

同等の菌量を接種した時のHI平板と各平板に出現するコロニー数の比較

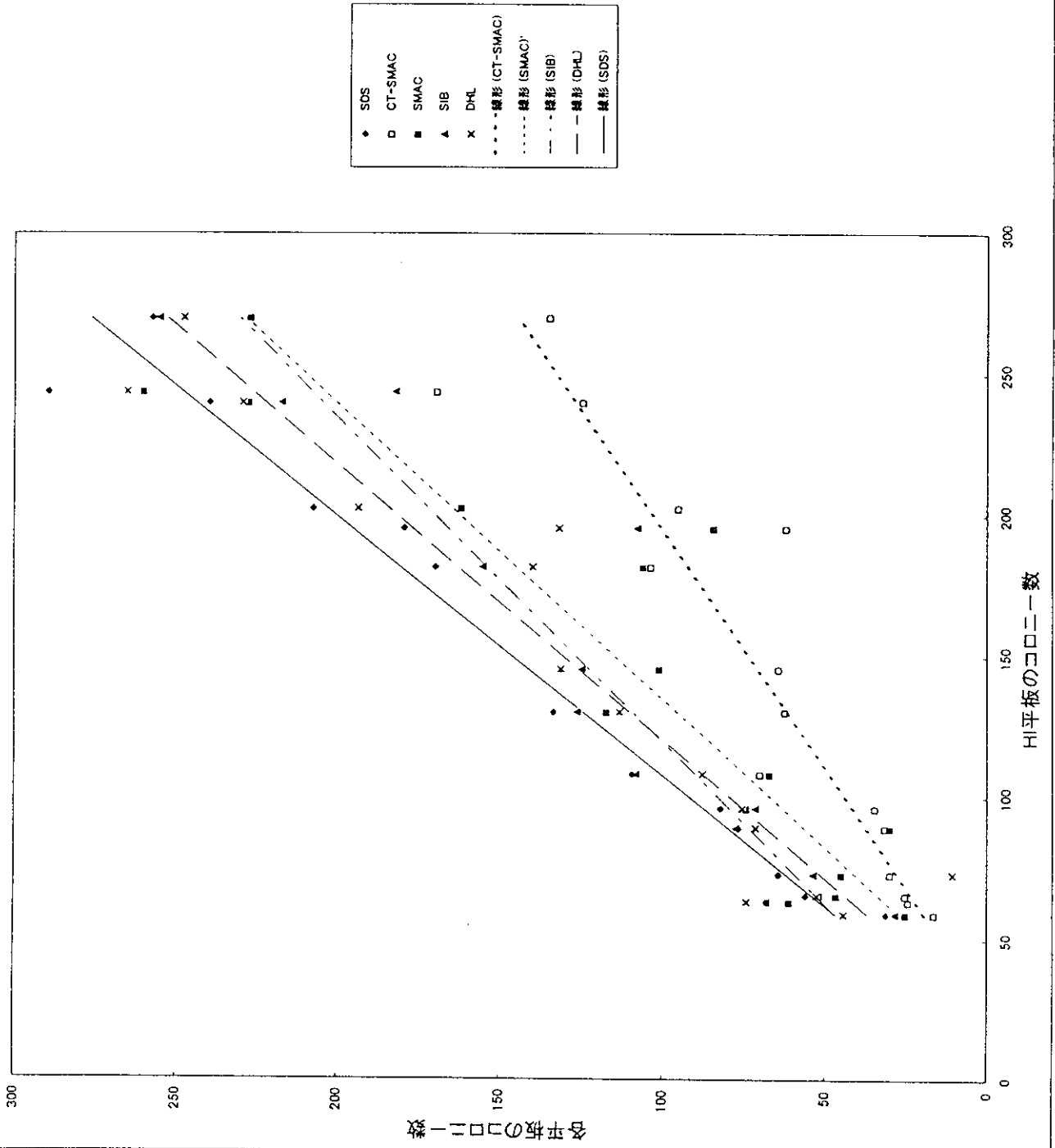
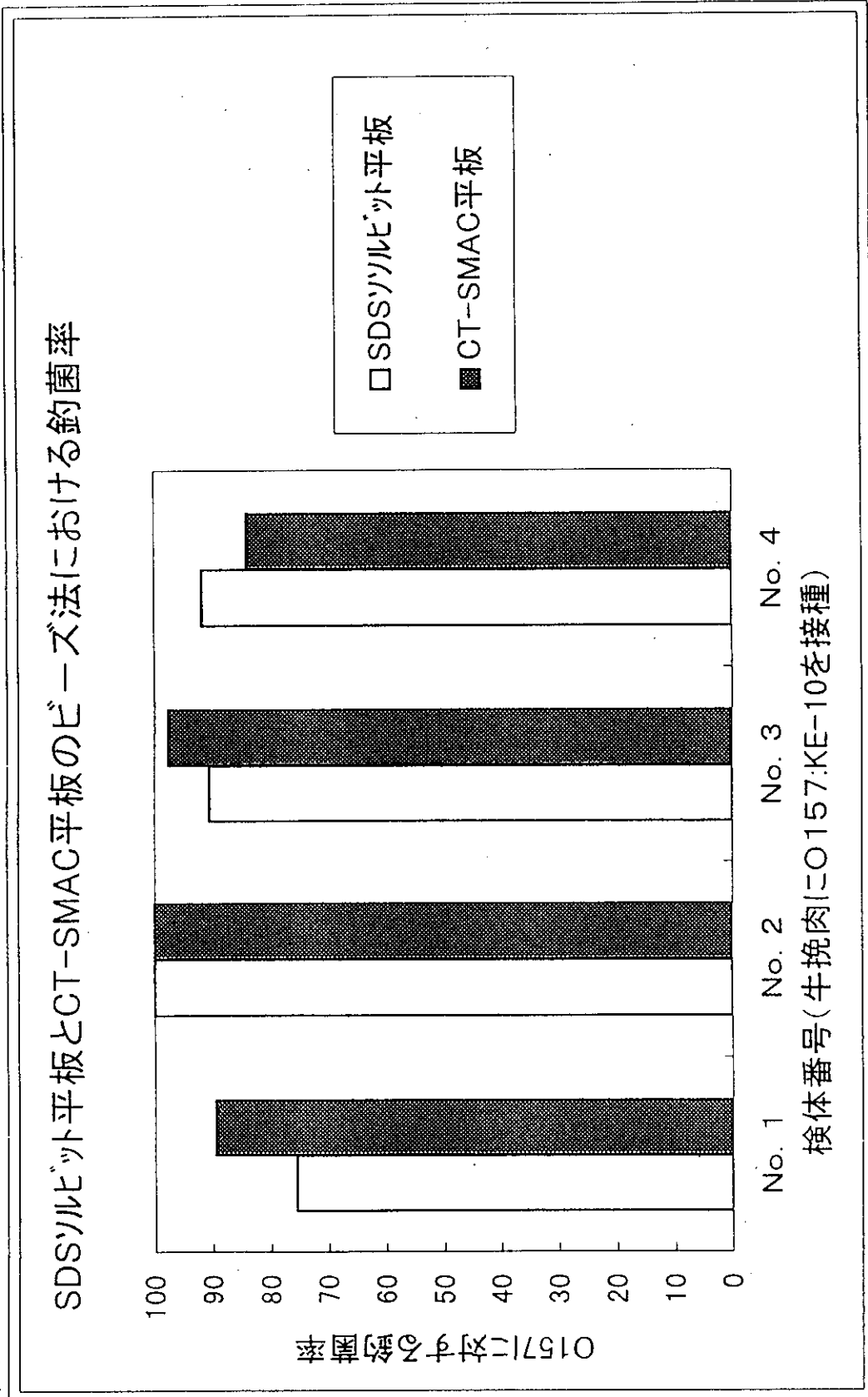


図2



* 釣菌率：0157のコロニー数 / (0157のコロニー数 + その他のコロニー数)

表 2 SDSソルビット寒天培地とCT-SMACのビーズ法における釣菌率

		SDSソルビット				CT-SMAC	
No. 1 (-)	0157	0	0	0	0	0	0
	others	94	87	50	31	26	32
	rate	0	0	0	0	0	0
No. 1 (+)	0157	70	90	56	84	93	104
	others	13	18	39	7	15	11
	rate	84.3	83.3	58.9	92.3	86.1	90.4
No. 2 (-)	0157	0	0	0	0	0	0
	others	0	1	6	0	2	0
	rate	0	0	0	0	0	0
No. 2 (+)	0157	109	87	49	90	123	118
	others	0	0	0	0	0	0
	rate	100	100	100	100	100	100
No. 3 (-)	0157	0	0	0	0	0	0
	others	90	78	93	34	38	41
	rate	0	0	0	0	0	0
No. 3 (+)	0157	105	79	106	103	95	65
	others	17	4	11	3	1	2
	rate	86.1	95.2	90.6	97.2	99.0	97.0
No. 4 (-)	0157	0	0	0	0	0	0
	others	117	75	114	53	39	52
	rate	0	0	0	0	0	0
No. 4 (+)	0157	83	72	74	77	64	91
	others	10	3	8	19	18	6
	rate	89.2	96.0	90.2	80.2	78.0	93.8

ヒトカリシウイルスの遺伝学的多様性とカキに濃縮されるウイルスの検出

分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部
協力研究者 名取 克郎 染谷雄一 国立感染症研究所ウイルス第二部
栄 賢司、小林慎一 愛知県衛生研究所ウイルス部
篠崎 邦子 千葉県衛生研究所ウイルス科
石古 博昭、橋本 修 (株)三菱化学ビーシーエル感染症特別開発部
鎌田公仁夫 デンカ生研株式会社ウイルス試薬製造部

研究要旨

GenBank、EMBL、DDBJからヒトカリシウイルス（Human calicivirus、HuCV）の配列を抽出し遺伝学的な多様性を解析した。わが国で分離されたHuCVのRNA依存性RNAポリメラーゼ領域の塩基配列を解読し、流行株の系統解析を行った。大部分がGenogroup IIのMexico virus、Torontovirus、あるいはOTH25 virusに類似の配列をもっていた。また、構造蛋白の5'末端（300bp）のプライマーで増幅される領域の塩基配列解析からHuCVは明確にGenogroup Iの5種類とGenogroup IIの7種類に分類された。HuCV構造蛋白を発現するために、Genogroup Iに属する3種類、Genogroup IIに属する5種類、合計8種類のウイルスで組換えバキュロウイルスを作製した。大量に産生された蛋白はウイルス様中空粒子の構造であった。

A. 研究目的

ウイルス性下痢症は1970年代初頭に形態が確認されたと言う意味でEmerging infectious diseaseの範疇の疾患である。病因病原体は全世界に日常的に存在し、先進国、発展途上国を問わず小児を中心に毎年数百万人ないし数千万人の患者発生をみるありふれた疾患である。ウイルス性下痢症の中でも、わが国では1、2月をピークとするウイルス性急性胃腸炎が毎年全国的に発生して注目をあびてきている。夏期にピークをむかえる細菌性下痢症とは異なり、ウイルス性胃腸炎は12月から翌年3月の冬季に頻発するのが特徴である。日本において食中毒事件の20%は非細菌性食中毒とされているが、RT-PCR法で患者糞便材料から遺伝子を増幅し塩基配列を調べてみると、大部分がHuCVによるものであることが判明してきた。ウイルス性食中毒として届け出があるときの患者はほとんどの場合大人で、しかも複数である。HuCVは冬季に報告が急増する小児のウイルス性胃腸炎の原因ウイルスでもあるが、この場合は散発的に発生する。食中毒の場合には原因食品を推定することは従来行われてきたことであるが、このウイルスは現在においても増殖させるための培養細胞系や実験動物系がないウイルスであるため、原因食品を特定するのが困難な状況がいまだに続いている。また、感染源となる食品中には極めて微量のウイルスしか含まれないため、患者糞便で用いられる電子顕微鏡法を用いることができない。したがって原因食品を迅速に特定するためには、食品中から病因ウ

イルスを迅速かつ感度良く検出する方法を新たに確立することが急務の課題と考えられる。また患者糞便材料から増幅され、解析された塩基配列から、HuCVには多数の血清学的に異なる株が存在していることが明らかになってきた。これらを迅速に検出するためには本ウイルスの遺伝学的、血清学的な多様性を解析する必要がある。一方、非細菌性胃腸炎の実態調査から、食中毒のかなりの部分が生カキによるものであることも明らかになってきた。

以上の状況をふまえ、本研究では食品、特に日本におけるHuCV感染源の一つと考えられているカキからHuCV遺伝子を効率良く増幅し検出する手法を確立すること、さらにその塩基配列を解読してカキに濃縮されるHuCVの生態を明らかにすることを第一の目的とした。また、現在HuCVの迅速診断が多方面から求められており、比較的多量のサンプルをこなせるELISAによるHuCV抗原検出系の確立が急務と考えられる。これを具体化してゆくため、組換えバキュロウイルスで中空ウイルス様粒子を発現し、これによる高度免疫血清を調製して抗原検出用ELISA系を構築することとした。HuCVには予想をはるかに上回る血清型が存在するらしいこと、ウイルス様中空粒子を用いたELISAは当初思っていた以上に血清型特異性が高いらしいことなどが明らかになるにつれ、HuCVをELISAで同定するには相当数の抗原と抗血清を準備する必要があると思われる。ELISAによるウイルス抗原検出と同時にPCRでHuCV遺伝子を検出し、ELISAの特異性と感度を検証して食品からのウイルス検出の可能性と限界を明

らかにすることも目的のひとつである。

B. 研究方法

1. HuCVの遺伝学的多様性の解析：1999年2月現在、GenBank、EMBL、DDBJに登録されている配列から、HuCV遺伝子がコードするRNAポリメラーゼ領域および構造蛋白領域をGCGソフトウェアパッケージにあるFastaプログラムで抽出し、Pileupでアラインメントおよび系統解析を行った。また、Prettyでコンセンサス配列を抽出し、Primeによって構造蛋白領域を増幅するプライマーを設計した。

2. 便材料からのウイルスおよびウイルスRNAの調製：非細菌性嘔吐下痢症患者の糞便を電子顕微鏡で検査し、ウイルス粒子を含むものを出発材料とした。0.1%トリトンX-100存在化で塩化セシウム平衡密度勾配遠心およびショ糖密度勾配遠心を行いウイルス粒子を精製した。ウイルス粒子を含む分画からRNAをフェノール法で抽出した。

3. RT-PCRおよび塩基配列の解析：ORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ領域は、36/35あるいはNV82 (SM82) /NV81プライマーで増幅した。またアラインメントから設計したプライマーを用いて構造蛋白のアミノ末端約300塩基を増幅した。塩基配列はダイナーミネータ法によるサイクルシーケンシングで決定した。遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCGを用いて作成したデータベースと新たに解読した配列を比較し、ウイルスをGenogroup IとGenogroup IIに分類し、新規の配列をもつHuCV RNAについて構造蛋白全領域をPCRで増幅した。

4. 組換えバキュロウイルスの作製：増幅した構造蛋白領域をバキュロウイルストランスファクターpVL1392あるいはpVL1393にクローン化し、常法通りバキュロウイルスをとともにリポフェクシンでSf9細胞にコトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。

5. HuCV構造蛋白の発現：組換えバキュロウイルスをmoi 5-10でSf9細胞に感染後、4-5日26.5℃で培養した。発現蛋白は非細菌性嘔吐下痢症患者回復期血清を用いたウエスタンブロット法で確認した。

6. 中空ウイルス様粒子の精製：組換えバキュロウイルスを昆虫細胞Tn5にmoi 10で感染し、5-7日間培養した。培養上清に産生された大量の精製中空ウイルス様粒子をCsClならびに蔗糖密度勾配遠心で精製した。

7. カキの処理：市販の生食用カキから中腸腺を分離し、5個をプールして1検体とした。ホモジナイザで破碎後その遠心上清をHCFC-141bで処理し、超遠心法でHuCVを分離精製した。グアニジン法でRNAを抽出後、構造蛋白領域をGenogroup特異プライマーを用いてRT-PCR法で増幅した。PCR産物はサザンハイブリダイゼーションで同定してその塩基配列を解読し、系統解析を行った。

C. 研究結果

糞便からHuCV RNAを抽出する手法やプライマーの改良を背景に、ここ数年の間に世界各国でRT-PCRによって増幅された遺伝子が解析され、塩基配列データが蓄積されてきている。主としてポリメラーゼ領域の比較からHuCVはGenogroup I (Norwalk-like)、Genogroup II (Snow mountain-like) およびClassical human calicivirus (Sapporo-like) の3種の遺伝子型に分類されてきた。Classical human calicivirusはGenogroup IIIとも称されている。それぞれ5、7および3種類の血清型の存在が予想されている。したがって既に血清型は15種類に達すると考えられる。このうちGenogroup IとGenogroup IIがわが国のウイルス性食中毒並びに冬季の小児のウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとしてよく検出されている。

わが国におけるHuCVの遺伝学的多様性

はじめに1997-1998年冬季期間に4県で発生した食中毒9事例の患者糞便材料から増幅した49検体について配列を解読した。領域は主としてORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ、36/35あるいはNV82 (SM82) /NV81プライマーで増幅された領域である。遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCGを用いて作成したデータベースと新たに解読した配列を比較し、この領域のアラインメントならびに系統解析を行い解読した配列を分類した。49検体中38検体はMexico virus、Toronto virus、あるいはOTH25 virusときわめて類似の配列を、3検体は1994年にNorwayで報告された配列を、8検体はBristol virusと類似の配列を持つ、いずれもGenogroup IIに属するHuCVであった。

次に1996-1997年の冬季に一つの県で発生した食中毒3事例の患者糞便材料8検体を用いて、Genogroup IならびにGenogroup II HuCVの構造領域の5'末端を増幅するセミネステッドPCR用プライマーで増幅を試みた。8検体はすべてGenogroup IIのプライマーで増幅が確認された。また1検体ではGenogroup Iでの増幅が確認され、塩基配列は1987年千葉株と極めて類似の配列であった。同時期に別の県で発生した食中毒事例2検体はRNA依存性RNAポリメラーゼ領域の配列からはともにMexico virusに類似していたが、1検体からはGenogroup I用プライマーで増幅が確認された。塩基配列はこれまでGenogroup Iと分類されているNorwalk virus、Southampton virus、Desert shield virus、1987年千葉株とは全く異なるが、明らかにGenogroup Iに属する配列であった。一つの糞便材料からGenogroup I、II両方が増幅されてくる例は、1995-1996年の冬季間に発生した食中毒でもみられており、Desert shield virusと新規のGenogroup II、Southampton virusと新規のGenogroup IIに分類されるHuCVがとれてきている。

上記構造蛋白の増幅が確認された検体のほか、1995-1997年の約30検体について構造蛋白領域の増幅を行い、増幅断片の塩基配列を解読した。その結

果これまで確認Genogroup Iの4種類と新規の1種類、Genogroup IIの7種類の遺伝子型を検出した。

カキからのHuCV遺伝子検出

本実験では、中腸腺5個をプールして1検体とした。生食用カキ75検体を検査したところ29検体、実に40%近くがHuCV陽性であった。内訳はGenogroup Iが5検体(6.7%)、Genogroup IIは14検体(18.7%)、Genogroup IとIIの混合が10検体(13.3%)である。例数は少ないが、陽性検体と同一ロットのカキを1個づつ調べた場合にも、高頻度でHuCVが検出された。ひとシーズンを解析しただけであるが、Genogroup Iで3種類、Genogroup IIで4種類のHuCVが検出され、これらは全て患者糞便から検出された既知のHuCVのいずれかの血清型に分類された。したがって、国内で流通しているカキは予想以上に多様なHuCVによって汚染をうけていると考えられる。また、カキ1個体から両方のGenogroupが検出されることは珍しいことではなく、個々のカキに濃縮されるHuCVもまた多様であった。

ウイルス様中空粒子の作製

電子顕微鏡による形態観察とウイルス粒子の精製の検討に基づき、HuCV千葉株をクローン化し、3'末端から、約2.5kbの塩基配列を解析した。この2.5kbには5'末端側から1.6-1.7Kbの構造蛋白をコードするORF2、0.6Kbの機能未同定蛋白をコードするORF3、70-80塩基の3'非翻訳領域およびポリアデニル酸が配列していた。HuCV千葉株の構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞(Sf9およびTN5細胞)で産生された蛋白は患者回復期血清を用いたウエスタンブロット法で解析した。感染Sf9細胞内には、完全長と思われる58kDaのほかに50kDa、35kDa、30kDaの分子量を持つものが産生されていた。58kDa蛋白の診断上の有用性を確認するため、HuCV千葉株が病因ウイルスと思われる急性胃腸炎流行時に患者から採血されたベアー血清を用い、ウエスタンブロット法で抗体応答を解析し、診断試薬としての有用性を確認した。細胞培養液を直接電子顕微鏡で観察したところ、ウイルス様中空粒子が多数産生されていた。精製後、高度免疫血清を作製した。

同様の手法でGenogroup Iに属する2種類、Genogroup IIに属する5種類、合計7種類のウイルスの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現した。すべての株でウイルス様中空粒子が産生されていることを確認した。

D. 考察

世界を見渡してもHuCVの研究で成果を挙げているのは、患者・病原体情報の両面で収集可能な高度なサーベイランスシステムを持つ一握りの国に限られている。現在数株のHuCV全塩基配列が明らかになっており、またPCRで増幅した遺伝子断片の塩基配列からHuCVは少なくとも遺伝学的に3つ

に分類されることが分かってきた。組換えバキュロウイルスでHuCV構造蛋白を発現し、ウイルス様中空粒子を既に手にしている米国、英国そして我々のグループがこの研究課題の目的達成には最も近い位置にあり、これらのグループにのみ可能な研究であると思われる。HuCVには血清学的に異なるウイルスが少なくとも14種類あることが明らかにされてきており、最終的にはこれらの組換え発現抗原と高度免疫血清を全て準備する必要がある。現在、高度免疫血清を調製して抗原検出用ELISA系の構築が進行中である。

ポリメラーゼ領域の解析からHuCVはGenogroup I (Norwalk-like)、Genogroup II (Snowmountain-like)、Classical human calicivirus (Sapporo-like)の3種の遺伝子型に分類されている。Genogroup I、IIは全塩基配列から典型的なCalicivirusの遺伝子構造をもつことが確認され、一方Classical human calicivirusの遺伝子構造はGenogroup I、IIとは異なり、ORF1とORF2が一つの連続したORFを構成するRabbit haemorrhagic disease virusの構造に似ていることが明らかにされた。食中毒に関与するのはGenogroup IとGenogroup IIである。今回、国内の食中毒で検出された約50株のHuCVのRNA依存性RNAポリメラーゼ遺伝子の塩基配列を解読した結果、1997-1998年冬季は全てGenogroup IIの遺伝子型であった。これらの検体に関しては構造蛋白を増幅するプライマーで確認していないので実際にGenogroup IIだけが流行したのかどうかの結論はだせない。しかし以前の流行期にはGenogroup Iが検出されているし、カキ関連の食中毒からはGenogroup IとGenogroup IIが同時に検出されることはさほど珍しいことではないので1997-1998年冬季がGenogroup IIだけによるとは考えにくい。むしろRNA依存性RNAポリメラーゼ領域を増幅するプライマーで選択されてきたように思われる。

現在データベースに登録されているHuCV構造蛋白の塩基配列を解析すると、塩基のホモロジーはGenogroup IとIIの間で約50%、同グループ間でも70%程度であり、RT-PCRでの遺伝子検出がいかにも困難であるかが理解できる。また塩基配列からGenogroup I、IIにはそれぞれ少なくとも5種類と7種類の血清型が存在すると予想されたが、これらすべての配列が僅か2年間の流行期で検出されたことは、わが国では遺伝学的に異なるHuCVが同時に流行していることが示唆される。一つの糞便材料から複数の遺伝子型が増幅されてくることは、すでにカキが複数のHuCVで汚染されていることを意味している。今後は塩基配列を势力的に解析し、HuCVの流行状況をより詳細に解析する必要がある。またその過程で遺伝学的にあるいは血清学的に新種のウイルスが同定されてくる可能性が多分に考えられる。さらにそれらに基づいたデータベースの作製と提供、そしてより有効なプライマーの開発を進めてゆく必要がある。

E. 結論

過去20年間に免疫電子顕微鏡法、ELISA法あるいはウェスタンブロット法による解析から血清学的に異なるHuCVが多数存在することが確認されているが、われわれが明らかにした12株を含めその塩基配列の比較から、これらのウイルスの血清学的差異が遺伝子レベルで確認された。わが国では全ての血清型が同時に流行しているように思われた。HuCV Genogroup Iに属する3株、Genogroup IIに属する5株の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現した。大量に産生された蛋白はウイルス様中空粒子の構造であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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
3. 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
4. 石古博昭、島田康司、武田直利. 1999. 急性出血性結膜炎を起こす二つのエンテロウイルスの迅速同定. 新しい眼科1: 87-89, 1999.
5. 武田直利, 1998. 小型球形ウイルス, p. 280-286. In 厚生省生活衛生局 (ed.), 食中毒予防必携. 日本食品衛生協会.
6. 武田直利, 名取克郎. 1998. 小型球形ウイルス. 食品衛生研究. 48:65-75.
7. 武田直利, 名取克郎. 1998. 食中毒原因物質としての小型球形ウイルスの検出法. 食品衛生学雑誌. 39: 444-450.
8. 武田直利, and 内田俊和. 1998. E型肝炎ウイルス, p. 385-388. In 戸田綱太郎, 織田正也, 清澤研道, 坪内博仁, 中沼安二 (ed.), 肝臓病学. 医学書院, 東京.
9. 李 天成, 武田直利. 1998. E型肝炎ウイルスの検査. SRL宝函. 22:25-32.

2. 学会発表

国際学会

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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, 国内学会

1. 李 天成、武田 直利、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
2. 名取克郎、武田直利、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
3. 小林慎一、都築秀明、山下照夫、栄賢司、鈴木康元、名取克郎、武田直利：ヒトおよびカキから検出されたHuCVの遺伝子解析。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
4. 橋本修、武田直利、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
5. 橋本修、武田直利、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

分 担 研 究 報 告

野菜等の農水産物からの汚染微生物等の検出方法に関する調査研究

分担研究課題：野菜等食品からのクリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出法に關する研究

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌部 部長

研究概要 近年、クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどと言った腸管寄生性原虫類に起因する疾病への対応に迫られている。交通手段や物資の輸送手段の発達がかこれら感染症のグローバル化の重要な要因であることが指摘されていたが、予想を超えた速度で進行している現実に直面している。これら感染症に対する「危機管理体制の整備には食品や環境からの原虫の検出法、診断法、あるいは疫学的解析法の開発が必須で、それらの普及が急がれる。本研究ではいわゆる「糞-口感染」で伝播するクリプトスポリジウム、サイクロスポラ、ジアルジア、(赤痢)アメーバ、バランチジウム、マイクロスポリジウム、トキソプラズマ等の原虫が対象となるが、野菜等では表面の汚染が問題である。したがって、野菜の洗浄液からの原虫分離が求められ、多量の試料(洗浄液)を迅速、かつ効率的に濃縮する新たな技術開発が検出率向上の鍵を握っている。本研究ではこれらの原虫類の中でもっとも小さなクリプトスポリジウムオーシストを対象に、その検出法の検討を行った。現状では、わが国では食材からの原虫類の嚢子の検査に関して基準となる方法が示されておらず、普及に向けての試験方法の基準化が必要である。また、将来的には従来の形態学的な検出法とは別に *in situ* hybridization、DNA finger-printing などの分子レベルでの同定技術の開発が重要と考えており、標本中に検出されるごく限られた数の嚢子の検出を可能にし、集団発生時の疫学的解析に導入したい。

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部 室長

I. 野菜洗浄法と連続ローターによる洗浄液の濃縮

近年、野菜、果実等生鮮食料品(野菜等食品)が感染源として疑われる原虫感染症が問題となっている。確定した検査法がないため市場の汚染調査も限定され、食品汚染の実態と原虫類感染の可能性についての関係は不明である。しかし、集団発生の危険性のみならず、食品としての安全性を確認することは重要かつ、緊急を要する問題である。

食品からの効率の良い原虫類の検出方法の確立を目的として、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium parvum*) オーシストをイチゴ表面に塗布したものを試験材料としてオーシスト検出のモデル実験を行った。本試験では試験行程を洗浄、洗浄液濃度、分離・精製、検出に分け、それぞれにつき検討を加えた。

材料と方法

洗 浄

攪拌洗浄： 8×10^3 個/100 μ l に調整したオーシストの浮遊液を 10 個のイチゴに各 10 μ l づつ (8×10^2

個/イチゴ) 塗布し、一晚風乾させた。このイチゴ 10 個を 1.0l の 0.1% laureth-12 水溶液に浸漬し、室温で 20 分間 100rpm の速度で攪拌洗浄した。洗浄液をすべて回収し、連続遠心機で濃縮した。

超音波洗浄： 1.2×10^4 個/100 μ l に調整したオーシストの浮遊液を 20 個のイチゴに各 10 μ l づつ (1.2×10^3 個/イチゴ) 塗布し、一晚風乾させた。卓上型超音波洗浄機 (ブランソニック ; 内容積 約 9l) に所定量の 0.1% laureth-12 水溶液を満たし、ステンレス製の編み籠に入れたオーシスト塗布イチゴを浸漬して室温で 60 分間洗浄した。洗浄液をすべて回収し、連続遠心機で濃縮した。

濃縮・精製

連続ローターを用いた遠心沈殿では回転しているローターに連続して試料液を注入し、沈渣を得ることができる。このとき、ローターからは上清が廃液として流出してくるが、条件によっては沈殿・濃縮すべき粒子が漏出する恐れがある。そこで予備的にオーシストに匹敵する形状のプラスチック粒子をオーシストの代替粒子として用い、損耗率を検討した。実験条件は連続ローターの回転数を 16,000rpm とし、ローター内への送液量を 177ml/分とした。代替指標粒子として直径 5.0 μ m の蛍光ビーズ (蛍光色素 (UVIT EX-EBR) 染色のポリメチルメタアクリレートビーズ (PNMMA) ; 比重 1.19、綜研化学) を 0.95×10^6 個/l となるように精製水に懸濁したものを用い、連続遠心からの排出液中に検出 (損失) される蛍光ビーズの数を測定した。その結果、表-1 に示したように 2 回の実験で蛍光ビーズの損失は 0.84% と 0.64% で、ビーズの回収率は 99% 以上と高率な捕捉率を示した。PNMMA ビーズは比重がクリプトスポリジウムのオーシストよりも大きいことを考慮しても、十分な捕捉率が期待できた。

表-1 連続遠心ローターの回収率

		FCM検出数 \pm SD	濃度 (/ml) \pm SD	ビーズ数 /液量ml	回収率
1回目	連続遠心前	1145.5 \pm 0.7	1194.374 \pm 8.1	2388747 /2000	100.0%
遠心前理論濃	上清 (3分後)	17 \pm 8.5	17.69809 \pm 8.7		
1.9×10^6	上清 (6分後)	10 \pm 1.4	10.36603 \pm 1.6		
/2000ml	上清 (9分後)	4.5 \pm 0.7	4.679118 \pm 0.8		
	上清 (11分後)	7 \pm 4.2	7.204537 \pm 4.4		
	上清平均	9.625 \pm 6.2	9.986943 \pm 6.4	19974 /2000	0.8%
	沈渣	9310.5 \pm 365.6	9665.514 \pm 379.5	1933103 /200	80.9%
2回目	連続遠心前	430 \pm 1.4	442.56 \pm 1.5	885129 /2000	100.0%
遠心前理論濃	上清 (3分後)	0.5 \pm 0.7	0.52 \pm 0.7		
0.95×10^6	上清 (6分後)	1 \pm 0.0	1.03 \pm 0.0		
/2000ml	上清 (9分後)	0 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0		
	上清 (12分後)	1 \pm 1.4	1.02 \pm 1.4		
	上清平均	0.625 \pm 0.7	0.64 \pm 0.8	1288 /2000	0.1%
	沈渣	3996.5 \pm 30.4	4104.53 \pm 43.7	820907 /200	92.7%

以下、イチゴの洗浄液の全量 (約 1,000ml) を連続遠心により 100ml に濃縮し、孔径 50 μ m のメッシュでろ過した。その 5ml を顕微鏡観察標本用の 25m/m フィルターに捕捉し、型のごとく蛍光抗体染色 (直接蛍光抗体染色試薬 ; Meridian 社製) を施し、落射蛍光顕微鏡下でオーシストの計数を行った。

フローサイトメーター (Partec 社製) によるオーシスト数の計数においては、濃縮液を 50 μ m メッ

シュでろ過し、さらにろ液をショ糖密度勾配遠心法（ショ糖浮遊法）にオーシスト画分を得て、磷酸緩衝液に浮遊させた後に蛍光抗体染色した。

結 果

連続遠心後の濃縮液の性状は、50 μ m のメッシュを通過する微粒子が多く残存した。したがって、50 μ m メッシュろ過後においても直径 25 μ m の顕微鏡標本用のメンブランフィルターに直接ろ過できるのは 5ml が限度であった。ちなみに添加オーシスト数は 2.4×10^3 個であるから、濃縮液 5ml あたりの理論値は 1,200 個にあたる。実際の洗浄濃縮液 5ml の試料におけるオーシスト数実測値をフィルターろ過測定ならびにフローサイトメーター測定の場合と比較して表にまとめた。

表-2 蛍光顕微鏡観察によるオーシストの計数（実測値）

濃 縮 方 法	測 定 値			
	# 1	# 2	# 3	平均 (n=3)
攪 拌 洗 浄 ¹⁾	246	218	237	234
超 音 波 洗 浄 ²⁾	92	92	96	93.3

1) 8×10^3 個/反応系（イチゴ 10 個）

2) 1.2×10^4 個/反応系（イチゴ 20 個）

表-3 フローサイトメーターによるオーシストの計数（実測値）

濃 縮 方 法	測 定 値			
	# 1	# 2	# 3	平均 (n=3)
攪 拌 洗 浄 ¹⁾	147	182	136	155
超 音 波 洗 浄 ²⁾	46	70	56	57.3

1) 8×10^3 個/反応系（イチゴ 10 個）

2) 1.2×10^4 個/反応系（イチゴ 20 個）

顕微鏡下（フィルター法）でのオーシスト定量

表に攪拌洗浄と超音波洗浄方法による検出オーシスト数を表-2 および表-3 に、試料への添加オーシスト数に対する回収率を表-4 に示した。攪拌洗浄では、5ml あたりの検出数が平均 234 個（4,680 個/100ml）であり、回収率として 58.5%を得た。一方、超音波洗浄では、5ml あたりの検出数が平均 93.3 個（1,866 個/100ml）で、回収率としては 7.8%であった。フィルターろ過した標本の所見では、オーシストは FITC の蛍光を強く発し、他の粒子の混在した中でも識別は良好であった。

表-4 計数法の違いと回収率の差の比較

洗 浄 方 法	回 収 オ ー シ ス ト 数	回 収 率
攪 拌 洗 浄 (8×10^3 個/反応系)	234.0/5ml	58.5%
超 音 波 洗 浄 (1.2×10^4 個/反応系)	93.3/5ml	7.8%

（表の値は 3 回の実験における平均値を示す）

フローサイトメーターによるオーシスト定量

オーシスト無添加イチゴの濃縮洗浄液（陰性対照）のフローサイトメーターによる測定ではオーシストの大きさにほぼ一致する $5\mu\text{m}$ 前後の微粒子が多数検出され、前方散乱光（粒子サイズ）、側方散乱光（粒子の内部構造）による解析のみではオーシストの判別は不可能であった。したがって、特異染色である蛍光抗体染色の導入は必須であると判断された。しかしながら、図-1、2の比較で明らかなように、現在市販されているオーシストの蛍光抗体染色試薬では、陰性対象においてもオーシストの分布領域（図内の枠内）に非特異的な粒子の検出(False Positive)は免れなかった。また、密度勾配遠心法による濃縮洗浄液の精製はオーシストの比重がかけ離れた粒子が除去され、標本中に混在するオーシスト類似の粒子数を減らすのに効果的であった。

陽性対象におけるオーシストの分布特性（前方散乱光/FITC 蛍光）を基準として、試料中の検出粒子の計数を行った。フローサイトメーターの計測ではオーシストの分布領域の近傍にも他の粒子の混入が危惧されるため領域を狭める方向に設定せざるを得ず、これが一つの制限要因となることが避けられなかった。したがって、検出率が低くなる傾向は否めなかった。2つの洗浄方法による検出粒子数、元の洗浄液に対する検出率ならびに各洗浄法のフィルター法による検出結果に対する比率を表-5 にまとめた。

表-5 フローサイトメーターによるオーシスト検出率

洗浄方法	回収オーシスト数 (/100ml)	検出率	フィルター法に対する比率
攪拌洗浄	3,100	38.8%	66.2%
超音波洗浄	1,146	4.8%	61.4%

（表の値は3回の実験における平均値を示す）

表-5 に示すように、攪拌洗浄を行った場合の濃縮洗浄液 100ml あたりの粒子数は 3,100 で、検出率は 38.8% であった。一方、超音波洗浄での濃縮洗浄液 100ml あたりの粒子数は 1,146 で、検出率は 4.8% と低いものであった。これらの値は顕微鏡によるオーシストの計数結果の 66.2%（攪拌洗浄）、および 61.4%（超音波洗浄）に相当した。

考 察

今回の実験では、比較的多量のオーシストの検出を目的として、 10^4 オーダーのオーシストに対する検出方法の検討を、フローサイトメーターの応用を兼ねて行った。

一般的なフィルター法では、微粒子の混入が少ない試料でその効果が最大限発揮されることから、精製途中でオーシストの損失を防ぐことを含めて、直接ローター内の濃縮液をろ過することを試みた。洗浄液は $50\mu\text{m}$ のメッシュを通過する多量の微粒子を含み、メッシュろ過後の場合でも、直接フィルターろ過できるのは 5ml が最大限であった。結果としては、極めて効率良く測定でき、攪拌洗浄の場合で約 60% の検出率を得た。前回 100 オーシストの検出を目的とした実験では、洗浄濃縮液全量を精製する条件で最大約 30% であったことから、連続遠心後の精製操作が検出率に大きく影響するものと考えられる。

超音波洗浄は代表的な洗浄方法の一つであり、米国 FDA の検査マニュアルにも採用されている。しかし、その効果は必ずしも高くない。今回の洗浄方法の比較からは、攪拌方法の方が明らかに高い検出率を示した。予備的実験でガラス表面上に乾燥固着させたオーシストに要した超音波処理の時間は 60 分以上であったことから、イチゴからの分離実験では 1 時間を採用した。この間にオーシストが破壊されることで検出率の低下につながった可能性はあるが、検出されたオーシストの形態に大きな変化は見られず、フィルターろ過標本上に破壊されたオーシストの残存物を確認することもできなかった。ちなみに、ガラスに塗布・乾燥させたオーシストの一部は 60 分の処理後にも付着しており、その形態は保持されていた。また、別の実験で、ペン型の超音波発生装置で局所的に強い洗浄を施した場合には十分な洗浄効果（キャベツ表面からの回収：回収率 \approx 57~72%）が得られている。ただし、ペン型では多量の試料に対しては使用に限界があることから、今回は浴槽型の超音波発生装置を選択した。いずれにせよ超音波洗浄の適用の可否に関してはさらに詳細に検討する必要があるものと判断された。

フローサイトメーターによるオーシストの検出は、現行ではフィルター法の 60~70% 程度に留まったが、機械的な測定方法として評価できるものと考えられた。フィルター法との検出率の差は使用可能な抗体の特異性によるところが大きいと考えられ、特異性の高い抗体の開発や、複数の単クローン抗体との組合せによる多重染色を利用して染色特異性の向上を図ることで問題の解決につながるものと期待される。

II. フローサイトメーターによる二重染色のオーシスト標本の検出

フローサイトメーターの検出特異性は一義的に用いる蛍光抗体試薬の特異性に依存するが、現在入手可能な蛍光抗体試薬はいずれもある種の藻類やその他の微粒子に非特異反応を示すことが知られている。この問題を解決に向けた試みとしてクリプトスポリジウムのオーシストを 2 種の標識単クローン抗体で二重染色（FITC（緑色）/ R-phycoerythrin（橙色））し、検出特異性の向上を図った。同一の試料に対して異なった 2 種類の単クローン抗体を用い、異なった色調の蛍光標識を行った場合、それぞれの抗体が単独で非特異反応が生じて、同一の異物粒子がいずれの単クローン抗体にも反応する確立はきわめて少ないものと期待されるからである。

材料：クリプトスポリジウムオーシストは新鮮なオーシストとホルマリン固定標本を用いた。陰性対象として正常マウスの糞便希釈液を用いた。

方法：蛍光標識の手技は小試験管内でオーシストを間接蛍光抗体染色用の一次抗体（無標識・マウス抗-クリプトスポリジウムオーシスト単クローン抗体（IgM）；Combokit）で処理し、洗浄後に R-phycoerythrin 標識・ラット抗-マウス IgM 抗体で処理〔一次処理〕した。次いで、直接蛍光抗体染色試薬でオーシストを再び処理し、二重染色〔二次処理〕を行うこととした。これによりオーシストは緑色とオレンジ色の蛍光により標識される。

一次処理：各 50 μ l のサンプルを 13,000 回転室温 1 分で遠心し上清を除き、沈渣に 20 μ l のリン酸緩衝液、5 μ l ヤギ血清、および間接蛍光抗体用の一次抗体 25 μ l を加えて計 50 μ l とし、25°C 30 分抗体処理を行った。反応終了後、遠心洗浄して沈渣を得た。沈渣に 43 μ l のリン酸緩衝液、5 μ l の R-phycoerythrin 標識・抗-マウス IgM 抗体を加えて、遮光して 25°C 30 分反応させた。反応終了後、10 μ l の試料を分取し、オーシストがオレンジ色の蛍光標識されていることを確認した。

二次処理：一次処理後のオーシストを遠心・回収し、沈渣に 80 μ l のリン酸緩衝液で遠心・洗浄した。次いで、沈渣に 20 μ l の市販の直接蛍光抗体染色試薬 (Cellabs 社、Meridian 社、Water Borne 社製) を添加し、遮光して 25°C で 30 分間反応させた。得られた標品に対してフローサイトメーターでオーシスト数を測定した。

結果と考察

今回の実験で用いたフローサイトメーターは検知機 (フォトマル) が 6 個装備されており、1 つの粒子に対して最大で 6 つのパラメーターを特定することができる。本研究では前方散乱光、側方散乱光、FITC 蛍光 (緑色) および R-phycoerythrin (オレンジ色) に関する計 4 つのパラメーターを検知した。その際、クリプトの集団を粒子の大きさ (前方散乱光)、あるいは粒子内構造 (側方散乱光) による解析からだけでは判別できなかった。図-3 には二重に蛍光標識された標品の解析結果を示した。図-3a には検知された粒子の前方散乱光 (FSC) と FITC (緑色) 強度の相関が示されている。図-3b には同一の解析結果を前方散乱光とオレンジ色 (R-phycoerythrin) 強度の相関が示されている。それぞれの図において四角形の枠で囲んだ部分 (ゲート 1、ゲート 2) がオーシストの分布域である。図-3c には同一の解析結果がオレンジ色と緑色の相関で示されている。図中には非特異反応によって染色された多数の粒子 (異物) が直線的に分布している。これに沿って緑色オレンジ色の双方に強く染色された (等価に特異的に染色された) 粒子塊が認められるが、この集塊のほとんどがオーシストと考えられる。この図に対して図-3a および図-3b のオーシスト領域 (ゲート 1 および 2) に限局する粒子を抽出すると、すなわち大きさ等粒形による選別を行うことで図-3d の結果を得る。このカラムに示されている粒子は両方の単クローン抗体に特異反応を示した粒子で、形状もオーシストと一致する粒子、すなわちクリプトスポリジウムのオーシストが選択的に抽出された結果である。同様の方法で陰性対象試料を処理した場合 (図-4a-d)、個々の蛍光染色ではオーシスト領域に粒子 (擬陽性粒子) が存在する (図-4a-b) が、図-4c では異物の集団が示されているのみで、両抗体に特異的に染色された粒子はごく少数が散在する程度である。また、粒形のパラメーターを加味するとまったく粒子が検出されなかった (図-4c)。すなわち、二重染色により非特異反応を完全に防ぐことが可能となった。

本試験では、市販の蛍光抗体染色試薬では、Cellabs 社の間接蛍光抗体染色試薬の一次抗体 (マウス IgM) と、R-phycoerythrin 標識・ラット抗-マウス IgM 抗体の組み合わせを一次処理とし、二次処理には Meridian 社の FITC 標識・直接蛍光抗体染色試薬を用いた場合に最も特異性の高い結果が得られた。ちなみに、他の 2 社製 (Cellabs 社、WaterBorne 社) の直接蛍光抗体染色試薬を二次処理用抗体として用いた場合には特異性の向上は認められなかった。今後は多重染色用の簡便な蛍光抗体試薬の開発が求められる。また、多重染色法はフローサイトメーターに限らず、顕微鏡観察における特異性の向上にも

利用できるものと期待される。

単一染色の場合には、非特異反応を示す粒子を取り込まないように領域を狭く設定する必要がある。しかしながら、多重染色では他の一方の染色結果により調整が可能なことから領域を広く設定することができる。

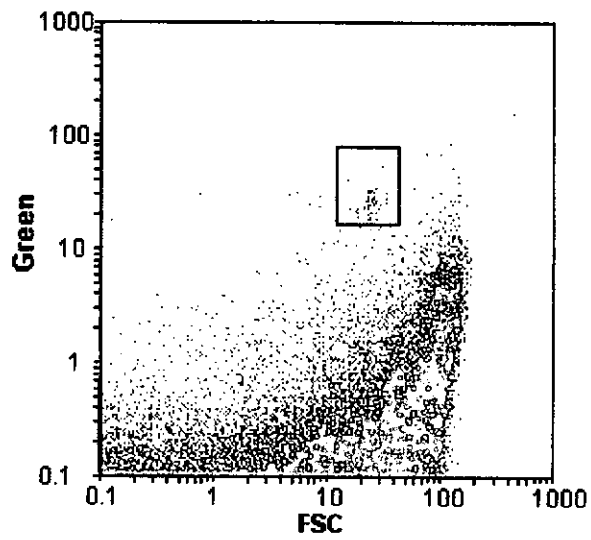


Fig. 1 振とう攪拌洗浄液からクリプトスポリジウムの計数

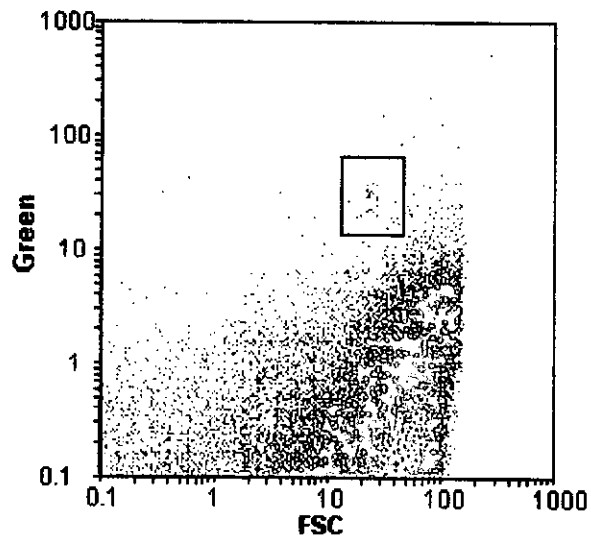


Fig. 2 超音波洗浄液からクリプトスポリジウムの計数

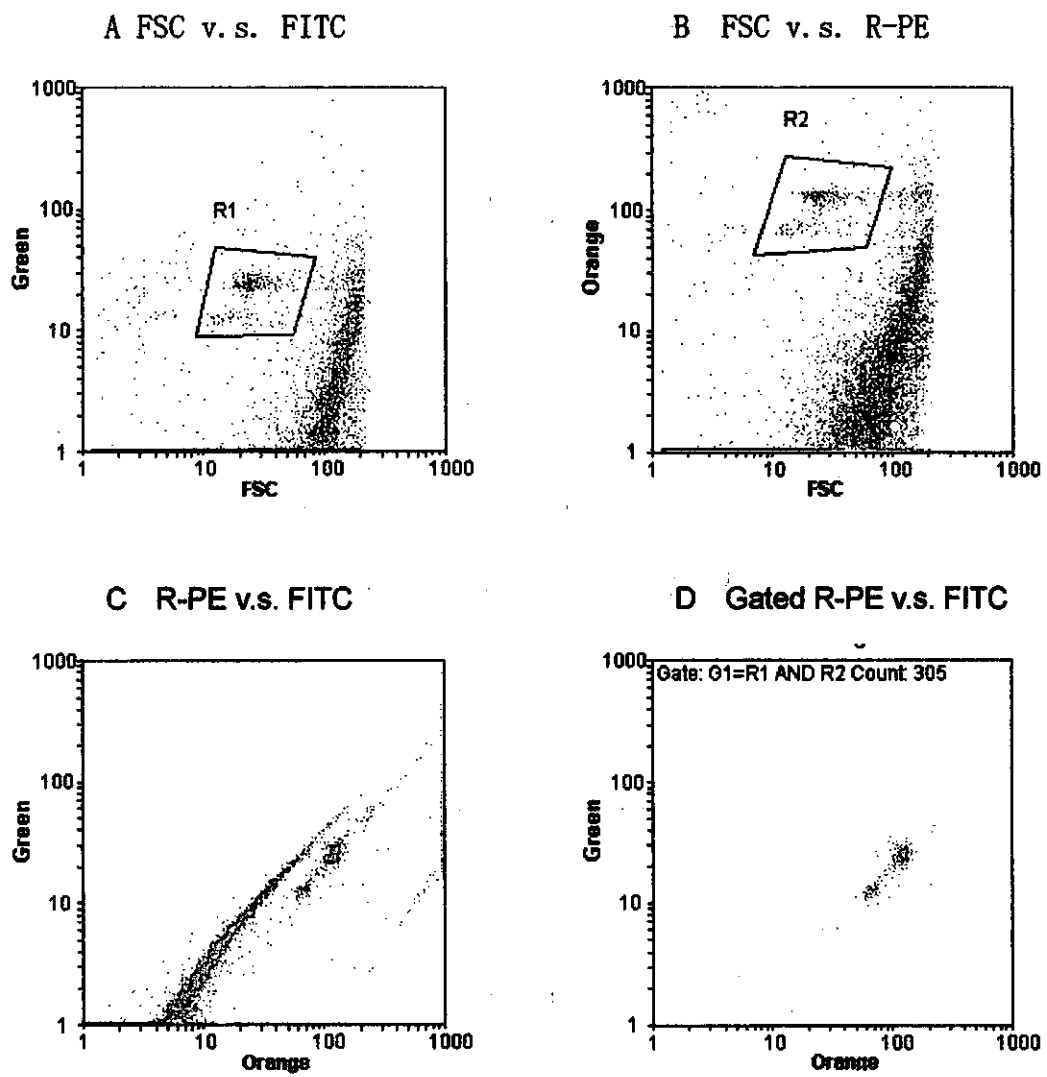


Fig. 3 フローサイトメーターで測定した二重染色のオーシスト

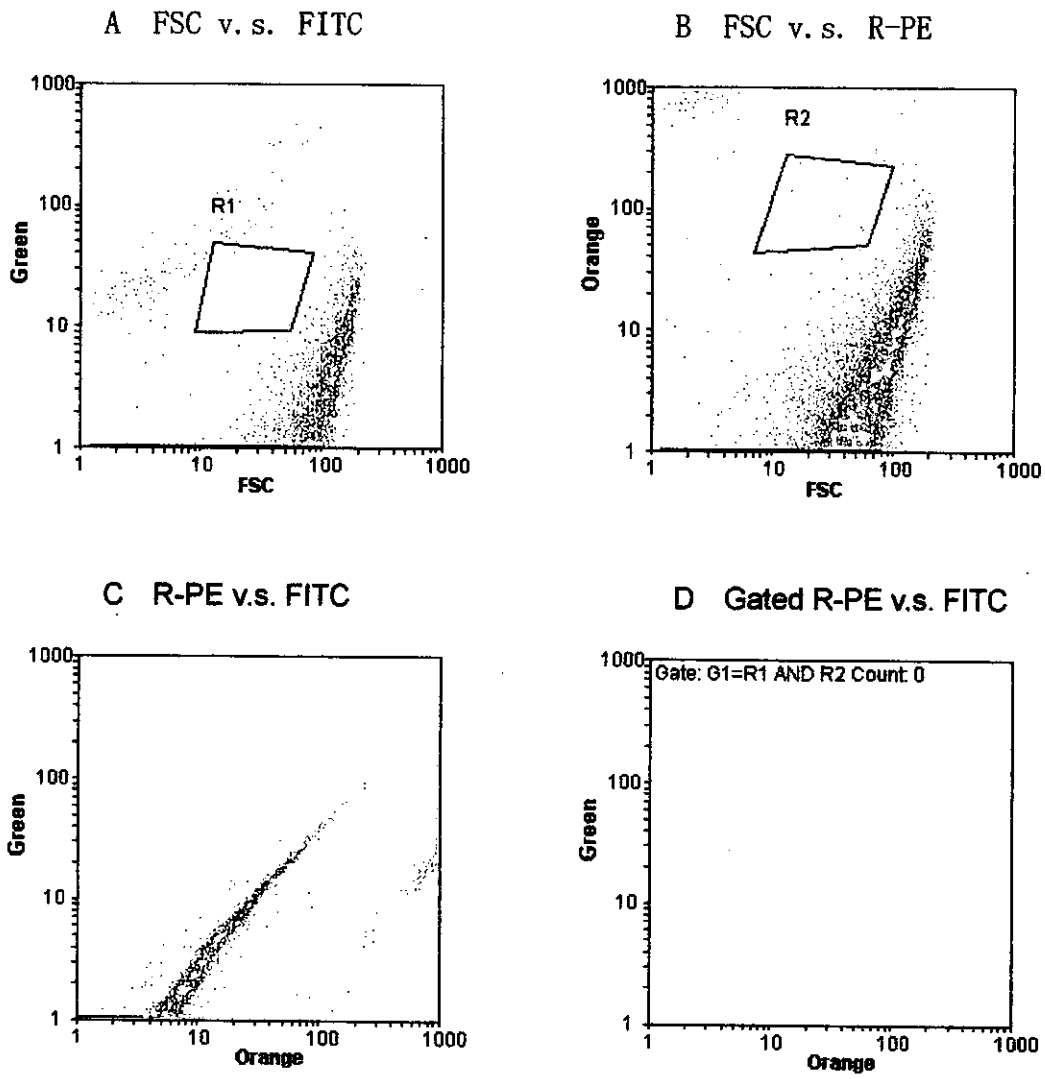


Fig. 4 二重染色オーシストの陰性コントロール

平成 10 年度 厚生科学研究

輸入農産物の試験方法に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所 食品試験部

1999年1月1日現在、日本で残留基準が設定されている農薬は179種である。基準設定された農薬数及び農産物数の増加に対応して残留農薬検査を効率的に行うため、厚生省では残留農薬迅速分析法開発検討委員会を平成6-9年に発足させ、告示農薬の一斉分析法の開発を行ってきた。この成果の一部は既に公表されている¹⁾が、この一連の検討の中で最も重要な部分はクリーンアップ行程である。特に穀類・豆類等の農産物に含まれる脂質はGC並びにHPLCにおいて農薬の測定に妨害を及ぼすため、これらの脂質含有性農産物については脱脂行程が必要不可欠となる。

穀類・豆類中の残留農薬分析における脱脂方法としては従来用いられてきたn-ヘキサン/アセトニトリル分配法^{2,3)}の他に、ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC)⁴⁻⁷⁾、固相抽出 (solid phase extraction, SPE) カートリッジを用いるエクストレルート/Sep-Pak[®] C₁₈法^{1,8,9)}等がある。本報告では実際の残留農薬分析において、どの方法が脱脂効率・操作性等において有利なのかを比較検討した。

まず、残留農薬迅速分析法開発検討委員会の方法¹⁾に基づいて抽出及びカラム精製を行い、上記の3法すなわちn-ヘキサン/アセトニトリル分配法、GPC、エクストレルート/Sep-Pak[®] C₁₈法による脱脂方法をピレスロイド系農薬について比較検討した。また近年農薬の抽出法として簡便、迅速かつ自動化が可能な超臨界流体抽出法 (Super critical fluid extraction, SFE)¹⁰⁾が使用され始めたので、本法を穀類に適用した場合の脱脂効果についても検討した。

さらに、SFEで抽出し、Extrelut[®]/Sep-pak[®] C₁₈、GPC、Sep-pak[®] フロリジルで脱脂・クリーンアップした後、HPLCで親水性農薬を含む多成分一斉スクリーニング法についても検討した。

実験方法

1. 試薬及び装置

1. 1. 試料

玄米、小麦は大阪市内の米穀店で、サラダ油（大豆油と菜種油の混合物）及び大豆、とうもろこしは大阪府下の小売店で購入した。

1. 2 農薬標準溶液

農薬標準品は林純薬工業（株）、和光純薬工業（株）またはルセル・ユクラフ社より購入した。これらの農薬をそれぞれ *n*-ヘキサンあるいは酢酸エチルに溶解して1 mg/mlの濃度に調製したものを農薬標準原液とした。

農薬標準A混液：シフルトリン、フルシトリネート、フェンバレレート、トラロメトリンは40 μ g/ml、ピレトリンは80 μ g/mlとなるようにアセトンで調製した。

農薬標準B混液：シハロトリン、ペルメトリン、シペルメトリン、フルバリネート、デルタメトリンは40 μ g/mlとなるようにアセトンで調製した。

農薬標準C混液：イマゾスルフロン、イナベンフィド、ジクロメジン、テブフェノジド、ペンシクロン、テクロフタラムイミド、エトフェンプロックスは20 μ g/ml、イプロジオン、ジフェノコナゾールは40 μ g/mlとなるようにイソプロパノールで調製した。

農薬標準D混液：カルバリル（NAC）、ブプロフェジン、ベンフレセート、ピラゾキシフェン、イプロジオン代謝物は20 μ g/ml、トリフルミゾール代謝物は40 μ g/ml、テクロフタラムは60 μ g/mlとなるようにイソプロパノールで調製した。

1. 3. 試薬

アセトン、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、シクロヘキサン、アセトニトリル、ジエチルエーテルは残留農薬分析用を用いた。塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは試薬特級を用いた。水は再蒸留イオン交換水を用いた。

1. 4. 装置

超臨界流体抽出装置：日本分光（株）社製、Super-201型

高速液体クロマトグラフ：島津製作所（株）製LC-10A（ポンプ）、SPD-M10A（フォトダイオードアレイ検出器）及びRF-10A（蛍光検出器）を直列に配置
ガスクロマトグラフ：島津製作所（株）製GC-17A（電子捕獲型検出器，オートインジェクターAOC-17）

GPC分取装置：Waters社製510型 HPLCポンプ，717 plus型オートサンプラー，486型紫外可視検出器，フラクションコレクター

固相抽出用カートリッジカラム：Waters社製Sep-Pak[®] plusシリカ（690 mg），Sep-Pak[®] plusフロリジル（910 mg），Sep-Pak[®] plus C₁₈（360 mg）とMerck社製Extrelut[®] 3

2. 溶媒抽出法

2. 1 試験溶液の調製法

粉碎して均一化した玄米20 gをブレンダーカップに計り取り，水40 mlを加えて2時間膨潤させた．アセトン100 mlを加えブレンダーで3分間（10,000 rpm）ホモジナイズし，吸引ろ過した．残渣をアセトン50 mlで洗浄し，ろ液と洗液を合わせ50 mlまで減圧濃縮した．濃縮液に10%食塩水100 ml及び酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液（2:8）100 mlを加え，5分間振とうした．有機層をとり，水層に酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液（2:8）50 mlを加え5分間振とうした．有機層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後溶媒を留去した．

2. 2 脱脂法

A) GPC：2. 1で得た残留物を酢酸エチル/シクロヘキサン混液（1:1）4 mlに溶解し，2 mlをGPCに注入して65-95 mlの溶出画分を分取して減圧乾固した．残留物をアセトン/*n*-ヘキサン混液（15:85）1 mlに溶解し，試料液とした．

B) *n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法：2. 1で得た残留物を*n*-ヘキサン20 mlに溶解し，*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mlを加えて5分間機械振とうし，アセトニトリル層を分取した．*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mlを加え，同様の操作を2回繰り返した．アセトニトリル層を合わせ，減圧乾固した．残留物をアセトン/*n*-ヘキサン混液（15:85）1 mlに溶解し，試料液とした．