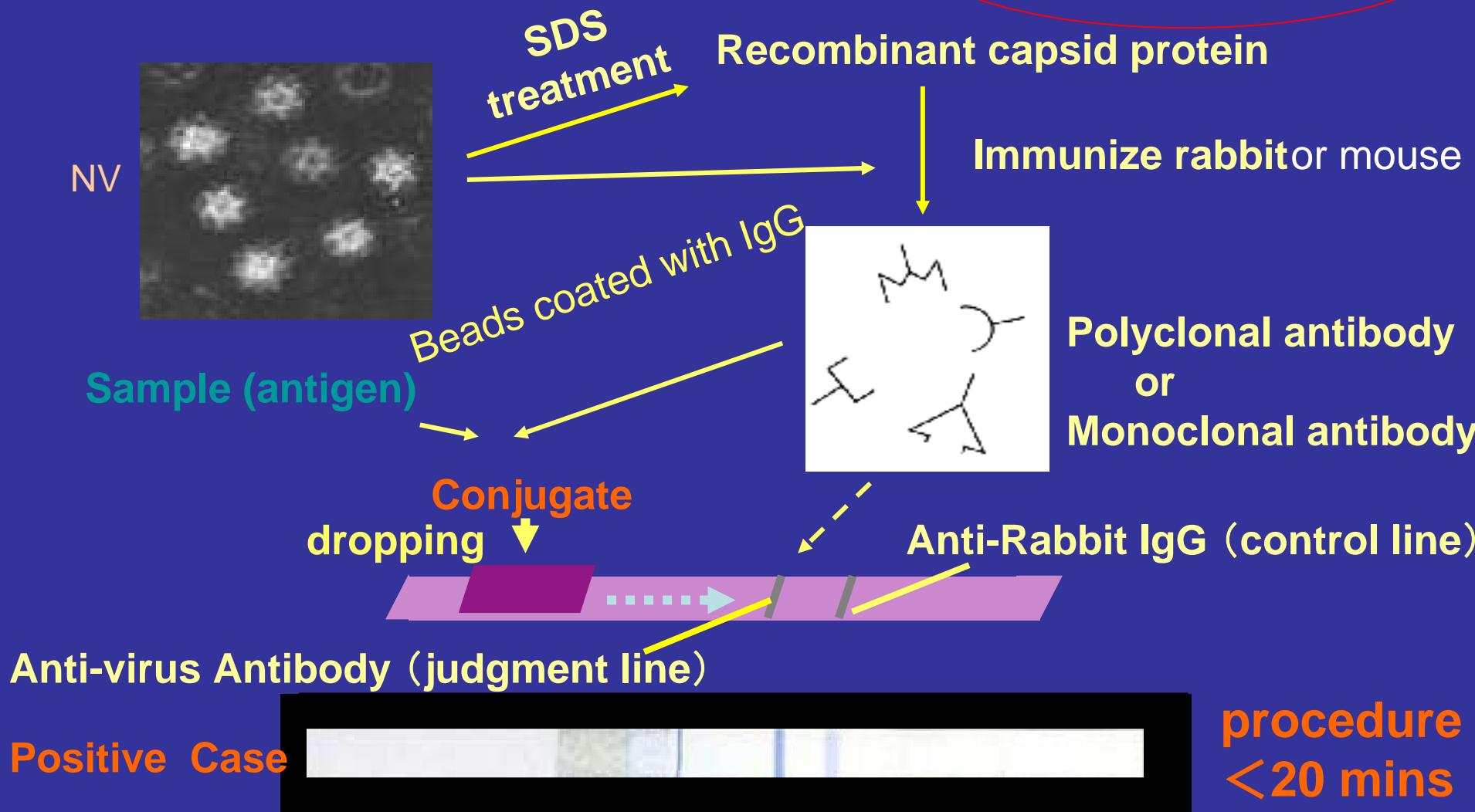
Expression of rVLPs (recombinant virus-like particles)



Principle of Immunochromatography

Purified virus (Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus) or
Virus like particles (Norovirus, Sapovirus)

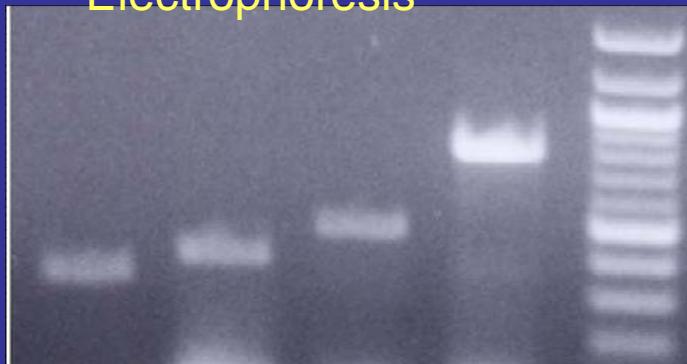
いつでも どこでも 誰でも 簡単に
迅速に(安く)出来る検査法の開発



RT-PCR

1

Electrophoresis

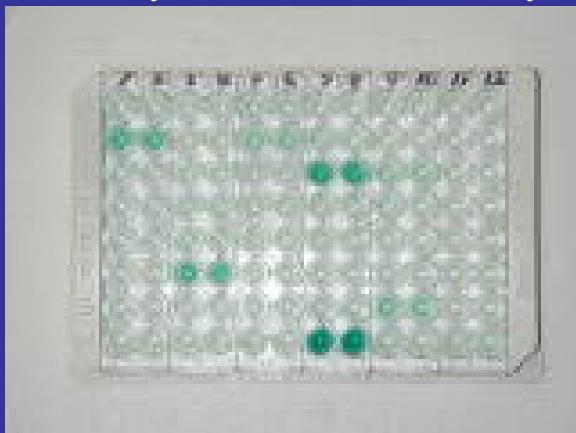


Detection of Norovirus

RT-Loop-Mediated Isothermal amplification

著作権処理の都合で、
この場所に挿入
されていた画像を
省略させて頂きます。

Enzyme immunoassay



著作権処理の都合で、
この場所に挿入
されていた画像を
省略させて頂きます。

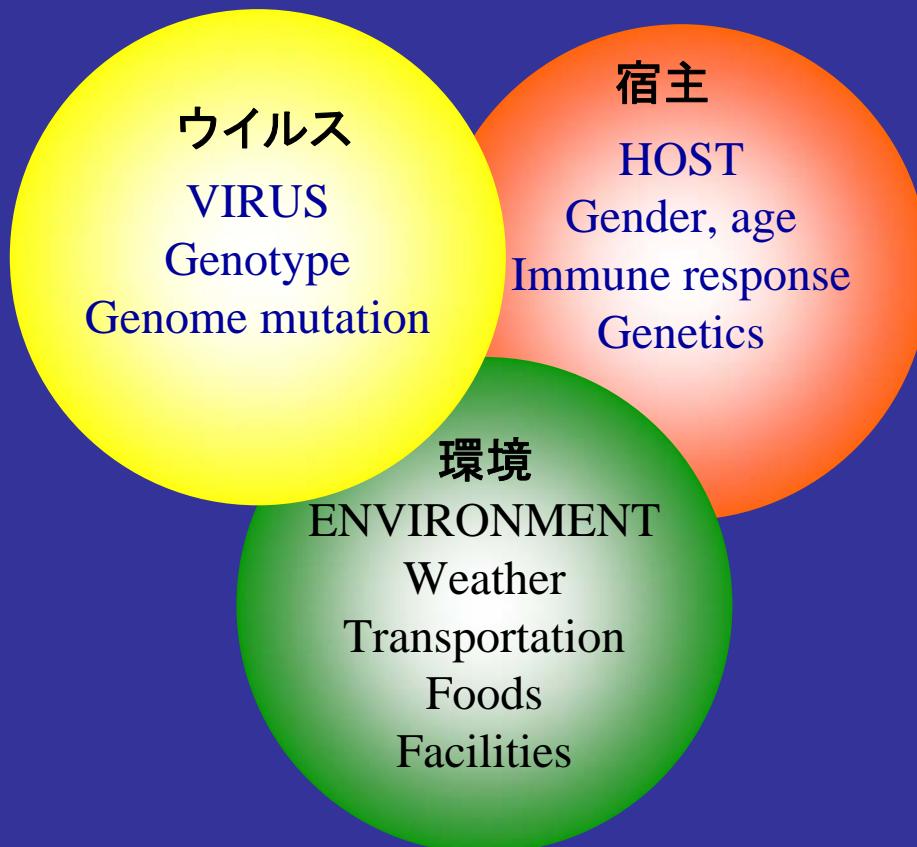
Immunochemical Methods



下痢症ウイルスの診断における教室の成果

- 1) Multiplex PCRによる遺伝子診断で下痢症に関する複数のウイルスを同時に診断可能とした。
- 2) ノロウイルスの中空ウイルス粒子(VLP)を作製した。VLPを用いてモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を作製した。
- 3) ノロウイルスのイムノクロマト法を開発した。
- 4) ノロウイルスの遺伝子診断の1つであるLAMP法の開発に協力した。

Variability of Viruses and clinical manifestations



- ・ウイルスの変異
地域、年
 - ・環境の変化
温暖化で流行期の変化
人・食の移動で広範囲・同時に
住居等の変化で感染機会増す
 - ・宿主の免疫
自然免疫・獲得免疫の変化
子どもだけでなく成人・高齢者
- ↓
- 速やかに診断し、感染の拡大
を防ぐ。情報の共有。日常の
感染症対策。重症化しないよ
うに注意する。

国際母子保健学

アジアにおける母乳哺育 (日本、中国、タイ、韓国、台湾、ベトナムなど)

少数民族の母子保健 (肥満とやせ、微量栄養素不足、鉛中毒、発達など)
(ベトナム、ラオス、中国、タイ、在日外国人など)

エイズの母子感染、下痢症、B/C/E型肝炎
(タイ、中国、ベトナム、日本など)

母子保健支援
(栄養指導のDVD、栄養指導の冊子、わが国の母子保健の英語版、
在日外国人の子どものための日本の予防接種の多言語訳)
(中国、ラオス、日本など)

他

雲南省潞西における5歳以下の子どもの栄養とビタミンB1欠乏に関する介入型の研究 (2000-2004)

- この地域(74%がタイ族)では栄養不良が多く、またビタミンB1欠乏で死亡する子ども(600人/10万人)がある。

方法 質問紙での調査、身長・体重・尿中B1測定、面接

結果: 30%が栄養不良、10%がB1欠乏

医療(医師、設備等)の不足、

栄養に対する知識不足(米の研ぎ過ぎ、煮炊き過ぎ)

誤った認識(分娩後米が中心で、卵・魚などを母親がとらない)

(早期から大人に近い食べ物を児に与える、母乳栄養の低さ)

介入: 地域中心型の計画(行政、医療保健関係者、地区の住民など)

栄養指導、ビタミンB1の提供

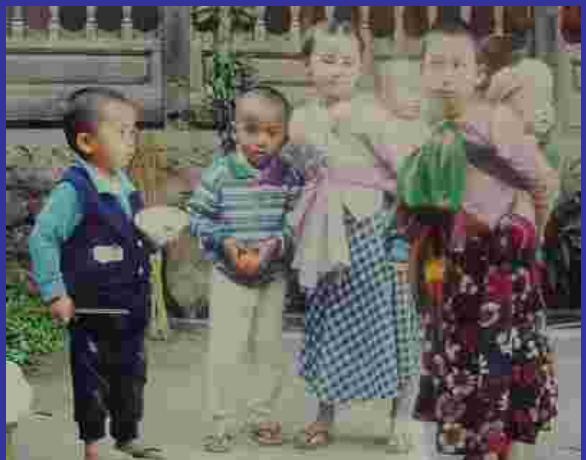
母乳栄養の推奨

医師・医療施設の補充

結果: ビタミンB1欠乏での死亡なくなる。栄養不良の減少(8%に)

医療設備の向上

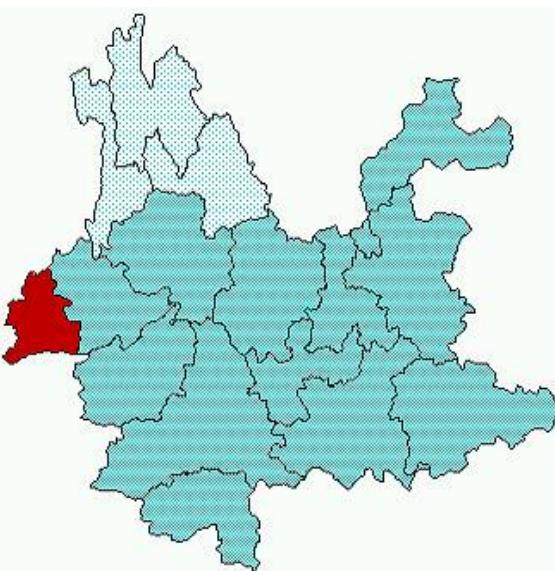
更なる改善へ



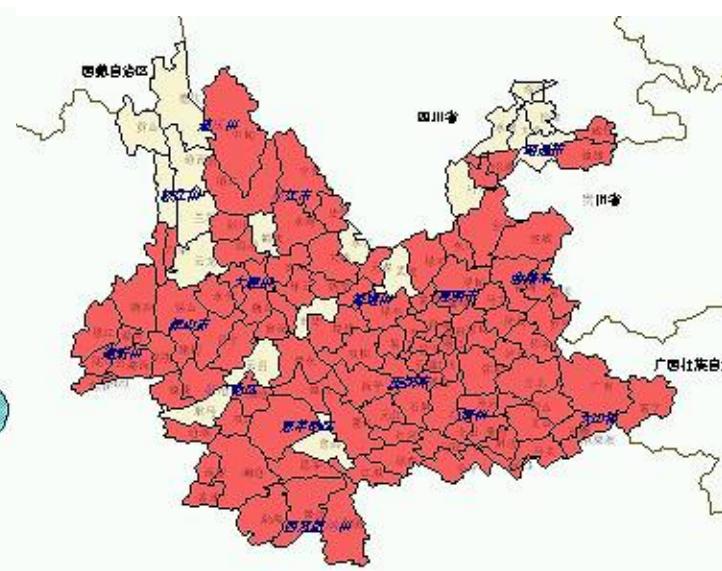
Research on Prevention of Mother-to-child Transmission of HIV in Yunnan, China

HIV Prevalence of pregnant women up to 1% in some region , 2004

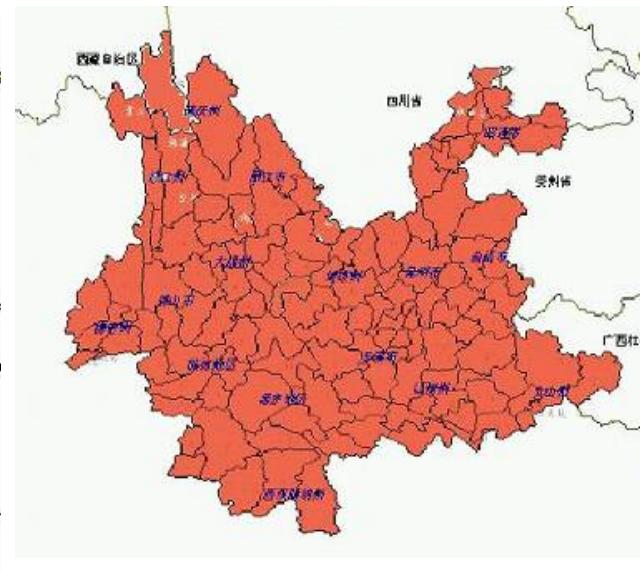
1989



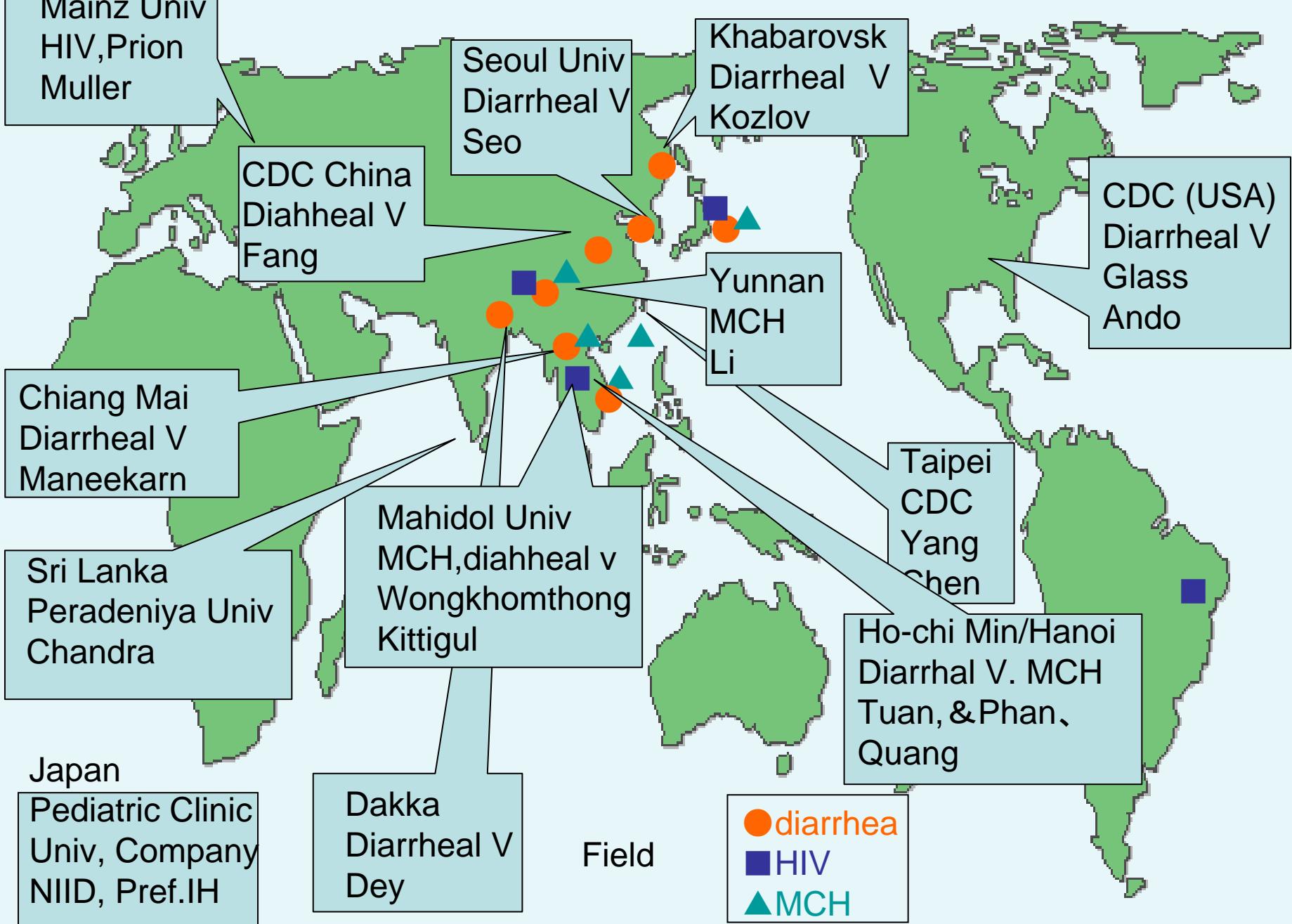
1999



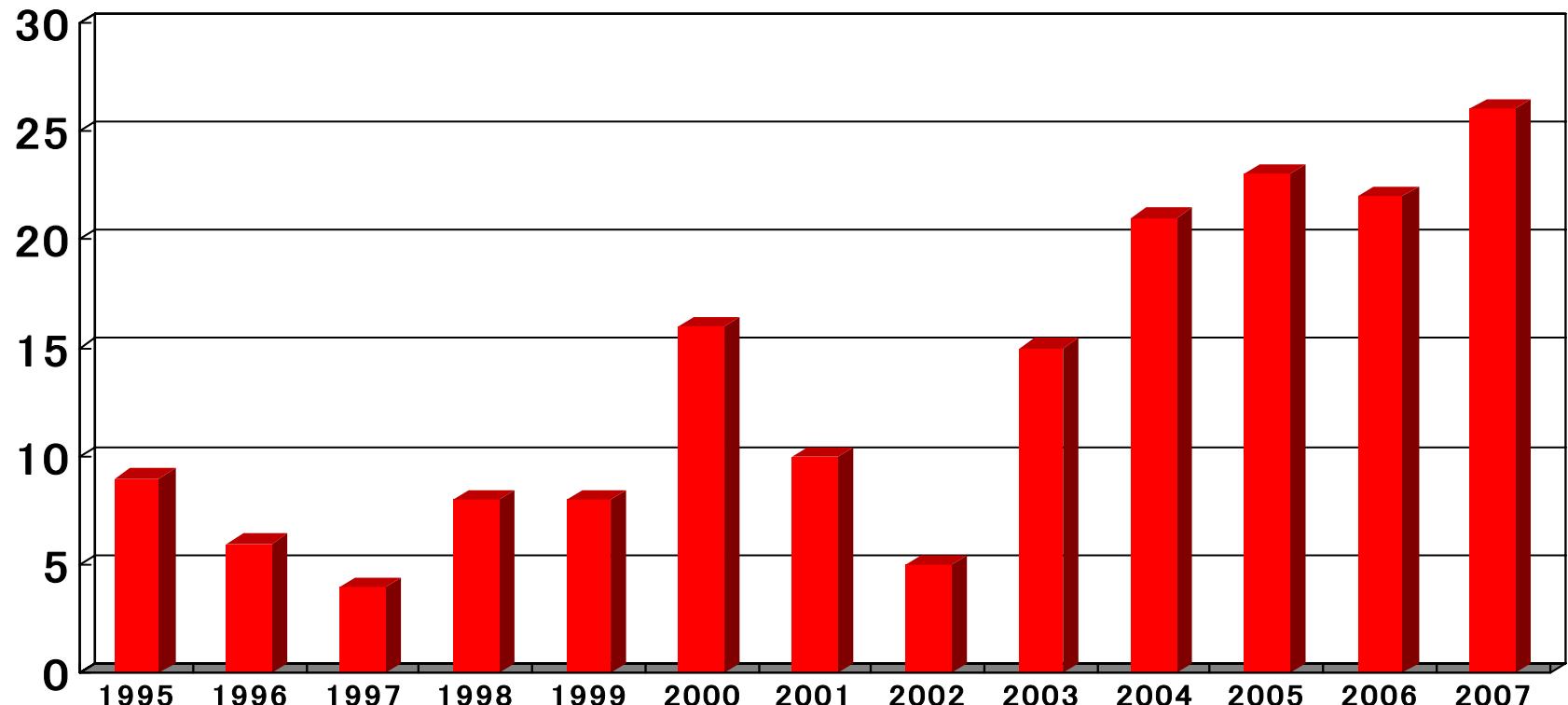
2005



Worldwide Collaboration and/or Communication



Publications of research (or in press) in English



174 papers

今後の研究

- ・分子疫学

　ロタウイルス、ノロウイルスなどの世界規模での流行に関係する
要因解明 と 対策 (環境との関連)

- ・診断法の開発および改良

　イムノクロマト法、 新たな遺伝子増幅法

- ・ワクチンに向けての一歩

　ロタウイルスワクチン (不活化ワクチン ー コンポーネントワクチン)
ノロウイルスワクチン (ウイルス中空粒子)

- ・治療および健康食品

- ・国際協力

　感染症

　母子保健

主体として行うこと、若い研究者に引き継ぎ、 民間企業に引継ぎ
社会貢献



- ・夢、目的意識
dream, purpose
- ・情熱
passion
- ・挑戦
challenge
- ・継続は力なり、千里の道も一歩から
Make progress everyday
- ・ハングリー精神
hungry spirit
- ・健康、安全
health, safety
- ・共生、協力
live together, friendship

発達医科学教室

医学系研究科

東京大学

の

更なる発展を

アンパンマンと共に

期待します！



最終講義

御清聴ありがとうございました。



シュバイツワーの生家



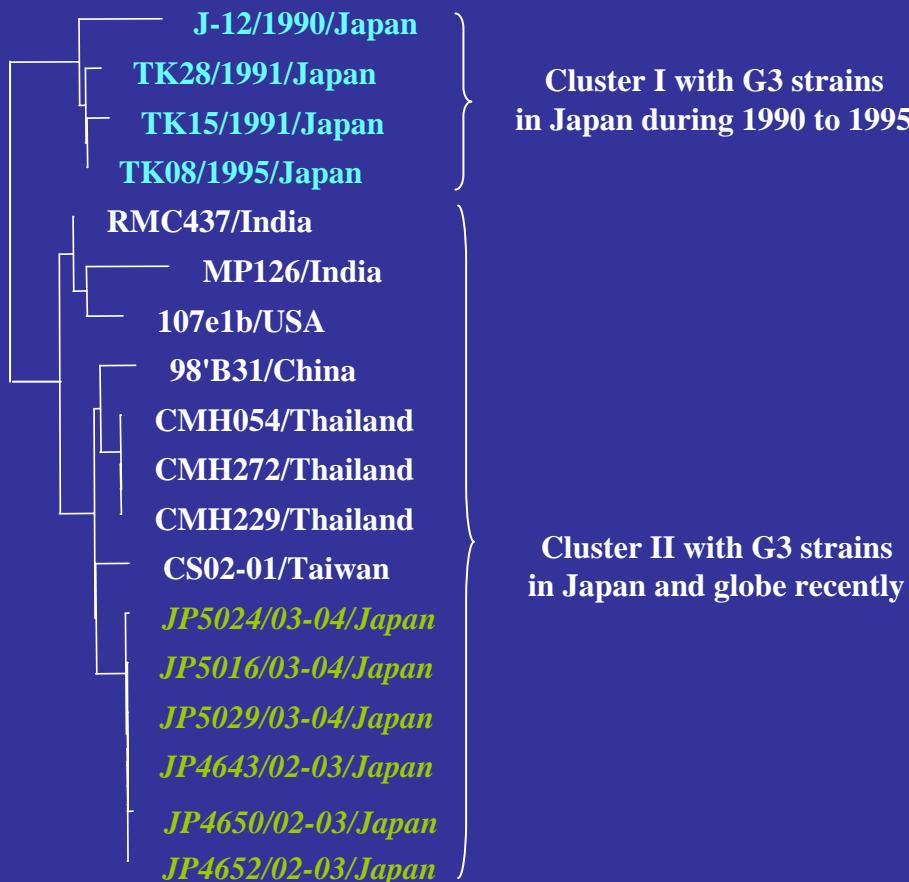
ヘレン ケラーの生家

長い間 研究生活などを一緒に
していただきて感謝いたします。
今後とも宜しくお願いします。

(本日の準備、教室関係者に深謝します)

Emergence of new variant G3

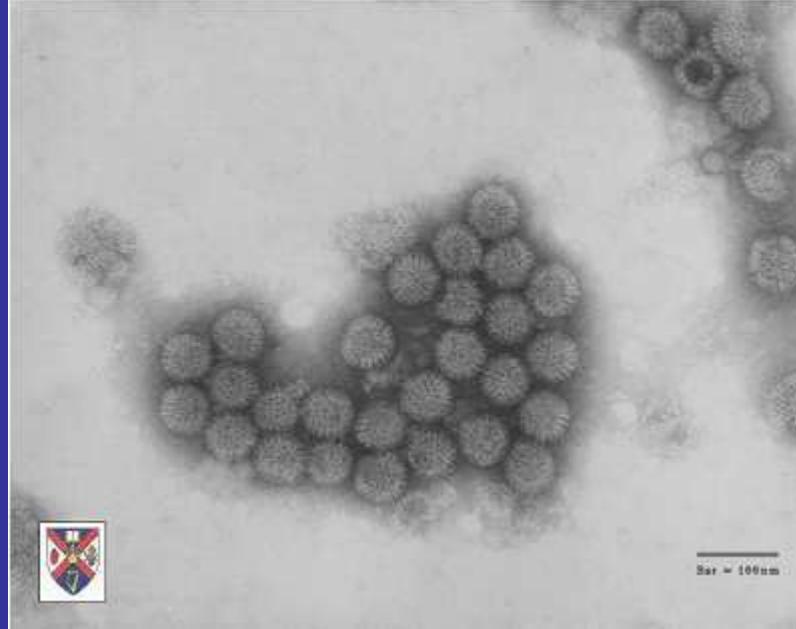
JAPAN, 2002-2004



* **16 amino acid substitutions: rotavirus G3 in 1990-1995**

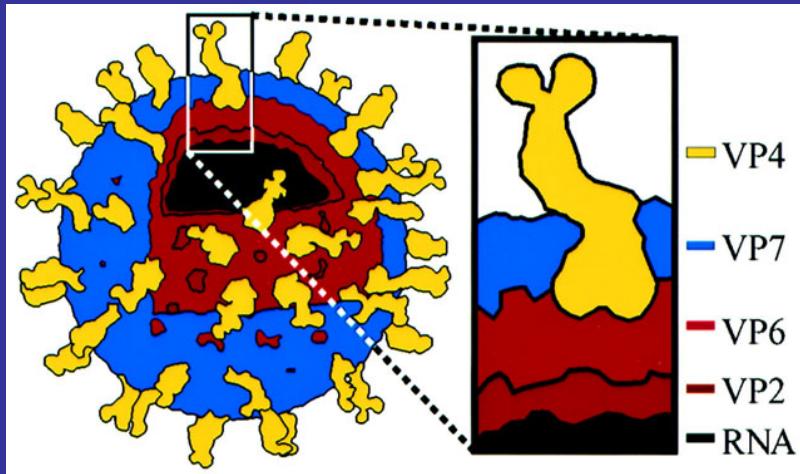
* **4 amino acid substitutions: antigenic A and C regions**

Virology of Rotavirus



From Stewart McNulty at Veterinary Sciences, Queen's University, Belfast

‡ Veterinary Sciences at Queen's (Brian Meehan)
<http://www.qub.ac.uk/afs/vs/vsd6b.html>



‡ Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd:
THE EMBO JOURNAL, copyright 2002

Family	Reoviridae
First report	1973
Transmission	Person–person
Classification	Group A–G
Particles	Icosahedra, 65–75nm, 3 layer, no enveloped
G serotypes (VP7)	15 (G1–6, G8–10, G12 in human)
P genotype (VP4)	26 (P[8],P[4] etc)
Genomes	11 segments of dsRNA, each segment codes for at least one protein
Lab diagnosis	EM, EIA, RT–PCR, IC, Cultivable
Human	Group A,B,C,ADRV Zoonotic

分子疫学について述べる前に

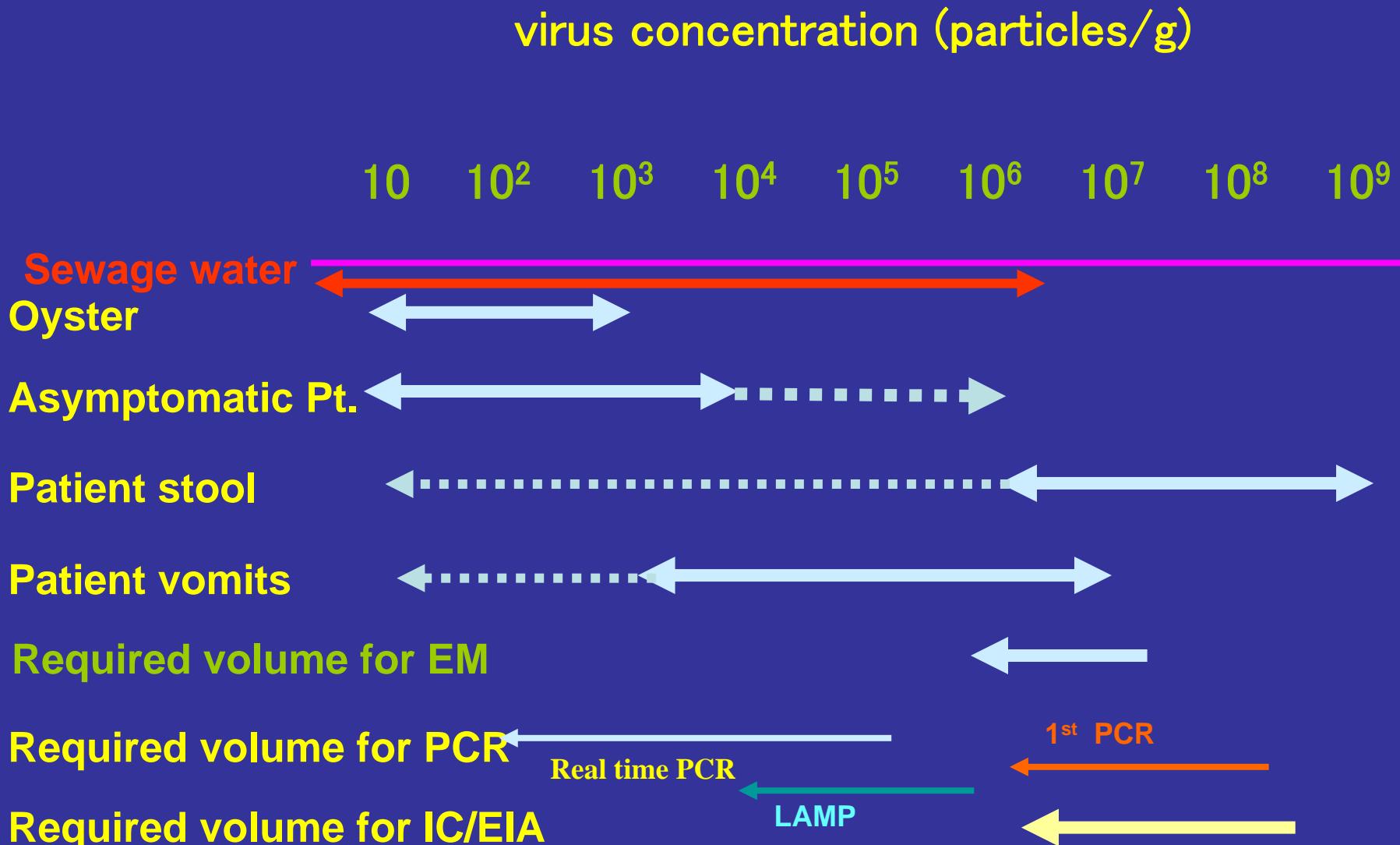
細胞レベルで

- マウスロタウイルスの培養
 - マウスロタウイルスの遺伝子解析
マウスモデル
 - ヒト骨髄系未熟細胞でのHIV感染
- 胎盤細胞のHIV感染(コレセプターとの関係)

感染症に対する取り組みとその要約

新しいウイルスを見出す	×
ウイルスの疫学、病態	○
診断法	○
国際保健に役立つ	○△
ワクチン	×
治療	× (in vitroのみ)

Norovirus concentration and examination methods



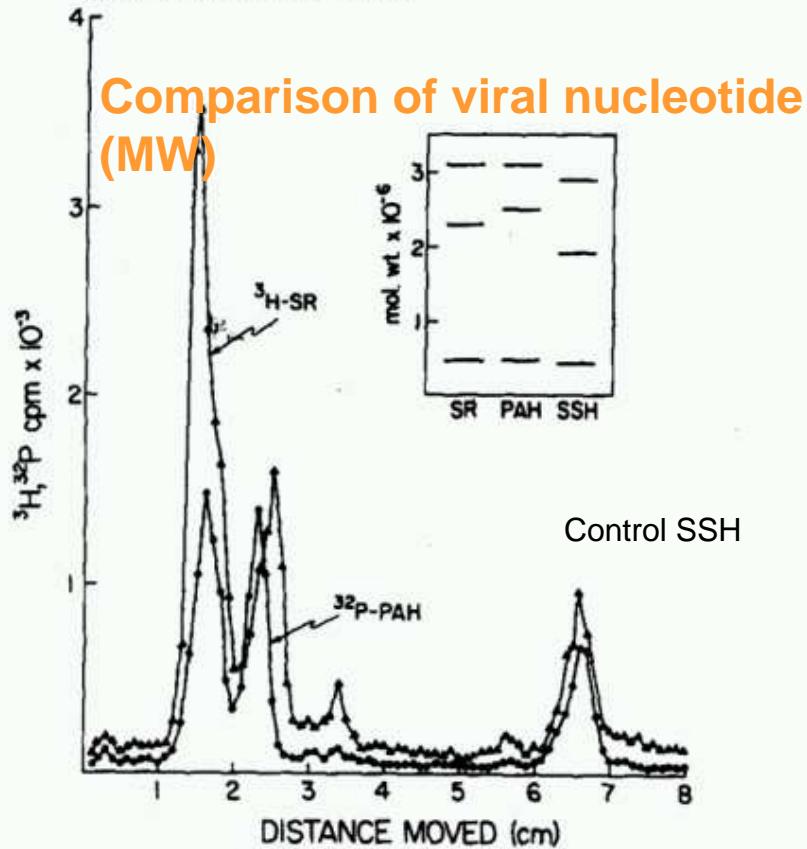
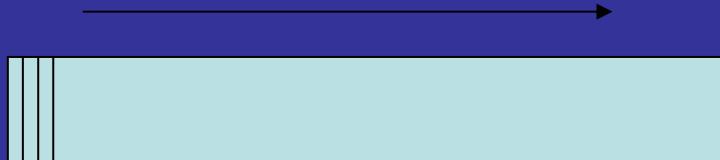
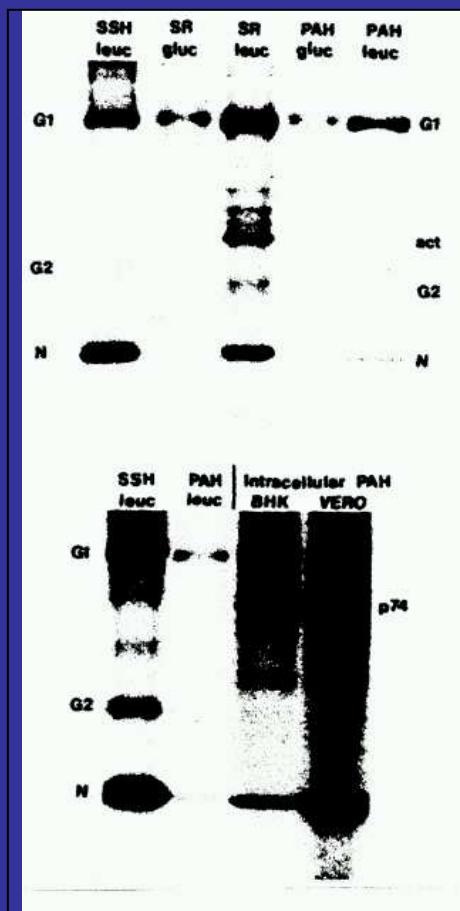


FIG. 1. The viral RNA species of PAH and SR viruses. Preparations of [3H]uridine-labeled SR viral RNA and [^{32}P]phosphate-labeled PAH viral RNA were mixed and resolved by 2.4% polyacrylamide gel electrophoresis (Bishop *et al.*, 1967). In the inset is depicted the relative apparent molecular weight values of SR, PAH, and SSH viral RNA species as determined from various coelectrophoreses.



Electrophoresis,
Then cut gel thinly after freezing



Virion and intracellular polypeptides using labeling.

Control;SSH

Comparison of Viral polypeptide (MW)

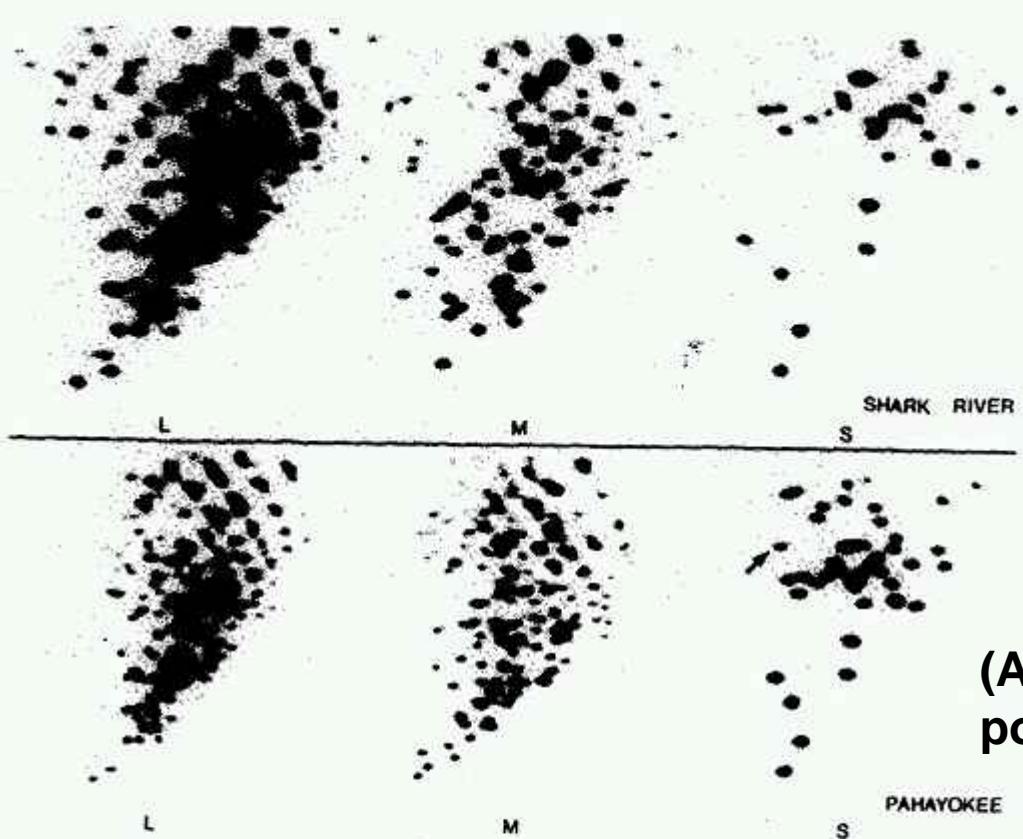


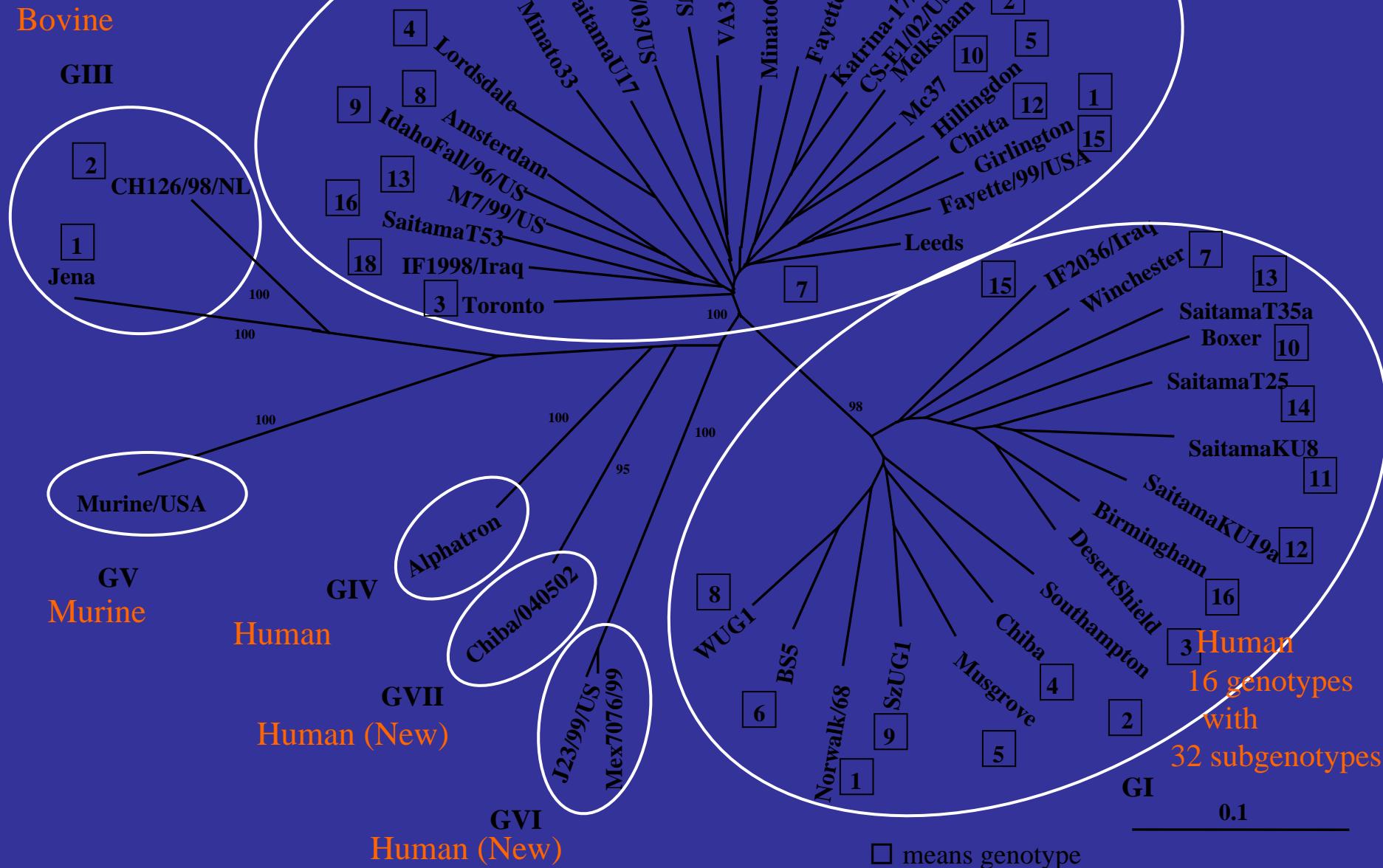
FIG. 2. Oligonucleotide fingerprint analyses of PAH and SR viruses. The individual L, M, and S RNA species of SR (top three panels) and PAH (bottom three panels) viruses were recovered after resolution by agarose gel electrophoresis (Wieslander, 1979). The ribonuclease T1 oligonucleotide fingerprints of the viral RNA species were obtained as described by Clewley *et al.* (1977). The first-dimensional gel was run from left to right, the second-dimensional gel from bottom to top. Oligonucleotides that are absent from the S or L RNA patterns of one virus, by comparison to the other, are indicated by a *. Analyses of the oligonucleotide that is highlighted by an arrow in the PAH S RNA pattern showed that it was the 3' terminal oligonucleotide (see text).

PAH	SR
L RNA	almost identical
M RNA	different
S RNA	almost identical

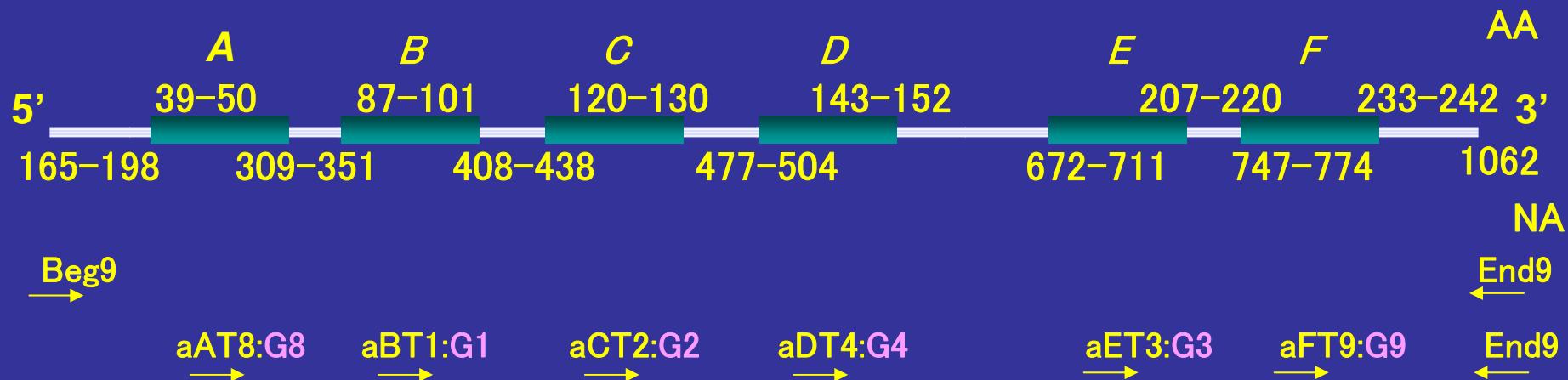
Naturally occurring
reassortant viruses
(At that time, sequencing was not
popular and just started.)
These observations are in
agreement with serological
studies.

Nutralization different,
complement fixation
same

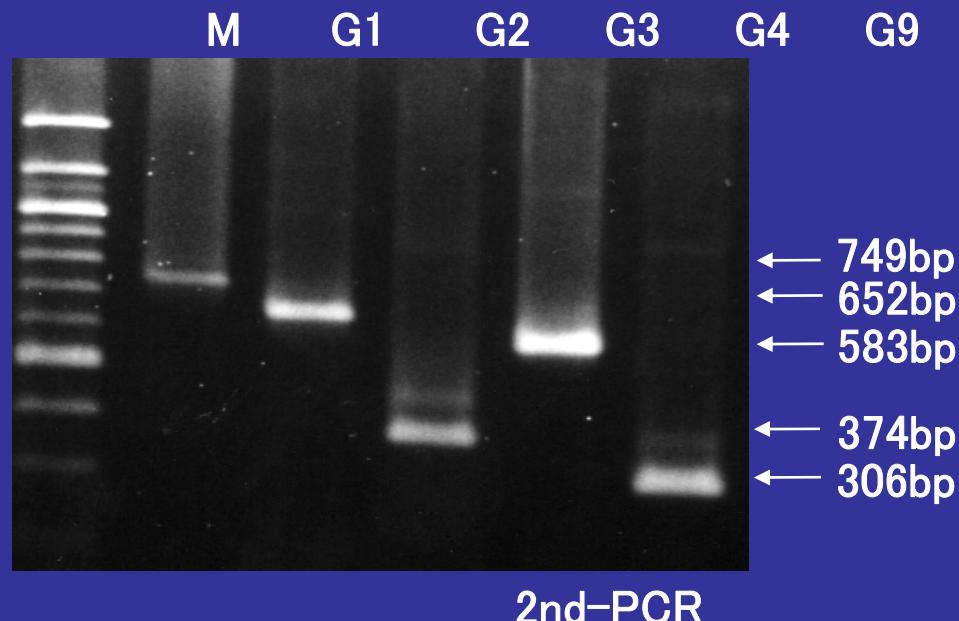
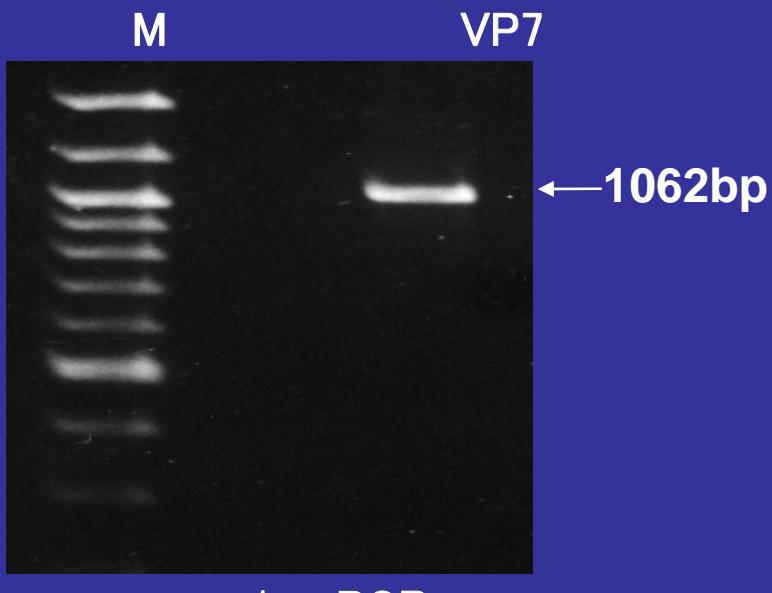
Human & Porcine
23 genotypes with
34 subgenotypes



RT-PCR with specific primers designed by Gouvea to differentiate G serotypes



Gouvea V et al., J Clin Microbiol 28: 276-82.



Multiplex PCR

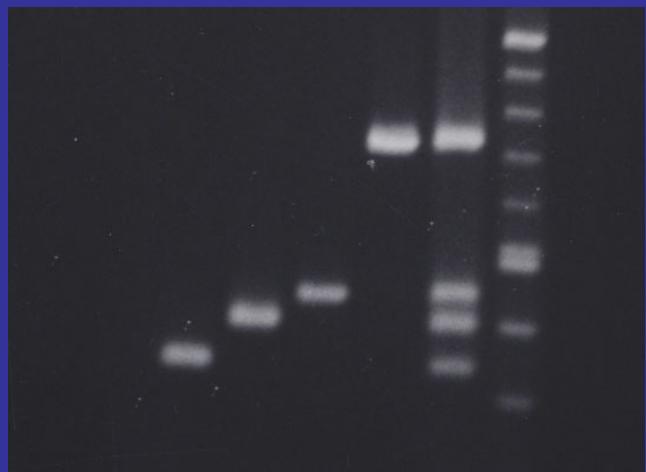
RNA Extraction from 10% stool supernatant



RT (SS RT II, random primer, 42°C 1 hr)



PCR with mixed primer pairs
(different size PCR product)



A set: rotavirus A, B, C and adenovirus

B set: astrovirus, norovirus GI & GII, sapovirus

C set: hepatitis virus A & E, influenza A, enterovirus

Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR H Ushijima, KQ Xin, S Nishimura, S Morikawa and T Abe
J Clin Microbiol 32(12): 2893-2897, 1994. 髄液、血液中にもロタウイルスがある。

Human rotavirus RNAs from stool samples, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs of 15 children with rotavirus gastroenteritis were detected and serotyped by reverse transcription and PCR. The reverse transcription-PCR method may allow us to consider rotavirus infections in other parts of the body in addition to the gastrointestinal tract. Moreover, sequence analysis of the VP7 gene was performed on seven samples (one stool, two serum, three cerebrospinal fluid, and 1 throat swab sample). There were no appreciable differences in viral sequences between samples from cerebrospinal fluids, sera, or stools. 新たに注目されている。

→ Rotavirus RNA in CSF of 1/3-1/2 cases of rotavirus encephalopathy

Neurological complications associated with rotavirus infections in children.
Review of the literature by Lynch M et al. CID 2001:33

Rotavirus in blood by Blutt, S.E et al.: Lancet 362:1445-1449 (2003)
Rotavirus antigen in blood around ½ cases



in case of Norovirus ???

2. 突然変異と表現型の変化 genotype and phenotype

a. 抗原性の変異 antigen mutant

点突然変異(point mutation) 置換・欠出・挿入

特に中和抵抗性変異株 neutralization escape mutant ↓

例えばインフルエンザのHA変異でantigen drift

b. 抗ウイルス薬に対する感受性変異

drug-resistant mutant

例えばアマンタジン耐性インフルエンザウイルス

c. プラークのサイズや形の変異

plaque morphology mutant

d. 条件致死性変異 conditional lethal mutant

$37^{\circ}\text{C} \rightarrow$ 例えば 32°C

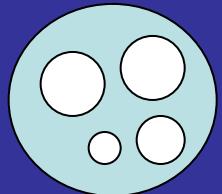
例えば温度感受性変異株 temperature sensitive mutant

弱毒ワクチン株として低温順化株 cold adapted mutant

また宿主依存性変異株 host-range mutant

e. 欠陥干渉粒子 defective interfering particle

高感染性で繰り返し培養すると遺伝子が大きく欠損するため不完全粒子が増え、正常ウイルスが減少する



混合感染におけるウイルス間の相互作用

2種あるいはそれ以上の近縁ウイルスが1つの細胞に同時感染すると、それぞれの遺伝子間で、または遺伝子産物(蛋白質)間で作用しあう。

1. 遺伝子間での相互作用

1) 遺伝的組み換え genetic recombination

① 分子内組み換え intramolecular recombination

② 遺伝子再集合 genetic reassortment

2) 遺伝的再活性化 genetic reactivation

① 多重感染再活性化 multiplicity reactivation

致死的ウイルス同士が感染すると補いあい

上記の相互作用で再活性化する。

② マーカー救済 marker rescue 感染性ウイルスのマーカーに非感染性ウイルスのマーカーが組み換えて入る

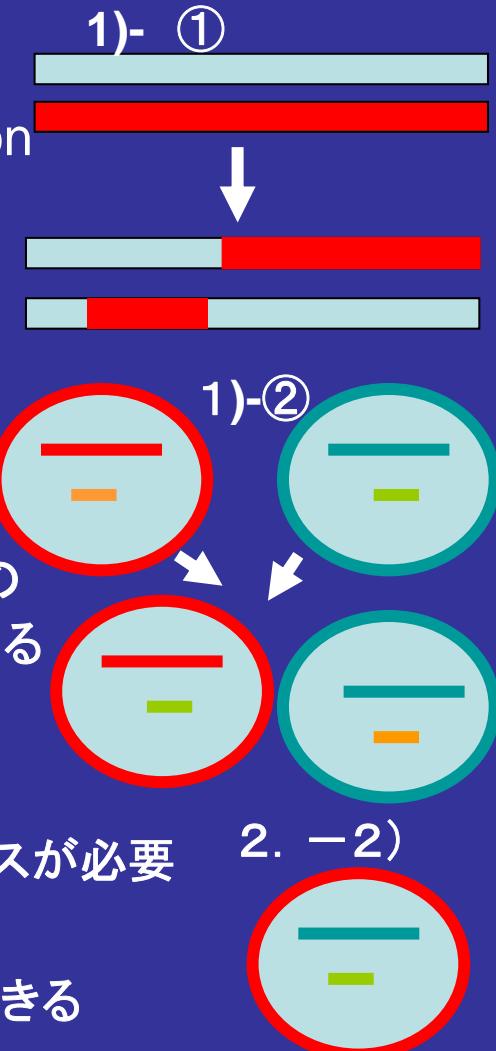
2. 遺伝子産物間の相互作用

1) 相補 complementation

アデノウイルス随伴ウイルスの増殖のためアデノウイルスが必要

2) 表現型混合 phenotype mixing

近縁ウイルスの混合感染で、交じり合った構成蛋白ができる
子孫は続かない、もとに戻る



ウイルスの進化

a.遺伝子多様性 genetic diversity

DNAウイルス:RNAウイルス 10^2 の差

年あたりの変化率は世代時間(ウイルスの種類、宿主、抗ウイルス薬など)によってかわる。

HIV-1(レトロウイルス)では 2.4×10^{-3} /塩基/年

HHV-1(DNAウイルス)では 3×10^{-8} /塩基/年

同義置換(アミノ酸の変化は伴わない)ー自然変異

非同義置換(アミノ酸の変化を伴う)ーより影響大

b.進化の方向

遺伝子多様性は選択圧(中和抗体、CTL、薬剤など) drift, shift, hypervariable

1)宿主の免疫が到達しないように潜伏 ヘルペスウイルスは潜伏感染

2)宿主の免疫を積極的に抑制 非構造蛋白の一部

3)ウイルスの生存のため 宿主とのバランスが必要

C.進化の解析

分子系統樹

タイ国チェンマイ市の小児下痢症入院患児における新しいロタウイルスG9の高頻度出現に関する研究

Khamrin P, Maneekarn N, Ushijima H et al.

- ・ロタウイルスは世界中の子どもの急性胃腸炎の原因となる。
- ・11本分節の2重鎖RNAウイルスである。
- ・ロタウイルスはVP7をコードするG遺伝子型(血清型)とVP4をコードするのP遺伝子型で分類される。これまでG1P[8], G2P [4] , G3 P[8] , G4P [8]が主流であった。

尚、 1987－1989 G9=1. 98% (Urasawa S et al.)
1996－1997 G9=16. 2% (Zhou Y, Ushijima H et al.)

今回 2000－2001 G9=91. 6%を見出した。

ブニヤウイルス科 Bunyaviridae

ブニヤウイルス属 Genus: Bunyavirus

主なウイルス: ブニヤンベラウイルス *Bunyamwera virus (BUNV)*、LA Crosse (カリフォルニア脳炎)
アカバネウイルス *Akabane virus (abortion of calf, anomaly of calf)*

ハンタウイルス属 Genus: Hantaanvirus

主なウイルス: ハンタウイルス *Hantaan virus (HTNV) (hemorrhagic fever with renal syndrome)*
Muerto Canyon (pulmonary)

ナイロウイルス属 Genus: Nairovirus

主なウイルス: *Dugbe virus (DUGV)*、*Crimean hemorrhagic fever virus*

フレボウイルス属 Genus: Phlebovirus

主なウイルス: リフトバレー出血熱ウイルス *Rift Valley fever virus (RVFV)*

トスピウイルス属 Genus: Tospovirus

主なウイルス: トマト黄化えそウイルス *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*

・感染と病気

動物、植物に感染するものがある。動物では、カやダニを中間宿主として他の動物に伝播されるものが多い。しかし、ハンタウイルスはげっ歯目の動物(ネズミなど)を自然宿主としており、げっ歯目動物が排出したウイルスにヒトが感染すると、腎症候性出血熱や呼吸困難を特徴とするハンタウイルス肺症候群を引き起こし、ときに重篤な経過をたどることがある。トマト黄化えそウイルスは、アザミウマ目(総翅類)昆虫で媒介される。ナス科、マメ科、キク科など、単子葉、双子葉植物に広く感染する。

・粒子構造

約100nmの径を持つ球状ないし橢円形で、やや多形性を示す。エンベロープを持つ。エンベロープ表面には、長さ10nmのスパイク(細い突起構造)を持つ。エンベロープ中に三種の複合体ヌクレオカプシド(遺伝子-タンパク質)を持つ。ヌクレオカプシドは、太さ約2.5nm、長さ200~3000nmの纖維状構造で螺旋状になっている。

・遺伝子

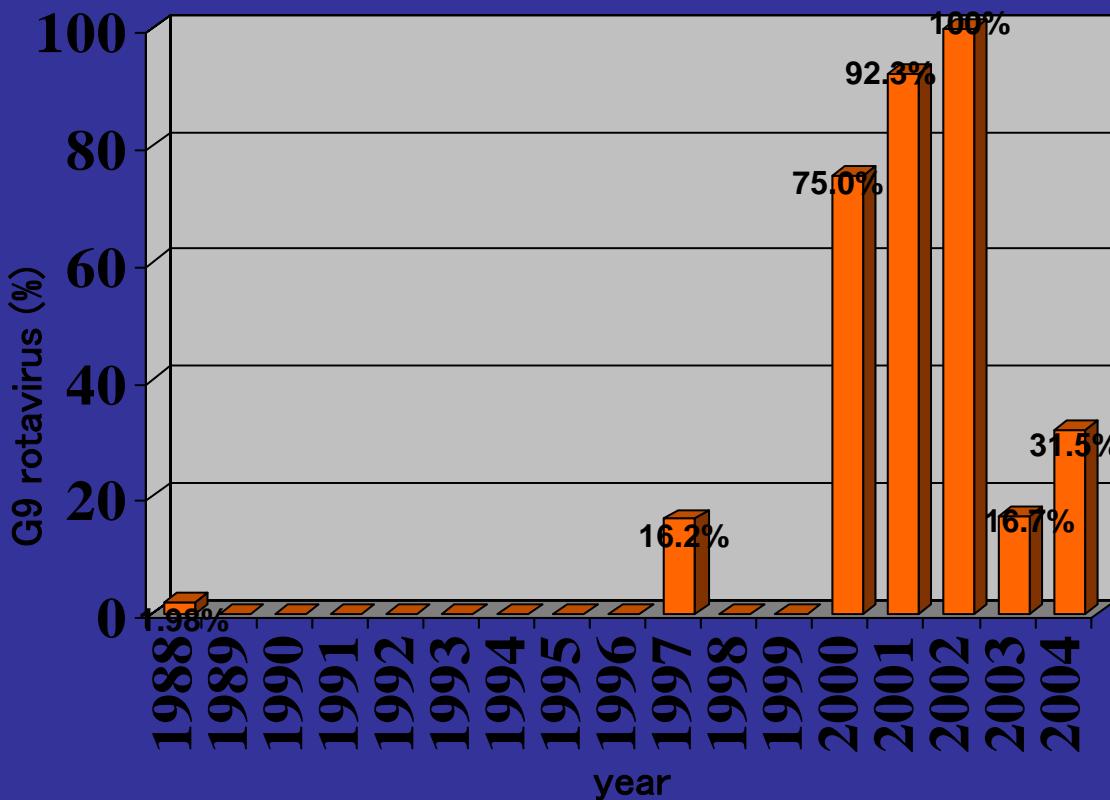
L、M、Sの大きさの異なる三本に分節した(分かれた)一本鎖(一)RNAを遺伝子とする。それぞれが、ヌクレオカプシドを作つて粒子中に存在する。粒子内に転写酵素を持ち、これを用いて感染細胞の細胞質内でmRNAを合成する。フレボウイルスのS RNAはアンビセンス (6.5-12.3K, 3.8-4.8K, 0.9-2.9K)

RNA segment	VP	Predicted A.A.	Location	Function	(SA11)
1	VP1	125K	Core	RNA polymerase, ssRNA binding	
2	VP2	94K	Core	RNA binding, required for activity of	
VP1					
3	VP3	88K	Core	guanylyltransferase, methyltransferase	
4	VP4	88K	Outer CP	hemagglutinin, neutralization antigen	
5	NSP1	53K	NS	zinc finger, RNA binding, block interferon regulatory factor3	
6	VP6	41K	Inner CP	subgroup antigen	
7	NSP3	34K	NS	bind 3' end of viral mRNAs, interact with eIF4G1	
8	NSP2	35K	NS	RNA binding, viral replication factor	
9	VP7	38K	Outer CP	RER integral Pr, neutralization Pr	
10	NSP4	28K	NS	RER transmembrane Pr, enterotoxin integrin receptor	
11	NSP5	26K	NS	phosphoprotein, viral replication factor	
11	NSP6	12K	NS	interacts with NSP5, in viroplasm	

これまで報告された、ロタウイルス 感染と下痢症以外の疾患との関連

- 腸重積、壊死性腸炎、出血性胃腸炎、蛋白漏出性胃腸炎、胆道閉鎖
- 脳炎、無菌性髄膜炎、ライ症候群、ギランバレー症候群、熱性痙攣、無熱性痙攣、出血性ショック脳症症候群
- 腎溶血性尿毒症症候群、ネフローゼ症候群
- ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、播種性血管内凝固、突然死症候群
- 筋炎、低カルシウム血症、過ナトリウム血症

Emergence of Human G9 Rotavirus in Children Hospitalized with Diarrhea in Chiang Mai, Thailand



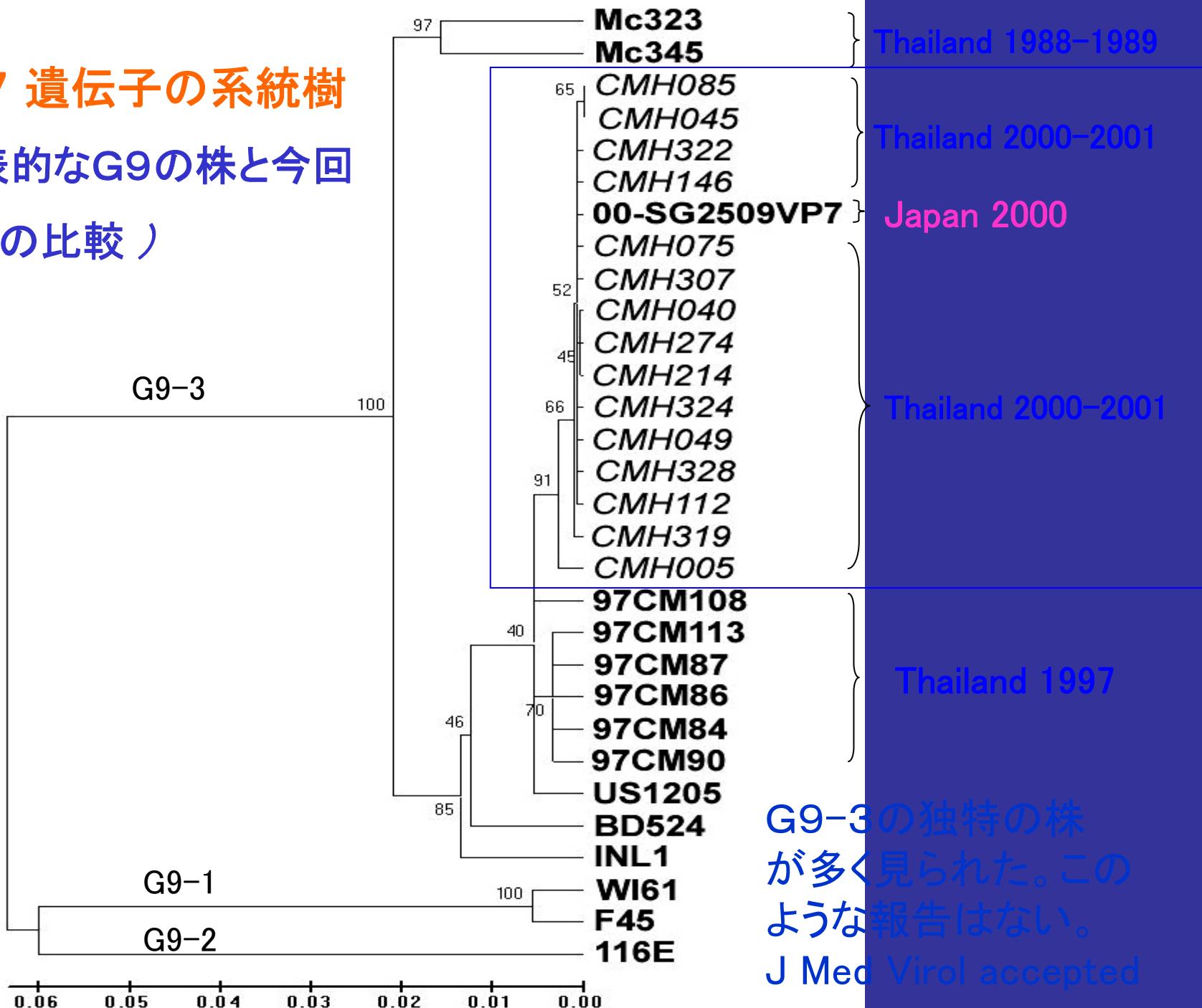
- 1988, G9 = 1.98% (Urasawa, et al. *J. Infect. Dis.* 166 : 227-34. 1992)
- 1997, G9 = 16.2% (Zhou, et al. *J. Med. Virol.* 65 : 619 – 28. 2001)
- 2000-2001, G9 = 75.0-92.3% (Khamrin, et al. *J. Med. Virol.* Accepted for publication)
- 2002-2004, G9 = 16.7-100% (Present study, Department of Developmental Medical Sciences)

G遺伝子型とP遺伝子型組み合わせの分布(2000–2001)

G遺伝子型	P遺伝子型			総計 (%)
	P[4]	P[8]	P[3]	
G9	–	98	–	98 (91.6)
G3	–	5	1	6 (5.6)
G2	3	–	–	3 (2.8)
総計(%)	3 (2.8)	103 (96.3)	1 (0.9)	107 (100)

G9P[8]の組み合わせが多かった。

VP7 遺伝子の系統樹 (代表的なG9の株と今回 の株の比較)



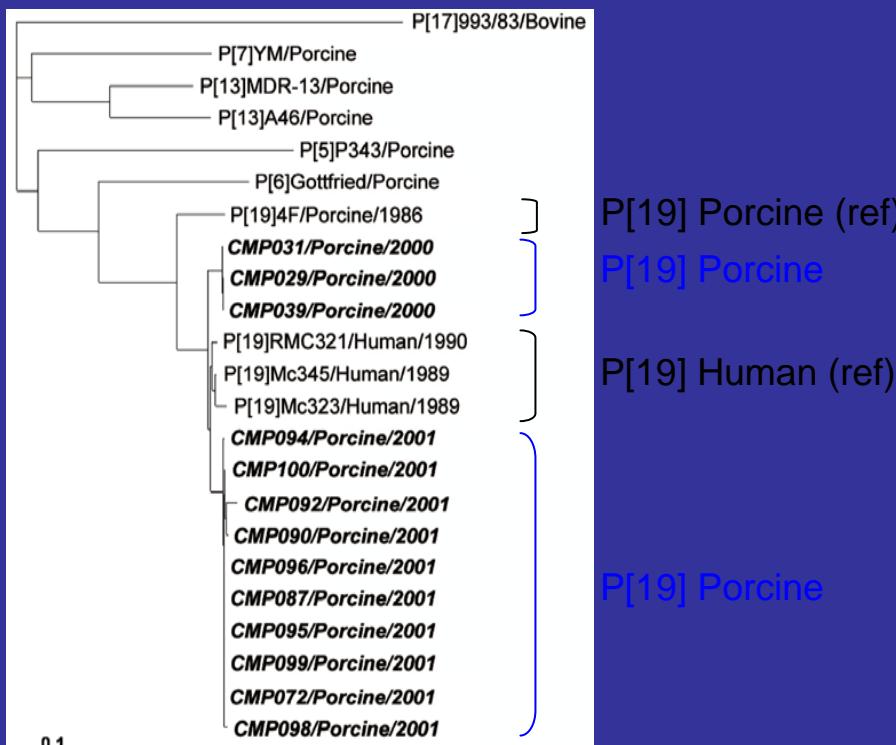
Detection of Unusual P[19] Porcine Rotavirus Strains in Chiang Mai, Thailand : Evidence of Natural Human-Porcine Genetic Reassortment

Background : In 1988, two strains of G9 rotavirus Mc323, Mc345 were isolated from children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand (Urasawa, et al, *J. Infect. Dis.* 1992)

: Nucleotide sequence analysis of VP4 gene of Mc323 and Mc345 found to be P[19], and closely related to porcine rotavirus (Okada, et al. *J. Med. Virol.* 2000)

This study found the prevalence of P[19] rotavirus in diarrheic piglets as 13 isolates (33.3%).

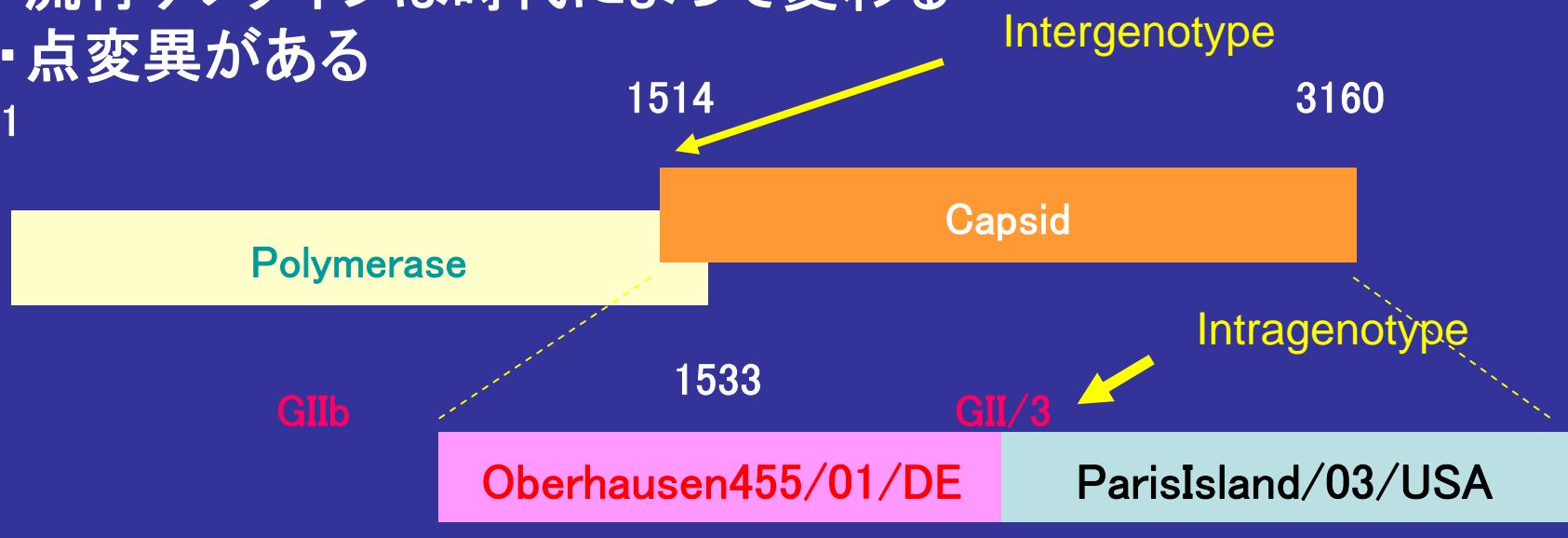
Phylogenetic tree of VP4 gene nucleotide sequences of P[19] porcine rotaviruses isolated in 2000-2001



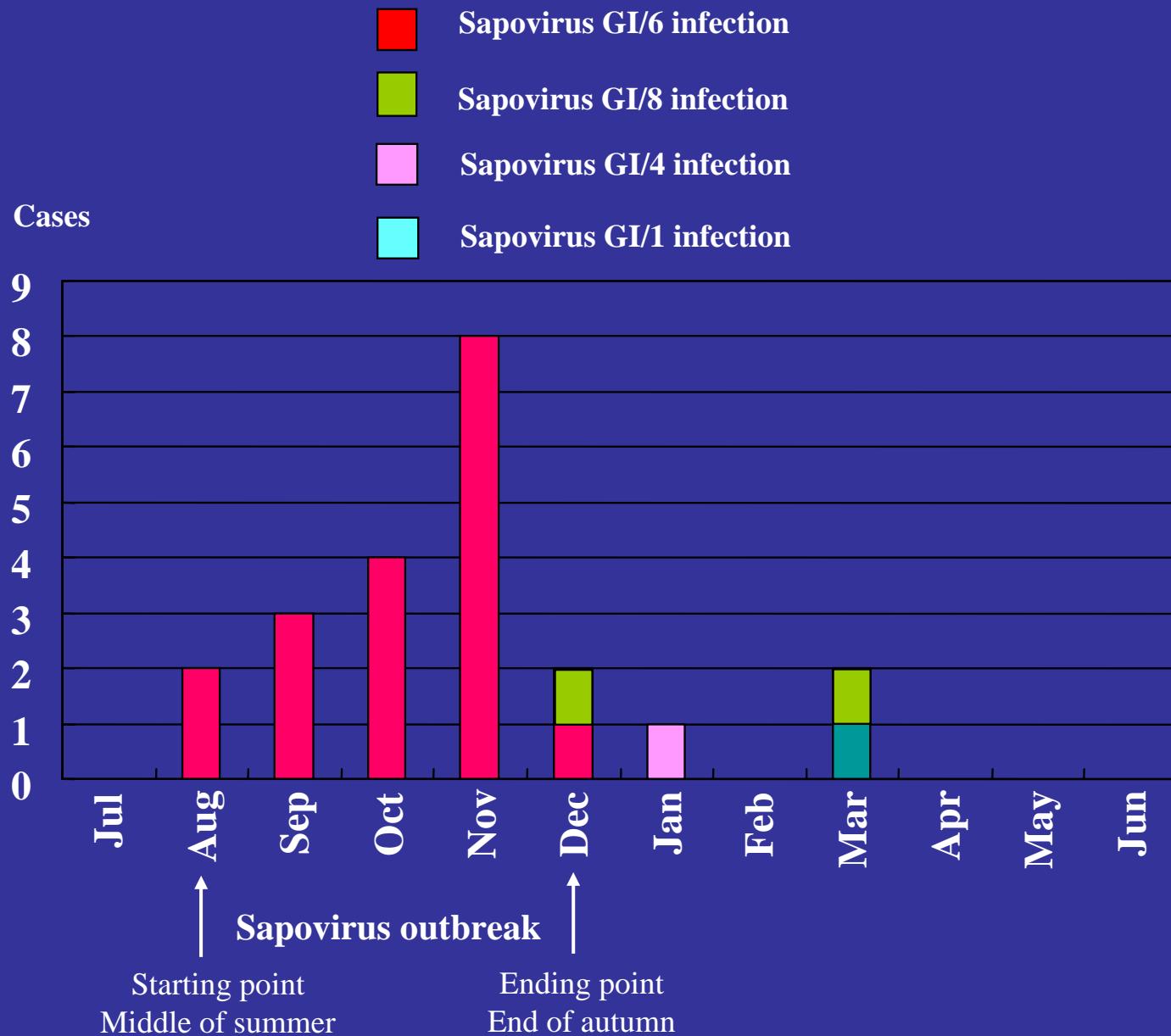
- Porcine P[19] rotaviruses, detected in this study, showed a greater homology with human P[19] rotaviruses (95.4-97.6%) than with porcine P[19] rotavirus (88.1-89.0%) reference strain.
- This finding indicated that genetic reassortment between human and porcine rotaviruses might be occurred in the nature.

ノロウイルスのゲノグループとゲノタイプ

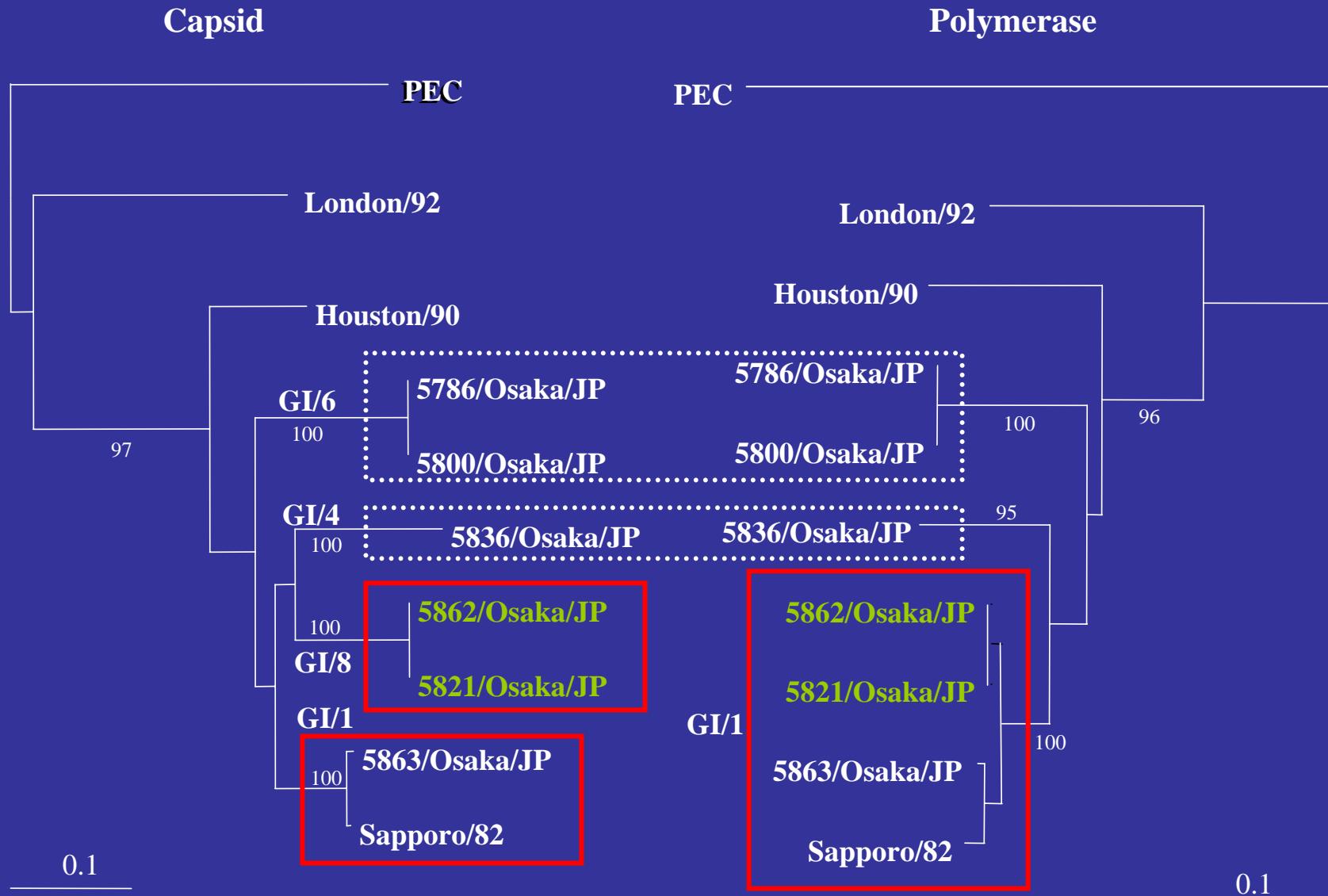
- ・カプシド領域(ORFII)で区分しているがポリメラーゼ(GI)も考慮する
- ・大きくGIとGIIがある(GIは14、GIIは17のゲノタイプ)
- ・ゲノグループ間の交叉免疫はない
- ・同じゲノグループ内でも交叉免疫は弱い
- ・リコンビナントウイルスが存在する
　インターベノタイプあるいはイントラベノタイプのこともある
- ・流行ベノタイプは時代によって変わる
- ・点変異がある



OUTBREAK OF SAPOVIRUS IN JAPAN

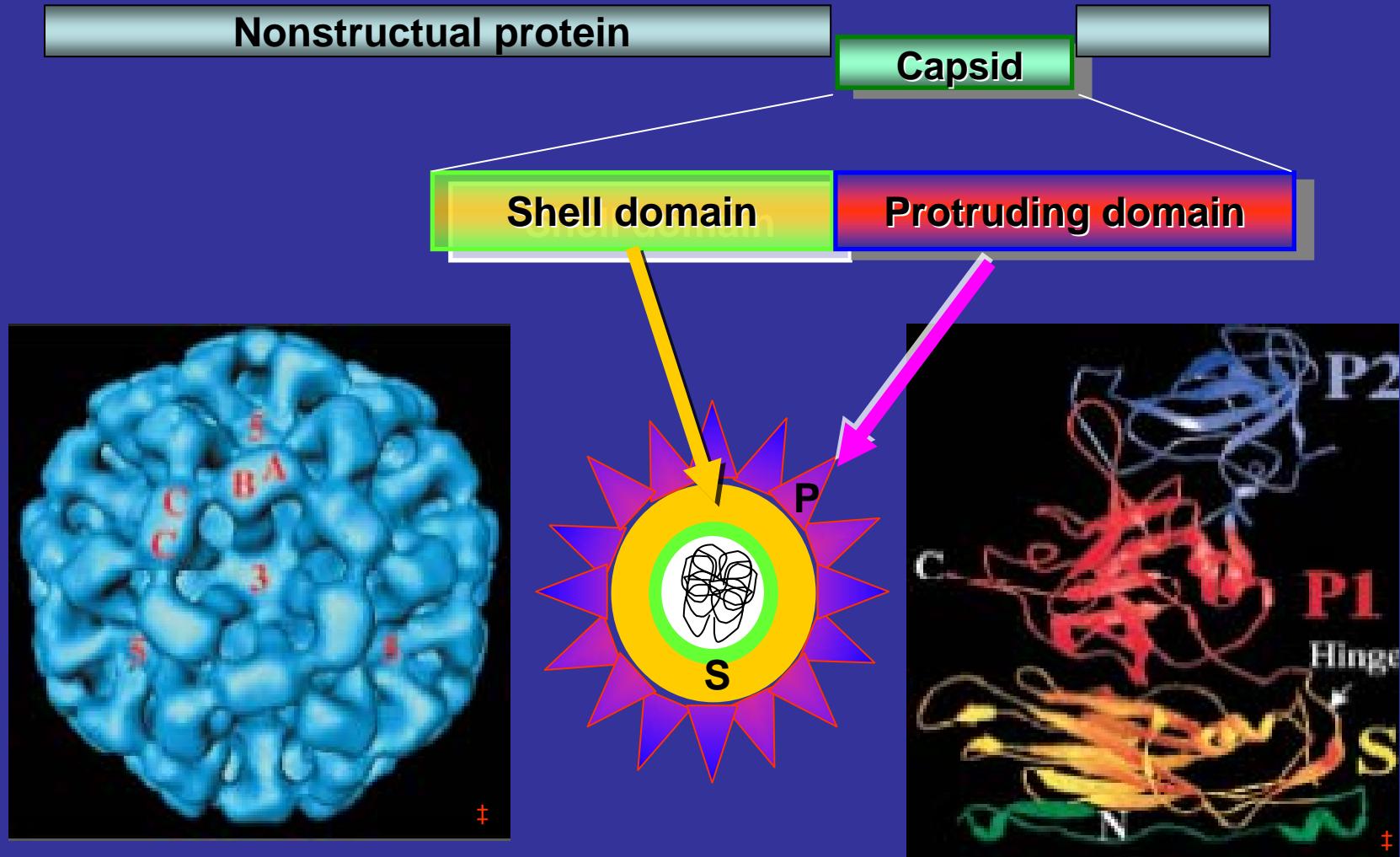


NOVEL RECOMBINANT SAPOVIRUS



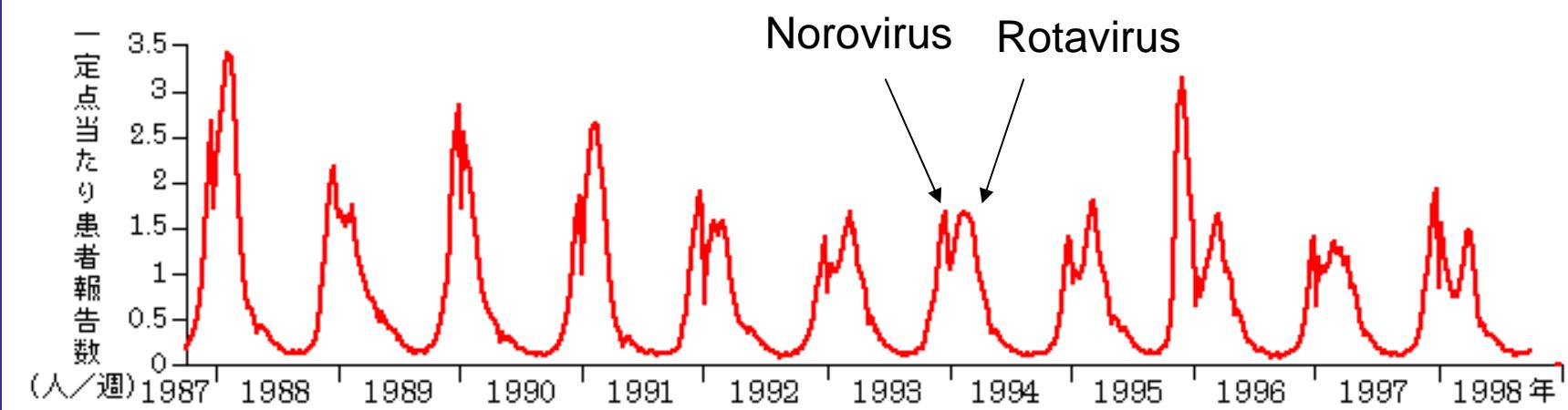
Structure of NV

Gene structure of NV



‡ From "Fig 1 A & C from Prasad et al., SCIENCE 286:287-290(1999)" Reprinted with permission from AAAS.

図1. 乳児嘔吐下痢症患者報告数の推移（感染症サーベイランス情報）



† 国立感染症研究所感染症情報センター

IASR Vol.19 No.11 November 1998 「小児のウイルス性胃腸炎 1993～1998」掲載資料
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/19/225/tpc225-j.html>

乳幼児が主

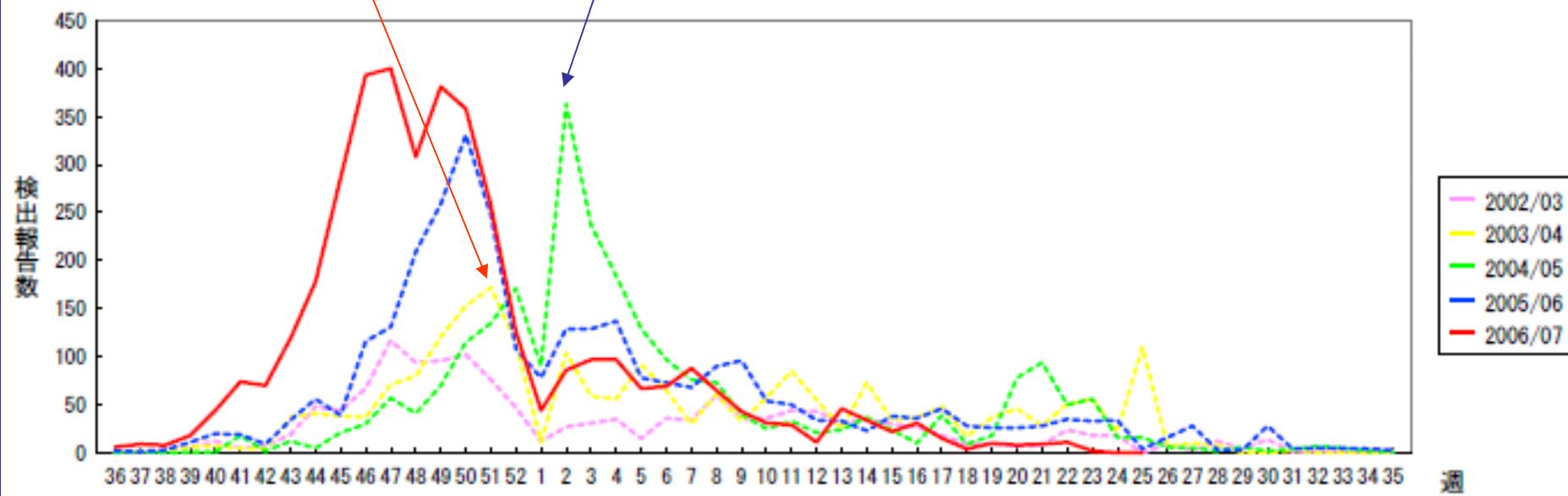
集団で幅広い年齢

週別 S R S V (ノロウイルス、サポウイルス) 検出報告数、過去4シーズンとの比較、2002/03~2006/07シーズン
(病原微生物検出情報：2007年6月19日 作成)

IASR

Infection Agents Surveillance Report

* 各都道府県市的地方衛生研究所からの検出報告を図に示した



‡ 国立感染症研究所感染症情報センター

IASR 最新グラフ・ウイルス

<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-kj.html>

<https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data12j.pdf>