

座 談 会

ウイルス性下痢症の今昔



語り手

国立感染症研究所
大手前栄養学院 管理栄養学科／元 大阪府立公衆衛生研究所
理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫系構築研究チーム
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 分子疫学分野

宇田川 悦子 先生
大 石 功 先生
大 野 博 司 先生
中 込 治 先生 (五十音順)

聞き手

東京医科大学 小児科学 河 島 尚 志 先生

[平成22年9月3日(金)収録]

はじめに

河島 本日は「モダンメディア」の座談会にお集まりいただきありがとうございます。今回のテーマは「ウイルス性下痢症の今昔」といたしました。「モダンメディア」は微生物を中心とした読者が非常に多いので、このテーマは、読者の方からも注目されると思っております。

ウイルス性下痢症の歴史は、本邦における医学の歩みのようなところも非常に感じますので、その創成期からのお話と現在、そしてこれからウイルス性下痢症はどうなっていくのかということで、4人の

先生方からいろいろお話を聞きたいと思います。

自己紹介を最初をお願いし、アイスブレイクというわけではないですが、最後に私がもし下痢症ウイルスだったらこうだろうと言付け加えて言っただけであれば幸いです。最初に中込先生からよろしいでしょうか。

中込 長崎大学の中込治です。長崎大学は熱帯医学の分野で非常にユニークな活動をしておりまして、現在、仕分けの対象になって、こんなものはやめろと言われているような海外拠点もあります。特に2006年からは熱帯医学の専門医を養成するという熱帯医学修士課程を、日本ではじめて作りました。

私はその熱帯医学修士課程の専攻長として、教育の責任にあたっています。

ロタウイルスあるいはウイルス性下痢症ということに関しては、ほぼ30年間こつこつと研究してきました。特に1980年代には2年間にわたってアメリカのNIHで、ノロウイルスの発見者であり、また最初のロタウイルスワクチンを作ったAlbert Kapikian博士の下で研修しました。現在、ロタウイルスワクチンが世界各地で使われるようになって、ロタウイルスの研究者としては、これが使われることによって、いったい病気がどうなるのか、あるいはウイルスの生態にどういう影響を与えるのかということに大いに興味がありますが、残念ながらわが国ではまだワクチンが使われていないので、わざわざ海外に、特にベトナム、ブラジル、ネパール、あるいはアフリカのマラウイなどをフィールドとして研究しています。

自分がウイルスであればということについては、僕は目立たない性格なので、ピコビルナウイルスとか、そのようなところだろうと思います(笑)。

河島 ありがとうございます。

大石 よろしくお願ひします。本日は、モダンメディア編集室からご提案のあったテーマが、ウイルス性下痢症の今昔ということでありましたので、昔の話題であれば何とかできるのではないかということで参加いたしました。私は、大阪府の公衆衛生研究所というところで、長年ウイルス感染症を担当していました。今から30年以上前の昭和40年代の半ば(1970年)ごろから嘔吐下痢症の流行が非常に問題になっていました。それ以来、病因というか、病原体を調べ続けてきました。

何しろ当時この分野は、Kapikian先生のいわゆるノーウォークウイルス発見の論文やBishop先生が小腸の粘膜からロタウイルス粒子を見つけたとか、ごく限られた情報しかなくて、このような疾患の検査をどのように扱ったらいいのか、いろいろ議論をしました。結局、まず電顕から始めようということになって、そこからスタートしました。

それからおよそ30年、この間、電顕観察からロタウイルスはじめノロウイルスやアストロウイルスなど現在知られているほとんどの胃腸炎ウイルスを観察することができました。しかしながら、日進月歩のウイルスの診断法や流行の疫学解析について



中込 治 先生

は、ウイルス性下痢症研究会などを介して各地の大学や衛生研究所の皆さんと緊密な情報交換を図り、検査技術の向上に努めてきました。また国外においては、CDCのウイルス性胃腸炎研究室のDr. RI Glass室長、安東民衛先生やノーウォークウイルスの遺伝子をクローニングされたベイラー医科大学(米国)のDr. MK Estes教授とも研究交流をすすめました。

振り返ればこの30年ほどの間に、胃腸炎ウイルスの検査法は、電顕法から今では遺伝子検査や迅速な免疫検査法へ著しい進化を遂げてきたわけですが、電顕の時代から胃腸炎ウイルス研究発展の軌跡を見つけて来た者にとりまして、大変感慨深いものがあります。

ところで、さきほど中込先生から熱帯地域での研究のお話がありましたが、私はリタイア後にJICAの派遣でケニアへ行っていました。ここではKEMRI(ケニア中央医学研究所)というアフリカ屈指の研究所でHIV/AIDSに取り組んでいましたが、同研究所には日本の留学経験がある下痢症ウイルスの研究者がいて、赴任中はアフリカの現状についてよくディスカッションをしたものです。

このような経過で今日に至っていますが、現在は栄養学の専門校で食の安全と関わりが深いノロウイルス胃腸炎(食中毒)に力点を置いた微生物学の講義を行っています。

私を下痢症ウイルスにたとえたとしたら、多様性(笑)、いろいろ多様な性質を持った人間になっているのではないかと思います。ロタウイルスやノロウイルスだけではないということですね。以上です。

河島 ありがとうございます。では、宇田川先生、お願いします。

宇田川 このたびは私の企画を皆さんで盛り立てていただきまして、ありがとうございます。下痢症ウイルス研究会は世界的にも注目に値するわが国独自の発想で創設された研究会です。この研究会の今までの経緯をこれからの若い人にぜひ聞いておいていただきたいと思いますし、記録に残しておきたいと考えました。本来ならば、ここに私ではなくて、もっと偉い先生が座らなければいけないのですが、お忙しいということで、私が末席を汚させていただいております。

下痢症の仕事は中込先生が東北大でロタウイルスをおやりになっていたときに、私はせこせこ甲野禮作先生（当時、国立予防衛生研究所 ウイルス中央検査部長）や山崎修道先生（当時、国立予防衛生研究所 ウイルス中央検査部室長）の下で、電子顕微鏡で毎日非細菌性嘔吐下痢症患者便材料を鏡検していました。そういうテクニシャン的な仕事をやらせていただいてから現在まで下痢症の研究をしてきました。ですから、おかげさまで下痢症というのは私の研究歴の中では一番長くなりました。今になって思えば、これが私のメインテーマではないかと思うぐらい30有余年長い時間かかわってきました。その後、山崎修道先生、千葉峻三先生（札幌医科大学名誉教授）、浦澤正三先生（札幌医科大学名誉教授）、錚々たるメンバーが発起人として名を連ねている下痢症研究会を発足させる仕事のお手伝いもさせていただきました。そういう意味では、研究者としても、裏方としても、非常にハッピーな研究生活を過ごさせていただいてきたと思います。

できれば、何のためにこういう研究会を立ち上げなければならなかったのか、どうやってこの会を運営してきたのか、誰のための研究会なのかなどを若い人たちにもっと知っていただいて、これからの参考にして頂ければと思います。

いま RT-PCR、Real-time PCR、LAMP など簡便な方法でノロウイルスなどの遺伝子検査はできていますが、未だに培養系が無いためにこれらの遺伝子検査結果とノロウイルス感染性との関連性については未知のままです。しかしながら、これらの遺伝子関連のデータが一人歩きしているようなところが見受けられます。遺伝子検査で得られた数値（〇〇コ

ピー）が何を意味しているのかノロウイルスのヒトへの感染性との関連性を含めまだ未解決な事が大きな問題として残っています。これからどうしたら良いのか私どもの話を参考にいただければと思っています。そういうことで今回の企画をお願いしました。

私をウイルスにたとえたら何ですかね（笑）。

最初に電顕で小型球形ウイルスを見たときはロタウイルスが華やかなりし頃でしたが、私が一生懸命に観察してノロウイルスらしきウイルス粒子の写真を撮って先生に持っていくと、「きみ、これはファージの頭だよ」と言われる。そういう時代でした。だから、ウイルスというよりはファージのような感じだったのかなと思います（笑）。

河島 ありがとうございます。では、今昔とこれからということで、大野先生にもお願いしております。

大野 理化学研究所の大野博司と申します。私は免疫系をやっていて、理化学研究所に移るちょっと前の2000年ぐらいから腸管免疫をやりはじめました。実際にはウイルスとはまったく無縁です。お話をいただいたときに、「何もウイルスのことはやっておりませんが、それでもいいのでしょうか。役に立たないと思います。」と申し上げたのですが、腸管免疫系のことを中心に、わかる範囲でお話しさせていただければいいと言われて出てまいりました。

簡単にどんなことをやっているかというところ、小腸のパイエル板に代表される腸管関連リンパ組織のリンパ濾胞の部位は通常の絨毛とは若干、かたちが変わって、なだらかな丘状になっています。その部位の上皮細胞というのは、性質も普通の吸収上皮と違って、特に特殊なM細胞と呼ばれる細胞が、このリンパ濾胞を覆うところだけに散在しています。ヒトやマウスだと、この覆っている領域の5%から10%ぐらいがM細胞だと言われていました。

M細胞というのは、1974年ごろにはじめて報告されて以来、これまで形態学的にはいろいろなことがわかってきていました。例えばウイルスとか、バクテリアのような大きなものも取り込む細胞と言われていましたが、M細胞だけを集めることもできないし、マーカーもないということで、分子生物学、生化学的な解析は非常に立ち遅れていました。しかし、ちょうど2000年ぐらいからマイクロアレイテクノロジーが開発されて、非常に少量のマテリアル

から遺伝子発現を網羅的に調べることができるようになりました。

私たちもそういうものを利用して、このパイエル板を覆っている部分と絨毛の部分、M細胞がある部分とない部分を比較することで、M細胞に特異的な遺伝子を取ってきましたが、その1つがGP2という分子です。もともとGP2は膵臓にはたくさん出ていることが知られていましたが、機能は不明でした。それが、腸管上皮ではM細胞だけに出ている。そして、それがサルモネラ菌とか大腸菌のようなI型絨毛というものを持つような腸桿菌と特異的に結合して、それを取り込むことがわかりました。

GP2 (M細胞) のあるマウスとないマウス (ノックアウトマウス) との比較では、ノックアウトマウスはGP2がないために、菌の取り込みが非常に悪くなっています。

GP2を介して取り込まれた細菌は樹状細胞に受け渡され、T細胞に抗原提示をして、そしてB細胞に抗体、IgAを作りなさいという指令が出される。そしてIgA抗体が糞便中に分泌されて、中和抗体のようなかたちで働くわけですが、その抗体産生がノックアウトマウスでは非常に悪くなっています。

このように、これまでほとんど分子メカニズムとしてわかっていなかった、腸内抗原の取り込み口であるM細胞の抗原取り込み受容体を明らかにして、それがその後のIgA産生という、腸管あるいは粘膜免疫の免疫応答に非常に重要であるということを見つけて、昨年『Nature』^{*1}に報告しました。

ウイルスも、下痢症ではありませんが、例えばポリオウイルスはM細胞から入ることが言われています。受容体もCD155という分子が同定されています。また、ロタウイルスもレオウイルスの中に入りますが、レオウイルス科は非常に広い。あまり詳しくないので正確にどのウイルスかは存じませんが、レオウイルスのヘマグルチニン ($\sigma 1$) という分子がこのM細胞と結合して、そこから入り込むということが言われているので、ウイルスを取り込むこともできる。感染症自体は普通の上皮に感染して起こるのですが、むしろM細胞は、それを取り込んで抗体産生、免疫応答を起こすことによって、排除の方向への特異的な免疫を起こすリンパ濾胞の抗原取り込み口としてあるのです。そのような研究をしています。

ウイルスのことはあまりよく知りませんので、自分がウイルスとしては何かと言われて非常に困りますが、そういう意味では、あまりよくわかっていないということで、まだ見つかっていないようなウイルスではないかと勝手に思っています。

河島 ワクチンということでは、中込先生からたくさん聞きたいことがありますので、またワクチンのところでお願いします。

最後に私ですが、東京医科大学の小児科の河島尚志と申します。私はどちらかというと現場におり、ウイルス性の下痢症ではいつも悩まされています。院内感染も含めて、下痢症の患者で亡くなる方もいます。今、ウイルス性下痢症は、重症は少ないと軽く言われることもあります。新宿の大学病院ですので、セレクトされて重症の患者さんが来るため、悩ましい病気の1つです。

私は免疫も少しかじっていて、消化管のいろいろな持続的な炎症を起こすような病気と、ピロリではないですが、もしかしたらウイルスとは何か関係があるのではないかと、そういう免疫のほうも興味があるので、大野先生からの意見も楽しみにしております。

I. ウイルス性下痢症の歴史

河島 では、最初にウイルス性下痢症の歴史について話を進めたいと思います。下痢症研究会もだいぶ長くいっていますが、宇田川先生、ウイルス性下痢症研究会発足のころについて教えていただけますか。

宇田川 口火を切らせていただいて、歴史的なことをお話ししたいと思います。色々勉強してきましたので、明治時代から紐解こうと思います (笑)。

名古屋大学の坂本陽先生 (名古屋大学名誉教授) が、昭和40年に『白痢』という本を出していらっしゃるんですが、その本によると、小児下痢症というのは明治時代から報告がありました。われわれが考えている以前から、わが国ではこれについてはいろいろな先生方が非常に苦労されているし、また報告もなされているということです。

世界的に見ると、昭和4 (1929) 年に、Zahorsky が冬期嘔吐下痢症 (winter vomiting disease) という名前を出しています。それがだいたい世界的に有

*1 Hase K, Kawano K, et al.: Nature 462 : 226-230, 2009.

名になっていますが、実はその前に日本では小児コレラに似ている病気ということで、坂本陽先生や福岡大学の先生、今の九州大学の伊東祐彦先生などが、仮性小児コレラという名前で総説や論文を出しているらしいです。ですから、われわれは途中から仲間に入ったようなものなのです。

私は国立感染症研究所（感染研）の前身である予研、国立予防衛生研究所にいましたが、私が入所するずっと前に、福見秀雄先生（元国立予防衛生研究所長）が下痢症のお仕事をなさっていました。昭和22年、23年に、新潟県、山形県で原因不明の伝染病下痢症流行が起きて、その後日本中ではやったという報告書もあります。そこではボランティアの実験をやっていて、患者さんの便材料をゾンデで胃に流し込んで、2代目、3代目で同じ病気が出ているという報告を出しております。

河島 継代できるということですね。

宇田川 ええ、human passageですが、継代できると言うことでした。今まで不勉強でしたが、アメリカだけではなく、日本でもそういう報告がすでにあったということで、私はびっくりしました。われわれの先輩たちもがんばっているのだと、あらためて認識しました。

これは福見秀雄先生が書いていらっしゃるのですが、昭和27年に刊行している『伝染性下痢症』という単行本があります。その中に、伝染性下痢症流行が愛知県でも出ているし、九州も出ている。それから、北海道旭川市郊外の神居古潭（カムイコタン）の流行報告で金光正次先生のお名前が出ています。

中込 有名なのは千葉の茂原下痢症です。

宇田川 そうなのです。それは昭和28年です。厚生省、国立予防衛生研究所と千葉県の茂原市が共著で茂原下痢症の報告書^{*2}を出していますが、事件が発生したのは昭和28（1953）年6月です。

河島 そうすると、そのころは点滴も補液もない時代ですから、かなりのかたが亡くなったということでしょうかね。

宇田川 茂原下痢症の流行時には、幸いなことにお亡くなりになった方はいないようです。この茂原市の事例は上水道の中に汚水が入り込んで、それを茂原市の皆さんがお飲みになって7,000人からの患者さんが出ています。当時としてはすごい数ですよ。その原因は上水枡が壊れて、そこに2～3日大

雨が降って近くの汚水が流れ込んだということと塩素処理施設の故障が重なったことが原因です。この事例に置いて、やはりボランティア実験をしています。日本というのはすごいですね（笑）。

しかも、このボランティアの方達のお名前も実名で出ています。実験中、どなたがどういう状況になって、どういう症状を起こしたかということも、こと細かに報告がなされています。そして、病原性はわかったけれども、病原体そのものの検出には至っていないがウイルス性下痢症であろうと結論をつけています。昭和28（1953）年の段階でそういう状態でした。

中込 このときの検体は残っているのですか。

宇田川 保健所あたりに残っているかもしれませんが分かりません。

中込 感染研にはないのですか。これには関与していないのですか。

宇田川 そのとき福見先生は予研細菌部でしたが、この本には材料に関する記述は残っておりません。残っているかな。どうでしょう。

大石 そのとき濾過性のものということになっていましたよね。

宇田川 ええ。報告書の記載ではちゃんと濾過してから投与したと記載されていますから。そして、濾過した患者便材料をボランティアに飲用させて下痢便が出るかどうかをチェックしています。次の継代では、その初代の便を飲ませて下痢便が出て、それをまた濾過して飲ませてと、3代、passageしています。病気は確実に起こっているけれども、病原体がわからない。その当時、電顕があれば一発でわかったのですが、残念ながらその当時は電子顕微鏡がないのでウイルスを特定出来ていません。しかしながら、報告書ではウイルスの可能性が高いことを明らかにしております。

中込 サンプルを取っておかなかったのはもったいない。

宇田川 もったいないですね。

大野 こういうのはどこがやるのですか。県と市とおっしゃっていましたが、やはり予研がやるのですか。

宇田川 これは、最初は茂原市が主体となって検査をやっていたのですが、大流行の兆しがあり患者が多数出て来てしまった。そのときに茂原市だけではどうにもならないということで、千葉県と厚生省

*2 『茂原下痢症』昭和29（1954）年3月31日、千葉県衛生部発行 非売品

防疫課のほうにもヘルプというかたちで依頼があり、それで福見秀雄先生（当時、予研細菌部長）たちがフィールドワークへ出て行ったようです。このことは予研の年報に報告されています。予研は厚生省の下部機関なので、調査依頼が来て現場調査にあたっています。

河島 この時代だと、細菌性腸炎の伝染ですか。

宇田川 それはちゃんと否定しています。最初は疑がっていましたが、コレラでもないし、赤痢でもない。それは全部否定した上で、濾過性病原体でウイルス性であるということで報告しています。

中込 そうですね。ザイツ型濾過器が何かを通して濾過して。

宇田川 ええ。福見先生はその当時、細菌部の部長ですから、細菌検査のほうを最初におやりになったと思います。それでもなおかつ出ないので、これは非細菌性の嘔吐下痢症だということで、ウイルスを疑って検査をやっているらしいです。

中込 継代しているのですね。

宇田川 継代しているのですよ。human passageです。昭和28（1953）年にすでにボランティア実験で結果を出しています。すごいですね。

中込 ノーウォークウイルス自体も、免疫電顕法で見つかったのですが、今、やっているように患者さんの便から免疫電顕法で見つけたかという、そうではなくて、そこでは見つからなかった。ボランティアで継代しているのです。

宇田川 患者便材料を濾過した後ボランティアに飲ませている点では福見先生と同じですね。

中込 それでやっと見つかったのです。

河島 では、ウイルスの増殖力は増えたのですね。

中込 増えたのです。

宇田川 もしこれが英文で論文が出ていたら、たぶんノーウォークウイルスよりもものすごく早い段階で、小型球形ウイルスではないけれども、非細菌性の嘔吐下痢症の病原体がウイルスであろうということで、話題になったり引用されたりしたのではないかと思います。残念ながら日本語だからどなたも引用していませんが、そういう意味では日本語の論文や本というのはちょっと残念ですね。

そのあとの歴史を見ますと、昭和43（1968）年米国ノーウォーク市の学校給食が原因と考えられた非



大石 功 先生

細菌性嘔吐下痢症の非常に大きな流行がありました。以前 Kapikian 博士に聞いたら、ボランティアに飲ませた検体は女の先生の便材料だそうです。

大石 そうなのですか。

宇田川 はい。大人の便だそうです。日本の話と同様、それを濾過してボランティアに飲ませて電顕を見るということを繰り返して、同じ症状を出すということ、さらに免疫電顕法で凝集すると言う事が明らかとなりました。そこで、1972年（昭和47年）に『The Journal of Virology』に Kapikian が論文を出しています*3。

中込 Kapikian は常に「27nm の」というのを言っていますが、最近大きさがどんどん大きくなっていますね。

宇田川 35nm とか 40nm と言っている（笑）。

中込 あれはどうしてなのですか。

大石 電顕でよく使われる標準粒径のラテックス粒子のようなのがなかった時代なので、サイズの比較が難しかったのではないかと思います。

宇田川 解像度の違いが出ているのですかね。

中込 常に彼は 27nm viral particles と言っていました。最近の本を見ると大きさが 35nm とか 40nm。

大石 そうですね。40nm 近いですね。

大野 それは走査電顕ですか。

中込 いや、普通の透過型電顕で陰性染色（negative staining）したものです。

大野 切っているということですか。それともウイルスだと切らなくもいいのですか。

*3 Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Kapikian AZ, Wyatt RG, Doline R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM.; J Virol. 10 (5) : 1075-1081, 1972.

中込 いや、ただグリッドに乗せているだけです。

大野 では、直径は分かるはずですね。切れた場所によって変わるというわけではなく。

中込 そうではないのです。電顕をやっている人に聞いてみようと思っているのです。なぜそんなに大きさが違うのか。

宇田川 もしかしたらアンダーフォーカスとかオーバーフォーカスになっているのではないですか。あとは、今でもそうかもしれませんが、昔はフィルムに撮り developing (現像) しなければいけなかったのです。そのへんで、ちょっとぶれがあったりすると、大きさが違ってきます。また、写真を引き伸ばしてそれでサイズを測っているの、撮影時にアンダーフォーカスになったりオーバーフォーカスになったりすると、どうしてもサイズの違いが出てくるのではないかと思います。

大石 テクニカルな問題があったと思いますね。

河島 厚さもありますね。

宇田川 実は、福見先生の退官記念に出版された本『微生物学のめざすもの』を見たら、1973年頃 NIH の Chanok のところに遊びに行って、Kapikian に「いま伝染性下痢症は何をやっているのだ」と聞いたら、「伝染性下痢症患者の水様便中に、特異抗体で凝集する粒子を発見した。27nm の直径の金平糖の様な形態に見える粒子で、形態或は物理化学的な性質からおそらくパルボウイルスに属するかまたはそれに近いものだと推定した」と言ったそうです。27nm だから、それが今でいうノーウォークウイルスです。後々はノーウォークウイルスと呼ばれることになるのですが、そのときは Chanok も Kapikian も、あれはパルボウイルスの一種ではないかと思っていたようです。おもしろい話です。

中込 パルボウイルスというのは、動物で非常に重症の下痢症を起こすのです。たぶんそういうことがあったのでしょうね。だから、パルボウイルスだろうということなのですね。

宇田川 いろいろな本や論文などをあたってみると、おもしろいですよ。その2年後に『The LANCET』に、White がロタウイルスを電顕で発見したという報告があります。1975年には Dolin などが『The American Journal of Medicine』に Hawaii agent を報告しています。このへんでアストロウイルスも出てきていますし、電子顕微鏡のレベルが非常に上

がってきて、皆さんがそれを検出しています。

中込 そうですね。全部 1970 年代ですね。

宇田川 それはわれわれもそうなのです。われわれの研究所などでもやはり 1970 年代半ばから、どうも電顕で見れば見えるらしいということで、最初にターゲットにしていたのは、ロタウイルスです。ロタウイルスは見やすかったのですよ。直径が 80nm ぐらいありますし、患者便材料中にウイルスが大量に出るのです。たしか 1 グラムあたり 10 の 11 乗個ぐらいの粒子数が患者便中に出てきますよね。

ところが、直径がその半分以下になってしまうと、表面積が 8 分の 1 以下になってしまうから、30nm ~ 40nm の大きさのノロウイルスを探すのはかなり大変なのです。しかも、1 個ずつバラバラにあるとなかなか見つからなくて、ある程度、集まってブドウの房状とかにならないと検出が出来ません。これは実際に電顕を見ていただければわかると思います。

河島 素人の質問で申し訳ありませんが、下痢のときはいろいろな組織が剥脱してきて、水溶性の下痢になりますよね。そういう状態で、ウイルスとヒトの細胞はどういう関係になるのですか。電顕だとフリーのウイルスが撮れるという感じですか。

中込 見ているのはフリーのウイルスです。

大石 前処理をして、部分精製して、それを電顕で見るというかたちが多いと思います。

宇田川 患者便材料を 10% 乳剤にしてから前処理をし、超遠心をかけて濃縮したサンプルを観察します。超遠心法によってデブリスは出来るだけ除くというかたちです。

中込 最初のころは、超遠心で精製して、精製したものを東北大小児科の鈴木宏先生 (新潟青陵大学教授) に見てもらおうということをやっていたのです。ところが、最後になるとそのまま見れば見えるという (笑)。

宇田川 本当にロタウイルスはすごかったですよね。ウイルス粒子の直径が大きい事と排泄量が多いということで、最初の頃はロタウイルスをメインに私たちは下痢症ウイルスを観察していましたね。そのうち、臨床症状はあるのにロタウイルスがどうしても検出出来ない検体が出てきました。その時は、何も無いのかと考えていましたが、その後、時間をかけてじっくりと電顕観察すると、小型のウイルスらしきものがかなりの確立で検出出来ました。でも、

未だウイルスと確定出来るまでには至っていませんでした。

70年代後半になると、今で言うサポウイルス、カリシウイルスの Sapporo agent を、札幌医大の千葉峻三先生のグループが『The Journal of Medical Virology』*4 に報告しています。音更因子も、札幌医大の公衆衛生の谷口孝喜先生が『Journal of Clinical Microbiology』に報告しています*5。あとは鈴木宏先生が1981年、『The Journal of Medical Virology』に報告していらっしゃいますね。

中込 あれは同じ1979年の4号なのです*6。

宇田川 同じ号に、カリシウイルスの疫学ということで、今、おっしゃったように、電顕で患者さんからどれぐらい出たかということを報告されています。

同時期に、大阪でもかなり大きな流行がありました。そこから Osaka agent というのも出てきました。それもノロウイルスでいうと GII グループですかね。

大石 そうです。大半がそうだと思います。

宇田川 当時、下痢症ウイルス研究の(特にロタウイルス研究)メッカと言われた東北大学医学部の石田名香雄先生(元東北大学総長)が雑誌『ウイルス』に、「ロタウイルス以外の小型下痢症ウイルス」という論文を発表しています。

日本でもアストロウイルスも出てきていますし、世界各国、日本の各地を問わず、色々な小型球形ウイルスというのが検出出来る様になって来た訳です。

ところが、例えば地方の衛生研究所の先生方が業務として電顕検査でご覧になっているものが、本当にノロウイルスに似ているのか(?)と、皆さん疑問を持つようになってきたのです。

電顕観察をしてウイルス粒子らしきものを検出した時、自分ではたしかにそうだろうと思っているし、写真も撮る。しかし、先ほどお話ししたように、写真の撮り方によっては形が違ってくるし大きさも違って見えるのです。そうすると、自分が検出したウイルス様粒子が本当にノロウイルスに似ているのかそうなのかと疑問があちこちで出て来ていました。こういう状況のもと、山崎修道先生が(そのとき中央検査部の部長をなさっていて)厚生科学研究費で、みんなでちょっと相談しましょうという研究班を立ち上げました。それが昭和60(1985)年です。

そのときに、予研の目黒庁舎に地方衛生研究所の

先生方が集まりました。当時大学の先生方は皆さんスペシャリストが揃っていますが、衛研の先生方はまだ電子顕微鏡がそんなに得意な分野ではなかった時代ですから、みんなで何とかしようということで集まったのです。特に一生懸命電顕観察をされていた大石先生をはじめ、各地方の衛生研究所の先生方5~6人が集まりました。そこで電子顕微鏡の技術についてどうすればいいのか、電顕でウイルス粒子を検出し易く見やすくするにはどうするかということを検討し始めた訳です。

先ほど言ったように、ロタウイルスというのは大きいし、形もきちんとしているので、すごく見つけやすいのです。しかし、ノロウイルスやカリシウイルスというのは、非常に形が不確かなところがあります。ノロウイルスというのは表面構造がありデコボコしているのです。自分で見えても、これはどうかな(?)と見分けがつかないものもありました。ちょっとコントラストが強くなるとわからないという時代でしたね。

大石 その通りですね。

大野 それは地方の厚生省の機関ということですか。

宇田川 地方衛生研究所は県の独自の機関なのです。各県は独自に衛生研究所をお持ちになっていて、色々な時に、例えば非細菌性嘔吐下痢症の流行があったり、食中毒事件があったりすると細菌やウイルス検査をなさる人たちがいらっしゃるのです。

大野 各県に電顕が配備されているということですか。

宇田川 当時、47都道府県の全部に電顕が配備されているということではなかったと思います。

大石 当時はそれほど多くなかったですね。ごく限られたところしかなかったです。

大野 持っているところに近隣から来るということですか。

宇田川 そういうこともありましたね。例えば神奈川県衛生研究所や東京都立衛生研究所は比較的早くから電顕を持っていたのですが、近隣の県等から、「先生、これをちょっと見て」ということはあったと思います。それから、私たち予研のほうに行政検査や研究検査依頼と言うことでそういう材料が集まってきた、検査してほしいということはありませんね。

*4 Chiba S, et al.: Med. Virol. 4 : 249-254, 1979.

*5 Virus-like particle, 35 to 40nm, associated with an institutional outbreak of acute gastroenteritis in adults. Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T.; J Clin Microbiol. 10 (5) : 730-736, 1979.

*6 Suzuki H, et al.: J. Med. Virol. 4 : 321-326, 1979.

中込 たぶん、歴史の中で大切なのは、Kapikian がいつも言っていました、下痢便を見ても病原体はわからない。みんながそう信じていたのです。先ほど、宇田川先生がおっしゃったように、ファージもあるし、何でもあると。これがウイルスだということとはわからない。それで免疫電顕法という方法を開発して、抗原抗体反応でやっていく。Kapikian はずっとそれにこだわっていました。したがって、アメリカの場合は全部 NIH で検査した。だから、アメリカではノーウォークウイルスと言って、決して SRSV という言葉は使わなかった。ウイルスだけを見ているのではだめだという考えだった。ところが、当時、抗血清というのは限られていたので、一部の人がしか持っていない。ボランティアの血清ということで。

宇田川 当時はそんなこんなで皆さん電顕観察で苦労した時代ですね。

中込 だから、ウイルスがクローニングされるまでは、カリシウイルスなのかどうかということすらもわからなかった。

宇田川 そういう時代を経て、これだけ論文が出てくると、非細菌性の嘔吐下痢症が流行すると全国的に検査しなければならなくなるわけです。そうすると、担当されている地区あるいは地研の担当者は「私はできません」ではすまなくなってきました。われわれ行政官としては、業務として行政検査をしなければならない責任がある訳です。そうすると、「できません」「やりません」というわけにいかないので、どうにかしなければいけないということになります。そこで、先ほどお話ししたリファレンス委員会のようなものを立ち上げました。そして、いろいろな会合があるとき、例えば、日本臨床ウイルス学会のとき、あるいは衛生研究所の先生方が集まりやすい全国レベルでいうと衛生微生物技術協議会というのがありますが、そういうときに有志がみんな集まって、ああでもない、こうでもない写真を見せ合って、「これはそう思う？」「違う？」という感じで相談していましたね。

大石 そうですね。

宇田川 そこで実際問題として、電顕観察の技術が各地研で同一かどうか本当にそうかどうかということを実地にやってみようということになってきました。今で言う検査の標準化です。しかし、ノロウ

イルスは今でも培養が出来ないのですが、当時も検査材料が患者便材料だけしか無かった時代ですから、標準品として必要な地研へ電顕観察用検体を配布することは困難でしたので、どこか一同に会して材料を持ち寄り鏡検することを考えました。それから、先ほど先生がおっしゃったように、免疫電顕法でたしかに aggregation する、抗原抗体反応が起こるということを確認しなければならない、抗原性が違うのかどうかも見なければならないということになりました。そこで、昭和 62 (1987) 年厚生科研費特別事業『公衆衛生微生物検査における制度管理に関する研究班の分担研究の一環として【下痢症ウイルスに関する検討委員会】を山崎修道先生が委員長となり立ち上げ、都立衛生研究所の電顕室に各地の研究所の先生方が検査材料を持ち寄って集まりました。先ほどお話ししたメンバーの宮城県梅津幸司先生 (宮城県保健環境センター)、安東民衛先生、関根誠治先生 (東京都立衛生研究所)、木村輝男先生 (大阪市立公衆衛生研究所)、大瀬戸光明先生 (愛媛県立衛生研究所)、大石先生とか、われわれが集まって、実際に同一検体を鏡検し、同じ様な粒子が検出出来るかどうかを検討しました。また、免疫電顕法の検討も行いました。

大野 免疫電顕というのは、金コロイドなどではなくて、aggregation を見るということですか。

中込 そうです

宇田川 抗原抗体反応でウイルスの凝集塊を見るだけです。先ほど言ったように、観察視野にバラバラに存在しているウイルス粒子は、1 個や 2 個で存在していると分かりにくいのです。だから、ある程度、固まって塊になっていけば、同じようなものが集まっているので、そうすると見やすくなってくる。ただ、残念なことに、逆にいうと、抗体がくっついているから、表面構造が見えにくくなってくることもありました。そこが難しいですが、そういう条件検討なども一生懸命にやりました。

大野 抗体を作る努力というのも並行してなさっていたのですか。

宇田川 いや、そのとき使っていたのは患者さんのペア血清が主です。

大野 でも、このころだと、モノクローナル抗体の技術も出てきていたころですよ。

大石 それはまだです。出はじめたころですかね。

中込 1980年代になればそうですね。見つかったのは1970年代ですし。

宇田川 ただ、モノクロナール抗体を作成するために必要なウイルスの抗原量の絶対量が足りないのです。

大石 培養系がない。

宇田川 患者さんの便材料そのものが材料なのですが、それを濃縮してしまうと、最初患者便材料が100gあったとしても濃縮後は1ccにもならない。量的にいうと非常に少ないので、それを抗体作成用抗原材料にしようと思ってもなかなかできないのが現状でした。ノロウイルスはヒト以外で培養が出来ないので、患者材料を使ってしまうようになってしまうということが前提だから電顕検査そのものも大変なのです。言い換えれば、材料が少ないと電顕検査が出来ないので大量の便材料（数十グラム以上）を確保することが当時重要なことでした。大きな採便容器を配布して臨床の先生方に集めて頂きました。

中込 ウイルス量としては、よく見ると数はロタウイルスと同じぐらいの量はあるのですが、大きさが違う。

宇田川 抗血清を作るための抗原としてみるとノロウイルスはロタウイルスと比較して蛋白量が全然違うと思います。

中込 体積にすれば10分の1ぐらいの大きさですから、かなり少ない。イギリスのAlmeidaという人が抗原抗体反応を電子顕微鏡で見るということをやったのです。Kapikianは、イギリスに6カ月間、サバティカルで行って、そこで免疫電顕法を習得しています。それを新しいウイルスの発見に応用できないだろうかということで試みた、先端技術だったのです。

大野 それが1972年のノーウォークウイルスの発見につながったということですね。

中込 そうです。今日のノロウイルスです。そして翌年の1973年には同じ方法で、A型肝炎ウイルスを発見しています。

大石 ああ、そうですか。

宇田川 本当にあの時代というのは電子顕微鏡が花形で、それで見れば何でも出てくるのではないかというような時代でしたね。

大石 電顕で見えたら、それがすべてペーパーに

なった時代でしたね（笑）。それに加えて免疫電顕という方法を使いましたね。

宇田川 当時の地方衛生研究所等のいろいろな人たちのリクエストとしては、技術的な面でもっとサポートしてほしいという話がわれわれに対してありました。ウイルス下痢症に対して皆さん興味を持っていたので、昭和63（1988）年7月臨床ウイルス学会が箱根で開催された時に山崎修道先生、千葉俊三先生、浦沢正三先生達が主導されて地方衛生研究所だけでなく、大学関係者や予研の先生方も含め下痢症ウイルスを研究する人たちが集まり、夜の会合を開きました。多分数十名の先生方が一堂に会したとおもいます。この会合で、「ウイルス性下痢症研究会というのを立ち上げて、みんなで話をしよう」と言う話で盛り上がったのです。この時の話し合いでは、「下痢症に関する仕事で各地方衛生研究所の先生方が困っていることがあるので、大学、企業や予研が助力してあげることが必要である。小難しい学会形式ではなく、ラウンドテーブル・ディスカッションではないけれども、技術的な面等困っていることがあったら、オープンな形式の研究会にしてそこでみんなで話し合いながらクリアしていけばいいのではないか」という趣旨で話はまとまりました。

これを受けて、同年、秋田市で開催された衛生微生物技術協議会の開催期間中、地方衛生研究所の下痢症を研究している先生方に集まっていただきました。この会合も予定していた人数を遥かにオーバーしましたが、狭いお店に折り重なる様に集合しました。この席で、山崎修道先生が、「ほんとうに、これからも下痢症ウイルスの研究が地方衛生研究所の仕事として大切なかどうか」と集まった人たちに問いかけた結果、「やはり必要である。これからも是非電顕の技術的な面や新しい検査法の開発等で地方衛生研究所の仕事を手助けしてもらいたい」との要望が強く出されました。そこで、平成元年10月、大阪のなにわ会館に28名の関係者が集まり下痢症研究会が始まったのです。始めは少人数の研究会でしたが、数年も立たないうちに多数の先生方が参加してくれました。

それからもう今年で22回目です。今回、これを調べて、平成元年に始まったというのはびっくりしました。それまでのプレの期間ですが研究会を立ち上げるために7～8年かかっているのです。もう30



宇田川 悦子 先生

年近い間、この仕事をやっているということですね。

大石 後で説明させていただきますが、ノロウイルスは現時点でまだ培養できていません。

河島 ロタウイルスは培養系があるのですか。

大石 ロタウイルスはずいぶん前から培養系ができています。

中込 1981～82年にかけて論文が出ています*⁷。

大石 佐藤先生（家畜衛試）で1981年でしたかね*⁸。

中込 1981年です。一番最初はそうですね。

大野 その細胞は何ですか。

中込 MA104 というアフリカミドリザルの腎臓細胞由来の細胞です。

大野 腎臓にもトロピズムがあるということですか。

中込 いや、そういうことではなくて、ウイルスの分離にはよくサル腎臓細胞が使われるのです。

宇田川 昔は、primary といって、サクリファイしてすぐの細胞を使っていたのです。primary MK といっておりました。ウイルスの分離培養にサルでもヒトでもみんな Primary 細胞を使用していた時代でした。

中込 今も日本のポリオのワクチンはミドリザル腎細胞の初代培養のはずです。

宇田川 そのほうが感受性は良いのです。いろいろな細胞が入っているらしくて、何がいいのかわからないのですが、セルラインにしてしまうと、どうしてもそこでセクションがかかってしまうので検出感度に差が出て来てしまう様です。

大石 レセプターが多いということですね。

宇田川 レセプターが多いのですかね。それとも細胞の種類がいろいろ入っているということですかね。

大野 腸管上皮だけにかかるというわけではないのですね。

中込 腸管上皮細胞への感染も、例えば東北大学などではやっていたのです。

宇田川 バイオブシーをやっていましたよね。

中込 バイオブシーではなくて、培養のほうです。

大石 ロタウイルスですか。

中込 ロタウイルスです。しかし、やはり増えなかったようです。

大野 レセプターはもうわかっているのですか。

宇田川 ロタはわかっているでしょう。

中込 完全にはわかっていませんが、ある程度はわかっています。

宇田川 ノロウイルスに関しては、培養系がなく感染性が調べられないので、まだわからないのですが、似たようなものではないかという話もありますよね。ロタウイルスの培養に特徴的なのは、培養メジウムにトリプシンを入れるのです。そうすると、開裂して中に入り込むらしいということになります。だから、ウイルスが感染するためには何かヘルパーがないとちょっと入らないかも知れません。そのままだけではだめな様です。

河島 なるほど。体内だといということですね。

宇田川 そうですね。ノロウイルスが増殖するためには何か補助するものが不可欠だと言うことなのかも知れませんね。

大野 消化酵素でしょうね。

宇田川 そうなのですかね。でも、トリプシンでもキモトリプシンでないといけないですよ。

中込 いや、普通のトリプシンです。

大野 レオウイルスもそうですね。

中込 レオウイルスもそうです。レオウイルスもトリプシンです。

大石 アセチルトリプシンは使ったことがあります。

中込 それはアセチルトリプシンの方が安定性が高いだろうということでしょう。培養するときには37度で置いておきますから。レオウイルスもロタウイルスも、消化酵素である程度、消化されて、その宿主の環境を使ってより感染性を増すのです。トリプシンを使って増えるというようなことで、今の

*7 Sato K, et al.: Arch. Virol. **69** : 155-160, 1981. Urasawa T, et al.: Microbiol. Immunol. **25** : 1025-1035, 1981. Kutsuzawa T, et al.: Clin. Microbiol. **16** : 727-730, 1982.

*8 Sato K, et al.: Arch. Virol. **69** : 155-160, 1981.

動衛研、前の家畜衛試の佐藤さんがヒトのロタウイルスを培養しています。だから、それは日本人の業績として誇るべきものですね。それがなければワクチンもできないわけですから。

大野 日本がはじめてですか。

宇田川 そうです。ロタウイルスに関しては、培養もできますし、低温馴化株とか、いろんなものでキメラを作るとか、そういう仕事もすごく進んでいます。これからまだまだいろいろなこともやらなければいけないのでしょうけれども、ノロウイルスは残念ながら、カリシウイルスもそうですが、今のところ培養はまだのようです。いちおう研究会ができるまでの歴史を語らせていただいたので、あとはお願いします。

Ⅱ. 診断の進歩

河島 では、大石先生をお願いします。

大石 私に与えられたテーマは、ウイルス性胃腸炎の検査法と培養ということなので、この分野を紹介させていただきます。

先ほどお話ししたように、私は大阪府の公衆衛生研究所に勤めていました。昭和40年代の半ばごろから嘔吐下痢症の集団発生が問題になっていて、この原因を何とか突き止めなければいけないということで、まず取り組んだのが電顕法です。当時ウイルス感染症の診断は専ら培養法が主体でした。ポリオウイルスはじめ、いろいろなエンテロウイルス、インフルエンザも培養が主体で、電顕で病原体を見る（検出する）などということは考えてもいませんでした。そういうことで、先ず患者さんの便材料を集めて、部分精製をしたものについて電顕観察を始めました。折角の機会なのでいろいろな下痢症ウイルスの電顕写真を見ていただこうと思って用意してきました。

これはノロウイルスの写真です。（写真1）

中込 これは周りに抗体がついているのですか。

大石 ついているかもしれませんね。

宇田川 ついていますね。

大石 凝集するということ自体がもう。

中込 だから、表面がでこぼこしている。

宇田川 粒子の周りにヒラヒラしているのが出ているでしょう。

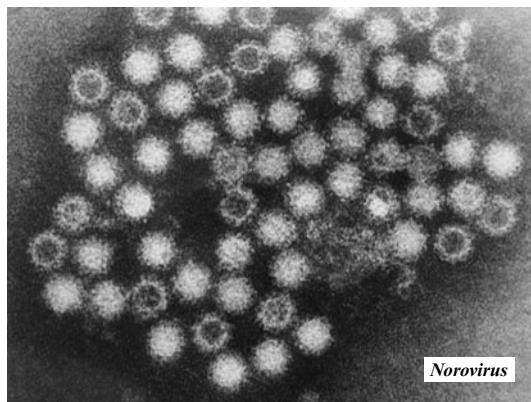


写真1 ノロウイルス（大石 功）

中込 もやもやくっついていっているでしょう。これはみんな抗体なのです。免疫電顕をやるとこんなふうに見える。これは免疫電顕ではなくて、患者さんの便材料を直接見たものですが。

河島 患者さんの抗体と一緒にあったウイルスですか。

大石 そのように見えます。

中込 おそらくIgA抗体なのでしょうね。

大石 このように粒子が凝集したかたちでしばしば観察することがあります。

大野 そんなにすぐ抗体というのはできるものですか。

大石 だいたい1週間ほど経ってから抗体がレスポンスしてきます。

中込 これはたぶん大人の人だと思うんですよ、だからね。何回も感染しているのでしょうか。

大石 そういうことは十分考えられると思います。

中込 ただ、たしかにこういうふう凝集するぐらいなら、なぜ感染するのか。

大石 疑問点でもありますね。

大野 でも、ノロウイルスというのは1種類ではないですね。

中込 たくさんあります。

大石 30数種類とされています。

宇田川 遺伝子解析をすればまだまだ出てきますよ。

中込 だから、もちろん中和しないものもあるのですが、でもこうやって aggregate を作るぐらいなら（笑）。

大石 電顕写真というのは一番いいところを撮りたいので、粒子がある程度集まっているところを狙

います。通常のサンプルには夾雑物がいっぱいあって、この写真のようにバックが綺麗なもののばかりではありません。

中込 こういうものになると、診断がつくというわけですね。

大石 ええ、もちろんこのようなものなら、形態的に容易に判定できます。

中込 わかるものについて診断するということですね。

大石 主要な胃腸炎ウイルスを表1に示しました。SRSV、NLV、SLVなどと長らく様々な名称が使われたのち2002年になって漸く命名されたノロウイルスとサポウイルス、そのほかアイチウイルスも載せています。それぞれのファミリーとか核酸、先ほど問題になっていたサイズ、それに型別（遺伝子型または血清型）などを書いています。

形態について、ノロウイルスは、写真1のように辺縁がもやもや（フリンジ様）して見えることが多いですが、一方のサポウイルスは粒子表面にダビデの星状の模様が観察されます。また、アストロウイルスは5つか6つぐらいの星状のポイントが見てとれます。ロタウイルスのAとCは、形態的にはほとんど区別できません。

中込 そうです、区別できない。

宇田川 形態学的には差がないです。

大石 ノロウイルスは、これだと確信が持てる鮮明な写真はなかなか撮れません。同じカリシ科のサポウイルスは、粒子の表層にネガティブ染色液が入り込むコップ状の窪みがあるのが特徴です。

中込 5回対称軸になっているのですよね。

大石 ウイルス粒子は概ね球形をしているので、平面上をランダムに転がるために全ての粒子が同じ方向を向いているとは限らないわけです。

中込 見る位置によって変わる。

宇田川 そういう意味では、電顕だけでウイルスを確定することはちょっと難しいです。

中込 全部がダビデの星に見えるわけではない。

大石 その通りです。一方、アストロウイルスは、粒子の表面に星状の模様が見えるのが特徴です。しかし、典型的な星状粒子が見えるのはたかだか20%程度といわれています。ですから電顕のみでこのような小型球形ウイルスを鑑別するには大変難しい面があります。教科書に出て来るような鮮明な粒子が見えたら、形態的に判定を間違えることはありません。

腸管アデノウイルスは、ロタウイルスとサイズは大差ありませんが、試料中にあれば簡単に判別できます。

中込 細胞培養で増したロタウイルスの電顕写真を撮ると outer capsid が見えないウイルスが多い。便材料からですから患者さんの腸の中でたくさんトリプシンのあるところからウイルスを撮っていますね。

大石 つぎは胃腸炎ウイルスの疫学分布についてお話します。河島先生がご専門の小児科領域では、胃腸炎の原因ウイルスはロタウイルスとノロウイルスが主要だということでしょうでしょうか。私の印象としては、ノロウイルスの検出率が割合高いように感じます。昔調べた乳児下痢症の成績では、ノロウイルスはそれほど多く見つかりませんでした。

大野 その時の検出法は何ですか。

表1 主な胃腸炎ウイルスの種類と性状

ウイルス	Family	核酸 (kb)	電顕像 (nm)	型別	培養	主な検査法
<i>Rotavirus A</i>	<i>Rotaviridae</i>	dsRNA 16-27	60-80 2重殻	P, G	可	EM ELISA Latex凝集 IC
<i>Rotavirus C</i>	<i>Rotaviridae</i>	dsRNA 16-27	60-80 2重殻	3~4	可	EM RT-PCR R-PHA ELISA
<i>Norovirus</i>	<i>Caliciviridae</i>	ssRNA 7.4-7.7	28-35 辺縁フリンジ	GI GII GIV 30種超	不可	EM RT-PCR Lamp NASBA Rt-PCR ELISA IC NB
<i>Sapovirus</i>	<i>Caliciviridae</i>	ssRNA 7.4-7.7	28-35 ダビデ星状	GI GII GIV GV	不可	EM RT-PCR IC Rt-PCR ELISA
<i>Astrovirus</i>	<i>Astroviridae</i>	ssRNA 7-8	28-30 5-6星状模様	1~8 新タイプ出現	可	EM RT-PCR NT ELISA
<i>Enteric Adenovirus</i>	<i>Adenoviridae</i>	dsDNA 28-45	70-90	F (40, 41)	可	EM IC ELISA RE-PAGE Latex凝集
<i>Aichivirus</i>	<i>Picornaviridae</i> (<i>Kobuvirus</i>)	ssRNA 8.3	28-30	1~3	可	RT-PCR NT

EM：電顕 RE-PAGE：制限酵素処理DNAのポリアクリルアミド電気泳動 ELISA：酵素抗体法 Ret-PCR：リアルタイムPCR
NB：ノーザンブロット法 NT：中和法 IC：イムノクロマト

大石 主に電顕法でした。

宇田川 最近の検査法としてPCRのような遺伝子検査が多用されるようになったのでノロウイルスの検出率が上昇したと思います。

大野 PCRですか。

大石 PCRがほとんどです。

宇田川 あと、ロタウイルスに関しては、ロタレックス[®]ドライ（第1化学薬品）とか、市販の簡便な検査キットですね。

中込 そうですね。抗原検査法ですね。

宇田川 一般的に、現在汎用されている検査方法を見ると、アデノウイルスとかロタウイルスは検査薬としては市販のキット、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスは遺伝子検査でしょうね。

大野 それは現在のキットですか。

宇田川 そうです。あまり電顕はやられなくなってきているというのが現状です。遺伝子検査が汎用されるようになってから検査材料が大量に集まらなくなる傾向がありますので、濃縮して検査をする電顕検査が出来なくなって来ていることも否めません。

大石 ロタウイルスの年齢分布は圧倒的に3歳までの乳幼児に多く、ウイルス陽性例のおよそ50%を占めます。アストロウイルス、サポウイルスの検出率は3～5%程度ではないかと思われます。成人の分布では、ロタウイルスがぐっと少なくなります。さて、つぎにそれぞれの季節分布をみますと概ね決まっているようです。

年末から年始かけて出てくるのがノロウイルスで、その次にロタウイルスが出てくるという感じです。

中込 先生、ところが最近ロタウイルスの季節分布がちょっとずれてきているという印象がありますね。昔は真冬だったのですが。

中込 そうですね。新潟大学の鈴木宏先生が感染研の人たちと一緒にやったのは、ずっと遅れて、だんだん4～5月です。6月でもあるという報告になっています。

大石 その理由は何かあるのでしょうか。

河島 遅れているのはロタウイルスですか。

大石 現象だけでその理由はわかりません。

さて、つぎに診断法、検査法についてお話しします。まず、ノーウォークウイルスが1972年に電顕で見つかりました。つづいて1973年のロタウイルスと



大野 博司 先生

なりますが、間違いありませんか。

中込 そうです。ロタウイルスは1973年です。

大石 いずれも1970年代の初めに発見されましたが、当時はまだまだウイルス分離が全盛の時代で、電顕を用いて検査を行うのは非常にまれなことでした。しかし、胃腸炎を起こすウイルスのほとんどは、まず電顕によって検出されてきたといっても過言ではありません。また血清診断にはウイルスの陽性検体を部分精製した抗原を使って古くはCF（補体結合反応）、そのほか免疫電顕法、ELISA法や粒子の構造蛋白を利用したウエスタンブロット法（WB）を実施していました。

時代が下って胃腸炎ウイルスはやがて培養できるものと培養できないものの2つに大きく分かれています。現在は遺伝子検査ができますので、両群間で検査レベルにほとんど差がありません。

1990年に至ると培養困難なウイルスの代表格であったノーウォークウイルスの全長の遺伝子が解読されました^{*9}。

これを契機に胃腸炎ウイルスの検査は、ノロウイルスを中心に電顕の時代から一気に遺伝子検査の時代へと大きくシフトして行くことになりました。ノロウイルスの遺伝子検査は間もなくカキなどの食品や環境試料の検査にも応用されるようになりました。サポウイルスも同じような経過を辿っています。現在では遺伝子検査法だけではなく、構造蛋白質を発現したVLP抗原に対する特異抗体を用いたイムノクロマトやELISAといった免疫系の検査法が使われるようになりました。胃腸炎ウイルスの検査法は、現在でもなお一層高感度なものへ開発が進めら

*9 Jiang X, Graham DY, Wang K, et al.: Science 250 : 1580-1583, 1990.

れています。

さて、折角の機会でありますので、ここでネガティブ染色法の実際をお話しましょう。検査するサンプルを部分精製して浮遊液を作り、これをグリッドという約5mm径の金属メッシュの支持体に乗せて、これに燐タングステン酸(PTA)とか酢酸ウランといった金属の希薄な溶液を重層して乾燥させた後に電顕観察を行います。

ところがここで問題なのは、金属溶液の濃度とか、pHとか、サンプルとの作用時間によって、見えてくるウイルス粒子の形態が微妙に変化するのです。例えばPTAのpHは6.7がベストですが、それより少しでも高いと粒子表面が変性して正常な電顕像が観察できないことがあります。金属液の作用時間が長すぎると2重殻のロタウイルスの外層が消失することがあります。また金属液のpHが極端に酸性であると、免疫電顕には使えないわけです*10。

つぎは被検サンプルの保存温度ですが、これについて皆さんのご意見をお聞きしたいのです。例えばノロウイルスの場合、陽性サンプルを通常-20℃で(長期間)保存しますが、そうするとどうもウイルス粒子の表層の形態が崩れて、電顕や構造蛋白質を利用するウエスタンブロット反応において、正常な形態が観察できなかつたり、バンドの消失を招くのではないかと考えています。ですから元のサンプルを-80℃とか4℃ぐらいに置いておく方が、ウイルス粒子(形態)のメンテナンスにとってベターなのではないかという印象を持っています。

中込 感染性も同じような傾向がありますね。分離するときに、どちらかというと4℃のほうがよい。中途半端に-18℃とか、それぐらいしかない病院があります。ちゃんと-20℃あればまだいいのですが、もっと高いのがあります。家庭用の冷凍庫のようなものは-20℃にはならず、-10数℃です。だから、粒子が壊れるというのは十分理解できる話です。

宇田川 以前CDCに行ったときに、Roger Glass博士のところで患者の便材料をストックしている場所を見ましたが、氷室保存、4℃なのですよ。ストック材料の表面にかびがものすごく生えている。そのかびを削り取ってその中の便材料を取り出し精製してから電顕観察し写真を撮りました。(笑)。

大石 そうですね。私もCDCのラボで見ました。

宇田川 この便材料を濃縮した検体で遺伝子検査とか、電顕用のサンプルを作っています。彼らは4℃がいいと薦めていました。私が-20℃が良いのではないかと言ったら、彼らは-20℃保存なんて温度管理が難しいのでだめと言っていました。

大石 検査法をつづきですが、1990年の半ばまでわが国で実際どのような検査法が使われていたかですが、その答えは、1995年に報告された『最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査—総合報告書』*11にはっきり載っています。図1がそうですが、調査期間の1990～95年に全国の地方衛生研究所が主体となってすすめられていた(主に食中毒に関わる)下痢症ウイルスの検査法の使用状況がよく示されています。これによると、当時わが国では電顕法が圧倒的に多く使われていて、PCR法は未だほとんどやられていませんでした。

中込 下痢症の原因のSRSVなどを検査するために、いろんな電顕が入ったからではないでしょうか。

宇田川 そういうわけではありません。

中込 やはり下痢症を見るとしたら電顕が必要だということになる。最終的にはほとんどの衛研に入っている。

大石 そのように全国的に配備されるようになったのは、厚生省(現厚労省)が食品衛生法の改正を発令する1997年より後のことです。

中込 PCRはもっと後でしょう。

宇田川 でも、ある研究所ではもう90年代に導入されていますよね。

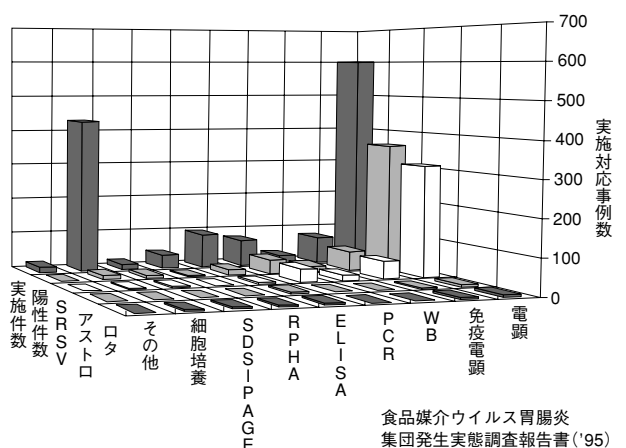


図1 食品媒介ウイルス性胃腸炎の検査法
調査期間 1990～95

*10 大瀬戸光明ら(愛媛県立衛生環境研究所): ウイルス性下痢症研究会 第12回研究会抄録、2000年

*11 井上栄(国立予防衛生研究所) 研究班、川本尋義(岐阜県保健環境研究所) 報告書総括

大石 導入していたのは一部の研究所で、ノロウイルスのPCR法が開発されて5年ほど経っていますが、実状はまだ図に示された程度でした。

宇田川 予研や大学等ではある程度PCRの装置が入り、検査法等を検討していましたが、各地の衛研にはなかなか入らなかったと思います。

最初のころはすごく高かった様な気がします、一般の検査に使える値段とはほど遠い段階でした。一部の研究用として使用されていただけの様な気がします。

中込 でも、下痢症検査ということで、衛研にいろいろな機器が入ってきましたよね。

大石 それはたしかです。

中込 だって、見るとしたら電顕が必要だということになると、やはり下痢症でしょう。最終的にはほとんどの衛研に入っている。

大石 この調査の後に、厚生省から食品のウイルスを病原物質として認められるという法律ができたので、そこから先です。

宇田川 ウイルス性下痢症研究会が立ち上がった平成元年以降、食中毒事件の原因として小型球形ウイルスが関与している可能性を示す報告数が顕著となったために、岐阜衛研の川本先生を始めとした有志が集まり食中毒の原因物質としてウイルスを厚生省に認知してもらいたいという気運が高まりました。そこで、井上栄先生をリーダーとした調査研究を厚生科学研究費で行うための事前調査活動が行われました。その後、平成6(1994)年から5年間の『ウイルス性胃腸炎全国実態調査』を厚生科学研究費で実施しました。平成7(1995)年12月の報告書を基に、厚生省は食品を媒介とするウイルス性の健康被害対策について本格的な検討に入り、平成9(1997)年3月の食品衛生調査会による意見具申をふまえ、平成9(1997)年5月30日の食品衛生法施行規則の改正により、ウイルスを食中毒の病因物質とすることとしました。

中込 そこから先はもうPCRになっているのではないですか。

大石 いや、まだなのです。

宇田川 電顕が主流だったのですよ。

大石 まだそこまでは行っていない。

宇田川 この時期以降電顕が各地の衛研に普及しはじめて、その中には古くなった電顕を取り替える

ことも多々ありましたね。このように電顕が地方衛研の検査で一般的になってきていましたが、そのときにPCRはまだまだといった感じです。PCRは大学とか感染研は早かったのですが、他ではそんなに早くなかったのですよ。

中込 いや、これは1990年代の後半でしょう。

大石 今のは、1990年代の真ん中ぐらいまでです。

中込 それはいわゆる黄色い表紙の本^{*12}というか、報告書でしょう。

大石 そうです。そのとおりです。

河島 遺伝子はわかっていましたかね。ノロウイルスはまだだったのではないですか。

宇田川 ノロウイルスに関して遺伝子レベルの研究が進み1992年にはRT-PCRが確立されて、ペーパーが出ています。だから、クローニングはされているし、PCRの結果も出ていますが、まだ一般的な検査法としてはわが国では認知されていなかったのです。

中込 まだそんなに検査のレベルまで行っていないのですね。

大石 ええ、繰り返しになりますが、1997年までは、全国的にまだそこまで到達していません。

宇田川 行っていなかったです。2000年以降からです。それまでは電顕が主流でした。

大野 1995年から2000年だったら、PCRの機械は100万円しないですよ。

宇田川 安いのもありました。オイル式のものです(笑)。

大野 それは1990年ぐらいの話だと思いますよ。ぼくはベチョベチョになりながら使っていましたよ。最初は手でやっていました。

宇田川 感染研とか、大学とか、そういうところは入っていましたが、今、話題になっているのは各地の行政の研究機関のことなので、なかなか機械の導入が出来なかったのです。

大野 でも、電顕が普及したのが1995年の後だとしたら、そのころにはABIの機械が100万円ぐらいで入っていたはずですよ。金属の小さいチューブのやつです。

宇田川 ただ残念なことに、行政のほうはちょっと遅れるのですよ。大学や企業等と異なり検査機械が導入されるためには世間一般から見てディレイがあるのです。

*12 食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班：最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査総合報告書, 1995.

河島 予算の問題ですね。

宇田川 予算の問題もあります。がそれ以外に、高額の出費が入ったばかりなのに、電顕を使わずに、これが新しくしかも簡便な検査法だからこちらの機械を使用してPCR検査をやりたいと言うわけにいかないのです。

大野 そうですね。

大石 さて、私どもの研究所で胃腸炎ウイルスの研究は、1974年からスタートしましたが、それ以後の経過を少しお話します。まず1974年にA群ロタウイルスによる集団発生を確認したのが最初です。ただ、電顕検査を始めたものの、1年間は丸で何にも見えませんでした。兎に角、陽性サンプルというものなかった時代です。そのうちに今言うノロウイルスなども次第に見つかるようになりました。

1979年には東北大学の石田名香雄教授の科研研究班に参加しました。このころはロタウイルスの研究がかなり進んでいた時代です。研究班では班員からいろいろな小型ウイルスの写真を集めて1981年に『本邦で検出された下痢症ウイルスの多様性、とくにrotavirus以外の小球形ウイルス群について』のタイトルで論文を出しました^{*13}。これは日本で最初に報告された小型球形ウイルスのまとめの論文です。

その後、大阪府公衛研では1989年にアストロウイルス6型による集団下痢症を確認しています。このウイルスの検査と同定には宇田川先生やCDCのDr. Glass、安東先生のお世話になりました。ちなみにこの時に検出した交野K23というアストロウイルス6型の株は、20年のちの2010年に遺伝子の全塩基配列が解読されています。

その後、1990年にベイラー医科大がノロウイルスのクローニングに成功しましたがいろいろなシンポジウムを通じて懇意になった同大学のEstes教授(分子ウイルス学)からSRSVの共同研究の話が持ち上がりました。1990年のことです。その成果は、1994年にSRSV(現ノロウイルス)の分子疫学について共著で論文発表となりました^{*14}。

中込 Estesとのいきさつは何だったのですか。

大石 日米医学です。

宇田川、中込 仙台であった日米医学ですね。

大石 そうです。そのときです。要するにいろい

ろなSRSVを持っているということで、話が来たのだと思います。そのときの論文の要点は、SRSV(ノロウイルス)が遺伝的に多様であるというもので、世界初の知見となりました。また論文には今日で言うGIとGIIに分かれることが示されています。このとき分析されたSRSVは、私ども大阪の2株(KY89とOTH25)や東京都の株を入れてわずか10株ほどでした。そのおよそ10年後の2005年に感染研から出された成績を見ると、驚くほどたくさんの株が分析されていて、まさに隔世の感がありました。また共同研究の一環として1993年に私どもはPCRと増幅産物のシーケンスにも着手しています。PCR検査法の導入はわが国でかなり早い方ではなかったかと思います。また1995年のはじめにCDCのアトランタのラボに押し掛けてプローブ法(ノーザンブロット)の実地研修を受けました。これらをまとめた知見を1995年の「札幌ウイルス胃腸炎国際シンポジウム」や1999年の「第1回国際ヒトカリシウイルスワークショップ」で発表しました。

さて、繰り返しになりますが、食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班の報告書が出たのにつづいて食品衛生法の改正がありましたが、間もなく国立感染研を軸に国による新しい検査法の研修が始まり、ここから遺伝子検査法が全国的に波及することになります。

宇田川 先ほども言いましたが、この時代までウイルスは食中毒の原因物質には入っていなかったのです。

大野 1997年の改正まではなかったということですか。

宇田川 そうです。われわれの報告者が出てから、食品衛生調査会で審議されて原因物質として明確な位置づけが決まったということです。

大野 それ以前は細菌ということですか。

宇田川 病因物質には、細菌とか、毒素とか、化学物質がありましたがウイルスと言う項目はありませんでした。このために「その他」の項目の中に全部のウイルスが一括りになって入っていたと思います。ですから、分布を見ると「その他」がすごく大きかったのです。ところが、皆さんが実際の食中毒の事例で電顕検査を行うとノロウイルスらしきものが多数検出される様になって来て、どうもウイルス

*13 石田名香雄ら：ウイルス 31 (2) : 167-170, 1981.

*14 Wang J, Jiang X, et al.: J Virol 68 (9) : 5982-5990, 1994.

も関係あるのではないかということが明らかとなりました。そこで、前にもお話ししましたが、機会ある毎に学会会場のロビーなどで、岐阜衛研の川本尋義先生や大石先生と食中毒事件にウイルスも大いに関与しているから、ウイルスも原因物質の中へ入れてもらえる様厚生省へ働きかけをしようではないかと話し合いをし、意見がまとまりました。そこで、厚生省科学研究費をもらって井上栄先生を主任とする研究班を立ち上げて、各地の衛生研究所の過去5年間のデータをまとめました。報告書をみるとウイルスが関与していると思われる事例がかなりの量ありました。その後厚生省は私たちの1995年の報告書を基にして1997年5月食品衛生法を一部改正しました。

大野 ずいぶん最近ですね。

宇田川 そうですね。

大野 日本は諸外国に比べたら遅れているのですか。

大石 遅れていないと思いますね。

大野 みんなこんなものだったということですね。

宇田川 昔の食中毒、例えば先ほど話に出た茂原下痢症とか、あの当時も遺伝子検査が可能でしたらもっと違う結果が出ていたかも知れません。電頭で検出出来るデータと比較して最近の統計を見ると、遺伝子検査で検出された事例が増えて来ていますので、以前よりも報告されるノロウイルスが原因の事件数が多くなっていますよね。

中込 食中毒のわが国の原因としては、ノロウイルスが1番ですね。患者数で一番多い。

大野 よくニュースになりますよね。

大石 冬になると流行がある。ところが現在でも、食中毒に加えてヒトーヒトの感染が多くなっています。毎年寒冷期になると同じような発生パターンを毎年繰り返している様子は、昔とほとんど変わっていません。これを減少させるにはどのようにすればいいのか、大きな課題だと思います。

さて、最後に今後の研究課題ですが、まずノロウイルスの培養について触れさせていただきます。先ほどからお話がありましたように、1972年にボランティアによる実験がありました。したがってヒトだけが胃腸炎を発症し、抗体のレスポンスもあり、感染が成立するということです。

その後、in vitro の培養がいろいろ試されました。



河島 尚志 先生

ありとあらゆる単層培養された細胞とか3次元培養のCaCo2細胞を使った試み、またリバースジェネティックスも試みられています。しかし、現時点でin vitroで安定した増殖系の成功には至っていないのではないかと思います。今も世界中で精力的に培養へのチャレンジが続いているではありませんか。

つぎに、検査法の課題ですが、ノロウイルスの遺伝子解析では、全長を検査の対象とするのか、あるいはカプシド蛋白の領域だけを調べたらいいのか、そのへんのところが今も世界中で議論されているところです。

検査キットについては現在、LAMP法やその他の高感度な遺伝子検査法が実用化され、操作の簡易化もすすみ、複数の胃腸炎ウイルスのプライマーを同一の試験管内で反応させるPCRキットも用意されていて、使用目的に応じて広く使えるようになっていきます。

最近の話題として、腸内フローラの研究分野で、便材料から一度にごっそり細菌類のDNAを抽出してきて分類するメタゲノム解析というのが行われています。胃腸炎ウイルスでも同じ方法が開発中であると聞いていますが、今後の展開に興味もたれます。

一方の免疫系検査ではベッドサイドで使用可能な迅速性のイムノクロマト法がいくつかの胃腸炎ウイルスについて市販されています。一方、ノロウイルスでは多検体の検査用の高感度なELISA検出キットの開発が進められていて、一層の期待が寄せられています。

さて、このような市販の検査キットについてユー

ザー側からの要望を申しますと、もう少しキットの有効期限を延ばす工夫ができないかということです。コストと使用頻度との関わりがありますから。またアイチウイルスや今回触れなかったその他の新しい胃腸炎候補ウイルスの動向を監視しながら、検査キットの開発にも注目してゆきたいものです。以上で、私の説明を終わらせていただきます。

河島 先生がたの見解として、今後、ノロウイルス以外に新しいウイルスが見つかるという可能性はありますか。アストロウイルスとかパレコウイルスは出てきていますが、それほど頻度としても多くないですね。

大石 多いとは思えませんが、先ほど述べたメタゲノム法とか、そういうものを駆使すると、まだ見つかるかもしれません。

河島 検出できているのはだいたい6割ぐらいとおっしゃっていましたが。

大石 そうですね。

河島 そうすると、また違うものがあるとか、電顕で先生が前に見ていたものがあるとか、そういうこともあるのですか。

大石 実はいろいろなサイズのウイルスを観察していましたが、それらが果して胃腸炎を起こす候補ウイルスなのかどうかなど、整理ができていないわけです。もう元へ戻れませんが、最新の遺伝子分析法や電顕検索にしても、まだ残されている領域があるのではないかと思います。

Ⅲ. ワクチンの現状

河島 そうすると、今後はワクチンを含めて、治療ということになりますね。

大石 やはりそういうところに入りますね。

河島 そうですね。ロタウイルスのワクチンは世界ではかなり使われて、劇的にロタウイルスの患者が減っているという報告もありますが、国内ではまだまだという状況です。今、申請を始めたということですが、中込先生は今、そちらの現状はいかかでしょうか。

中込 世界的に使われているワクチンは2種類あって、1価のロタウイルスワクチンと5価のロタウイルスワクチンがあります。ROTARIX® (GSK 社) と RotaTeq® (Merck 社) です。両者とも今、わが国

で治験が終わって、承認申請をしているということらしいです。

宇田川 ワクチンを飲むとロタウイルスに対する抗体は確実に上がっているのですか。

中込 抗体ではなくて、エンドポイントの発症防御というところで見えています。

大石 あとはノロウイルスワクチンの開発もそろそろ始まっているように聞きますが、どうですか。

中込 ワクチンというと、やはり一番大切なのは、使った場合にどれだけのインパクトがあるかということです。ノロウイルスがものすごく騒ぎになるのは、患者数が多いためです。しかし、重症になるかどうかということ、実は入院する人というのは非常に少ないし、ほとんどの人は1日ぐらい寝ていれば治る。ただ、患者数がいきなりたくさん出るので、大騒ぎになる。

河島 ホテルが営業停止になるとか、そちらの経済的な問題が大きいですね。

中込 そうですね。それに対してロタウイルスのほうは、重症の下痢症になる。調べると、ロタウイルスはわが国でも下痢症による入院のだいたい50%近くを占めています。そういうことから、ワクチンはやはり重症となる病気に使うのが便利になります。

ただし、かつてノロウイルスというのは、学童以降の成人を中心としたウイルス性胃腸炎の集団発生、一方、ロタウイルスというのは乳幼児の下痢症の原因だというように、だいたい2つに分けたパターンで考えていましたが、ノロウイルスもよく調べてみると、ロタウイルスに次ぐ2番目の小児下痢症の原因であること。それから、ほくたちは大人のほうも調べたことがありますが、成人の下痢症の10%から15%ぐらいがロタウイルスです。ということは、おそらくノロウイルスはもう少し多いかもしれませんが、だいたいそういう散発性の下痢症の原因になっている。

それから、皆さんご承知のように、福山市の特別養護老人ホームの事件がありましたが、老人に起こると死ぬこともある。実はイギリスでは Health Protection Agency の人たちが調べた8年ぐらいのデータがありますが、イギリスでは報告されているノロウイルスの8割ぐらいが、医療関連施設で起こっています。

宇田川 ノロウイルスによる院内感染もかなりありますね。

中込 そうですね。平均すると 1,000 人に 1 人ぐらいは院内感染で亡くなっています。

河島 ノロウイルスですか。

中込 ええ、ノロウイルスです。

大野 それは高齢者ですか。

中込 高齢者です。だから、ノロウイルスにしろ、ロタウイルスにしろ、いろいろな疫学的な研究の結果から、われわれが認識する疾病像というのは変わってきているような気がします。

ロタウイルスのワクチンということになると、文科省の海外学術調査でブラジルに行って調べると、ワクチンを使う前はロタウイルスがわが国などと同じで、やはり重症下痢症の 30% から 40% ぐらいの割合をロタウイルスが占めていましたが、ワクチンを使い始めると、あっという間に数パーセントぐらいになっています。ブラジルはパースコホートが約 350 万人で、アメリカに次ぐぐらいの大きさですが、2006 年から全乳児への定期接種を開始しています。

宇田川 オーラル投与ですか。

中込 オーラル（経口接種）です。1 価のワクチンです。

河島 免疫は何年ぐらい維持されるのですか。

中込 それは非常によい質問なのです。どれぐらいの期間持続するかというのは少し問題なところがあって、印象として、いわゆる途上国になるほど持続が短いような気がします。

宇田川 ロタウイルスの便中への排泄はどうですか。飲ませると、ポリオワクチンなどは、revertant が出たり、かなり問題になるでしょう。そういうおそれはどうですか。

中込 両方のワクチンとも排泄はします。

宇田川 排泄期間は長いのですか。今までの報告からするとロタウイルスの排泄期間というのは長いでしょう。

中込 長いですね。

宇田川 2 週間とか、下手すると 1 カ月とか、毎日排泄している。電顕でフォローアップスタディをしても、1 カ月という人もいるし。免疫不全の子供だと 1 年、2 年も出る。

中込 そうですね。一生というか、死ぬまでというか。

宇田川 一生、毎日ロタウイルスを排泄しつづける。そういうことになる問題ですよ。

中込 かつては死ぬまででしたが、今は骨髓移植をして治る。大石先生が免疫不全の報告をされていますよね。

宇田川 赤ちゃんのうちにみんなにワクチンを飲ませて、その中の何人かが、もし免疫不全か何かだったら大変ですよ。

河島 ロタワクチンは 3 カ月ぐらいが対象ですよ。

中込 最初の接種は 6 ～ 12 週間です。だから、2 カ月ぐらいです。

河島 そうすると、免疫不全症の患者では診断がつく前に打ってしまうということになりますね。

中込 免疫不全の診断がつく前だと思います。実際、今のところブラジルとか、そういうところでは報告はないですが、原因がわかって免疫不全だということは、ある程度の医療レベルが必要です。それで、アメリカやオーストラリアからは報告があります。アメリカとかオーストラリアというのは、RotaTeq[®] という 5 価ワクチンを使っているところですが、そこで免疫不全の患者さんがずっと排泄しつづけると。その結果下痢を起こすということがわかっています。

中込 日本では大石先生がなさっています。この患者さんはずっと排泄していたわけですね。

大石 亡くなるまでウイルスの排泄がありました。

中込 この症例はワクチンではないですが、免疫不全のためにロタウイルスを排除することができなくなってしまうのです。

大石 11 本の RNA-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）パターンに、驚くほど過剰なバンドが出現しました。

河島 SCID（重症複合型免疫不全症）の患者さんですね。

大石 そうです SCID です。

中込 ワクチン株もその SCID の患者さんで持続感染が起こっています。

河島 SCID だと、3 カ月ぐらいまでは診断されていない患者さんもいますよね。

宇田川 そういう意味では、ワクチンの first dose が早い時期になるというのはいいことでもあるけれども、抱えている問題もいろいろありますね。

中込 ただ、SCID の患者さんというのは、頻度が10万人に1人ぐらいです。

大野 それは、ワクチンによって病気になってしまうということですか。

中込 そうです。

大野 でも、ワクチンをしなくても病気になってしまうということもありますよね。

中込 そのとおりなのです(笑)。

中込 骨髄移植をしなければ生きられない人たちののです。それで、何か病気になって見つかるわけです。「治りが悪いな。おかしい」ということで見つかる

河島 治らないので、そのまま入院になって調べると、免疫不全だったというパターンが多いですね。私どもの病院でも SCID は下痢症で入院していますね。

大石 その原因というのは、ロタウイルスが多いのですか。

河島 菌とかウイルスは検出できなくても、下痢が治らないです。

大野 普通の人ではかからないようなものでも、なってしまうかもしれないわけですね。不顕性のようものでも顕性になってしまう。

河島 はい。

中込 ただ、ロタウイルスというのは3歳から5歳ぐらいの間に、事実上100%の人が感染しますから。

大野 1価と5価というのは何が違うんですか。

中込 簡単にいうと、ロタウイルスにはいろいろな血清型があるのです。例えばポリオウイルスのワクチンというのは3価ですが、1つのポリオウイルスの型で、例えば1型に対する抗体というのは、2型の発症は防御しないことになっています。そういうのが血清型ですが、ロタウイルスにはその血清型がたくさんあって、ヒトで主に多いのは4つとか5つなのです。さらに、血清型を決定している抗原というのは、ウイルスの外側の蛋白質ですが、表面の蛋白質とウイルスのスパイクの蛋白質の2つで、独立してその血清型が決まっているので、ヒトで主に見つかるような血清型を入れた5種類で、組み換え体を作っています。

河島 抗体が少し交差するのでしょうか。

中込 おそらく少しは交差するのだらうと思います。

大野 インフルエンザはHとNがありますね。それと同じような感じですか。

中込 そうです。インフルエンザのHとNと同じで、ロタウイルスの場合にはGとPという名前をつけています。

大野 では、交差する可能性はありますね。その交差するかしないかというのを調べているのは、IgGですか。

中込 in vitro の試験管内の実験でやると、交差しないのです。

大野 だから、ほとんどIgGですよ。

中込 だから、モノクローナル抗体のようなものを使って、中に共通の、ある程度、幅広くクロスするようなエピトープはあるのですが。

大野 結局、血清型ということは、抗体で見ている。当然、IgG抗体ですよ。

中込 そうです。IgG抗体です。

大野 IgGはスペシフィシティが高いので、IgAはクロスする。インフルエンザなどでも、今はインフルエンザは注射なので、全身免疫系しか刺激しないので、IgG抗体しかできないではないですか。しかし、マウスのレベルでは、粘膜免疫としてIgAを作らせれば、H1N1でやってもH5N1何とかも抑えられる。IgAはあまり出来のいいものではないかもしれませんが、その分、かなり交差反応が起きるので。

宇田川 例えばロタウイルスなどは、一度、咽喉部が増えて、中に入っていくと言う話があります。腸管というのは2次増殖部位なのでしょうか。

中込 どうかかわらない。

宇田川 やはりダイレクトに腸管に行ってしまうのかしら。

大野 どっちでも平気ですよ。例えば経鼻とか舌下とかbuccalで感作して、cervicalで作られたものは、腸管にも行く。

宇田川 体全体に回るのですか。

大野 B細胞はhomingして、移行しますから。粘膜系は全部つながっていて、汎粘膜免疫機構と言って、そういうhomingがあります。

宇田川 今のお話だと、例えば喉あたりで吸引して接種する方法のワクチンのほうが危なくなくていいかもしれないですね。

大野 中枢神経系に影響を与えるようなワクチン

だと、経鼻はそれが問題で、アジュバントも使いにくい。例えばコレラ毒素などの粘膜免疫系のアジュバントは、脳に行ってしまうのではないか。だから、安全なアジュバントというか、もちろんウイルスの場合は粒子そのものがアジュバントなのでしょうが、本来は違うけれども脳炎のようなものを起こす。特に免疫不全の方などで脳炎が起こってしまうと、経鼻は問題になります。

河島 このワクチンはアジュバントが入っているのですか。

中込 入っていません。生ワクチンですから。

大野 というか、たぶんウイルス自体がアジュバントの効果を示すわけですよ。

中込 先ほどのワクチンのところに戻ると、動物にもロタウイルスというのがあるわけです。動物のロタウイルスとヒトのロタウイルスというのは、宿主域が違うので、おそらく動物のロタウイルスはヒトに対しては弱毒化しているだろうと。そういう考えの下に組み換え体を作って、表面だけはヒトのロタウイルスにする。それで血清型が重要だということで、5つの組み合わせのものを作っている。そういう考え方のワクチンが1つです。

もう1つは、防御免疫に働くのは必ずしも中和抗体だけではない。それが粘膜表面で働くIgAであろうと何であろうと、そればかりではないだろうと。したがって、ヒトの病気を予防するためには、古典的な方法ですが、ヒトのロタウイルスを弱毒化して使ったほうがいいだろう。そうすると、もっと幅広くちゃんと抑えるはずだと。

というのは、感染というのは大人になってもなるように、一生の間おそらく何回も繰り返すのです。ただ、発症するのは最初のせいぜい1回とか2回で、一番重いのは最初の感染です。その次はだんだん不顕性感染になっていってしまう。とはいっても、5種類もある血清型にすべて感染しなければ免疫にならないかという、そうではなくて、そんなにたくさん感染する必要はない。最高でも3回ぐらい感染すれば、免疫になるだろうと言われています。

そこで、そんなにたくさんの必要はないだろう、1種類でいいという考え方で、ヒトのロタウイルスの中で最も多いタイプのウイルスを使って弱毒化して

作ったというのが、1価のロタウイルスワクチンです。

宇田川 それは温度感受性株 (ts) ですか。

中込 tsではありません。

河島 そうすると逆に考えると、そのタイプのワクチンをその国で全員に接種すると、他のタイプのものに替わってしまう可能性はどうでしょうか。

中込 そうですね。例えば肺炎球菌ワクチンでは、serotype replacementとかserotype shiftと言われていますが、そういう現象がたくさん起こってきています。ロタウイルスはどうか議論されているところですよ。

河島 それはまだわかっていないのですね。

中込 実はぼくたちがブラジルで研究していたのは、先ほど言ったように、患者さんはものすごく減るのですが、残ったのは何かというと、そのワクチンとはまったく交差のないウイルスがたくさん増えた^{*15}。それを報告したら、それはワクチンを使っていないところでも増えてくるとか、ぼくたちは専門的にはG2P [4] と言っている株ですが、natural variationの範囲だとか、今、いろいろ議論になっているところですよ。

実はブラジルで使われているのは、ROTARIX[®] といって1価のワクチンです。血清型G1P [8] ということで、少なくとも試験管内の中和反応ではG2P [4] とクロスしないものです。では、どれぐらい効くのかということで、症例対照研究という疫学的方法を使って、ワクチンの有効性 (effectiveness) を計算しました。そうしたら、重症下痢症に対しては83~85%効くのです^{*16}。実質上ほとんどよく効く。おそらく同じ血清型と同じぐらいに効いていると予測されます。だから、効いていることは効いている。

ただ、ウイルスの生態のことですから、おそらくわずかな有効性の違いとか何とかということで、dominantであればたくさん増えていく。それに置き換わってしまうということは、ありうるだろうと思います。しかし、そういう考え方が世の中で支持されているわけではありません。ぼくたちはそう考えていますが、あれは違うと言われています^{*17}。

大野 世界的には1価、2価、5価があるということですか。

*15 Gungel RQ, et al.: Emerg. Infect. Dis. **13** : 1571-1573, 2007.
Nakagomi T, et al.: Arch. Virol. **153** : 591-593, 2008.

*16 Correia JB, et al.: J. Infect. Dis. **201** : 363-369, 2010.

*17 Grimwood K, Kirkwood CD, Lancet **371** : 1144-1145, 2008.
Linhares AC, et al.: Lancet **371** : 1181-1189, 2008.

中込 1価と5価です。変な言い方ですが、実際に使ってみればいったいどちらがいいのか決着がつくとみんな期待していたのです。ところが不思議なことに、両方のワクチンとも、ほぼ同じくらい効く。違いがわからないのです。先進国でやると、重症の下痢症に対して、つまり入院するような下痢症に対しては、95%ぐらいの有効性がある。少し軽いというか、外来を受診している人に対する有効性はどれぐらいかということ、85%ぐらいになる。それから、中所得国で野外試験をやると10%ぐらい落ちて、重症下痢症に対して85%くらい。ただ、アジアやアフリカにある最貧国の発展途上国になると、有効性は50～60%ぐらいに落ちてしまいます。

大野 それは、ロタウイルスと診断がついた中でというわけではなくて、重症下痢症の中でということですか。

中込 いや、全部、ロタウイルス下痢症に対する有効性です。ロタウイルスの重症下痢症です。

河島 前の年と比べてとか、そういうことですか。

中込 いや、ワクチンの無作為化対照試験とか、あるいは症例対照研究で有効性を計算します。

大野 飲ませているということは、コホートですか。

中込 臨床試験の場合にはコホートになります。飲ませたコホートと飲ませていないコホートを比べる。市販後調査の場合になると、下痢症になった人とならない人を比較するわけです。それぞれワクチンをどれぐらい飲んでいてかということで、その割合を調べて計算する。

大野 それで、ロタウイルスだと診断がつく。飲ませていないほうはこれだけの量に対して、飲ませたほうはそれがどれぐらい減っているかということですね。

中込 そうです。

大野 それはなぜ途上国の有効性が違うのですか。

宇田川 先進国と比べて何が違うのですか。

中込 いくつもその理由は考えられています。例えば生ワクチンというのは、働くためにはある一定量に増えなければいけない。そこが不活化ワクチンと違うところです。つまりある意味でワクチンと人間との共同作業である程度の量まで増やして、免疫ができあがっていく。ところが、例えば腸管に寄生虫が感染しているとか、細菌感染がある。途上国の子供たちの腸と先進国の子供たちの腸の内容というの

は、たぶん違うと思うのです。そういう腸内における競合のために、十分増えないということがあります。

それから、栄養失調、栄養状態が悪ければ、免疫もよくできないかもしれない。

大野 生ワクチンの保存が悪いということはないのですか。

中込 あります。生ワクチンのコールドチェーンということがあります。ただ、もちろんワクチンの臨床試験のときは、途上国であっても理想的な条件でやりますから問題は少ないはずです。

一方、実際に使われた状況でどうかということになれば、先生がおっしゃったように、途上国というのはほとんど熱帯地方のようなところが多い。たとえ熱帯地方ではなくても、ワクチンをきちっと貯蔵しているかどうかということで、いくらでも悪くなるというか、ワクチンの効果が落ちてくる原因というのはあると思います。

大石 ワクチンは先生のご専門だと思いますが、いわゆる食べるワクチンというのが、一時よく話に出たと思います。そのへんはどうですか。

中込 edible vaccine ですね。

大石 ええ、植物の中に入れたりする。

河島 バナナの遺伝子の中に組み込んで、それでワクチンにしてしまう。

河島 お米に入れるというのもありましたね。

大石 コールドチェーンとか、そういうものが必要ないという話がありましたね。

大野 そうですね。

宇田川 でも、今のところ食べるワクチンの研究は先に進んでいないようですね。ノロウイルスに関しても今の所ないようです。ロタウイルスも食べるワクチンはないですね。

大野 まだ全然そういう段階ではないと思います。それこそコレラ毒素を米に発現させてそれをマウスに食べさせたら、それに対してよい免疫が起きたというのが、論文に出ているという段階です。

中込 あればたぶん1つのワクチンを保存する方法というか、何というのかな。

大野 あればピークルですよね。

中込 ピークルですね。だから、それでご飯を作って食べるわけではなくて、それをすりつぶして、ごくわずかな量で、しかも安定に発現しているということで、冷凍も何も要らないという。

大野 おそらく錠剤とか、カプセルとかで飲むということを考えていると思います。ただ、お米のグレインというか、もともとその中の貯蔵粒のようなところにある蛋白質で、非常に安定で、長期間保存できて、飲んだ後に消化酵素で分解されにくいので、先ほどのコールドチェーンの話ではありませんが、注射の針も要らない。だから、2次感染というか、コンタミしない。飲む、貯蔵できるということで、お金もかからないし、iatrogenicな別の感染も起らないということが、売りですよ。

大石 進行中ですか。

大野 でも、昨年か一昨年にそのお米の論文が出たばかりですよ。

宇田川 ウイルスが増殖できないから、遺伝子組み換えにして作物の中にその遺伝子を入れてしまって、そこで蛋白を発現させて、それを食べさせようという話は、もう10年くらい前からあったことですよね。

中込 そういうものは、実際のスタートから実用化までというのは時間がかかりますよ。

大石 Dr. Estesはたしかジャガイモにノロウイルスを入れて、それをマウスに投与したら抗体のレスポンスが認められたという話がありましたね。もうだいぶ前ですよ。

宇田川 あれから先に進んでいないということは、やはりなかなか難しいのではないですか。作物というのは1回増えてそれをハーベストしてしまうと次の世代にいかないではないですか。そういうことも問題なのでしょう。

大野 でも、粘膜ワクチンのほうがいいことはいえると思うのですが、他にもそういう例があるのですか。今まではポリオしか効かなかったですよ。

中込 そうです。今のところは、経口的に飲むワクチンというか、口から入れるワクチンというのは、ポリオとロタウイルスだけです。

大野 ロタウイルスが実用化の2例目ということですね。

中込 はい。

河島 ということは、夢のような話ですが、ロタウイルスのワクチンにいろいろなものを組み込むということもできるわけですかね。

中込 reverse geneticsができていますからね。

河島 いまヒブワクチンなど、急にいろいろなワ

クチンが認可されていますよね。そうすると、6か月以下に、ものすごくいろいろなワクチン接種の予定が入る。ロタウイルスも入ってくる、場合によってはB型肝炎も入ってくる。このように多くのワクチンを行ってinterferenceは起きないのかと考えるのですが、起きていないということですか。

中込 起きていないかどうかというよりも、海外では同時接種です。それしか方法はないと思うのです。

宇田川 でも、先生が今、おっしゃったように、interferenceという問題は出てくるのではないですか。

中込 いちおうロタウイルスとポリオウイルスは、お互いに干渉しないという成績が出ています。

河島 でも、ヒブワクチンなどはアジュバントが入っていますよね。アジュバントですから、当然、人によると思いますが、一般的な免疫が上がってロタウイルスワクチンの効果が落ちるといえるのか、そういうことはないですか。

中込 これは大野先生のご専門で、私自身は免疫系がどれぐらいの数の抗原まで対応できるのか知りませんが、よく言われるのは、例えば種痘のワクシニアウイルスでいうと、あの抗原に対する抗体のことを考えれば、今のワクチンはみんな混ぜてもまだ少ないぐらいだと。だから、むしろ離して1週間おいたりというとその影響を受けるようですが、同時にやればよいのだということを聞いていますけれども。

河島 ああ、そういうことですか。

大野 よくわからないのですが、生体内でも干渉というのは本当に起きるのですか。たぶんvitroでそういう実験をやって、先生がおっしゃったように、例えば時間をおいたときにやったら起きなかったと。でも、もしvitroでやったら、1週間たっていると、そのクローンが増えているので、他のクローンはほとんどいないような状況ですよ。体自体も同時にいろんなものにさらされているわけですよ。

河島 普段もですね。

大野 普通の免疫系の予備力と考えたら、別に問題がないような気がします。

中込 ただ、その同時接種というのは、小児科の先生方はどうでしょうか。

河島 今は同時に百日咳とヒブワクチンの両方を打ちはじめています。

中込 そうしないともう無理ですね。生ワクチンは4週間空けなければいけませんね。不活化ワクチ

ンも2週間空けなければいけない。BCGも3カ月からですよ。予防接種法では、生まれた直後からでいいことになっていますが、現実的に接種されているのは3カ月です。そうすると、BCGをすると、1カ月間他のものはできないということになってしまいます。

宇田川 赤ちゃんに何種類ものワクチンを打つのはすごく大変そうですね。昔もそんなだったかしら。うちの子たちもそうだったかな？今は記憶の彼方になってしまいましたが（笑）。

IV. 腸管免疫との関連

河島 では、腸管免疫との関連と、それからウイルス性下痢症というのは、腸管免疫から考えると将来どのような感じなのか。そのあたりを大野先生にお話いただければと思います。

大野 ロタウイルスのワクチンは出来ているみたいですが、ノロウイルスはどうですか。ぼくはほとんど何も知らない状況なのです。

中込 ロタウイルスの免疫で一番わかっていないことは何かというと、何が効いているのかわからないということです。もう1つは、何を見たら免疫があるかどうか。その調べようがないのです。要するに correlate of protection がわからない。したがって、clinical trial をやらなければ結果がわからない。

河島 実際、腸内でのIgAですか。

中込 それはなかなか標準化も難しい、調べるのも大変ですよ。いちおうみんなリーズナブルだなと思うのは、腸管粘膜局所でのウイルス特異的なIgA抗体だろう。それが第一義的には一番重要なメディエーターにはなっているのだろうと想像しています。

大野 でも、糞便中にIgAは検出できないのですか。

中込 出てきます。糞便中から測ることはできますが、やはり血中の抗体と比べれば、より標準化とか何とか検査上の問題として大変ですよ。

大野 たしかに（反応を阻害する夾雑物が多いという意味で）汚いですし。

中込 便1g当たりどうか、あるいはトータルのIgAに対して特異的IgAがどれくらいとか。

大野 唾液はだめなのですか。唾液中にもIgAは

かなり出ますよね。

河島 インフルエンザでは、鼻汁中の特異的なIgAの論文がありますが。

中込 唾液中のIgAと例えば腸管でのIgAというのは、うまく関連するのでしょうか。

宇田川 同じものと考えていいのですか。

大野 同じものと考えていいのではないかと思います。でも、糞便よりは圧倒的にきれい（つまり夾雑物が少なく検査しやすいという意味）ですよ。母乳中にはすごく出ますよね。ものすごい量です。特に初乳には出ます。

中込 一応、血中のIgA抗体をよく使うのですが、血中に出てくるIgAは腸管とは違いますよね。

大野 なぜ血中にIgAがあるのか。漏れ出ているだけではないかという悪口を言う方もいらっしゃいますから。でも、もちろん骨髓中でもIgAは作られるので、それは当然、血中に出るのですが、いろいろなマウスの実験などだと、腸管の分泌が悪くなれば、血中にも出てきますよね。ヒトとマウスはまた違うではないですか。ヒトはIgAが2種類ありますよね。IgA1とIgA2がある。マウスは、ヒトというIgA2型しかない。ヒトで血中に主に見られるのはIgA1です。モノマーで、ダイマーではない。肝臓でのクリアランスがたぶん違うのです。腸管循環でportalから来ますが、肝臓でほとんどクリアランスされて、できなかったものが血中にどんどん出てくる。

宇田川 先生がおっしゃったように、便中に出てくるIgAを検出するということですね。

大野 どれくらいコリレートするというのが本当にきっちり調べられていないのかもしれませんが、唾液中と平衡するのであれば、唾液中のものでもいいのではないかと思います。

宇田川 でも、先生がおっしゃったように、マウスで実験したところで、ヒトとは違うわけですよ。

大野 違うかもしれないですね。

宇田川 かもしれないというところがあると、やはりヒトの材料を取って、フォローアップスタディをやらなければならないということですかね。

大野 先ほどの糞便中には必ずIgAがあるというのは、過去に感染しているからということですよ。

直接これと関係ないのですが、マウスのノロウイルスというのがありますね。マウスのノロウイルス

は培養もできる。それがどれぐらいヒトと平衡するのかわかりませんが、先ほど先生がおっしゃっていた慢性炎症、クローンがあります。クローン病の例で、今年の6月の『Cell』に論文が掲載されていました^{*18}。

クローン病も宿主側の因子がいくつかあって、例えばNod2とか、Atg16L1があります。これはautophagyといって、自分の細胞の中で不要になったものを壊すために、例えば古くなったミトコンドリアとか、あるいは細胞の中で古くなったようなものを取り込んで、リソゾームとくっついて分解してアミノ酸などにしてリユースする。もともとは培養細胞が飢餓状態になると、つまり外から培地をあまり与えないと、自分の中で要らないものを自己消化するというのがautophagyです。

実際に最近では、例えば溶連菌の感染症とか、あるいは肝炎ウイルス、あるいは変性性の脳疾患などでその変性物を分解するのも、autophagyです。autophagyを異常にさせるとそういう病気になる。そういうものの1つとして、autophagyはいろいろな遺伝子がカスケードに働くのですが、この遺伝子にpoint mutationがあると、実際にそういうpolymorphismがあるような患者さんは、クローンとの相関があります。ただ、欧米では半分ぐらいの人にこのAtg16L1のmutationがある。mutationと言っではいけないか。mutationというのは1%以下ですよ。

河島 polymorphismですね。

大野 SNPsです。しかし、実際に発症する方はそんなに多くない。このSNPがあると、パネート細胞からの抗菌物質の分泌がおかしくなるということは、マウスでわかっていたんですが、マウスを非常にきれいな環境に置いておくと、そういうことがない。しかし、普通のところに置いておくとマウスが発症するというので、その違いはノロウイルスがいるかないかということがわかりました。

しかも、マウスのノロウイルスにCR6とCW3という株がありますが、CR6というのは長くいつまでも排除されない。つまりずっとpersistentな株である。

宇田川 腸管の細胞の中にpersistにしているということですか。

大野 いや、糞便中にいる。

宇田川 糞便中に出てくるということは、どこか

で感染しているということですね。

大野 そうですね。もちろん腸管に感染している。

宇田川 そこで長く増殖しているということですね。

大野 そうです。ずっと増殖して、感染しているのだと思います。

CW3のほうは、下痢もそんなに起こさないし、1週間ぐらいたつとウイルスは糞便中に検出できなくなるようなものです。その株があった場合には、mutationとその株が一緒になってもノーマルです。しかし、ずっと感染しつづける慢性感染のノロウイルスがいた場合には、それとこのmutationが重なると、クローン病になる。

大石 そういうことですか。

大野 これはもちろんマウスですが、ウイルス性下痢症の原因ウイルスは、もしこういう患者さん側のmutationというか、遺伝的な背景と重なった場合には、クローン病のようなものを発症というか、two hitのような感じで、一緒になったときだけそういうものが出る。そういう論文があります。『Cell』に出たぐらいなので、かなりインパクトが高いと思います。

宇田川 おもしろいですね。

大石 結局ウイルスだけではないわけですね。ウイルスの病原性だけではなくて、いろいろなファクターが重なっている。

大野 ただし、抗生物質をやると抑えられるので、このウイルスがいたら、抗菌物質が出にくいというパネート細胞の異常が出るので、それによってその次の段階としては、腸内細菌が抑えられにくくなって、それが例えばたまたまtranslocationしてしまうとか、そういうことを引き金にするのではないかな。

もともとクローン病とか、こういう慢性の炎症性腸疾患というのは、腸内細菌との因果関係が言われていて、無菌マウスにするとか、抗生物質をやると軽くなる。患者さんでも抗生物質をやると、症状が緩和されるような患者さんがいらっしゃいますよね。ですから、菌も重要で、この場合にもおそらく腸内細菌も関与しているだろうと考えられています。

中込 その抗菌物質というのは、例えばディフェンシンのようなものですか。

大野 そうです。

中込 それはパネート細胞から分泌されるのですか。

*18 Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, et al.: Cell 141 : 1135-1145, 2010.

大野 小腸ではそうです。でも、大腸にはパネート細胞がないので、大腸は大腸上皮が違う種類の抗菌物質を出しています。抗菌物質も何種類もあります。ディフェンシンも α タイプと β タイプがあります。

中込 α が構成的作られるのですでしたか。

大野 そうです。 α がパネート細胞から出ているほうで、 β は好中球や上皮細胞が出しますよね。でも、パネート細胞を取ってきて、ウイルスのPCRをやると、たしかそこではディテクションできないので、パネート細胞ではないと書いてあったような気がします。ほくもぎっと一回読んだだけなのですが。

中込 このへんはstem cellがあるところですよね。

大野 そうです。クリプトの内腔というのは、例えばFISHをやっても菌はほとんどいないのです。菌はだいたい上のほうにしかいないので。ここはstem cellがいると考えられていて、ここがやられてしまうと逆に病気になるのではないかと。このあたりは、上のほうと違ってtight junctionもあまりしっかりしていないのではないかとというようなことも言われています。ですから、そこに菌が来てしまうと、もちろんtight junctionのような隙間から入るかどうかわかりませんが、そういうtranslocationが起きやすくなるような一因にはなるのではないかと。

中込 逆に言うと、パルボウイルスはそういう分裂細胞でしか増えないのです。それで、こういうところに感染する。だから、stem cellがやられてしまうので、ネコなどは重症な下痢症になってしまう。ヒトのロタウイルスも、おそらくノロウイルスもそうですが、十分に分化した細胞のみに感染する。

大石 organ cultureで成功したとしても、このような組織細胞では増えない可能性があると思うのですが。

中込 増えないと思います。ノロウイルスもロタウイルスも増えない。

大野 でも、クリプトをcultureして、そこにファクターをいくつか入れて、たぶん3D (culture) だと思いますが、そうするとすべての細胞がそこから出てくるといようなことは、論文では言われています。日本でもやっている人がいらっしゃると思います。

宇田川 3Dということは、タンク培養でしょうか。

大野 いや、寒天というか、ゼラチンのようなもので3D cultureすると、きちっと上に伸びていって、

enterocyteやgobletが出てくるということです。

大石 それでノロウイルスが増えたというデータがありますが、どうもはっきりしない。

中込 それは3Dのような立体的なcultureですね。

大石 そうです。

大野 それは何年ぐらい前ですか。

中込 2年ぐらいだと思います。

中込 『Emerging Infectious Diseases』に出しました^{*19}。

宇田川 そう、スペインのグループでしょう。

大石 その通りです。

宇田川 スペインのグループが3次元培養でうまくいったと論文を出していました。

中込 ちょっと追試できないという。

大野 ずっとtranscription factorなどをやって、腸管上皮がどうやって分化してくるかということをやっているグループがオランダにありますが、その人たちが去年か一昨年の終わりごろに『Nature』^{*20}に出した論文があります。それは、クリプトを取ってきて、分化させるために必要なファクターを加えてやっているのです。first authorの方は慶應の内科の方です。たぶん、もう日本に帰っていらっしゃると思います。そういう系を使って、そこにかければ培養もできるかもしれないですね。

中込 免疫というか、新しいワクチンの考え方として、例えばGP2によくくっつくようなことをやると、免疫原性は高くなるのでしょうか。

大野 そうです。少なくとも適切なアジュバントのようなものと一緒にやれば高くなると期待して、ほくもこれで経口ワクチンのターゲットとして使えないかということを考えて、今、マウスレベルでやっています。ただ、パイエル板は経口免疫寛容の場所でもあるのです。ですから、入ってくる抗原側が、免疫原性が強いのか、それとも普通の単なるOVA、卵白アルブミンのような害がないようなもの、免疫原性の高くないようなものなのか。それによって寛容に行くのか。寛容といっても、全身の寛容であって、IgAはできますよね。IgAはできるけれどもIgGができないという免疫寛容です。

そういう両方をやっていて、単にくっついて入っているたけなので、当然、細胞自身は何も考えられない。

*19 Stranb TM, et al.: Emerg. Infect. Dis. 13: 396-403, 2007.

*20 Sato T, et al.: Nature 459: 262-265, 2009.

中込 GP2というのは何とでもくつつくというのは、レセプターなのですか。

大野 そうです。

中込 特異性はないのですか。

大野 いえ、もともとはGPIアンカー型の蛋白質で、ほくらが試した中では、大腸菌、サルモネラ菌にはつきますが、緑膿菌、リステリア、エルシニアにはつかない。vitroでやってもつかない。ノックアウトマウスにエルシニア菌を経口投与しても、ちゃんと入っていきます。エルシニア菌もM細胞から入っていくと報告されています。ですから、M細胞上にはいろいろな蛋白質が出ていて、エルシニア菌は別の蛋白とくつつくから、GP2ノックアウトマウスでもちゃんと入っていく。

宇田川 例えばウイルスのほうに、GP2にうまくコンバインできるような蛋白を発現させれば、入りやすくなるということですか。

中込 そう思います。

大野 はい。ですから、例えばロタウイルスとかノロウイルスがM細胞には指向性がなくて、普通の上皮のほうによりアフィニティがあって、そちらに感染するのだとしても、それをモディファイしてやれば、そういうことも起きると思います。

中込 レオウイルスは指向性があるのでしょうか。M細胞にくっついていきますよね。

大野 ええ、そうです。レオウイルスは、例えば $\sigma 1$ のリボソームを作ると、M細胞に行くという論文が出ているのです。M細胞上で相手が何かという論文はないかもしれませんが、JAM-A (junctional adhesion molecule-A) というのが $\sigma 1$ のレセプターだという論文が出ています。

中込 電顕の写真をずいぶん前に見たことがあります。M細胞のところにレオウイルスの粒子がいっぱいくっついていてのです。

大野 ただ、M細胞はラテックスビーズのようなものもかなり取り込むので、無差別にもともとそういうphagocytosisやendocytosisがさかんな細胞だと言われています。ただ、何もしていないビーズと、例えば $\sigma 1$ のようなM細胞により付きやすいビーズでやった場合には、100倍ぐらい違う。その100倍というのは、たまたまその分子、つまり $\sigma 1$ の場合にそうだということかもしれませんが、そう

いうことは総説に前から書かれています。

宇田川 そうすると、例えばウイルスのVLPなどで、周りにコーティングしてやってそれを入れてやれば入る可能性もあるわけですね。

大野 そうですね。

中込 生ワクチンというのはやはり常に副反応の問題とか、一緒にコンタミしているウイルスの問題とかが避けられません。生産の途中で不活化すると本体のワクチン株も死んでしまうので、不活化の処理をできないわけです。そういう意味で常に危険が伴うので、次世代の新しいワクチンが期待されています。

大野 生でないとか効かないのですか。

宇田川 いや、効かなくはないのかもしれませんが、不活化だと抗体レスポンスも悪いし、持たないといわれています。

河島 何度も回数をやらなければいけない。

中込 コストだけを考えても大変です。

宇田川 そう、4回打たなければならないとか、1回飲んですむものを4回、5回と注射しなければいけないということです。

大野 でも、それがもし効率よくスペシフィックに免疫系を賦活化することかできれば、その4回のところをもっと少なくできるということも可能性はあるということですね。

中込 だから、外で増やしておいて、それを不活化してヒトにやるわけですね。それに対して生ワクチンというのは、シードを入れてやって、後でおなかで増やすわけですから。

大野 量が少なくてすむ。

中込 少なくてすみます。それだけを考えても大きな違いがあります。ただ、ちゃんと増えてくれるかどうかはわからない。

河島 まだまだ話し足りないところもあるかと思いますが、ウイルス性下痢症の分野のスタート時の黎明期の話から将来まで、また、腸管免疫では夢のあるような話を聞かせていただき、非常に楽しい座談会でした。皆様のご協力に感謝いたします。私自身、楽しませていただきました。長時間にわたりまして、ありがとうございました。皆様方のご活躍をお祈りしまして、終わりにしたいと思います。