

厚生省

平成10年度

厚生省科学研究費補助金  
新興再興感染症研究事業

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標  
および疫学に関する研究

研究報告書

主任研究者 武田直和

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部室長

研究要旨

Genogroup I、Genogroup IIおよびGenogroup IIIに特異的と思われる領域を同定し、SRSV遺伝子増幅用プライマーを設計した。RNA抽出法の検討した結果、糞便検体に関しては方法間で大きな差は無いこと、カキ検体に関してはHot Phenol法が最も抽出効率において優れていることがわかった。患者糞便、食品および海水からの遺伝子検出を行い、食品を介して感染した例を捕らえたこと、健常人の糞便からSRSV遺伝子が検出されること、プローブ型別検出頻度がことなること、わが国におけるSRSVは遺伝学的に多様であることが明らかになった。Genogroup Iの3株、Genogroup IIの5株の計8株でウイルス様中空粒子を作製した。各々の中空粒子に対する高力価免疫血清を作製し、これらのSRSV間の血清学的近縁関係を明らかにした。抗原検出ELISAを開発し集団食中毒患者の糞便検体について抗原検出を行い、電子顕微鏡法およびPCR法による検出率と比較した結果、ELISA法がSRSV検査の迅速診断法として有用であることが示された。アストロウイルス迅速検出のためラテックス凝集法を開発した。海水および汽水についてSRSV分布を調査した。また、F特異大腸菌ファージの持つ衛生評価指標としての特性を、現況の微生物指標と比較検討を行った。多くのSRSVの共通抗原決定基を認識する単クローン抗体の作製を試みた。その抗体を用いてELISA法を開発した。G3以外に、G1、G4、G8、G9、G12のヒトロタウイルスも経口投与により乳のみマウスに下痢を誘発することを見出した。

分担研究者

牛島廣治 東京大学医学部 教授  
田中智之 和歌山県立医科大学医学部 助教授  
谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部 教授  
大垣眞一郎 東京大学工学系研究科 教授  
柴 賢司 愛知県衛生研究所 課長  
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所 研究員  
斎藤博之 秋田県衛生科学研究所 技師  
石川 幸 広島県保健環境センター 所長  
篠崎邦子 千葉県衛生研究所 研究員  
大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所 室長  
巽 正志 国立感染症研究所 主任研究官  
名取克郎 国立感染症研究所 主任研究官  
西尾 治 国立公衆衛生院 室長

A. 研究目的

ウイルスが原因と思われる集団食中毒様急性胃腸炎は毎年全国的に発生している。これら食中毒に関する情報については、食中毒事件の原因物質としてSRSVが位置づけられたことから、食中毒統計の中

で情報を収集できる体制が整った。また近年SRSVの遺伝子情報が蓄積されるにおよび、原因不明の大部分が実はSRSVによるものであること、予想に反しSRSVには多数の血清型が存在していることも明らかとなった。事件発生時には原因食品からSRSVを迅速かつ感度良く検出して原因食品を特定し、迅速に対策を講じる必要があるが、ウイルス量が極めて微量であるためこれまで標準法とされてきた電子顕微鏡法が使えない。本研究では食品中のSRSV遺伝子を検出するため主としてプライマーの検討を行い、PCR標準法を確立する。ウイルス遺伝子が増幅されさえすれば、塩基配列の解析によって食品が汚染される経路を明らかにすることができ、また予防対策も可能になる。一方、カキ養殖海域における海水の汚染状況、SRSVの汚染実態は解明されておらず汚染実態調査を早急に行う必要があるが、微量遺伝子検出技術を導入することによって養殖海域のSRSVの分布、生態が解明でき対策のための基礎資料を作成することが可能となる。本研究ではPCR法と並行して組換え蛋白を用いるELISAおよびラテックス凝集によるSRSV検出法を確立する。これは患

者糞便中のウイルス抗原をより迅速簡便に検出するうえで有用である。SRSV汚染指標の開発、およびカキに濃縮SRSVの消毒方法を確立することもウイルス性食中毒を防御する上で重要であり、目的のひとつである。

## B. 研究方法

### 1. プライマーの設計とRNA抽出法の検討

GenBank Release 110.0 (12/1998)、EMBL Release 56.0 (9/1998)、PIR-Protein Release 58.0 (9/1998)、SWISS-PROT Release 36.0 (7/1998)を参照した。遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCG version 9.1によって上記データベースに登録されているSRSV遺伝子を検索し、ORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ領域および構造蛋白領域ORF2のSRSV塩基配列を抽出した。これらの領域のアラインメントを行い、構造蛋白領域を増幅するプライマーを設計した。このプライマーを用いて増幅した領域の塩基配列を解読した。さらに系統解析を行い、Genogroup I、Genogroup IIおよびGenogroup IIIに分類した。RNA抽出法の比較検討のためには十分量の共通検体が必要であるが、あらかじめ定量したコクサッキーA16を糞便及びカキ検体に加えることで解決した。すなわち、10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/mlのコクサッキーA16培養上清を原液とし、蒸留水、10%糞便乳剤をフルオロカーボン処理したものおよび生カキ中腸腺の凍結融解抽出液をフルオロカーボン処理したもので希釈して用いた。CTAB法、Glassmilk法、Hot Phenol法を含む8種類の抽出法でRNAを回収してRT-PCRを行い、どの程度の希釈まで増幅バンドが検出できるかを比較した。

### 2. 患者糞便、食品および海水からの遺伝子検出

1) 1997年11月中旬名古屋市内の某保育園で発生した集団嘔吐下痢症で集めた、患者糞便8検体(調理人1件、保母2件、園児5件)および保存食61検体、2) 平成10年度千葉県内で発生した集団下痢症10事例の患者便、検食、健康人として平成10年4～9月まで2～4週ごとに採取された給食従事者11施設52名のべ274検体、3) 1997年11月から1998年12月の約2シーズンの間、松山市の1小児科医院外来で散発性の急性胃腸炎患者から糞便、4) 国内で集めたヒトカリシウイルス陽性糞便材料合計50件およびヒトカリシウイルス陽性二枚貝(牡蠣11件およびムール貝3件)を用いた。

糞便は電子顕微鏡法(EM)とRT-PCRによるカリシウイルスの検索を行った。PBSで10%乳剤とし、

ダイフロン処理を行いウイルスRNAを抽出した。食品からのウイルスRNA抽出は、食品をPBS中でストマッカーにかけ10%乳剤とし、粗遠心後の上清をダイフロン処理し、30%ショ糖クッションに載せ超遠後、ペレットを100  $\mu$ lに溶かし、ウイルスRNAを抽出した。PCR陽性検体についてダイレクトシークエンスにより塩基配列の決定を行った。ハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン標識プローブを用い、ドットプロットハイブリダイゼーションによりPCRの確認試験とプローブ型別を行った。

広島湾沿岸のカキ養殖場および東京湾において、1998年11月～1999年3月に月1回採取された海水のE.coli数、大腸菌群数、F特異大腸菌ファージ数を測定した。同時に採取したマガキに含まれる大腸菌群数、F特異大腸菌ファージ数を測定した。海水は同時にpH、電気伝導度、SSを測定した。E.coli数:クロモカルトコリフォーム寒天(MERCK)による混釈法により、試料10mlもしくは1mlを測定した。培地凝固後36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで20～24時間培養し、得られたコロニーのうち濃青色から紫色に発色したものを測定しその合計をE.coli数とした。大腸菌群数:デソキシコレート培地(栄研社製)を用いて測定を行った。供試液量は、海水は10mlもしくは1ml、カキは1mlとした。

広島湾内11地点から検体を採取した。カキおよび海水は1998年11月から1999年2月の間に8地点から毎月採取した。また、汽水は1998年5月から1999年2月の間に3地点から1週間間隔で採取した。海水中のNLV遺伝子は20リットルの海水を陽電荷フィルター(約140mm径、Cuno社、USA)でろ過し吸着・回収後、ポリエチレングリコールで濃縮する方法、180mlの海水からポリエチレングリコール(6,000)沈殿法によりNLV粒子を回収・沈殿する方法の2方法により行った。汽水中のNLV遺伝子の検出は海水と同様に180mlを用いポリエチレングリコール(6,000)沈殿法により濃縮後、CTAB法によりRNAを抽出した。PCRはカキと同様の方法で行った。

### 3. ウイルス様中空粒子の作製と抗原検出ELISA

ウイルス性下痢症あるいは急性胃腸炎患者の便材料からRT-PCR法で構造蛋白領域(ORF2)の5'末端から約300 bpを増幅し、その塩基配列を解析して遺伝子型を決定した。アミノ酸配列のホモロジーから血清型が異なると予想された株について発現を試みた。便材料からORF2全長を含む領域をPCRで増幅しクローニング後、常法通りバキュロウイルストランスファーベクターに組み込み、組換えバキュロ

ウイルスを作出した。発現は Tn-5 細胞に組換えバキュロウイルスを感染し、5～6日間培養した上清から SDS-PAGE と電子顕微鏡で 58K 蛋白および VLPs の観察で確認した。培養上清から CsCl 平衡密度勾配遠心法で精製した VLPs を免疫原および抗原として抗血清の作製と ELISA 法による交叉反応試験を行った。また同 VLPs を抗原として患者血清中、健常人血清中の SRSV 抗体価を測定した。また発現蛋白は CNBr 活性化セファロースを用いて選択的に N 末端ペプチドを単離し、タンデム質量分析法によって解析した。

抗原検出 ELISA の検査材料として、1986 年度から 98 年度に愛知県で発生した集団食中毒 8 事例の 46 名から採取された糞便を用いた。SRSV 抗原検出 ELISA は、組換えバキュロウイルスで発現された 7 種類の VLPs に対するウサギ免疫血清を捕獲抗体とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗 SRSV 抗体 (7 種) を検出抗体とするサンドイッチ型 ELISA である。7 種類の VLPs の内訳は、Genogroup I (GI) で r124 (Norwalk-like virus)、r258 (Southampton-like virus) および rCV16 (Chiba virus) の 3 種、Genogroup II (GII) で r104 (Bristol-like virus)、r76 (Hawaii-like virus)、それに r47 と r7 の 4 種の合わせて 7 種である。

#### 4. ラテックス凝集法の開発

アストロウイルスの 1、2、3、4、5、6、7 型の標準ウイルスを CaCo2 細胞で培養、精製後家兎に免疫し抗体を作製した。硫酸分画とプロテン A カラムクロマトグラフィーを用いて精製してラテックス粒子にこの抗体を被覆した。非細菌性、非ロタウイルス、非アデノウイルスの小児下痢便 220 検体で行った。ダイフロン処理した糞便検体あるいは培養ウイルス検体と 1、3 型ラテックス粒子あるいは対照ラテックス粒子を用いた。2分と5分で反応を観察し凝集反応の比較を行った。非特異反応が見られた場合は、PBS・BSA のバッファーからロタウイルスラテックス凝集反応用のバッファーに換えても検討した。同時に検体からウイルス RNA を抽出し、逆転写を行った後、アストロウイルス共通のプライマーで 1st PCR そして混合型特異プライマーで 2nd PCR を行いアストロウイルスの有無と型を調べた。

#### 5. 単クローン抗体の作製と解析

プロトタイプで Norwalk virus (NV)、Snow Mountain virus (SMV) および 47 のバキュロウイルスにて発現された中空粒子を Balb/C マウスに免疫・細胞融合後、MAb を得た。免疫方法は従来の腹腔

内、皮下投与と異なり経口的投与単独或いは両者の併用投与後に脾細胞と融合した。融合細胞のスクリーニングは中空粒子固相プレートを用いた ELISA 法を用いた。一部臨床糞便材料を用いてウイルス抗原の検出を応用した。異なった二種類の単クローン抗体を固相抗体、検出標識抗体とした。臨床材料はエステス博士より分与された NV 陽性便 3 検体、陰性便 2 検体、ロタウイルス陽性便 8 検体、健常人便 7 検体、国立感染症研究所宇田川博士より分与を受けた 120 検体、愛知衛生研究所 小林博士より分与された 33 事例の検体を用いた。

#### 6. ロタウイルスの病原性

性状がよく調べられ、G1P1A のレファレンス株の 1 つであるヒトロタウイルス KU 株を使用した。RNA パターンはウイルス感染細胞を SDS, 2-ME, EDTA で処理し、ウイルス RNA をフェノール抽出により得た。10% ポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動したのち、銀染色を施した。塩基配列は PCR 産物を TA ベクターにてクローニング後、あるいは PCR 産物を直接用いて塩基配列の決定を行った。各 RNA セグメントの 3', 5' 末端配列はウイルス自身の transcriptase を利用して、in vitro で調製した mRNA あるいは精製ウイルス粒子から調製した dsRNA を用いて dideoxynucleotide 法で決定した。構造蛋白コード遺伝子を pVL1392 あるいは pVL1393 transfer vector に挿入し、Pharmingen の BaculoGold システムを使用してバキュロウイルス発現系を構築し、Sf9 細胞あるいは TN5 細胞で各蛋白を発現した。感染実験は生後 5～6 日令の BALB/c 乳飲みマウスで行った。異なる G 血清型を有するヒトロタウイルス感染細胞培養液 50～100  $\mu$ l を経口投与し、12 時間ごとに下痢の発症を観察した。

#### C. 研究結果

##### 1. プライマーの設計と RNA 抽出法の検討

国立感染症研究所の GCG 遺伝子解析パッケージを用い、SRSV のポリメラーゼと構造蛋白領域のデータベースを構築した。35/36 プライマーで増幅される 430 塩基を用い fasta でホモロジー検索した。抽出された配列を相互に比較して SRSV と関連のない配列を除き、ポリメラーゼ領域のデータベースとした。同様にポリメラーゼ領域について NV82 (SM82)/NV81 プライマーで増幅される 310 塩基、P69/P39 プライマーで増幅される 118 塩基のデータベースを構築した。これらを前年度構築したものに統合した。Genogroup I に分類される

SRSVから構造蛋白領域約1,600塩基を抽出した。Pileupでアラインメントをおこない、Prettyでコンセンサス配列を抽出した。セミネステッドPCR用プライマーG1-F1、G1-F2、およびG1-R1の他に可能性のある領域を一ヶ所同定した。同様に、Genogroup IIに分類される株から構造蛋白領域約1,600塩基を抽出した。アラインメントからセミネステッドPCR用プライマーG2-F1、G2-F3、およびG2-R1の他に可能性のある領域を一ヶ所同定した。ポリメラーゼ領域を増幅する従来のプライマーと検出効率を比較している。

糞便検体に対する抽出効率はDr.GenTLEの成績が低かったがそれ以外はその方法を用いても差がなかった。カキ検体ではHot Phenol法の抽出効率が最も高く他の方法とは明らかな差が認められた。

## 2. 患者糞便、食品および海水からの遺伝子検出

名古屋市某保育園で発生した集団嘔吐下痢症の患者糞便について RT-PCR およびPCR産物の遺伝子解析を行い、データベースと比較検討した結果Hawaii株に近似のgenotype 2のウイルスであることがわかった。保存食の検査については2nd PCRを行うことにより、レンコンの炒め物、さらに食材のレンコンからも患者糞便と同様Hawaii株に近似のgenotype 2のヒトカリシウイルス遺伝子を検出した。しかし、遺伝子解析の結果患者糞便、調理人糞便から検出された遺伝子と全く同一のものではなかった。園児から検出されたヒトカリシウイルス遺伝子と調理人、保母から検出された遺伝子は、ほぼ同一であった。食品であるレンコンの炒め物から検出された遺伝子と食材のレンコンから検出された遺伝子もほぼ同一であった。

千葉県内における10事例はウイルス検査の結果、全ての事例でEMまたはPCRによりSRSVを確認した。EMでは、10例中8例から、PCRでは、ポリメラーゼ領域のプライマーで8例中6例、構造蛋白プライマーで10例全例が陽性であった。これら検出したSRSVの遺伝子解析の結果、Genogroup1が3、Genogroup2が6例であった。残り1例は、Genogroup1を3株Genogroup2を3株検出し、これらは全て異なる株であった。この事例はあさりスパゲッテイが原因食と推定された。この事例以外にも、主になる株以外の株が検出された事例が3例みられた。今回の事例のうち3例について、保存されていた検食についてSRSV遺伝子の検出を試みた。3事例とも1~2品の陽性検体がみられた。これら陽性検体の遺伝子解析の結果いずれもSRSVと確認され、2事例の食品では患者由

来株とほぼ塩基配列の一致がみられた。患者由来株と一致のみられた食品は、1例はあさり・わかめとサラダ、1例は魚甘酢あんかけとオープンフルーツタルトであった。

給食従事者274検体についてPCRを行ったところ、8検体からSRSV遺伝子が検出され陽性率2.9%であった。陽性は、4月に2検体、6月に3検体、7月に1検体、9月に2検体検出された。これらの陽性検体の遺伝子解析の結果、6月の2検体はGenogroup1・サザンプトン株類似、残り6検体はGenogroup2・トロント株類似であった。

愛媛県で発生した散発性の急性胃腸炎患者からの電子顕微鏡法及びRT-PCRによる病原体の検出をおこなった。487例の糞便から電子顕微鏡法でロタウイルスが29例、カリシウイルスが24例、アデノウイルス、アストロウイルスがそれぞれ7例、6例検出された。Yuri系プライマーを用いたPCRでは、カリシウイルスの好発時期を中心に200例実施したが、そのうち49例が陽性であった。電子顕微鏡法と比べ少なくとも2倍以上の検出率を示した。49例のPCR産物は2例を除きすべていづれかのプローブと特異的に反応した。プローブ型の時期的な集積性がみられることから、地域におけるカリシウイルスの流行はシーズン毎に流行株が変遷していることが伺われた。ウイルス性食中毒が食品衛生法上に認知されて以後、県内で最初のカリシウイルスによる食中毒として認められた集団発生事例においては伝播経路として調理中の二次汚染も含まれていると考えられた。典型的な生カキによる食中毒、寿司が原因食品とされた事例、カキフライが共通食と判明した例があった。

全国の各地から得られたカリシウイルス(HCV)についてポリメラーゼ領域のpositin 4,561~4,861の301bpについてUPGMA法による解析を行った。患者からのHCVは50件でそのうちgenotype 1(G1)が10件(22%)で、G2は40件(78%)であった。東海・北陸地区がG1が多く、北海道・東北・新潟は例数が少ないものの、G1とG2が同数であった。また牡蠣は11件中1件がG1で、10件がG2、ムール貝は3件中2件がG1、1件がG2であった。G1の遺伝子配列は系統樹から5つに分けられた。すなわちG1であったものは14株で、Ky-89/89/Jに近縁なもの(新潟、韓国赤貝、愛媛県での検出株)、KY-89/89/JとNorwalkとの中間に属するもの、Southamptonと少し異なるもの、鳥取、三重、岡山、佐賀、愛知県)、Southamptonに近縁なもの(愛媛県)およびそれらと少し異なっていたもので

ある（岐阜県）。G2の遺伝子配列も系統樹から、5つに分けることができた。すなわち、Camberwellに近縁なもの（愛媛県）、Lorsdaleに近いもの（福岡、北九州、群馬県）、Hawaii（千葉、岐阜県）、SM（静岡県）、Mexico(MX)、Melkesham（静岡、横浜、山梨、北九州市）である。

カキからのNLV遺伝子の検出では32検体中1地点3検体（9.4%）からNLV遺伝子が検出された。NLV遺伝子が検出された3検体は、広島県が定める指定外海域（生食用として出荷できない海域）から採取されたカキであり、広島湾内で細菌学的に最も汚染度の高い地点であった。NLV遺伝子は11月下旬、1月中旬および2月上旬に採取したカキから検出された。NLV遺伝子はYuri系プライマーで3検体中3検体、NV系プライマーで3検体中2検体から検出された。汽水60検体中1998年12月下旬に採取した1検体（1.7%）から2系統のプライマーセットで検出された。海水28検体および市販生食用カキ15検体からはNLV遺伝子は検出されなかった。1998/99年と1997/98年との検出率を比較したところ、昨シーズンの検出率は13.8%（8地点中6地点から検出）であったが、本シーズンは9.4%（8地点中1地点、図1に示す地点4）であり、検出率が低下した。また、海水においても同様に18.8%（8地点中5地点）から0.0%に低下した。

### 3. 汚染指標の策定

汚染指標の策定のため広島湾および東京湾の海水を検査した。pHは、すべての海水が7.0～8.4の範囲にあった。電気伝導度は、広島湾で54～65（mS/cm）、台場で45～53（mS/cm）、葛西で35～39（mS/cm）の範囲の値を示した。SSは16～108（mg/l）の範囲にあり、場所による違いは認められなかった。海水中のE.coli、大腸菌群、F特異大腸菌ファージの濃度分布はE.coli、大腸菌群は生食用カキ捕獲許可区域（広島湾）で濃度が低く、カキ捕獲禁止区域（東京湾）で濃度が高い傾向が見られた。F特異大腸菌ファージは広島湾の海水からはほとんど検出されなかった。海水の電気伝導度と塩化物イオン濃度の相関から、電気伝導度が低いほど海水中の淡水の割合が多いと考えられる。大腸菌群およびF特異大腸菌ファージともに、カキ中の濃度は海水中よりも高かった。特にF特異大腸菌ファージは、100mlの海水中から検出されない海域のカキからも高い濃度（10000PFU/100ml）で検出されることがあった。

### 4. ウイルス様中空粒子の作製と抗原検出ELISA

1.6kbの構造蛋白(ORF2)のみを含むもの、構造

蛋白(ORF2)、機能未同定蛋白(ORF3)、3'NC領域およびポリAを含む2.3kbの長さのものについて、それぞれ組換えバキュロウイルスを作製し発現に用いた。ともに感染後72h以降に58KDa(530aa)の構造蛋白が大量に産生され、これらはそれぞれの株の回復期血清と反応した。発現蛋白の大部分は感染細胞内に留まるが、凍結融解で容易に遊離し、電子顕微鏡下に直径30nmのウイルス様中空粒子が多数認められた。また $10^8$ 個のTn5細胞から1mgの精製中空粒子が得られた。ORF3の機能は不明であるが、構造蛋白発現と中空ウイルスの産生にはORF2のみで十分であることが明らかになった。

血清型が異なると思われる株を選出して構造蛋白の発現を試み、G-Iの3株、G-IIの5株でVLPsの作出に成功した。これらの株間の交叉反応を調べた結果、G-IとG-II間では数%以下、同グループ内では強い交叉反応を示した。下痢症患者のSRSVに対する抗体応答はカキ関連食中毒では同一集団でG-I,IIに反応する患者が混在した。しかし施設内食中毒例では単一な株に最も強い抗体上昇が見られた。健康人血清中のSRSV抗体は2歳代ですでに高い陽性率を示した。特にG-IIに対し高率であった。

集団食中毒8事例の46名の糞便材料についてELISA法で抗原検出を行なった。7事例(87.5%)の26検体(56.5%)がELISA陽性となった。GIグループの抗原が陽性であったものは6事例からの44検体中21検体(47.7%)、GIIグループの抗原が陽性であったものは5事例の30検体中9検体(30.0%)であった。また、3事例の4検体は両グループの抗原が陽性であった。GIグループのウイルスがGIIグループのウイルスと比べて高率に検出された。集団食中毒8事例について、併行して実施した電子顕微鏡検査およびPCR法と比較した。電顕法では7事例の14検体(30.4%)からSRSVが検出されたのみであり、ELISA法は電顕法と比べて高率にSRSVを検出することができた。抗原型と遺伝子型が一致していた場合にはELISA法はPCR法と同等な感度が得られた。しかし、PCRの検出率が優っていた事例では、今回のELISA系でメキシコタイプのウイルスを検出することができないことがELISAの検出率を低下させた要因と考えられた。

### 5. ラテックス凝集法の開発

1型アストロウイルスLAの感度をRT-PCRを基準として考えると88.5%（23/26）で精度は97.9%（8+2+180/12+2+180）であった。陽性期待値は85.1%（23/

23+4)で陰性期待値は98.4%(180+8+2/180+8+2+3)であった。診断値は96.8%(23+180+8+2/220)であった。

#### 6. 単クローン抗体の作製と解析

作製された単クローン抗体の各Genogroupとの交差反応をしらべた。Genogroup IのNVとGenogroup IIのMexico virus(MX)の両方と特異的に交差反応する単クローン抗体を固相し、NV, MXを特異的に認識する単クローン抗体を検出系に使用したAssay系ではNV陽性便3検体、陰性便2検体は特異的に識別できた。ロタウイルス陽性便8検体、健常人便7検体はいずれも陰性であった。交差反応単クローン抗体をそれぞれ固相、検出標識抗体とした検出系の検討を加えた。

#### 7. ロタウイルスの病原性

##### 1. バキュロウイルス発現系を利用したロタウイルス蛋白の発現

ヒトロタウイルスの6種のすべての構造蛋白質(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)のバキュロウイルス発現系による発現を行った。VP2とVP6の共発現により、一重殻粒子の自己集合空粒子を得た。また、VP2, VP6およびVP7の共発現により、粒子表面の滑らかな二重殻粒子の自己集合空粒子を得た。さらに、VP2とともに、VP1, VP3, VP6, VP7, VP4と複数の構造蛋白を共発現することで、遺伝子(11本の2本鎖RNA)を含まない人工粒子を得た。VP7の抗原性は、発現VP7単独では抗ピリオン抗体により認識されず、VP2, VP6, VP7の共発現によって人工粒子となってはじめて認識されることを確認した。

多数の各G血清型を有するヒトロタウイルスを用いて乳のみマウスでの経口感染実験を行った結果、G2を除きG1, G3, G4, G8, G9, G12のヒトロタウイルスでも、50%下痢誘発量は異なるもの下痢を誘発することを確認した。

#### D. 考察

既に解かっているポリメラーゼ領域の塩基配列からでも、SRSVには15を越える血清型が存在することが予想される。また我々が設計した構造蛋白領域のプライマーで増幅されてきた塩基配列の中にもこれまでに報告されていないSRSVの配列が見つかった。本研究で構築したデータベースは迅速に既存の塩基配列と比較し、血清型を予想する上で有用と思われる。

糞便の場合は方法ごとの効率の差は無いため、

コストと手間を選んでかまわないことになる。Catrimox-14とGlassmilk法が最も安く済む。より手間のかからない方は前者だが、糞便の性状(脂質の多い便やキャリープレア入りの便など)によって影響を受けやすいので、ここでは安定した検査精度を得られるGlassmilk法を推奨したい。カキ検体ではHot Phenol法の抽出効率が極めて高いので、通常はこれを選択すべきであろう。コストも安く済み、手間もISOGEN-LSと同程度と考えられる。阻害物質を含まない対照として蒸留水で希釈した試料についてもテストしたが、意外なことに糞便検体より成績が低い場合が多かった。これは不純物が逆にキャリアーの役目を果たしたものと考えられる。そのため単純な煮沸のみの処理では損失が少なくなっている。この結果は、環境水に対してモニタリング調査を行う場合、あらかじめ適当なキャリアーを添加する必要性を示唆している。

2枚貝とは違った一般食品とその食材からヒトカリシウイルス遺伝子を検出することに成功したが食品由来の遺伝子群と患者由来の遺伝子のホモロジーが一致しないことから、ただたんに食品にもヒトカリシウイルスが付着してただけで、今回の食中毒事件とは何ら関係がないのかもしれない。RT-PCR法の問題点として、いくつかの増幅される遺伝子が存在した場合に、それら遺伝子を全て同じ比率で増幅するわけではなく、特定の遺伝子のみを特異的に増幅してしまうことが考えられる。また、ヒトの体内で増殖する時も、抗体などさまざまなファクターによりウイルスにセレクションがかかることも考えられるので、今回の事件の場合も、何らかの原因で食材が汚染され、その食材を用いた食品を介して調理人、保母、園児共に感染したと推測されたが、完全に決定するには問題も残る。

平成10年度千葉県内で集団下痢症は10例発生し、11月下旬から12月に集中していた。ほとんどが飲食店を介しての事例であったがカキ関連は1例のみであった。PCRでは11月以降の事例でポリメラーゼ領域のプライマーの反応性が良くなく、構造蛋白領域のプライマーの反応性が良好であった。遺伝子解析の結果、トロント株類似のウイルスが最も多かったが、さまざまな株の流行がみられた。また、一つの事例でいくつかの株の混在が多くみられ、アサリを原因食として推定した事例では6種類の株を確認した。健康人と考えられる給食従事者の平成10年4~9月の検便について、SRSVのPCRを実施し、2.9%に陽性がみられた。検出したウイルスは、集団発生でよくみられるトロント株類似、

サザンプトン株類似のものであった。これらのことから、健康人の間で症状は示さないもののSRSV感染を起こしている可能性が示唆された。

カリシウイルスのPCR結果は適当なプローブを用いてハイブリダイゼーションによる確認が必要とされている。ドットプロットは多検体処理に適し、4型のプローブと一度に反応させることができ、また、各反応時間の短縮も可能であるため、非常に有用な方法である。今後、さらに迅速性を高めるため、耐熱性アルカリフォスファターゼ標識プローブを応用してみたい。地域に流行するカリシウイルスには、遺伝学的にも抗原的にも多様なウイルス株が存在することが明らかにされている。われわれの急性胃腸炎の継続的病原検索の対象が小児であるため、ヒト-ヒト感染で伝播しているカリシウイルスの地域流行の動向をよく把握できていると考えられる。プローブ型別によって地域でのカリシウイルスの流行が、シーズン毎にその主流型を変えている実態が認められた。散発例と食中毒事例とのプローブ型の分布の比較は興味深い。今後、カキやその他の二枚貝からのカリシウイルス遺伝子と散発例のカリシウイルスとの塩基配列解析を行い、両者の関連性を明らかにしたい。

ヒトカリシウイルスは遺伝子配列が多様性に富むことが知られているが、今回日本の近年のウイルスについて比較的安定であるとされているポリメラーゼ領域について遺伝子配列を解析した結果G1は14株、G2は50株で、系統樹から共に5つに分けられヒトカリシウイルスの遺伝子配列が多様であることが裏付けられた。このことはヒトカリシウイルスの確認診断においてもこれらに対応するプローブを用意する必要があり、現時点でも少なくとも10種類を用いなければならないと考えられ、未だ5種類についてはふくまれていないので、これらのプローブを作製しより検査精度を上げる必要がある。

本シーズンのカキおよび海水からのNLVの検出率は昨シーズンに比較して低く、年変動が存在することが示唆された。年変動の要因については今後ともデータを集積し検討する必要があると思われる。昨シーズンに検出されたNLVはMexicoタイプであったのに対し、本シーズンはMexico、YuriおよびNolwalkタイプと検出される株も年々変化していることが示唆された。NLV遺伝子が検出された地点は広島湾内では最も細菌学的汚染度の高い地点である。昨シーズンの結果からも、NLV遺伝子の検出と汚染指標菌との間には強い相関があることが認められており、食品衛生法で加工基準として定められ

ている大腸菌群はNLVの汚染指標にもなると思われる。NLV遺伝子の検出時期は11月下旬から2月上旬であり、下痢症の多発時期に一致して検出される傾向が認められた。

東京および広島河川水中の微生物濃度は下水処理水が大きく影響し、地理的に河口域から遠ざかるにつれてすべての微生物濃度も低くなることが分かった。一方、カキに含まれる微生物濃度は海水中の濃度と比較して、大腸菌群で1000倍~10000倍、F特異大腸菌ファージで100倍~10000倍であった。河川水中に高濃度で存在していた大腸菌群及びF特異大腸菌ファージは、海水の希釈効果によって濃度が減少するが、カキによって濃縮されカキの体内で再び高濃度で存在することが分かった。特にF特異大腸菌ファージは、形状と大きさが病原ウイルスに似ていることから、ウイルス汚染の代替指標として期待される微生物である。しかしながら、このF特異大腸菌ファージをカキ養殖場におけるウイルス汚染の指標として適用するには、まだ様々な問題が残る。

VLPsの発現によって大量のSRSV抗原が使用可能となった。SRSVは遺伝的分類と同様に血清学的にも分類され多くの血清型が存在することが示唆された。またSRSVは広く浸淫しており、特に近年はG-IIに属すSRSVが多いことが明らかとなった。

単クローン抗体は融合細胞から無尽蔵に得る事ができる。その点ポリクローナル抗体は動物に免疫しなければならぬなどの制約がある。今回の単クローン抗体-単クローン抗体によるアッセイ系はPCRに比べ検出率は低かった。ポリクローナル抗体よりは特異性という点は高く今後この系にて測定していくならば反応部位の異なった単クローン抗体を使用、あるいはカクテルするなど工夫して感度を高める事を検討していかなければ行けない。

1型アデノウイルスLAは感度・精度からみてスクリーニングに有用である。2、3型も一部は検出可能であったが、もともとアストロウイルスは型特異的抗原抗体反応が強いためすべての型を検出するためには型別の抗体を作らなければならない。LAは時間的に短く検出できるために有用な方法であろう。今回、培養ウイルスと小児科外来検体で検査を行ったが、ウイルス性食中毒の場合にも有用と考えられた。

本研究において得られたロタウイルス人工空粒子は、少なくともワクチンとしての利用価値を検討する上で重要である。VP7の抗原決定基がコンフォメーションナルであることを確認し、人工粒子を利用



したVP7の解析が可能となった。また、これまで、ロタウイルスのマウス感染実験は、主として強い下痢誘発能を示すサルロタウイルスを利用して行われてきたが、今後乳のみマウスを用いたヒトロタウイルスの感染防御実験が可能であることが示された。

#### E. 結論

現在用いられているプライマーはSRSVのポリメラーゼ領域をターゲットにしたものであるが、カキ中腸腺からの検出効率に不満が残っている。野菜、魚、サラダなどの食材からの検出ではさらに効率の低下が懸念される。そこで、EMBLおよびGenBankから抽出したSRSV構造蛋白の塩基配列を基に設計したgenogroupに特異的と思われるプライマーを設計し、市販の生カキから効率良くSRSVを検出できる手法を開発した。

GenBankおよびEMBLに蓄積されてきた小型球形ウイルス (SRSV) の塩基およびアミノ酸の配列データを研究班内で共有するため、国立感染症研究所のサーバにSRSVのポリメラーゼと構造蛋白領域のデータベースを構築した。塩基配列が決定された場合、迅速に既存の塩基配列と比較することによって血清型を決定することが可能となった。

SRSVの診断が困難である最大の理由はこのウイルスを増殖するだけで全くないため、血清反応の抗原が確保できないことであった。しかし、近年SRSVの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現して形態的にも免疫学的にもネイティブなSRSVと区別出来ないウイルス様中空粒子が産生できるようになった。昨年度は新たに5種類の中空粒子の作出に成功し、計8種類の血清学的に異なる中空粒子を手にすることができた。SRSV研究が活発な米国や英国の研究室でも、これほどの中空粒子の作製に成功しているところはない。これらを用いることによってこれまでにはっきりとしなかったSRSV間の血清学的差異を明らかにできると考えている。これらの粒子を免疫して高度免疫血清を得て、一部のSRSVでは抗原検出ELISAを構築した。現在、多数の検体を用い評価を行っている。単クローン抗体もいくつかの株でえられた。これは今後サンドイッチELISAの構築へ応用される予定である。

カキ生産県である広島県の養殖海域において、降雨、気温、海水温等を計測すると共に、カキおよび海水についてSRSV汚染実態調査を実施し、SRSV対策の基礎データを得ている。具体的には海水からSRSV遺伝子検出を試みた。ウイルスを濃縮するための限界ロカ、イオンクロマト法等種々の手法を試み、

海水中の微量蛋白成分を濃縮する方法を確立した。PCR法によるSRSV遺伝子検出も可能になっている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yue HJ, Ushijima H. Detection and genotyping of astroviruses by RT-PCR and sequencing. *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* 70:1220-1226, 1996
- 2) Akihara S, Ushijima H et al. An outbreak of Norwalk-like virus infection in Tokyo and Saitama in late 1995. *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* 70:840-841, 1996.
- 3) Wen L, Ushijima H et al. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus serotype 3 isolated in China and Japan. *Arch Virol* 142:1481-1489, 1997.
- 4) Matsui M, Ushijima H et al. Detection and serotyping of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42:539-547, 1998.
- 5) Adhikary A-K, Ushijima H et al. Distribution of rotavirus VP4 genotype and VP7 serotype among Chinese children. *Acta Paediatrica Japonica* 40:641-643, 1998
- 6) Cao X-R, Ushijima H, et al. Genetic variation in the VP4 gene and the NSP4 gene of human rotavirus serotype 3 isolated in China and Japan. *Microbiol Immunol* 43:171-175, 1999
- 7) Zhou Y, Ushijima H et al. Serotypes of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1997. *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* 73: 35-42, 1999.
- 8) Yabe, M., Matsuura, Y. and Tatsumi, M.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-2 cDNA by the recombinant baculovirus system. *Int. Archiv Allergy Immunol.*, 113, 417 - 423 (1997)
- 9) Tatsumi, M. and Sata, T.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interferon-g cDNA. *Int. Archiv Allergy Immunol.*, 114, 229 - 236 (1997)
- 10) Totsuka, K., Takakura, H., Hashimoto, O. and Tatsumi, M.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-1b. *Int. Archiv Allergy Immunol.* in

press

- 11) Li, T-C, Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., Takeda, N., and Miyamura, T.: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71, 7207 - 7213 (1997)
- 12) Takakura, H., Mori, Y. and Tatsumi, M. Molecular cloning and expression of caprine IL-6 cDNA in insect cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:409 - 416 (1997)
- 13) Takahashi, H., Tatsumi, M., Nagashima, K., Kurata, T., and Hall, W.W. The role of topoisomerase I in HIV-1 replication. *Leukemia* 11 Suppl 3: 26 - 28 (1997)
- 14) K. Taniguchi, H. Wu, Y. Maeno, Y. Kusuhara, Y. Matsuura, N. Takeda, and S. Urasawa: Completion of nucleotide sequence of a human rotavirus genome and expression of its structural proteins by baculovirus system. (submitted for publication)
- 15) K. Taniguchi, J. Okada, K. Kojima, N. Kobayashi, H. Wu, Y. Kusuhara, Y. Maeno, and S. Urasawa: Further studies of nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene encoding a truncated protein. (submitted for publication)
- 16) C.N. Lee, C.L. Lew, C. Zao, C. Lee, W. Yu, and K. Taniguchi: Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.*, 1999 (in press)
- 17) J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, H. Shiomi: Analysis of effect of heterologous NSP1 genes in the genetic background of simian rotavirus SA11. *Arch. Virol.*, 1999 (in press)
- 18) M. Ramachandran, JR. Gentsch, UD. Parashar et al: Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3223-3229, 1998
- 19) H. Wu, K. Taniguchi, T. Urasawa, S. Urasawa: Serological and genomic characterizations human rotaviruses detected in China. *J. Med. Virol.*, 55:168-176, 1998
- 20) J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, S. Urasawa: Preferential selection of heterologous G3-VP7 gene in the genetic background of simian rotavirus SA11 detected by using a homotypic single-VP7 gene-substitution reassortant. *Antiviral Res.*, 38:15-24, 1998
- 21) KUYAMA Tetsuo, KATAYAMA Hiroyuki and OHGAKI Shinichiro (1999) F-specific coliphages and bacteria as viral indicators for monitoring viral pollution in oysters harvesting marine waters, the 7th IAWQ Asia-Pacific regional Conference (投稿中)
- 22) Yamashita T., Sakae K., Tsuzuki H., Suzuki Y., Ishikawa N., Takeda N., Miyamura T. and Yamazaki S. Complete Nucleotide Sequence and Genetic Organization of Aichi virus: A Distinct Member of the Picornaviridae Associated with Acute Gastroenteritis in human. 1998 *J. Virol.* 72: 8408-8412.
- 23) Li T.-C., Shinzawa H., Ishibashi M., Sata M., Mast E.E., Miyamura T. and Takeda N. A New Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. 1998 submitted
- 24) Katsuro Natori, Kenji Suzuki, Yoshio Yamakawa, Masashi Tatsumi, Kenji Sakae, Shinichi Kobayashi, Kuniko Shinozaki, Hiroaki Ishiko, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. Expression and self-assembly of capsid proteins of the Chiba virus, a genetically distinct Norwalk-like virus. 1998 submitted
- 25) Hiroyuki Saito, et. al., Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastro-enteritis outbreak. *Microbiol. Immunol.*, 42, 439-446 (1998)

## 2. 学会発表

- 1) Ushijima H, Akihara S et al. Detection and genetic analyses of astroviruses and Norwalk-like viruses in Japan. 31th Joint Working Conference on viral disease, 1997. The US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto 1998.
- 2) Ushijima H, Kaku H et al. Rapid detection of astrovirus serotype 1 by latex agglutination. 32th Joint Working Conference on Viral Disease, 1998. The US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto 1998.
- 3) N. Takeda, K. Natori, S. Kobayashi, K. Sakae, Y. Suzuki, K. Shinozaki, O. Hashimoto, H. Ishiko and Tatsuo Miyamura: FORMATION AND

- UTILIZATION OF EMPTY VIRUS-LIKE PARTICLES OF NORWALK-LIKE VIRUSES (NLVs). International Workshop on Human Caliciviruses. March 29-31, 1999, Atlanta, USA 4) N. Takeda, K. Natori, S. Kobayashi, K. Sakae, Y. Suzuki, O. Hashimoto, H. Ishiko and T. Miyamura : Formation and utilization of empty virus-like particles of small round structured viruses. Thirty-second Joint Working Conference on Viral Diseases. September 2-4, 1998, Kyoto, Japan
- 5) N. Takeda, K. Natori, S. Kobayashi, K. Sakae, Y. Suzuki, K. Shinozaki, O. Hashimoto, H. Ishiko and Tatsuo Miyamura : FORMATION AND UTILIZATION OF EMPTY VIRUS-LIKE PARTICLES OF NORWALK-LIKE VIRUSES (NLVs). International Workshop on Human Caliciviruses. March 29-31, 1999, Atlanta, USA
- 6) T.-C. Li, N. Takeda and T. Miyamura : A new ELISA using recombinant empty virus-like particles of HEV. The 20th US-JPN Hepatitis Panel Meeting. March 12-13, 1999, Chiba, Japan
- 7) Takeda N., Li T.-C. and Miyamura T. : Formation and utilization of empty virus-like particles of hepatitis E virus. 19th US-Japan Hepatitis Joint Panel Meeting. January 27-29, 1998, Asilomar, USA.
- 8) 工藤聡、牛島廣治他：ヒトロタウイルス血清型4のRT-PCR法を用いたサブタイプ分類 小児感染症学会、1997、11月佐賀
- 9) 蜂矢正彦、牛島廣治他：アストロウイルスのPCR法による遺伝子決定および4型亜型について 小児科学会、1998、5鳥取
- 10) 秋原志穂、牛島廣治他：1995-1997年におけるSRSVの分子疫学および遺伝子解析 臨床ウイルス学会 1998、6札幌
- 11) 南部みほ、牛島廣治他：パキスタンに於ける乳幼児下痢症の病因ウイルスについて 臨床ウイルス学会 1998、6月、札幌
- 12) 工藤聡、牛島廣治他：ヒトロタウイルス血清型内の変異について、日本ウイルス学会1998、9月
- 13) 小西恭子、牛島廣治他：硫酸化コロミン酸の腸管系ウイルスに対する効果 日本ウイルス学会 1998、9月
- 14) 秋原志穂、牛島廣治他：RT-PCRによるわが国のアストロウイルスの分子疫学 小児感染症1998、11松本
- 15) 西村修一、牛島廣治他：ロタウイルスの経済学 小児感染症1998、10
- 16) 顧艶紅、牛島廣治他：カカオおよび緑茶の抗ロタウイルス活性 第25回日本小児臨床薬理学会東京 1998
- 17) アデカリ AK、牛島廣治他：中国の小児におけるロタウイルスVP4遺伝子型およびVP7血清型(遺伝子型)の分布について 日本感染症学会1999、3
- 18) 田中智之、北元憲利、栗林恒一、福原良文、竹中徹 組替えウイルス粒子に対する効果的な単一抗体の作製第46回日本ウイルス学会総会、1998
- 19) 久山哲雄、大垣眞一郎、大瀧雅寛、片山浩之(1998) マガキによる大腸菌フェージQβの蓄積に関する研究 土木学会第53回年次学術講演会講演概要集 第7部、pp.6-7
- 20) 小林慎一、都築秀明、山下照夫、栄賢司、鈴木康元、名取克郎、武田直和：ヒトおよびカキから検出されたSRSVの遺伝子解析 第46回日本ウイルス学会総会、東京(1998).
- 21) 斎藤博之、他、SRSVに起因する食中毒における易学指標としてのSSCP解析の検討、第46回日本ウイルス学会、東京(1998)
- 22) 名取克郎、武田直和、小林慎一、栄賢司、篠崎邦子、宮村達男：小型球形ウイルスの組換え中空粒子の作製と血清学的解析への応用。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
- 23) 李 天成、武田直和、宮村達男：E型肝炎ウイルス中空粒子の腸管免疫原性。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
- 24) 名取克郎、武田直和、小林慎一、栄賢司、篠崎邦子、宮村達男：小型球形ウイルスの組換え中空粒子の作製と血清学的解析への応用。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
- 25) 橋本修、武田直和、石古博昭：「カキからのHuCV遺伝子の検出と遺伝子解析」。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
- 26) 橋本修、武田直和、石古博昭：「生食用カキからの小型球形ウイルス(HuCV)の検出とその遺伝子解析」。第19回日本食品微生物学会学術総会、1998.10.14 京都

ラテックス凝集法の開発 - 糞便検体からのアストロウイルス（血清型1および3型）の検出用ラテックス凝集検査法 -

分担研究者 牛島廣治（東京大学大学院医学系研究科）

研究協力者 秋原志穂、木村亜紀、坂本辰徳、神野英毅（同上）

研究要旨 アストロウイルスはカリシウイルスと同様に小児の下痢症の原因であるが、食中毒の原因でもある。アストロウイルス1型と3型のウイルスを培養し抗体を作成した。1996年から1998年のロタウイルスおよびアデノウイルス陰性の検体に対してラテックス凝集法（LA）を開発した。220検体中、1型アストロウイルスRT-PCR陽性の26検体中23検体が1型LAで陽性を示した。感度は88.5%で精度は97.9%であった。また3型アストロウイルスRT-PCR陽性の10検体で4検体が3型LAで陽性であった。3型LAは改良が必要である（用いた抗体の力価が弱い）が、1型LAは有用であることがわかった。

A. 目的

ヒトアストロウイルスは約28nmの小型球形のウイルスで1本鎖RNAからなる。1975年に小児の糞便材料から電子顕微鏡で見いだされた。子どもの下痢症の2-8%をしめる。散発的な発症とともに、集団発症も見られる。アストロウイルスは細胞培養が可能で、現在8つの血清型が報告されている。従来、電子顕微鏡での診断がなされ、最近酵素抗体法もなされている。またRT-PCR法による診断や血清型（遺伝子型）の決定がなされている。ここでは迅速診断法であるラテックス凝集法を用いて、数分での診断を行った。1型と3型の抗体で行ったので現時点での成績を報告する。将来カリシウイルスに関しても報告する予定である。

B. 方法

OxAsT1, OxAsT2, 2684-90, OxAsT4, OxAsT5, Symonds, Rana はそれぞれアストロウイルスの1、2、3、4、5、6、7型の標準ウイルスとして用いられた。

これらはCaCo2細胞で培養された。OxAsT1, 2684-90が培養され超遠心機で精製された後、電子顕微鏡でウイルスの存在を確認し、家兎に免疫し抗体を作製した。培養ウイルスはRT-PCRでも量と型が確認された。抗体は硫安分画とプロテINAカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。ラテックス粒子にこの抗体を被覆した。

非細菌性、非ロタウイルス、非アデノウイルスの小児下痢便220検体で行った。ダイフロン処理した糞便検体あるいは培養ウイルス検体と1、3型ラテックス粒子あるいは対照ラテックス粒子を用いた。2分と5分で反応を観察し凝集反応の比較を行った。非特異反応が見られた場合は、PBS・BSAのバッファーからロタウイルスラテックス凝集反应用のバッファーに換えても検討した。

同時に検体からウイルスRNAを抽出し、逆転写を行った後、アストロウイルス共通のプライマーで1stPCRそして混合型特異プライマーで2ndPCRを行いアストロウイルスの有無と型を調

べた。

感度 = LA と RT-PCR 共に陽性検体数 / RT-PCR で陽性検体数

精度 = LA と RT-PCR 共に陰性検体数 / RT-PCR で陰性の検体数

陽性期待値 = LA と RT-PCR で共に陽性検体数 / LA と RT-PCR で共に陽性検体数 + LA で陽性で RT-PCR では陰性検体数

陰性期待値 = LA と RT-PCR で共に陰性検体数 / LA と RT-PCR で共に陰性検体数 + LA で陰性で RT-PCR で陽性検体数

診断値 = LA と RT-PCR で両者とも陽性あるいは陰性検体数 / 検査を行った検体数

各々 100 倍し % で示した。

### C. 結果

1. 1 型アストロウイルス LA との反応培養液に関して：1 型で 10 倍希釈した液は 5 分ぐらいで反応し (1+) とした。1 型原液は 2 分で既に明らかな凝集を示し (2+) とした。2 型、3 型ウイルス原液は 5 分で凝集し (1+) であった。4 型は原液でも反応しなかった。

糞便検体について：217 検体中で 30 検体が陽性、4 検体は擬陽性であったが後者は EDTA を含むロタウイルス緩衝液で希釈したところ陰性となった。この 30 検体中 23 検体は RT-PCR で 1 型で、4 検体は RT-PCR で 3 型で、3 検体は RT-PCR で陰性を示した。RT-PCR で 4 型を示した検体は 1 型 LA では反応しなかった。

2. 3 型アストロウイルス LA との反応培養液に関して：3 型の培養液とは

(2+) の反応を示したが、他の血清型では原液でも反応はなかった。糞便検体について：RT-PCR で 3 型を示す 10 検体中、4 検体は強く 3 型と反応を示したが残りの 6 検体は非常に弱い反応で陽性とは難しい状態であった。RT-PCR で陰性の検体は 3 型 LA で陰性であった。

### 3. 感度および精度

1 型アストロウイルス LA の感度を RT-PCR を基準として考えると 88.5% (23/26) で精度は 97.9% (8+2+180/12+2+180) であった。陽性期待値は 85.1% (23/23+4) で陰性期待値は 98.4% (180+8+2/180+8+2+3) であった。診断値は 96.8% (23+180+8+2/220) であった。

### D. 考察

この研究で LA の感度・精度は RT-PCR を最終陽性・陰性として計算した。LA はウイルス抗原を計るもので、RT-PCR は遺伝子を調べるものである。従って糞便中のウイルスの遺伝子が壊れている場合は RT-PCR が正確な成績を示していることにはならない。また蛋白が壊れている場合も正確な成績とはならない。

1 型アストロウイルス LA では感度・精度を調べたが 3 型アストロウイルスに関しては行わなかった。3 型は検体数が少ないためである。3 型の免疫抗体価は 1 型と比較すると 4 倍程弱かった。同じ IgG 量でラテックスを被覆したため、3 型アデノウイルスラテックスは検出感度が弱くなっているかもしれない。1 型アデノウイルス LA は感度・精度からみて

スクリーニングに有用である。2、3型も一部は検出可能であったが、もともとアストロウイルスは型特異的抗原抗体反応が強いためすべての型を検出するためには型別の抗体を作らなければならない。

最近、酵素抗体法によるアストロウイルス検出試薬が市販されている。しかしながらLAは時間的に短く検出できるために有用な方法であろう。今回、培養ウイルスと小児科外来検体で検査を行ったが、ウイルス性食中毒の場合にも有用と考えられた。

#### E. 結論

アデノウイルス1型および3型のLA試薬を開発した。1型および3型の糞便検体に於いて有用であった。

#### F. 謝辞

アストロウイルスの抗体、ラテックス試薬作製のために御協力を得たイムノプローブ社の野村博氏、野村裕子氏と電子顕微鏡の観察に御協力を得た都立衛生研究所関根大正博士に深謝します。

#### 発表

##### 1. 論文

- 1) Yue HJ, Ushijima H. Detection and genotyping of astroviruses by RT-PCR and sequencing. J. Jap Assoc. Infect. Dis. 70:1220-1226, 1996
- 2) Akihara S, Ushijima H et al. An outbreak of Norwalk-like virus infection in Tokyo and Saitama in late 1995. J. Jap. Assoc. Infect. Dis. 70:840-841, 1996.
- 3) Wen L, Ushijima H et al. Genetic variation in the VP7 gene of human

rotavirus serotype 3 isolated in China and Japan. Arch Virol 142: 1481-1489, 1997.

- 4) Matsui M, Ushijima H et al. Detection and serotyping of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. Microbiol. Immunol. 42:539-547, 1998.
- 5) Adhikary A-K, Ushijima H et al. Distribution of rotavirus VP4 genotype and VP7 serotype among Chinese children. Acta Paediatrica Japonica 40:641-643, 1998
- 6) Cao X-R, Ushijima H, et al. Genetic variation in the VP4 gene and the NSP4 gene of human rotavirus serotype 3 isolated in China and Japan. Microbiol Immunol 43:171-175, 1999
- 7) Zhou Y, Ushijima H et al. Serotypes of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1997. J. Jap. Assoc. Infect. Dis. 73: 35-42, 1999.

##### 2. 学会

- 1) Ushijima H, Akihara S et al. Detection and genetic analyses of astroviruses and Norwalk-like viruses in Japan. 31th Joint Working Conference on viral disease, 1997. The US-Japan Cooperative Medical Science
- 2) Ushijima H, Kaku H et al. Rapid detection of astrovirus serotype 1 by latex agglutination. 32th Joint Working Conference on Viral

- Disease, 1998. The US-Japan  
Cooperative Medical Science  
Program, Kyoto 1998.
- 3) 工藤聡、牛島廣治他：ヒトロタウイルス血清型4のRT-PCR法を用いたサブタイプ分類 小児感染症 1997、11月佐賀
  - 4) 蜂矢正彦、牛島廣治他：アストロウイルスのPCR法による遺伝子決定および4型亜型について 小児科学会、1998、5鳥取
  - 5) 秋原志穂、牛島廣治他：1995-1997年におけるSRSVの分子疫学および遺伝子解析 臨床ウイルス学会 1998、6札幌
  - 6) 南部みほ、牛島廣治他：パキスタンに於ける乳幼児下痢症の病因ウイルスについて 臨床ウイルス学会 1998、6月、札幌
  - 7) 工藤聡、牛島廣治他：ヒトロタウイルス血清型内の変異について、日本ウイルス学会1998、9月
  - 8) 小西恭子、牛島廣治他：硫酸化コロミン酸の腸管系ウイルスに対する効果 日本ウイルス学会 1998、9月
  - 9) 秋原志穂、牛島廣治他：RT-PCRによるわが国のアストロウイルスの分子疫学 小児感染症 1998、11松本
  - 10) 西村修一、牛島廣治他：ロタウイルスの経済学 小児感染症1998、10
  - 11) 顧艶紅、牛島廣治他：カカオおよび緑茶の抗ロタウイルス活性 第25回日本小児臨床薬理学会 東京 1998
  - 12) アデカリ AK、牛島廣治他：中国の小児におけるロタウイルスVP4遺伝子型およびVP7血清型(遺伝子型)の分布について 日本感染症学会 1999、3

# 分担研究報告書

## 単クローン抗体の作製と解析

分担研究者 田中智之 和歌山県立医科大学 微生物学教室 助教授

### 研究要旨

いわゆる小型球形ウイルス (SRSV) がウイルス性下痢症に關与する頻度は極めて高い。ウイルス性下痢症の診断にはELISA法は重要で、そのためには単クローン抗体はなくてはならない。本研究はプロトタイプノルウォークウイルスを主な免疫源として多くのSRSVの共通抗原決定基を認識する単クローン抗体の作製を試みた。その抗体を用いてELISA法を開発し、一部流行事例症例からの糞便材料を用いてELISA法による診断を試みた。

### A. 研究目的

ウイルス性下痢症に關与する様々な小形の球形ウイルスにはノルウォークウイルス、サッポロカリシウイルスなど多数あり、現在統一的なウイルス分類について検討している。従来は小形球形ウイルスと呼ばれ、また遺伝子学的にはGenogroup I, II, IIIに分類されている。従って下痢症ウイルスの診断はPCR法による遺伝子学的手法が主流となっている。

本研究の目的はこれら遺伝子学的に異なった小形球形ウイルスのカプシド蛋白を共通に認識する単一抗体の作製である。この成果によりPCR法よりもっと経済的な、多量の臨床検体処理が可能なELISA法の開発が可能となる。

### B. 研究方法

- 1) プロトタイプでGenogroup IのNorwalk virus(NV)のカプシド蛋白はバキュロウイルスにて発現された中空粒子でエステス博士(ベイラー医科大学)より分与された。さらにGenogroup IIのSnow Mountain virus(SMV)のカプシド蛋白も同様に分与された。
- 2) Genogroup IIのr47カプシド蛋白は、

国立感染症研究所ウイルス第二部 武田直和、名取克郎両博士より分与を受けた。

3) Balb/Cマウスに免疫・細胞融合後、MAbを得た。免疫方法は前回の本学会議で報告したように従来の腹腔内、皮下投与と異なり経口的投与単独或いは両者の併用投与後に脾細胞と融合した。融合細胞のスクリーニングは中空粒子固相プレートを用いたELISA法を用いた。

4) 一部臨床糞便材料を用いてウイルス抗原の検出を応用した。異なった二種類の単クローン抗体を固相抗体、検出標識抗体とした。臨床材料はエステス博士より分与されたNV陽性便3検体、陰性便2検体、ロタウイルス陽性便8検体、健常人便7検体、国立感染症研究所宇田川博士より分与を受けた120検体、愛知衛生研究所 小林博士より分与された33事例の検体用いた。

### C. 研究結果

1), 2)について。作製された単クローン抗体の各Genogroupとの交差反応について表1に示す。



表1 単クローン抗体の交差反応

| MAbs    | 免疫抗原  | 抗体反応 |   |   |
|---------|-------|------|---|---|
|         |       | N    | S | F |
| NSF1250 | F     | +    | + | + |
| NFG176  | N x S | +    | - | + |
| SFG46   | N x S | -    | + | + |
| NS160   | N x S | +    | + | - |
| NSFG972 | N x S | +    | + | + |
| NSFG941 | N x S | +    | + | + |
| NSFG8   | F     | +    | + | + |
| NSFG120 | F     | +    | + | + |
| NSFG125 | F     | +    | + | + |

N: Norwalk virus-like 粒子

S: Snow Mountain Virus-like 粒子

F: r47 virus-like 粒子

(G: Glimsby 粒子)

#### 4) について

##### a) Genogroup IのNVとGenogroup IIの

Mexico virus(MX)の両方と特異的に交差反応する単クローン抗体を固相し、NV、MXを特異的に認識する単クローン抗体を検出系に使用したAssay系ではNV陽性便3検体、陰性便2検体は特異的に識別できた。ロタウイルス陽性便8検体、健常人便7検体はいずれも陰性であった。

国立感染症研究所 宇田川博士より分与を受けた120検体ではNV系では2例が陽性であった。MX系では5例が陽性であった。これらの検体についてはPCRの検索は未だである。

愛知衛生研究所 小林博士より分与された33事例の検体を用いた。NV系では全例が陰性であった。MX系では1例が陽性であった。この結果を小林博士によるPCRのそれと比較すると1st, 2nd PCR共に陽性例であった。

b)表1に示した交差反応単クローン抗体をそれぞれ固相、検出標識抗体とした検出系の検討を加えた。検体が少量であったため、愛知衛生研究所の33事例検体について検討した。その結果5例が陽性、うち2例がMXに対する1st, 2nd PCR陽性、3例が2nd PCR陽性であった。

#### D. 考察

抗原検出ELISA法はポリクローナル抗体を固相に、検出抗体に単クローン抗体を用いる方法がよく用いられる。単クローン抗体は融合細胞から無尽蔵に得る事ができる。その点ポリクローナル抗体は動物に免疫しなければならないなどの制約がある。

今回の単クローン抗体-単クローン抗体によるアッセイ系はPCRに比べ検出率は低かった。ポリクローナル抗体よりは特異性という点は高く今後この系にて測定していくならば反応部位の異なった単クローン抗体を使用、あるいはカクテルするなど工夫して感度を高める事を検討していかなければ行けない。

現在まで作製された単クローン抗体にはGenogroup IIIに交差反応する抗体はみられていない。Genogroup IIIとの交差反応する単クローン抗体は作製中である。

今後いわゆるSRSSVの共通の抗原部位を認識する単クローン抗体を用いたELISA法の開発が必須である。

#### E. 結論

1)比較的広範囲なSRSSV共通抗原部位を認識する単クローン抗体が作製された。

2)単クローン抗体のみ用いたELISA測定系を開発したが、感度の点で今後更なる改良が必要である。

F. 研究発表

1. 学会発表

(1) 田中智之、北元憲利、栗林恒一、福原  
良文、竹中 徹

組替えウイルス粒子に対する効果的な単一  
抗体の作製

第46回日本ウイルス学会総会. 1998

(2) T. Tanaka, N. Kitamoto and M. K. Estes  
High yield production of monoclonal anti-  
bodies to recombinant Norwalk virus-like  
particles by oral immunization.

International Workshop on Human  
Caliciviruses, CDC, Atlanta, Georgia,  
1998

## 分担研究報告書

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

### 研究要旨

ヒトロタウイルスの予防に向けた基礎的データを得るため、以下の2点について検討を加えた。1. バキュロウイルス発現系により、ヒトロタウイルスの6種の構造蛋白を発現し、共発現によりVP2/VP6あるいは、VP2/VP6/VP7よりなる中空粒子を得た。2. Gセロタイプの異なるヒトロタウイルスの乳のみマウスにおける下痢誘発能を検討し、以前報告のあったG3以外に、G1, G4, G8, G9, G12のヒトロタウイルスも経口投与により乳のみマウスに下痢を誘発することを見出した。

### A. 研究目的

ロタウイルスは、下痢症起因ウイルスの中でも最も高頻度で検出され、また最も重篤度の高いウイルスである。散発例が主ではあるが、食品を介した集団発生例も散見される。A群ロタウイルスは11本の分節した2本鎖RNAをゲノムとして有する。各RNAセグメントは、1部の例外を除いてモノシストロニックであり、6種の構造蛋白(VP1~VP4, VP6, VP7)と5種の非構造蛋白(NSP1~NSP5)をコードしている。ロタウイルス研究の多くは、サル、ウシなどの動物由来の株を用いた研究が多い。しかし、ヒトと動物ロタウイルスの間では、2種の感染防御抗原VP4, VP7の免疫原性と抗原性、細胞レセプター、マウスに対する病原性の点など大きな差異がある。本研究では、ヒトロタウイルス構造蛋白の共発現により、1重殻および2重殻人工空粒子の調製を行い、今後の感染防御試験、人工感染粒子作成の基盤を作ることを目的とした。さらに、得られたヒトロタウイルスの感染防御試験を行うべく、これまでG3血清型でしか報告のないヒトロタウイルスの乳飲みマウスでの、異なるG血清型のヒトロタウイルス株による下痢誘発能を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) ウイルス株

性状がよく調べられ、G1P1Aのレファレンス株の1つであるヒトロタウイルスKU株を使用した。

#### 2) RNAパターン

ウイルス感染細胞をSDS, 2-ME, EDTAで処理し、ウイルスRNAをフェノール抽出により得た。10%ポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動したのち、銀染色を施した。

#### 3) 塩基配列決定

PCR産物をTAベクターにてクローニング後、あるいはPCR産物を直接用いて塩基配列の決定を行った。各RNAセグメントの3', 5'末端

配列はウイルス自身のtranscriptaseを利用して、*in vitro*で調製したmRNAあるいは精製ウイルス粒子から調製したdsRNAを用いてdideoxynucleotide法で決定した。

#### 4) バキュロウイルス発現系を利用したロタウイルス蛋白の発現

構造蛋白コード遺伝子は、pVL1392あるいはpVL1393 transfer vectorに挿入し、PharmingenのBaculoGoldシステムを使用して、Sf9細胞あるいはTN5細胞で各蛋白を発現した。

#### 5) 乳飲みマウスのヒトロタウイルスによる感染実験

生後5~6日令のBALB/cマウスへ、異なるG血清型を有するヒトロタウイルス感染細胞培養液50~100 $\mu$ lを経口投与し、12時間ごとに下痢の発症を観察した。

### C. 研究結果

#### 1. バキュロウイルス発現系を利用したロタウイルス蛋白の発現

1-1) ヒトロタウイルスの6種のすべての構造蛋白(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)のバキュロウイルス発現系による発現を行った。

1-2) VP2とVP6の共発現により、一重殻粒子の自己集合空粒子を得た。また、VP2, VP6およびVP7の共発現により、粒子表面の滑らかな二重殻粒子の自己集合空粒子を得た。さらに、VP2とともに、VP1, VP3, VP6, VP7, VP4と複数の構造蛋白を共発現することで、遺伝子(11本の2本鎖RNA)を含まない人工粒子を得た。

1-3) VP7の抗原性は、発現VP7単独では抗ピリオン抗体により認識されず、VP2, VP6, VP7の共発現によって人工粒子となつてはじめて認識されることを確認した。

#### 2. ヒトロタウイルスの乳のみマウスへの感染実験

多数の各G血清型を有するヒトロタウイルスを用

いて乳のみマウスでの経口感染実験を行った結果、G2を除きG1, G3, G4, G8, G9, G12のヒトロタウイルスでも、50%下痢誘発量は異なるものの下痢を誘発することを確認した。

#### D. 考察

本研究において得られた人工空粒子は、少なくともワクチンとしての利用価値を検討する上で重要である。VP7の抗原決定基がコンフォメーションナルであることを確認し、人工粒子を利用したVP7の解析が可能となった。また、これまで、ロタウイルスのマウス感染実験は、主として強い下痢誘発能を示すサルロタウイルスを利用して行われてきたが、今後乳のみマウスを用いたヒトロタウイルスの感染防御実験が可能であることが示された。

#### E. 結論

バキュロウイルス発現系により、ヒトロタウイルスの中空粒子を調製し、また乳のみマウスでの異なるG血清型を有するヒトロタウイルスによる下痢誘発を見出した結果、ヒトロタウイルス感染に対する防御機構についての乳のみマウスを用いた実験系を確立した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. K. Taniguchi, H. Wu, Y. Maeno, Y. Kusuhara, Y. Matsuura, N. Takeda, and S. Urasawa: Completion of nucleotide sequence of a human rotavirus genome and expression of its structural proteins by baculovirus system. (submitted for publication)

2. K. Taniguchi, J. Okada, K. Kojima, N. Kobayashi, H. Wu, Y. Kusuhara, Y. Maeno, and S. Urasawa: Further studies of nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene encoding a truncated protein. (submitted for publication)
3. C.N.Lee, C.L. Lew, C. Zao, C.Lee, W. Yu, and K. Taniguchi: Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.*, 1999 (in press)
4. J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, H. Shiomi: Analysis of effect of heterologous NSP1 genes in the genetic background of simian rotavirus SA11. *Arch. Virol.*, 1999 (in press)
5. M. Ramachandran, JR. Gentsch, UD. Parashar et al: Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3223-3229, 1998
6. H. Wu, K. Taniguchi, T. Urasawa, S. Urasawa: Serological and genomic characterizations human rotaviruses detected in China. *J. Med. Virol.*, 55:168-176, 1998
7. J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, S. Urasawa: Preferential selection of heterologous G3-VP7 gene in the genetic background of simian rotavirus SA11 detected by using a homotypic single-VP7 gene-substitution reassortant. *Antiviral Res.*, 38:15-24, 1998