

## 2. ピコビルナウイルス

谷口 孝喜, 和久田 光毅

藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座

ピコビルナウイルスとは、小さなビルナウイルスとして名付けられた、まだ未分類のウイルスである。ビルナウイルスと同様に、2分節の2本鎖RNAをゲノムとして有するが、その性状は互いに大きく異なる。ピコビルナウイルスは、主として、胃腸炎患者の便から、そして、さまざまな哺乳動物、鳥類の便からも検出されているが、その病原性は明確ではない。いずれのピコビルナウイルスも、培養細胞で増殖できず、また実験動物での感染実験系もなく、このウイルスに関する情報はきわめて少ない。遺伝子解析もあまり進んでいなかったが、最近、ヒト由来のピコビルナウイルスの2分節のRNAの全塩基配列が明らかになった。

### はじめに

ピコビルナウイルスは、1988年に、ヒトおよびラットの便から初めて検出された<sup>30,31)</sup>。その後、ヒト<sup>2,4,8,9,13-15,17,23,27,30,33,34)</sup>以外に、ブタ<sup>6,12,25,32)</sup>、モルモット<sup>29)</sup>、ウサギ<sup>11,16,24)</sup>、ハムスター<sup>5)</sup>、アライグマ<sup>18)</sup>、ウマ<sup>3)</sup>、ウシ<sup>5)</sup>などさまざまな哺乳動物およびニワトリ<sup>1,5)</sup>で検出されているが、得られている情報は断片的である。解説をするには、いささか情報不足で、やや時期尚早の感はあるが、最近決定されたヒト由来ピコビルナウイルスの2分節RNAの全塩基配列の情報を中心に、これまでに明らかにされた性状などをまとめてみたい。

### 1. 粒子

直径約30-40 nmの小型の球形粒子である。エンベロープはなく、塩化セシウム中での浮上密度は、1.38-1.40 g/mlである。便中でのウイルス排泄量も少なく、培養細胞での増殖もできず、また、実験動物での増殖も明らかでない。得られる粒子が少ないため、電子顕微鏡による観察も不十分である。表面構造は明瞭ではなく、一見ピコビルナウイルス様である。

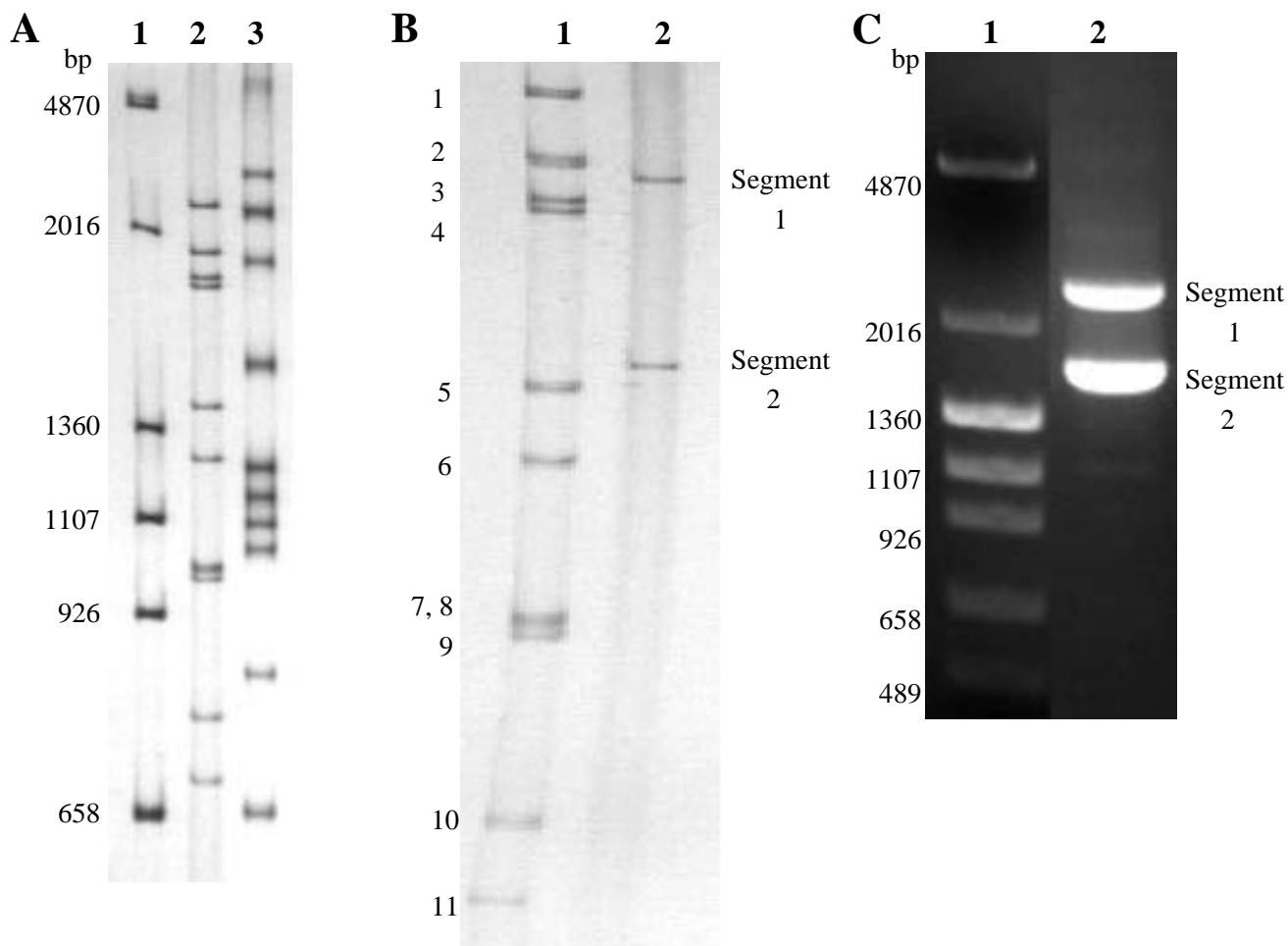
### 連絡先

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98  
藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座  
TEL : 0562-93-2467  
FAX : 0562-93-4008  
E-mail : kokitani@fujita-hu.ac.jp

### 2. ゲノム

ピコビルナウイルスの最大の特徴は、ゲノムが2分節の2本鎖RNAから構成されることである(図1B)。このウイルスの発見の経緯は、下痢便からロタウイルスを検出するために、便から抽出したRNAをポリアクリルアミド電気泳動(polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)で解析を行っている際、11本のロタウイルスゲノムのRNAパターンに対して2本のバンドを検出したことによる(大きい分節RNAをセグメント1、小さい方の分節RNAをセグメント2と呼ぶことにする)。2本のRNAバンドの移動度はさまざまであるが、ロタウイルスRNAの2番目のRNAバンド(約2,700塩基対)と5番目のRNAバンド(約1,600塩基対)の間に収まる。2本鎖RNAは、塩基対数が同じでも、塩基配列の違いによる高次構造の違いで、PAGEでの移動度はかなり異なってしまうことはあるものの、株により、2本のバンドの移動度はかなり異なり、多様性は大きいと思われる。

われわれは、Lambdenら<sup>21)</sup>により、C群ロタウイルスの塩基配列を決定する際に開発された、単一プライマー増幅法を応用し、タイで検出したHy005102株から、セグメント1およびセグメント2の全長cDNAを調製し全塩基配列を決定した<sup>34)</sup>。図1Aは、サルロタウイルスSA11株を用いて、単一プライマー増幅法の有用性を確認したものである。11本の分節RNAに対応したcDNAが増幅されている。この方法をピコビルナウイルスに適用した結果を図1Cに示す。アガロースゲルから、各DNAバンドを抽出し、TAクローニングし、塩基配列を決定した。



**図 1**  
 ヒトピコビルナウイルスのポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) におけるパターンと、単一プライマー増幅法による完全長 cDNA の調製 (文献 34)  
 A) サルロタウイルス SA11 株由来 RNA の PAGE におけるパターン(レーン 2)と単一プライマー増幅法により調製した cDNA の PAGE におけるパターン (レーン 3). レーン 1 は DNA サイズマーカー.  
 B) ヒトピコビルナウイルスのポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) におけるパターン (レーン 2). レーン 1 はサルロタウイルス SA11 株由来 RNA の PAGE におけるパターン.  
 C) 単一プライマー増幅法による、ヒトピコビルナウイルス Hy005102 株 2 分節 dsRNA の 2 本の完全長 cDNA のアガロースゲルでの泳動パターン (レーン 2). レーン 1 は DNA サイズマーカー.

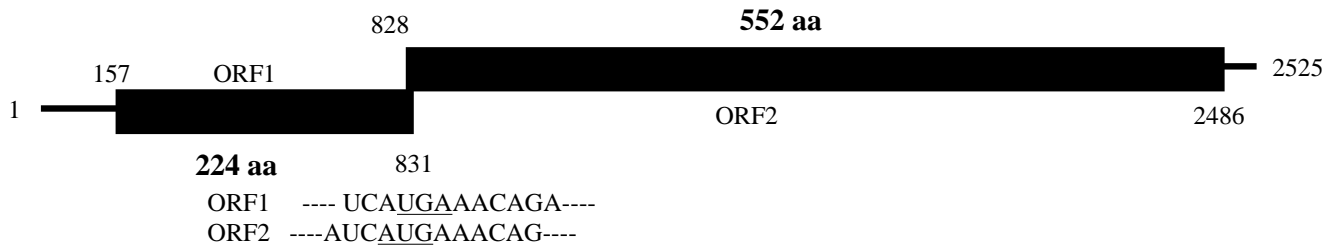
### (1) セグメント 1

PAGE における移動度から推定して、2.2 ~ 2.5kbp の長さである。これまで、最も長い塩基配列が決定されたのは、米国アトランタの HIV 陽性患者由来の 3-GA-91 株で、PAGE での移動度から約 2,500 塩基であると推測されたが、そのうち 1,572 塩基が決定されていた<sup>33)</sup>。タイの Hy005102 株では、初めて全長の cDNA が調製され、2,525 塩基あることが判明した。全体の GC 含量は、45.8% であるが、5' 非翻訳領域は AU リッチ (GC 含量: 36.5%) であった。3' 非翻訳領域にポリ A シグナルはない。図 2 に示す通り、2 つの ORF : ORF1 および ORF2 からなり、それぞれ、224

アミノ酸 (24.9kDa) および 552 アミノ酸 (62kDa) をコードする。ORF1 は塩基 No.829-831 に終止コドンが、ORF2 は塩基 No.828-830 に開始コドンがあり、塩基 No.829 と 830 がオーバーラップしている。現在のところ、この部位で、-1 のフレームシフトが起きている可能性は否定できない。ORF1 の 62kDa タンパク質は、アルギニン、リジン-リッチの 50 アミノ酸を含む高度に親水性の N 末端を有し、それ以外の領域は疎水性である。これまでに塩基配列の決定されている株との比較では、上述の 3-GA-91 株との相同性は 49.7% と低値であった。

ウサギ由来のピコビルナウイルス (35227/89 株) は、2,362 塩基で、ORF1, ORF2, および ORF3 からなり、それ

## Segment 1



## Segment 2

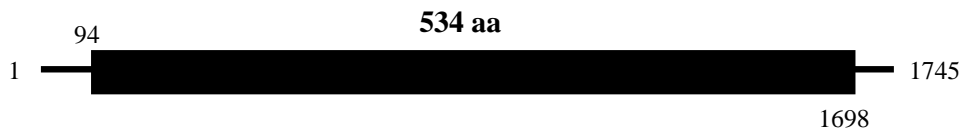


図 2

ヒトピコビルナウイルス Hy005102 株の 2 本の RNA : セグメント 1 とセグメント 2 の構造 (文献 34). セグメント 1 においては, ORF1 の終止コドン(UGA)と ORF2 の開始コドン (AUG) が一部重なっている.

ぞれ, 591 アミノ酸 (65.8kDa, pI 5.69), 155 アミノ酸 (11.9kDa, pI 5.44), および 55 アミノ酸 (6kDa, pI 8.5) をコードする. シュードノットなどの二次構造はないが, 塩基 No.215-366 と塩基 No.369-381 にダイレクトリピートがあり, 2 つのフレームシフトを起こしている<sup>16)</sup>. Hy005102 株との相同性は 46.2% であった.

セグメント 1 は, キャプシドタンパク質をコードしていると思われるが, EMBL, GenBank のデータベースで有意な相同性を示すものはない. また, 十分量のウイルス粒子を調製することが不可能なことから, 直接, ウイルス蛋白質を検出した報告はない. ただ, 私信 (Juan Ludert, ベネズエラ) によると, ブタ由来のピコビルナウイルスの濃縮材料の SDS-PAGE では, 58-60kDa の主要なバンドが捉えられている. Hy005102 株の ORF2 に対応すると考えられる. Hy005102 株のセグメント 1cDNA を用いた *in vitro* の転写/翻訳系で, 25kDa のタンパク質合成は検出できたが, 62kDa のタンパク質合成は確認できていない. 開始コドンの活性が低い事によると思われる.

### (2) セグメント 2

これまで検出されたピコビルナウイルスの RNA セグメント 2 の PAGE での移動度からは, 1.6 ~ 1.95kbp と予想される. タイの Hy005102 株は, 1,745 塩基対であった. 5' 末端の 5 塩基 GUAAA は, セグメント 1 と共通であった. 534 アミノ酸 (60kDa に相当) をコードし, *in vitro* の転写/翻訳系でも, 確かに 60kDa のタンパク質の合成を確認

した. これまでに, 米国株 4-GA-91 と中国株 1-CHN-97 の塩基配列が決定されている (末端配列は不明確のまま). 4-GA-91 は, 1,674bp で 517 アミノ酸 (59.6kDa) を, 1-CHN-97 株は, 1,696bp で 530 アミノ酸 (60.3 kDa) をコードしており, 5'非翻訳領域は AU リッチで, AU 含量はそれぞれ 82.9%, 74.1% であった. セグメント 2 は RNA 依存 RNA ポリメラーゼをコードしており, RNA 依存 RNA ポリメラーゼの 3 つのモチーフが保存されている. 現在, 部分的ではあるがセグメント 2 の塩基配列情報が蓄積されており, Genogroup I : 1-CHN-97-様株 と Genogroup II : 4-GA-91-様株に分類されている. セグメント 2 のごく一部 (168 塩基) の配列の比較では, Hy005102 株は, 米国株 207-FL-97 ともっとも関連していた (97.6% ; 図 3).

## 4. 病原性

病原性については, 報告により違いがあり論議がある. Pereira ら<sup>30)</sup> が胃腸炎の集団発生の 20% に検出している. Cascio ら<sup>4)</sup> も, 胃腸炎の患者便から 0.4% (3/690) でピコビルナウイルスを検出し, 胃腸炎症状のない患者便からは, 0% (0/92) であった. ピコビルナウイルスの検出は, 概して, 乳児には少なく, 老人, 成人に多いようである. Gatti ら<sup>12)</sup> によると, ブタにおいて, 胃腸炎を呈したブタで 15.3% の検出率に対し, 非胃腸炎のブタでは 9.6% の検出率であった. 一方, Gallimore ら<sup>9)</sup> は下痢を有する者に 9%, 下痢を有さない患者に 13% 検出している. Ludert ら<sup>24)</sup> は, ウサギにおいて, 下痢を有する, 有さないで差がなく

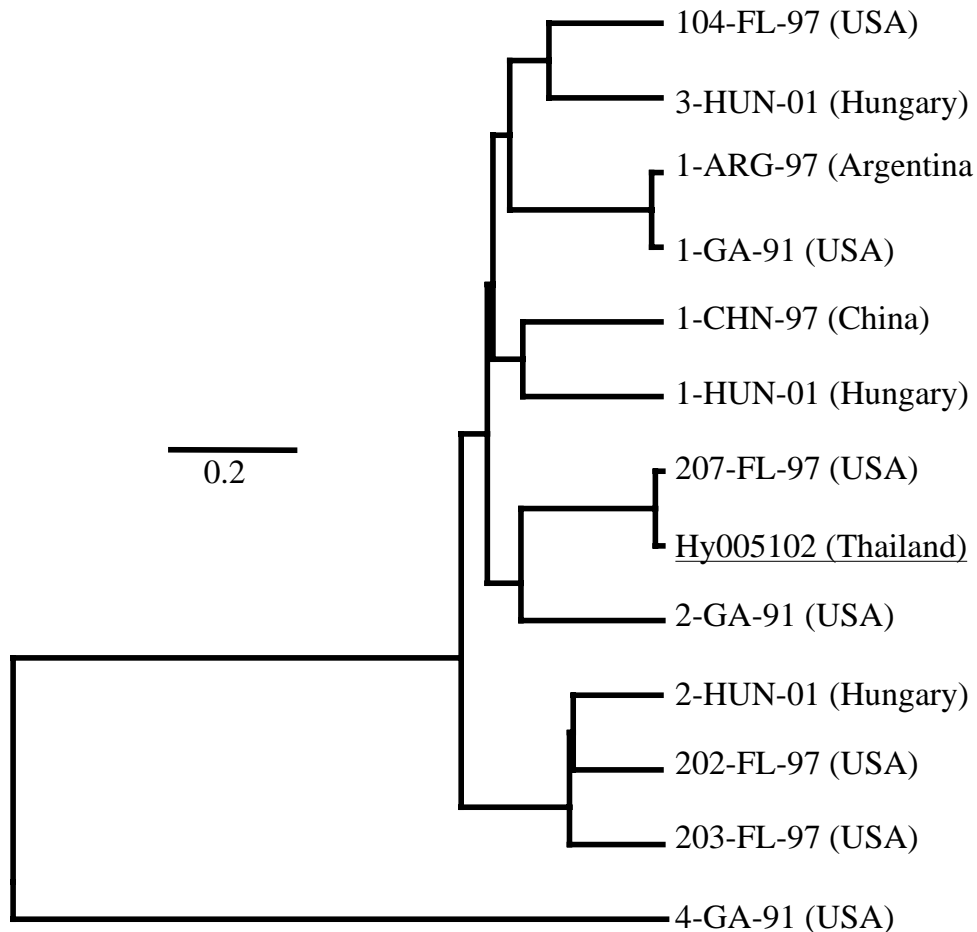


図 3

ヒトピコビルナウイルスのセグメント 2 の部分塩基配列 (168 塩基; HY005102 株の塩基 No.714-881 に対応) の系統関係 (文献 34)。

同率の検出率であった。

ピコビルナウイルスは、骨髄移植後<sup>7)</sup> や、HIV 感染者の胃腸炎で観察されることが多い<sup>8, 13-15, 17, 23)</sup>。そもそも HIV 感染者においては、急性、慢性の下痢が高頻度にみられ、AIDS 患者では、開発国では 60%、開発途上国では 90% にみられる。HIV 自身も下痢を起こすし、原虫、非定型 Mycobacteria、サイトメガロウイルスが下痢と関与している。Grohmann ら<sup>17)</sup> は、HIV 感染者で、下痢を有する場合で 9%、下痢を有さない場合で 2% にピコビルナウイルスを検出し、アストロウイルスに次いで多かった。Giordano ら<sup>13, 14)</sup> は、HIV 感染者で、下痢で 14.6%、下痢なしで 0% であった。一方、Gonzalez ら<sup>15)</sup> は、ベネズエラでの HIV 感染者に下痢の有無に関わらず、2.3% の検出率であったと報告している。また、ピコビルナウイルス陽性のサンプルで、同時にノロウイルスも検出されている場合がある。これは、同じく下痢便から低率で検出されるが、まだ下痢症ウイルスとしての地位が確立しているとは言えないアイチウイルスに類似している。

こうして、ヒトピコビルナウイルスが胃腸炎と関連があることは示唆されるが、病原性が確立されているとは言えない。さまざまな検出率の違いがみられるには、いくつかの事情がある。多くの調査では、PAGE のみでの調査しかなされていない。一般に便中に少量しか含まれていないため、感度が低い方法では、RNA の抽出方法で結果が変動し、精確な情報が得られない。調査対象の年齢分布も異なるなどが関係していると思われる。

#### おわりに

この解説を読んでいただいて明白であるように、ピコビルナウイルスについては、まだまだ情報が十分ではない。今後、遺伝情報の蓄積により、より感度の高い RT-PCR の開発によって、より多くのピコビルナウイルスが検出され、その性状が明らかにされてくるであろう。また、われわれの調製した完全長 cDNA を利用して、発現キャプシド蛋白 (中空粒子の構築も含めて) を調製し、抗血清の調製、単クローン抗体の調製を通して、さらに研究を進めていきたい。

特に、ピコビルナウイルスのヒトにおける浸淫状況，世界的な分布を大規模に調査する必要がある。また，2本鎖RNAウイルスの進化を考える上で，有益な情報が得られるかも知れない。そして，近い将来，恥ずかしくない量と質のデータをお示しできればと思っている。

なお，ここでは触れなかったが，原虫であるクリプトスポリジウムに寄生する非定型ピコビルナウイルスが存在する。遺伝子情報からは，ヒトを含めた動物由来のピコビルナウイルスとは，かなり性状を異にする。こちらについては，文献<sup>10, 16, 19, 20</sup>を参照していただきたい。また，粒子形態は類似しているが，ゲノムが3分節のdsRNA (2.9, 2.4および0.9kbp)から構成される，いわゆるトリルナウイルスも存在する<sup>22, 26</sup>。さらに，分類が確立しているビルナウイルスについては，大嶋ら<sup>28</sup>による本誌でのマリンビルナウイルスの詳細な解説があるので，そちらを参照していただきたい。

## 文 献

- 1) Alfieri AF, Alfieri A, Resende JS, Resende M: A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces. *Arq Bras Med Vet Zootec* 40: 437-440, 1988.
- 2) Banyai K, Jakab F, Reuter G, Bene J, Uj M, Melegh B, Szucs G: Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch Virol* 148: 2281-2291, 2003.
- 3) Browning GF, Chalmers RM, Snodgrass DR, Batt RM, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J: The prevalence of the enteric pathogens in diarrheic Thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Vet J* 23: 405-409, 1991.
- 4) Casio A, Bosco M, Vizzi E, Giammanco A, Ferraro D, Arista S.: Identification of picobirnavirus from feces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur J Epidemiol* 12: 545-547, 1996.
- 5) Chandra R: Picornavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. *Acta Virol* 41: 59-62, 1997.
- 6) Chasey D: Porcine picobirnavirus in UK? *Vet Rec* 126: 465, 1990.
- 7) Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, Meyer WG, Mori M, Tarr PI, Oshiro LS et al: Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 107: 1398-1407, 1994.
- 8) Cunliffe NA, Glass RI: Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Lancet* 348: 1037, 1996.
- 9) Gallimore CI, Appleton H, Lewis D, Green J, Brown DWG: Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. *J Med Virol* 45: 135-140, 1995.
- 10) Gallimore CI, Green J, Casemore DP, Brown DW: Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Arch. Virol.* 140: 1275-1278, 1995.
- 11) Gallimore C, Lewis D, Brown D: Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Arch Virol* 133: 63-73, 1993.
- 12) Gatti MSV, De Castro AFP, Ferraz MMG: Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Res Vet Sci* 47: 397-398, 1989.
- 13) Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D, Espul C, Martinez N, Isa MB, Depetris AR, Medeot SI, Nates SV: Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 15: 1427-1432, 1999.
- 14) Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D, Guinard S, Naretto E, Casero R, Yacci MR, Depetris AR, Medeot SI, Nates SV: Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18: 380-183, 1998.
- 15) Gonzalez GG, Pujol FH, Liprandi F, Deibis L, Ludert JE: Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J Med Virol* 55: 288-292, 1998.
- 16) Green J, Gallimore CI, Clewley JP, Brown DWG: Genomic characterization of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. *Arch Virol* 144: 2457-2465, 1999.
- 17) Grohmann, GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, Bryan RT: Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med* 329: 14-20, 1993..
- 18) Haga, IR, Martins SS, Hosomi ST, Vicentini F, Tanaka H, Gatti MS: Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in faeces of giant anteaters. *Vet J* 158: 234-236, 1999.
- 19) Khramtsov, NV, Woods KM, Nesterenko MV, Dykstra CC, Upton SJ: Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Mol Microbiol* 36: 289-300, 1997.
- 20) Khramtsov NV, Chung PA, Dykstra CC, Griffiths JK, Morgan UM, Arrowood MJ, Upton SJ: Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 86: 275-282, 2000.
- 21) Lambden, PR, Cooke SJ, Caul EO, Clarke IN: Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol* 66: 1817-1822, 1992.
- 22) Leite JPG, Monteiro SP, Fialho AM, Pereira HG: A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. *Virus Res*. 16: 119-126, 1990.
- 23) Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE: Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* 38: 2873-2877, 2000.
- 24) Ludert JE, Abdul-Latif L, Liprandi A, Liprandi F: Identification of picobirnavirus, viruses with biseg-

- mented double stranded RNA, in rabbit faeces. Res Vet Sci 59: 222-225, 1995.
- 25) Ludert JE, Hidalgo M, Gil F, Liprandi F: Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. Arch Virol 117: 97-107, 1991.
- 26) Ludert JE, Liprandi F: Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. Res Virol 144: 219-224, 1993.
- 27) 大嶋俊一郎, 今城雅之, 平山健史: マリンビルナウイロスの培養細胞における感染機構. ウイルス 55: 133-144, 2005.
- 28) Martinez, LC Giordano MO, Isa MB, Alvarado LF, Pavan JV, Rinaldi D, Nates SV: Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picornavirus. Intervirology 46: 207-213, 2003.
- 29) Pereira HG, De Araujo HP, Fialho AM, De Castro L, Monteiro SP: A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 137-140, 1989.
- 30) Pereira, HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JMS, Andrade ZP: Novel viruses in human faeces. Lancet 2: 103-104, 1988a.
- 31) Pereira HG, Flewett TH, Candeias JA, Barth OM: A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. J Gen Virol 69: 49-54, 1988b.
- 32) Pongsuwanna Y, Taniguchi K, Chiwakul M, Urasawa T, Wakasugi F, Javayasu C, Urasawa S: Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of G10 porcine rotavirus. J Clin Microbiol 34: 1050-1057, 1996.
- 33) Rosen BI, Fang Z-Y, Glass RI, Monroe SS: Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. Virology 277: 316-329, 2000.
- 34) Wakuda M, Pongsuwanna Y, Taniguchi K: Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. J Virol Methods 126: 165-169, 2005.

## Picobirnavirus

**Koki TANIGUCHI, Mitsutaka WAKUDA**

Department of Virology and Parasitology, School of Medicine, Fujita Health University,  
Dengakuga-kubo, Kutsukake 1-98, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

Picobirnavirus is named after the small birnavirus which contains two double-stranded RNA segments as a genome. However, their properties are quite different to each other. Although the virus has been detected mainly from the stools of gastroenteritis patients and several mammals and birds, the pathogenicity of the virus has not been established. Characterizations of the virus are hampered due to the lack in the system for multiplication of the virus in cultured cells or experimental animals. Recently, complete nucleotide sequences of two RNA segments of a human picobirnavirus detected in Thailand were determined.