

厚生科学研究費補助金
(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

平成11年度 総括研究報告書

主任研究者 武田直和
国立感染症研究所 ウイルス第二部

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
総括研究報告書

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
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 11種類の遺伝子型（結果的に11種類の血清型）のノーウォークウイルス（NV）を中空粒子として発現し、抗体ELISAを構築した。9種類の血清型を検出できるELISAをキット化し、国内80以上の機関に配布し、本年度冬季のウイルス検出に供した。GIおよびGGIIに単独、あるいは交差性に認識する単クローン抗体を105種作製した。これらは反応性の相違から8群に分類された。またサッポロウイルスに特異的な抗体も5種類得られた。one tube RT-PCRの条件検討し、確認のためのハイブリダイゼーションを液相で行なう手法を開発した。予め国内で分離されたウイルスの遺伝子系統解析を行い、これに基づいてプライマーおよびプローブを調製して各検査機関に配布した。チバウイルスについて、3'末端のポリAを除く7,697塩基の全塩基配列を決定した。アストロウイルス構造蛋白のデータベースを構築し、46ヶの塩基配列の比較が可能になった。アストロウイルス抗原検出ELISAを援用した中和試験法を開発した。7種類のNV抗原を型別できるELISA法を用いて食中毒事例、小児散発事例の糞便検体について抗原検出を行なった結果本ELISAがNV感染症の疫学的解析に極めて有用であることが示された。生カキ、海水、下水からNV遺伝子を増幅し、SSCPで解析した。下水からのNVの検出は感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎の発生動向と一致していた。1995年から2000年に乳幼児あるいは食品関連下痢症から得られたNVの遺伝子型を決定した結果、各年により、主流の遺伝子型が異なる傾向にある異が明らかになった。東京湾の海水、生カキに存在するF特異大腸菌ファージの実態調査から、海水中の微生物濃度に日中変動、季節変動は認められないこと、F特異大腸菌ファージは大腸菌群よりカキに蓄積されやすいことが明らかになった。カキ養殖海域のNVの分布と汚染指標を調べた結果、NV遺伝子の検出は細菌汚染度の高い地点で多く、カキにおいてはfecal coliformMPNが230を、海水においてはtotal coliformが70を越えるとそれ以下に比べて6～7倍高くなることが示された。ヒトロタウイルスVP2とVP6からなる空粒子を免疫アジュバントと共に経鼻接種することによって血中IgG、便中IgA抗体を誘導することができ、感染防御に有効であった。わが国の高度なNV検出技術を維持するため、実際の研究者が実験台において参照できるマニュアルを作成して国内の103機関に配布した。

分担研究者	秋原志穂	東京大学大学院医学系研究科	
牛島廣治	東京大学大学院医学系研究科	南部みほ	東京大学大学院医学系研究科
田中智之	和歌山県立医科大学医学部	王 秋紅	東京大学大学院医学系研究科
谷口孝喜	藤田保健衛生大学医学部	北本憲利	姫路工業大学
大垣眞一郎	東京大学大学院工学系研究科	小林慎一	愛知県衛生研究所
栄 賢司	愛知県衛生研究所	鈴木康元	愛知県衛生研究所
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
斎藤博之	秋田県衛生科学研究所	吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所
坂本征則	広島県保健環境センター	近藤玲子	愛媛県立衛生環境研究所
篠崎邦子	千葉県衛生研究所	福田伸治	広島県保健環境センター
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究所	高尾信一	広島県保健環境センター
染谷雄一	国立感染症研究所	徳本静代	広島県保健環境センター
名取克郎	国立感染症研究所	長谷川斐子	国立感染症研究所
西尾 治	国立公衆衛生院	松野重夫	国立感染症研究所
		佐藤俊則	デンカ生研株式会社
協力研究者	鎌田公仁夫	デンカ生研株式会社	

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ノーウォークウイルス (NV) 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NV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HuCVによるものであること、予想に反しNV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NV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NV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、NV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NVの分布、生態が解明でき対策が可能となる。カキおよび海中の病原ウイルスの挙動を調べるための指標微生物として、既存の指標である大腸菌群と、有望な指標といわれている大腸菌フェージとを比較する。また、カキのウイルス汚染のリスクを、指標微生物の測定によって評価する方法を開発する。本研究ではPCR法と並行して組換え蛋白および単クローン抗体を用いるELISAおよびラテックス凝集によるNV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。HuCV汚染指標の開発、およびNVの消毒方法の検討は、カキに濃縮されるウイルスの消毒はこれまで検討されてはいるがいまだ有効な手段はない現状において、将来的には実用面で重要なデータが蓄積できる。カキ中のウイルスは環境中から取り込まれたものである。したがって、カキを原因としない下痢症の流行とも何らかの関連があるものと予想される。両者をつなぐ要素として生活廃水が河川を通して海へ流れ込むルートを想定し、汚染状況を調査する。これによってNVによる食中毒 (下痢症) の全体像が把握でき、予防対策を立てるのに必要な情報を得ることができる。

B. 研究方法

(1) RT-PCRによるNV遺伝子検出：ポリメラーゼ領域をターゲットにした36/35、M4/M3、NV82/NV81(SM81)、Yuri22F/Yuri22R等のプライマーを用いた。同時に、EMBLおよびGenBankから抽出したNV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用いた。食品の中でNV遺伝子の検出が確認されているのは主としてカキであるが、この中腸腺を用いた。

(2) NV全遺伝子配列の決定：患者便材料からNV粒子を分離してRNAを抽出後、常法通りcDNAを合成した。全塩基配列が既知のNVウイルス株の配列に基づいて作成したプライマーを用いてPCR反応を行い、増幅断片をクローン化後その塩基配列を解読した。ゲノムの5'末端の塩基配列の決定には5'RACE法を用いた。

(3) SSCPによる遺伝子解析：5'末端をビオチン化したPCR用プライマーYuri22F、Yuri22Rを用い、NVのポリメラーゼ領域を増幅した。増幅産物をSSCPで解析した。

(4) 単クローン抗体の作製：NVのGI4種類、GII7種類、SV1種類の計13種類の組換え中空粒子をBALB/cマウスに免疫し、常法どおり摘出脾細胞とマウスPAIミエローマ細胞で融合した。培養上清をそれぞれの中空粒子を抗原に用いたELISAでスクリーニングした。陽性クローンはマウスの腹空に接種して腹水を採取し、ウエスタンブロット法等で性状を解析した。

(5) NV中空粒子の作製と応用：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塩基を増幅し、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クターに組込み、組換えバキュロウイルスを作出した。発現はTn5細胞に組換えバキュロウイルスを感染し、5~6日間培養した上清をSDS-PAGEで解析して58K蛋白を確認し、さらに電子顕微鏡でVLPsを観察することによって確認した。培養上清からCsCl平衡密度勾配遠心法でVLPsを精製濃縮した。これを免疫原として高力価血清を作製し、VLPsを抗原に用いたELISA法による交叉反応試験を行った。また同VLPsを抗原として患者および健常人の血清中の抗体価を測定した。

(6) アストロウイルスの構造蛋白遺伝子の解析：培養したウイルス粒子からRNAを抽出した。常法通りRT-PCRによって構造蛋白領域を増幅後、塩基配列を解読した。本実験で解読した3株、既に解読した33株、他の機関で解析された10株の計46株の全構造蛋白領域を遺伝子系統解析して系統樹を作成した。アミノ酸のホモロジーを比較して、I領域(1-424)、II領域(425-688)、III領域(689-776)、IV領域(777-end)に分割して比較した。

(7) ロタウイルス人工空粒子の作製とマウスへの経鼻接種：全塩基配列の決定されているKU株(G1、P1A)の全構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現した。このうちVP2とVP6、VP2とVP6およびVP7を共発現してそれぞれ自己集合した一重人工空粒子と二重人工空粒子を作製した。VP2/VP6粒子を免疫原として、大腸菌由来易熱性トキシン、コレラ菌由来易熱性トキシンをアジュバントとしてマウスに経鼻接種した。

(8) カキ、養殖海域の汚染調査と汚染指標の検索：養殖カキをサンプリングしてその中腸腺に濃縮されているNV遺伝子をRT-PCR法で検出した。また海水および汽水中の微量蛋白成分を陽電荷フィルター、ポリエチレングリコール等で濃縮後、同様にRT-PCR法でNV遺伝子を検出した。PCRで陽性となったサンプルはサザンハイブリダイゼーションによる確認を行なうとともに塩基配列を解読した。また、カキ養殖海域海水の衛生評価の指標にバクテリオファージが利用できないか検討するため、東京湾に定点を設置し、海水およびカキに含まれる大腸菌群数、F特異大腸菌ファージ数等を測定した。海水は同時にpH、電気伝導度等を計測した。

C. 研究結果

下痢症ウイルスの検出法

(1) ノーウォークウイルス(NV)抗原ELISA法の確立

わが国ではこれまでに13種類のNV遺伝子型が検出されているが、本年度は11種類の遺伝子型(結果的に11種類の血清型)をウイルス様中空粒子として発現することに成功した。このうち9種類の血清型を検出できるELISAをキット化し、国内80以上の機関に配布し、本年度冬季のウイルス検出に供した。

(2) NVおよびサッポロウイルス(SV)中空粒子に対する単クローン抗体の作製と抗原ELISAへの

応用

NV Genogroup I (GI) およびGenogroup II (GII)に単独、あるいは交差性に認識する単クローン抗体を105種作製した。これらは反応性の相違から8群に分類された。GIを特異的に認識する抗体が1種類、GIのみならずGIIをも広く認識する抗体5種類が得られた。またSVに特異的な抗体も5種類得られた。

(3) NV抗体ELISA法の確立

組換えバキュロウイルスを用いてノーウォークウイルス構造蛋白の発現を試み、GIの4株、GIIの7株の計11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NV間の血清学的近縁関係を明らかにした。さらに中空粒子を抗原としてNVの血清疫学、および患者の血清学的診断が可能になった。

(4) NV RT-PCR法の確立

約300本のポリメラーゼ領域の塩基配列を比較して、全てのNVの増幅が可能と思われる14組17本のプライマーを設計した。実際には混合プライマーとして用いた。コンタミを防ぐためのone tube RT-PCRの条件検討し、確認のためのハイブリダイゼーションを液相で行なうことによって検出感度の向上と検査時間の大幅な短縮が可能になった。カキの中腸腺からRT-PCR法でNVを検出する系も確立したが、カキ以外の食品からの検出は難しく、課題として残っている。

(5) NVポリメラーゼおよび構造蛋白遺伝子領域のデータベースの整備

RT-PCR法はハイブリダイゼーションによって確認検査が行われているが、プローブが合わない状況がしばしばみられている。これを回避し迅速同定を行なうため予め国内で分離されたウイルスの遺伝子系統解析を行い、これに基づいてプライマーおよびプローブを調製して各検査機関に配布した。プローブは多くの種類を混合することにより確実性が高まった。

(6) NV全塩基配列の決定と検出への応用

NV GIに含まれるチバウイルスについて、3'末端のポリAを除く7,697塩基の全塩基配列を決定した。他のGIウイルスの配列と比較することによって、構造蛋白領域に設計したプライマーの妥当性を評価した。

(7) アストロウイルス構造蛋白領域の塩基配列の解読と分子系統解析による同定

ブタアストロウイルスとヒト7型アストロウイルスの構造蛋白領域の塩基配列を新たに決定し、ネコ

アストロウイルスを含むアストロウイルス構造蛋白のデータベースを構築した。46ヶの塩基配列の比較が可能になり、系統解析によるアストロウイルス迅速同定の可能になった。

(8) アストロウイルス中和試験法の検討

アストロウイルスは感染細胞に対して細胞変性を引き起こさないため中和試験の判定が困難である。そこでアストロウイルス抗原検出ELISAを援用することによって解決した。愛媛県の住民の抗体保有状況は1型と2型では大きく異っていた。また抗体保有状況は同一地域で検出されるアストロウイルスの血清型の分布と一致していた。

下痢症ウイルスの疫学

(1) ELISA法によるNVの検出

7種類のNV抗原を型別できるELISA法を用いて愛知県、千葉県、愛媛県の食中毒事例、小児散発事例の糞便検体について抗原検出を行なった結果、NV流行期の主要な流行株を特定することが可能であること、NVとロタウイルスの流行時期に明らかな違いがあること、カキ関連食中毒では同一事例、同一人から複数の血清型が検出されること、キットに含まれていない血清型を除くとEMおよび1st PCRに匹敵した検出感度を有することなどが明らかになり、本ELISAがNV感染症の疫学的解析に極めて有用であることが示された。

(2) SSCPによるNV流行経路の解析

秋田県、広島県で採取した生カキ、海水、下水からNV遺伝子を増幅し、SSCPで解析した。12月に入った時点で下水中にNVが検出され、1-2月も検出された。下水からのNVの検出は感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎の発生動向と一致していた。また、下水処理場を経た後もNVは全く影響を受けることなく検出された。下水中には遺伝学的に雑多なNVが含まれていた。海水、および生カキから検出されたNVの遺伝子解析の結果も下水のそれとほぼ同様であった。

(3) わが国で検出されるNVの遺伝子型

PCRの確認試験のためのプローブ作製、プライマーの設定および分子疫学的解析を行うに当たり、遺伝子配列を決定する必要がある。1995年から2000年に乳幼児あるいは食品関連下痢症から得られたNVの遺伝子型を決定した結果、各年により、主流の遺伝子型が異なる傾向にある異が明らかになった。診断用プローブは15種類作製し、実際の確認試験に用いたところ、97%が陽性となった。プローブは多くの種類を混合することにより診断の確実

性が高まった。カキによる下痢症の集団発生では、患者から5つの異なる遺伝子型が検出された。

下痢症ウイルスの汚染指標

(1) 東京湾の海水、生カキに存在するF特異大腸菌ファージの実態調査

海水中の微生物濃度が比較的高い東京湾を調査対象区域として、1年間を通じてF特異大腸菌ファージ濃度を測定し、その挙動の日中変動および季節変動を調べて大腸菌群のそれらと比較した。海水中の微生物濃度に日中変動、季節変動は認められないこと、F特異大腸菌ファージは大腸菌群よりカキに蓄積されやすいことが明らかになった。

(2) カキ養殖海域のNVの分布と汚染指標

カキ養殖海域に流れ込む下水、河川および海域の海水からNV遺伝子を検出した。1999-2000年のシーズンは養殖カキの66.7%、海水の29.2%、汽水の4.1%、市販生食用カキの62.5%からNV遺伝子が検出された。検出率に年変動があり、一年おきに増減が繰り返される傾向はみられた。1997-2000年までの3シーズンにおけるNV遺伝子の検出は1、2月にピークになった。NV遺伝子の検出は細菌汚染度の高い地点で多く、カキにおいてはfecal coliform MPNが230を、海水においてはtotal coliformが70を越えるとそれ以下に比べて6~7倍高くなることが示された。

下痢症ウイルスの予防法

(1) ヒトロタウイルス人工空粒子の作製と応用
組換えバキュロウイルスを用いてVP2とVP6、あるいはVP2、VP6、VP7の共発現を行い、人工空一重殻粒子および人工空二重殻粒子を産生した。VP2とVP6からなる空粒子を免疫アジュバントと共に経鼻接種することによって血中IgG、便中IgA抗体を誘導することができ、感染防御に有効であった。小児下痢症の主要病原体であるロタウイルスを予防する上で有用な知見が得られた。

その他

(1) ウイルス性下痢症診断マニュアルの整備と配布

わが国の高度なノーウォークウイルス検出技術を維持するため、実際の研究者が実験台において参照できるマニュアルを作成して国内の103機関に配布した。

(2) ウイルス性下痢症技術研修会

平成11年国立公衆衛生院で開催された小型球形ウ

イルス（ヒトカリシウイルス）技術研修会において、本研究の班員が主催者、および講師として参加し、研究班で開発された技術、手技等を伝達した。

D. 考察

集団発生であれ散発例であれウイルス性下痢症が発生した場合、まず初めにすることは患者便材料からのウイルス抗原検出である。あくまでもEM法が標準法ではあるが、迅速性、容易さ、感度、費用の点からこれに変わる方法の開発が急務であった。本年度は合計11種類の血清学的に異なるノーウォークウイルス(NV) 中空粒子を手にすることができた。これらの中空粒子を免疫して高度免疫血清を得て、現在までに9種類のNV抗原を検出できるELISA法の開発に成功した。またキット化にも成功したので、材料が得られれば3-4時間で診断が可能になった。本キットは3種類のNV GIと、6種類のNV GIIをそれぞれまとめてGI、GIIとして検出するものである。キットは既に国内80以上の機関に配布し、本年度の流行で評価が進行中である。近々わが国におけるNVの流行を詳細に把握できるものと期待される。また、7種類のNVの抗原型を識別可能なELISA法を用いて小児の散発性下痢症患者の糞便を検査した結果、主要な流行株を明らかにすることも可能になってきた。NVとロタウイルスの流行時期に明らかな違いも認められ、今回のNV検出用ELISAは抗原性の異なるNVを型別して検出できることから、NV感染症の流行状況の把握などの疫学的解析に有用な方法と考えられた。

一方、これらの中空粒子を抗原にして患者血清中のIgGを検出するELISA法を構築することができた。これによって、糞便材料は採取できないが血清はとれるという状況での原因ウイルスの同定に威力を発揮するであろう。NVの血清疫学のための抗原を無限に産生する系が確立できたことになる。

中空粒子を抗原にして単クローン抗体を作製した。現在手にしている105種の中にGIのウイルスを特異的に認識するものがあつた。これを用いた抗原ELISAを構築し、患者糞便材料を測定したところ80%が陽性となった。この抗体はGIIウイルスは全く反応せずGI特異的であつた。今後多くの血清型の存在が明らかになっているGIウイルスを幅広く検出する試薬を構築する異が可能である。これとは逆にGIウイルスは全く反応せずGII特

異的なクローンも得られており、これらを組み合わせることによってGI、GII全てのNVを検出できる試薬が期待できる。これらはまだ我々が手にしていない新規のウイルスに対しても認識できる可能性を十分に秘めている。本年度はサッポロウイルスに対する単クローン抗体も得られたことから、ヒトに病原性をもつカリシウイルスの診断が経済的に且つ迅速に行なうことが現実的になってきた。

NVのRT-PCRにおいて、増幅領域とプライマーの設定が常に問題になってきた。本年度、全塩基配列を決定したチバウイルスは全塩基配列は解読された5番目のNVとなった。特異性の高いプライマーを設計するために、これまでに解析された遺伝子型とは異なるウイルスの全塩基配列を決定することが必須である。チバウイルスで得られた結果を詳細に解析することによって、より適切なプライマーの設計が可能になる。

本年度は、より増幅効率の高いプライマーを構造蛋白領域に設計し、生カキから効率良くNVを検出できる手法を開発した。またNVのポリメラーゼと構造蛋白領域のデータベースを独自に構築し、系統解析による同定法を確立した。今後新規の塩基配列は本データベースに基づいた遺伝子系統解析による迅速な同定が可能である。

1995年から2000年にわが国の乳幼児あるいは食品関連下痢症から得られたNVのポリメラーゼ領域を解析した結果、GIが5種類、GIIが9種類存在していることが明らかになった。プローブは多くの種類を混合することにより診断の確実性が高まったことから、今後国内で配布するプローブも混合したものを用いるべきである。カキによる下痢症の集団発生では、患者から5つの異なる遺伝子型が検出された。これはカキが複数のウイルスに汚染されていたことによると推察された。カキの汚染をいかに防いでゆくかが今後の大きな課題である。

カキ、海水、河川からNV遺伝子を増幅し、SSCPで解析した結果、患者の糞便が下水を通過して海へ放流され、カキの養殖場を汚染する結果として生カキによる食中毒が発生するという図式が確認された。現在の汚水処理システムではNVを除去できないことが明らかになり、生カキによる食中毒の予防には下水処理システムの改善が不可欠であることが明確となった。

カキ、養殖海域の汚染調査と汚染指標の検索においては、カキ生産県である広島県の養殖海域において、カキ、海水および汽水についてNV汚染実態調査を実施した結果、NV遺伝子の検出と汚染指

標菌には相関がみられた。今後さらに計測を続け、汚染指標としての有効性を評価する価値があろう。

ヒトと動物を含めた46株のアストロウイルス(AstV)で全構造蛋白遺伝子の塩基配列を比較することが可能になった。AstVは比較的軽症に経過するため重要視されていないが、大集団での発症があること、免疫不全である場合は重篤になることが知られている。現在までに8種類の血清型に分類されるAstVが、遺伝子系統解析によって迅速に同定されることが期待される。

ロタウイルス人工空粒子を粘膜アジュバントと共に経鼻接種した結果、感染防御抗体が産生されることが明らかになった。注射によらない安全なワクチンを開発する上で今後ヒトへ応用、活用されることが期待される。

わが国の高度な下痢症ウイルス検出技術を維持するためには、実際の研究者が実験台において参照できるマニュアルを整備、適宜改定されたものを提供してゆく必要がある。下痢症ウイルスの多くはRNAを遺伝子に持つウイルスであるため高速に変異が遺伝子内に蓄積される。さらに同じ血清型のウイルスであっても地域ごとに遺伝学的に異ったウイルスが流行するのが常である。したがってマニュアルの内容を確実なものにするためには、わが国で分離されるウイルスについて遺伝学的、血清学的性状を常時監視し、それらを効率良く検出するための予備実験が不可欠である。NVに関しては、本年度作成したマニュアルによって、RT-PCR法およびハイブリダイゼーションによる同定法の確立と標準プロトコールの作成が完成した。ウイルス性食中毒の大部分を占めるNVの診断に、常に実験台の脇において活用されることが期待される。

E. 結論

糞便およびカキ中腸腺からのNVの検出法は、RT-PCR法と抗原ELISA法の確立、診断マニュアル作成と標準プロトコールの配布、プライマーとプローブの配布によってほぼ確立したものとなった。抗体ELISAによる診断も可能になった。しかしカキ以外の食品からのNV検出は依然として困難である。カキ、海水、汽水から高率にNV遺伝子が検出される。カキの汚染を防ぐには河川の汚水処理が重要な課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Hale, A. D., T. N. Tanaka, N. Kitamoto, M. Ciarlet, X. Jiang, N. Takeda, D. G. W. Brown, and M. K. Estes. 2000. Identification of an epitope common to genogroup 1 Norwalk-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* in press.
- 2.Kobayashi, S., K. Sakae, K. Natori, N. Takeda, T. Miyamura, and Y. Suzuki. 2000. A serotype-specific antigen ELISA in the detection of Chiba viruses in stool specimens. *J. Med. Virol.* in press.
- 3.Kobayashi, S., K. Sakae, Y. Suzuki, H. Ishiko, K. Kamada, K. Suzuki, K. Natori, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. Expression of Recombinant Capsid Proteins of Chitta virus, a Genogroup II Norwalk-like Viruses (NLVs), and Development of an ELISA to detect the Viral Antigen. *Microbiol. Immunol.* in press.
- 4.Kobayashi, S., K. Sakae, Y. Suzuki, K. Shinozaki, M. Okada, H. Ishiko, K. Kamada, K. Suzuki, K. Natori, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. Molecular Cloning, Expression and Self-Assembly of Recombinant Capsid Protein from a Genogroup I Human Calicivirus. *J. Clin. Microbiol.* in press.
- 5.Li, T.-C., H. Shinzawa, M. Ishibashi, M. Sata, K. Kisoon, E. E. Mast, T. Miyamura, and N. Takeda. 1999. A Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. *J. Med. Virol.* in press.
- 6.Lin, K.-H., P.-Y. Chu, C.-H. Cheng, C.-L. Chern, H.-L. Wang, M.-M. Sheu, W.-L. Huang, Y. Pongsuwanna, S. Yamamoto, S. Yoshino, and N. Takeda. 2000. Molecular epidemiology of a variant of Coxsackievirus A24 in Taiwan. *J. Med. Virol.* in press.
- 7.Tuteja, R., T.-C. Li, N. Takeda, S. K. Panda, and S. Jameel. 2000. Augmentation of immune responses to hepatitis E virus ORF2 DNA vaccination by codelivery of cytokine genes. *Viral Immunology.* in press.
- 8.Natori, K., K. Suzuki, Y. Yamakawa, M. Tatsumi, K. Sakae, S. Kobayashi, K. Shinozaki, H. Ishiko, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. Expression and self-assembly of capsid proteins of the Chiba virus, a genetically distinct Norwalk-like virus. submitted.

9. Tamura, M., K. Natori, M. Kobayashi, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. Interaction of Recombinant Norwalk-like Virus Particles with 105-Kilodalton Cellular Binding Protein, a Candidate Receptor Molecule for Virus Attachment. submitted.
10. Someya, Y., N. Takeda, and T. Miyamura. 2000. Complete Nucleotide Sequence of the Chiba Virus Genome and Functional Expression of the 3C-like Protease in *Escherichia coli*. submitted.
11. Li, X., K. Kato, T. Li, N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammer, and H. Cheng. 1999. Self-assembled recombinant hepatitis E virus particle is a T=1 dual-domain capsid presenting native virus epitopes. *Virology*. 265:34-45.
12. J. Okada, T. Urasawa, N. Kobayashi, K. Taniguchi, A. Hasegawa, K. Mise, S. Urasawa: New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J. Med. Virol.*, 60:63-69, 2000.
13. C. Zao, W. Yu, C. Kao, K. Taniguchi, C. Lee: Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortment of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastro-enteritis. *J. Gen. Virol.*, 80:1407-1415, 1999.
14. J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, H. Shiomi: Functional analysis of the heterologous NSP1 genes in the genetic background of simian rotavirus SA11. *Arch. Virol.*, 144:1439-1449, 1999.
15. J. Okada, N. Kobayashi, K. Taniguchi, S. Urasawa: Analysis on reassortment of rotavirus NSP1 genes lacking coding region for cysteine-rich zinc finger motif. *Arch. Virol.*, 144:345-353, 1999.
16. Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Jiang and Mary K. Estes. Oral administration of the recombinant Norwalk virus-like particles produces the most efficient monoclonal antibodies (Submitted for publication)
17. Noritoshi Kitamoto, Tomoyuki Tanaka, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Shuji Nakata, Xi Jiang and Mary K. Estes. Cross-reactivity among several recombinant Calicivirus-like particles with monoclonal antibodies. (Submitted for publication)
18. Hiroyuki Saito, Shioko Saito, Kazuko Kamada, Seizaburo Harata, Hiroyasu Sato, Morihiro Morita and Yoshimichi Miyajima. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV Strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiology and Immunology* 42, No.6, 439-446 (1998)
19. Yumei ZHOU, Miyuki NAKAYAMA, Ayako HASEGAWA, Bosu KIM, Shuichi NISHIMURA, Shuzo CHIBA, Shuji NAKATA, Kumiko KANESHI, Yuichi UEDA, Shigekazu NAKAYA, Osamu NISHIO, Hiroshi USHIJIMA. Serotypes of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1996, *J.J.A.Inf.D.*, 73(1) 35-42, 1999.
20. Oseto M., Yamashita Y., Yoshida K., Kondo R., Asai T., Inouye H., Nakano S. and Ishimaru Y. Serotype of Astrovirus isolated from children in sporadic gastroenteritis cases in Ehime prefecture 1981-1997. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52:134-135 (1999).
21. 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
22. Zhou Y, Ushijima H, et al. Serotype of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1997. *J Jap Assoc Infect Dis* 73: 3 5 - 4 2, 1999
23. Hachiya M, Ushijima H et al. Genetic variation in the capsid region of human astrovirus serotype 4 isolated in Japan. *Microbiol Immunol* 43:1067-1070, 1999.
24. Sakamoto T, Ushijima H et al. Molecular epidemiology of astrovirus in Japan from 1995 to 1998 by RT-PCR with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol* in press
25. 李天成、武田直和、宮村達男. 2000. E型肝炎. 化学療法の領域. 16:169-173.
26. 染谷雄一、名取克郎、武田直和、宮村達男. 1999. ヒトカリシウイルスの多様性. 臨床とウイルス. 27:294-303.
27. 武田直和、名取克郎、宮村達男. 1999. ヒトカ

リシウイルス感染による急性胃腸炎. モダンメヂア. 45:169-179.

28. 武田直和、染谷雄一、名取克郎、宮村達男. 1999. ヒトカリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎. 臨床栄養. 94:768-774.

29. 斎藤博之、八柳潤、佐藤宏康、宮島嘉道、鈴木紀行、森田盛大. 老人保健施設内で集団発生したSRSV感染症に関する調査報告. Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.18、No.6、5-6 (1997)

30. 斎藤博之、斎藤志保子、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道. 最近のSRSV流行事例における効果的なRT-PCR法の検討. Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.19、No.1、pp5 (1998)

31. 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道、鑑屋公雄、高橋勝美、添野武彦. 老人保健施設内で集団発生した小型球形ウイルス感染症に関する調査報告(第2報). Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.20、No.11、5-6 (1999)

32. 原みゆき、古屋由美子、片山丘、今井光信、長谷川斐子、西尾治、A群ロタウイルスが検出された食中毒様胃腸炎の集団発生事例について、病原微生物検出情報、Vol20 (7)170(1999)

2. 学会発表

国際学会

1. Kobayashi S, Yamashita T, Sakae K, Kamata K, Satoh T, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y. Detection of Norwalk-like viruses by a serotype-specific ELISA based on seven antigenically distinct recombinant capsid proteins. Thirty-third Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28-30, 1999, Washington, DC, USA.

2. Li T-C, Takeda N, Miyamura T. 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. Tamura M, Natori K, Kobayashi S, Sakae K, Shinozaki K, Sakurai N, Miyamura T, Takeda N. Characterization of recombinant Norwalk-like virus particle-binding protein: a candidate cellular receptor molecule for the virus. Thirty-third Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28-30, 1999,

Washington, DC, USA.

4. Takeda N, Natori K, Kobayashi S, Sakae K, Suzuki K, Shinozaki K, Hashimoto O, Ishiko H, Miyamura T. FORMATION AND UTILIZATION OF EMPTY VIRUS-LIKE PARTICLES OF NORWALK-LIKE VIRUSES (NLVs). International Workshop on Human Caliciviruses. March 29-31, 1999, Atlanta, GA, USA.

5. Li T-C, Suzuki K, Takeda N, Miyamura T. A systemic and mucosal immune response in mice by oral immunization with recombinant hepatitis E virus-like particles. Second International Symposium on Hepatology. September 21-25, 1999, Beijing, China.

6. Ishiko H, Shimada Y, Takeda N. Rapid diagnosis of two enteroviruses that cause hand-foot and mouth disease. ASM, 99th General Meeting, May 30 - June 3, 1999, Chicago, USA.

7. Morino, Y., Tanaka, T., Kitamoto, N, Estes, M.K., Nakagomi T. and Nakagomi O. Molecular epidemiology of rotavirus infection which initiated from the AU-1 Norwalk-like viruses genogroup in the southern part of Japan. 33rd US-JAPAN Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28, 1999, Maryland, USA.

国内学会

1. 橋本修、武田直和、石古博昭. 1999. カキ中腸腺からのヒトカリシウイルスの検出とその遺伝子系統解析. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

2. 北元憲利、田中智之、名取克郎、武田直和. 1999. リコンビナントヒトカリシウイルス粒子に対する単クローン抗体の交差性. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

3. 秋山和夫、野池道子、有田有和、沖村容子、白石廣行、名取克郎、武田直和. 1999. かきが原因と推定された集団食中毒事例の血清学的・遺伝学的解析. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

4. 小林慎一、栄賢司、鈴木康元、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直和. 1999. ELISA法によるノーウォーク様ウイルスの検出. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

5. 大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近藤玲子、浅井忠男、井上博雄、鎌田公仁夫、武田直和. 1999. ウイルス性食中毒および散発性下痢症から

検出されるカリシウイルスのプロープ型と血清型の分布. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

6. 田村克、名取克郎、武田直和、宮村達男. 1999. ノーウォーク様ウイルスレセプターの解析. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

7. 武田直和、名取克郎、宮村達男. 1999. 日本で検出されたNLVs(SRSVs)の遺伝子解析. 衛生微生物技術協議会第20回研究会、名古屋.

8. 李天成、加藤賢三、武田直和、宮村達男. 1999. 組換えバキュロウイルスを用いたBKウイルス中空粒子の産生とその応用. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

9. 李天成、武田直和、宮村達男. 1999. E型肝炎ウイルス中空粒子蛋白のC末端構造とウイルス粒子形成の関連. 第47回日本ウイルス学会総会、横浜.

10. 呉 恵霞、辻 孝雄、前野芳正、楠原康弘、陳宏之、佐々木 潤、浦沢正三、谷口孝喜: ヒトロタウイルス人工空一重殻粒子 (VP2/VP6) のマウス経鼻接種における粘膜アジュバントの効果 第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999

11. 陳 宏之、呉 恵霞、前野芳正、楠原康弘、佐々木 潤、左近直美、大石 功、奥野良信、谷口孝喜: 重症複合免疫不全症患者において長期間排泄したロタウイルスの分離とリアレンジメントを起こした遺伝子の解析第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999

12. 北元憲利、田中智之、名取克郎、武田直和 リコンビナントヒトカリシウイルス粒子に対する単クローン抗体の交差性. 第47回日本ウイルス学会、横浜、1999

13. 川本尋義、沢田晴美、西尾 治、ウイルス性食中毒遺伝子検出検査指針確立と行政対応に関する研究、第40回日本臨床ウイルス学会、大阪、1999.5,13-14

14. 鈴木 博、加藤由美子、南部みほ、西尾 治、二枚貝におけるウイルス汚染指標、第58回日本公衆衛生学会総会、大分、1999,10,221-22、頁720

15. 原みゆき、古屋由美子、片山 丘、吉田芳哉、今井光信、長谷川斐子、西尾 治、食中毒様の集団下痢症から検出されたA群ロタウイルスについて、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999,11,7-9 P179

16. 西川 真、渡邊香奈子、新井礼子、篠川 旦、加藤由美子、鈴木 宏、短期間に発生した6集団の急性ウイルス性胃腸炎事例におけるノーウォーク様ウイルスの分子疫学的研究、第47回日本ウイ

ルス学会総会、横浜、1999,11,7-9 P176

17. 加藤由美子、南部美穂、西尾 治、西村浩一、全国各地で検出されたヒトカリシウイルスの遺伝子配列、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999,11,7-9 P197

18. 西尾 治、加藤由美子、鈴木 博、牛島廣治、秋山美穂、輸入食品のウイルス学的安全性について、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999,11,7-9 P199

19. 片山浩之、大垣眞一郎 水中ウイルス指標としての大腸菌ファージの可能性、第2回日本水環境学会シンポジウム

20. 久山哲雄、片山浩之、大垣眞一郎 沿岸域におけるF特異大腸菌ファージの挙動、第34回日本水環境学会年会

厚生科学研究費補助金
(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

平成11年度 分担研究報告書

アストロウイルスのカプシド領域の解析

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、南部みほ、王 秋紅 (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ヒトと動物の下痢症を来すウイルスである。現在までアストロウイルスは8血清型に分類されている。血清型特異的あるいは共通の抗原エピトープが見られる。ここではヒトアストロウイルス (HAstV) と共にブタアストロウイルス (PAstV) カプシド領域の解析を行った。また文献からネコアストロウイルス (FAstV) や HAstV のカプシドも解析に用いた。系統樹から PAstV と FAstV は HAstV とは非常にかげ離れていること HAstV-1,3 と7が近いこと、HAstV-2,4 と8が近いこと、HAstV-5 と6が近いことがわかった。ここでは更に、全カプシド領域を4つの領域に分けた。第1領域は型間で共通性が高く、第2領域は型間で変化が多く、第3領域は型によっては欠損あるいは挿入が見られた。第4領域はホモロジーがやや高かった。血清型4では欠損が大きく認められた。

目的：AstV は直径約 28nm 大のエンベロープのないウイルスである。ヒトと同様ブタ、ネコ、シチメンチョウ、ヒツジ、シカ、マウス、イヌ、ガチョウなどに肝炎を伴いながら胃腸炎をしめす。現在まで動物の AstV がヒトに感染を示した報告はないが、諸外国での新興・再興感染症の勃発をみると研究を進める必要性が考えられる。HAstV は小児の胃腸炎の 7-10%を示す。症状は通常重症ではないが、院内感染や慢性感染を示す。また免疫不全の患者は高い HAstV の感染を示し、慢性の下痢を示すことがある。現在まで HAstV は8型に分けられ、免疫電子顕微鏡法、酵素抗体法などで分類がなされていた。最近、RT-PCR や遺伝子解析での分別が我々を含め行われるようになった。現在まで、乳幼児の感染が多いこと、優勢な血清型は地域や時(年・月)によって異なることがわかっている。しかしなが

ら HAst1 が最も世界的に広がっている。HAstV は約 6.8kb の長さで sRNA (+) である。AstV のカプシドは約 2.4kb でプロテアーゼで2から5の蛋白に分割される。現在モノクローナル抗体を用いて中和エピトープが検討されている。現在まで 1-8 型の HAstV のカプシドの遺伝子での検討は十分にはなされていない。我々は、たまたま PAstV 及び中国で見られた HAstV 5型の流行株・標準株・多くの分離株を解析する機会を得たので報告する。RT-PCR は感度の上で最も優れており、血清型(遺伝子型)を区別するプライマーの作成にも成功しているのでそれを加えて報告する。

材料と方法：PAstV は 1983 年に徳島の農園におけるブタの急性胃腸炎から ESK 細胞を用いて分離された(家畜衛生研究所清水博士より分与)。また 1996 年北京で流行した胃腸炎から我々の開発した方法

で HAstV 5 を見出し、その中から 2 株を遺伝子解析した。RNA はガラスパウダーを用いて抽出し逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。さらに 1st と 2nd PCR で産物を得、シーケンスを行った。我々がすでに解析している HAstV の 33 株のカプシド領域の成績及びにすでに他の機関から報告されている 10 株の成績と比較検討した。

結果：ヒトおよび動物を含めた 46 株の全カプシドアミノ酸の系統樹を図 1 に示す。型内でのホモロジーは 90% 以上であった。型によってカプシドの長さが異なり、4 型が短かった。1 と 3 と 7 型、5 と 6 型、2 と 4 と 8 型が比較的近縁であった。N と C 端は比較的型間でも共通であった。PAstV と FAstV は HAstV とかけ離れていた。ここではアミノ酸のホモロジーの関係から I 領域(1-424)、II 領域(425-688)、III 領域(689-776) と IV 領域(777-end) に分けた。I 領域でみると FAstV は HAstV と比較的ホモロジーは高いものの、PAstV はかけ離れていた。II 領域は型間で非常に異なっていた。しかし型内では類似していた。PAstV、FAstV、HAstV 間では異なっていた。III 領域では欠損、挿入が多く見られた。しかし型内では類似していた。4 型が一番短く、FAstV が一番長かった。IV 領域では比較的ホモロジーは保たれていた(図 2)。

考案：動物にヒトのアストロウイルスを感染させると型特異的な免疫が出来やすいが、感染したヒトでは型特異抗体以外にも共通の抗体が強くてきていることがわかっている。ここでは PAstV と HAstV 7 型のカプシド配列が決定されたことが新

しい。また中国で流行した AstV の血清型を解析でき 5 型であることがわかった。また系統樹を 46 株で行うことも可能であった。HAstV はロタウイルスと比べると重症になることが少なく、重要視されていないが、集団での発症があること、免疫不全の場合は重症もあり得ることがわかっている。抗原エピトープに関する報告では I 領域の C 端付近に中和モノクローナル抗体の反応部位が確認されている。II 領域にも抗原エピトープが考えられている。我々はさらに HAstV 4 には 2 つのサブタイプが存在することを見いだしている。現在遺伝子解析から想定される共通アミノ酸でエピトープと考えられる部位(図 2 の矢印の 20aa と 16aa) の合成ペプチドを作成し、抗原・抗体系の測定等に有効であるかの検討を行っている。III 領域に欠損、挿入が多い理由は我々の解釈を越えるところがある。また HAstV 4 になぜ欠損が際だって多いのかははっきりしない。

尚、昨年度の研究報告では HAstV のラテックス診断法の開発に関して述べた。昨年は 1 型を用いて行ったが、現在 2 型の抗体を作成中で 2 型についてラテックス試薬を作成中である。また昨年某試薬メーカーから酵素抗体法によるアストロウイルスの試薬が市販された。今回、ラテックス凝集法、酵素抗体法を比較し遺伝子増幅法での感度が一番高かった。またラテックスおよび酵素抗体陽性の場合には PCR でも陽性であった。

結論：HAstV および FAstV、PAstV の全カプシド領域の遺伝子解析をし、46 株に於いて比較した。また I-IV 領域に分けて

ホモロジーを検討した。FAstV,PAstV は HAstV かけ離れていること、また HAstV は3つのクラスターに分けられた。II 領域で型間の変異が大きいこと、III 領域は欠損、挿入が見られ I,IV 領域はより保存されていた。

論文発表：

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

ZhouY, Ushijima H, et al. Serotype of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1997. *J Jap Assoc Infect Dis* 73: 35-42,1999

Hachiya M, Ushijima H et al. Genetic variation in the capsid region of human astrovirus serotype 4 isolated in Japan. *Microbiol Immunol* 43:1067-1070, 1999.

Sakamoto T, Ushijima H et al. Molecular epidemiology of astrovirus in Japan from 1995 to 1998 by RT-PCR with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol* in press

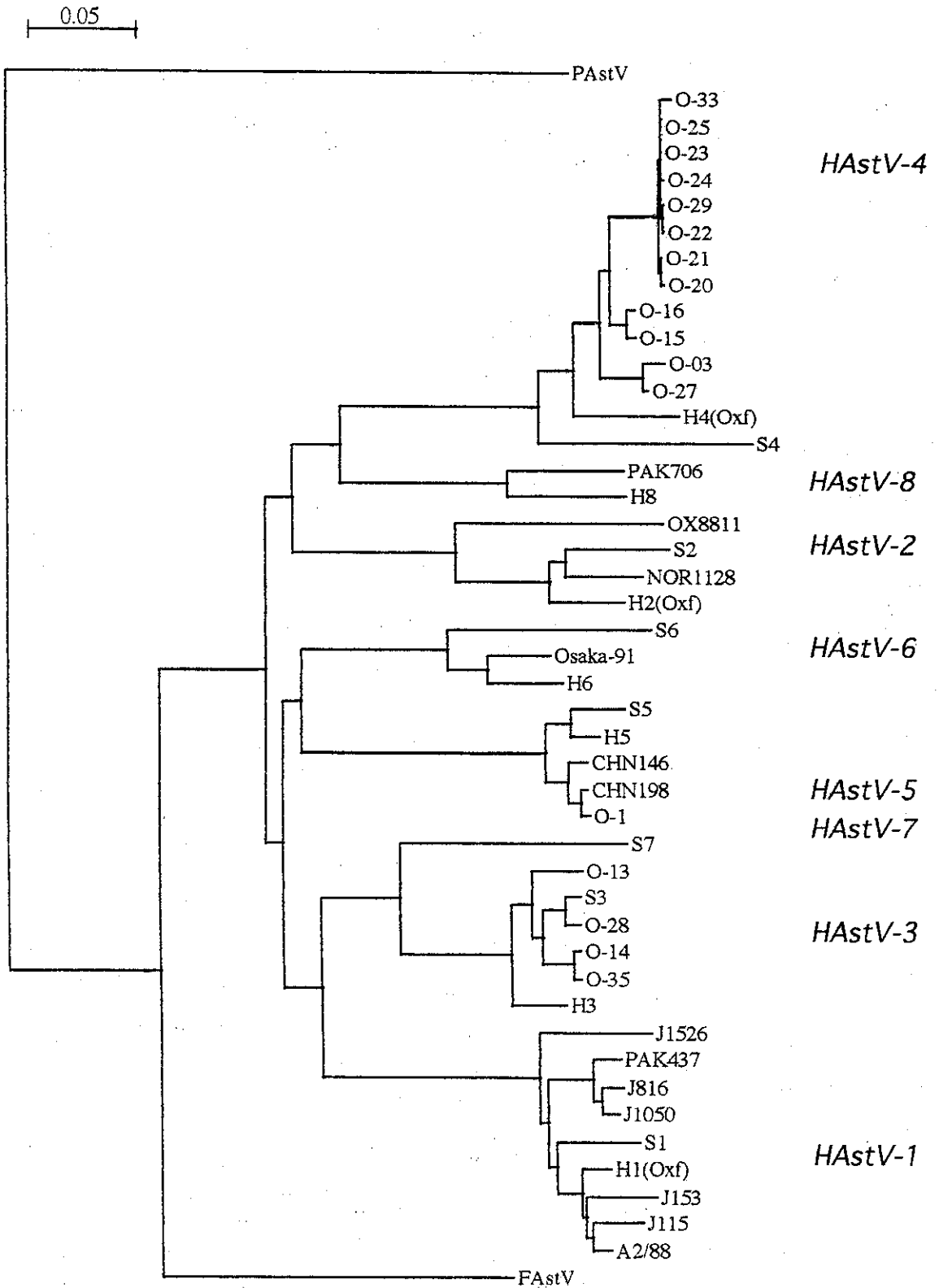


Fig. 1. Phylogenetic tree of the capsid protein precursors of astroviruses

Fig. 2

Region IV (777-end)

Region III (689-776)

AZ/BB	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	850	860
J153	KGVLHIMLPSTOMCYEALYSIPIRS	ASRGYESDMTEY	LDAPSA	DOFEDLETIDESTED-EADPDLIOTS	DEEDENSTRV	ACEIM	PCTSSGHAH							
J115	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H1(0xf)	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S1	P**OI**F**PHI*****P*	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
J1526	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
J1050	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
J816	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
PAK437	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-13	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-28	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S3	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-14	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-35	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H3	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S7	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H5	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S5	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
CHN146	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
CHN198	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-1	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H6(0xf)	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S6	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0sAk91	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-23	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-33	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-22	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-25	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-24	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-20	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-21	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-15	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H4(0xf)	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-16	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-03	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0-27	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S4	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H8	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
PAK706	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H2(0xf)	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
NOB1128	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
S2	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
0x1811	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
FA31V	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
PA31V	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

単クローン抗体の作製と解析に関する研究

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
研究協力者 北元憲利 姫路工業大学 環境人間学科 教授

研究要旨

バキュロウイルス発現系を用いて発現されたカリシウイルスカプシド蛋白を免疫源としてモノクローナル抗体の作製を試みた。Norwalk-like viruses群からはgenogroup I およびGenogroup IIに単独或いは交差性に認識するモノクローナル抗体が作製された。Sapporo-like viruses に対しては単独に特異的に反応する抗体が作製された。これらの抗体は各種のリコンビナントカプシド蛋白との反応態度から8群に大別する事が出来た。交差性の高い或いは genogroupに高い特異性を持つモノクローナル抗体を用いた抗原検出ELISA 法の開発が試みられ、すでにgenogroup I ウイルスに対しては臨床検体の測定が進行している。

genogroup I, II のNorwalk-like viruses群交差性抗原検出ELISA 法および Sapporo-like viruses 抗原検出ELISA 法は基礎検討が終了しつつある。

今後これらの抗原検出ELISA 法がカリシウイルス検出に広く用いられると考えられる。

A. 研究目的

本邦におけるカリシウイルス〔旧称ヒトカリシウイルス、小型球形ウイルス (SRSV)〕関連下痢症は年ごとに増加している。その多くの原因は魚貝類を含めた食品媒介による。さらに輸入生カキ摂取の問題も浮上してきている。感染症新法によりウイルス性食中毒に指定されたこれらの食品媒介ウイルス性下痢症は的確かつ迅速な診断が求められる。しかし現行の診断方法は経済性、迅速性、特異性の点でまだまだ改良の余地がある。カリシウイルスの共通抗原を認識するモノクローナル抗体の作製とそれを用いたELISA法による診断方法が確立されれば多検体の臨床材料を特異的に、安価にかつ迅速にカリシウイルス下痢症と診断することが出来る。

本研究の目的はカリシウイルス共通のエピトープを広範囲に認識するモノクローナル抗体の作製で、続いてそれを用いたELISA診断法の確立である。

B. 研究方法

1) モノクローナル抗体の作製

これまでの報告書に報告しているので詳細は割愛するが、BALB/Cマウスに下記の抗原で免疫し摘出脾細

胞とマウスPAI ミエローマ細胞で細胞融合を行った。マウスへの免疫、脾細胞の摘出はエーテル麻酔下で行い実験動物への倫理は配慮された。

2) 免疫抗原

カリシウイルスのカプシド蛋白をバキュロウイルスにて発現したリコンビナントウイルス様粒子 (VLPs) を免疫源に用いた。VLPsはNorwalk-like viruses (NLVs)では genogroup I (GI) からNorwalk virus (Dr. Estes, ベイラー医科大学から分与)、Chiba, 124, 258(武田・名取両博士、感染症研究所から分与)、genogroup II (GII) から Snow mountain virus, Glimsby(Dr. Estes, ベイラー医科大学から分与)、Mexico virus(Dr. Xi Jiang, イースタン・バージニア医科大学から分与), 47/97, 76, 7K/94, 104/97 (武田・名取両博士、感染症研究所から分与)を用いた。Sapporo-like viruses (SLVs) ではrSV (Dr. Estes, ベイラー医科大学, 中田博士、札幌医科大学小児科から分与)を用いた。

3) モノクローナル抗体のスクリーニング

融合細胞からの産生モノクローナル抗体のスクリーニングは培養上清を用いて VLPs coated ELISA法で

行った。基質にABTSを用い呈色後分光光度計にて測定した。陽性クローンはマウスの腹腔内に投与し腹水化した。性状の解析は主にウェスタン・ブロッティングを用いた。

C. 研究成果

1) モノクローナル抗体

これまで作製されたモノクローナル抗体は合計105種類である。それらの抗体をVLPs coated ELISA法での反応パターンにて8群に大別することが出来た(図1)。genogroup I, IIと交差性の高い抗体をウェスタン・ブロッティングで解析するとこれらは10種のNLVs中空粒子の58K蛋白で特異反応が認められた(図2)。GIを特異的に認識するモノクローナル抗体はELISA法による診断方法の開発に使用され、後述の結果のごとく高い特異性と感度を持って診断され臨床面への応用が出来た。

一方GIのみならずGIIのNLVsをも広範囲に強く認識するモノクローナル抗体5種類は現在同様のELISAによる診断方法を開発中であるがいずれも高い特異性と感度を持った反応結果が得られている。

2) モノクローナル抗体を用いたELISA診断法
特異的にGIを認識するモノクローナル抗体#3901はカプシド蛋白のC末端に存在する74個のアミノ酸を含むエピトープを認識することが分かった。このモノクローナル抗体を用いたELISA法を用いたところ糞便材料から80%の特異性を持って検出することができた。これらの材料はRT-PCR法にてGIあるいはGIIかの鑑別はなされているがGIIには反応しなかった。

3) Sapporo-like virusに対するモノクローナル抗体の作製

rSVを抗原としてマウスに免疫・細胞融合したのから5種類のrSV特異性モノクローナル抗体を作製し腹水化することが出来た。抗体価はVLPs coated ELISA法で32,000倍以上であった。今後これらの抗体の性状についてさらに解析中が必要でありELISA法への応用も検討中である。

D. 考察

食品媒介ウイルス性下痢症の診断には電子顕微鏡による糞便内ウイルス粒子の検索、糞便材料からPCR法或いはRT-PCR法によるウイルスゲノムの検出・解析が主流である。

しかし糞便内からウイルス粒子を検索する方法は、感度、迅速性、設備などの点で多くのハンディを有していると言わざるを得ない。一方ウイルスゲノムの検出は便中のみならず今後さらなる予防的観点から解析の求められる食品中のウイルスゲノムの検出には便利である反面、①測定時間、経費共に多大で経済的負担が大きい、②サッポロウイルスの判定には特別なプライマーセットを新たに使用しなければいけない、③精度、特異性に慎重さが求められる、④細菌性下痢症、ウイルス性下痢症の速やかな鑑別が困難な場合がある、などの点で多くの問題点、改良すべき点を含んでいる。

一方これらのカリシウイルスには遺伝子系統樹からも分かるように共通蛋白抗原の存在が予測される。これらの共通抗原を認識するモノクローナル抗体の開発は単にカリシウイルスのウイルス学的解析に貢献するのみならず、これを武器とした診断的キットの開発が有用と考えられる。

昨年まで作製された数個の交差反応性クローンからELISA法の確立と臨床的応用を試みてきた。今回GIカリシウイルスに対するモノクローナル抗体を用いて開発されたELISA法を臨床的に応用した結果よい成績が得られたが(JCM, accepted for publication)今後例数を増やしてさらに確認する予定である。

一方免疫方法の改良によりGI, GIIカリシウイルスエピトープをより広範囲に認識する抗体を作製する事ができたが、これらの抗体は同様にELISA診断法の開発に寄与している。これはモノクローナル抗体-Capture, モノクローナル抗体-Detectorのstrategyであるが予備的検討では診断に適用出来る成績が得られ、今後臨床材料を用いた検討段階に入っている。

一方今回はサッポロウイルスに対しても特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功した。この抗体は現在性状を解析しているが、ELISA 診断法の開発が可能である。

カリシウイルス属の中で人に病原性のあるNorwalk-like viruses, Sapporo-like virusesと特異的に反応するモノクローナル抗体を用いるELISA 法によってカリシウイルス感染の診断が経済的に且つ多検体処理ができる。

本研究の最終目的は最終検討段階に入っている。この診断方法の確立は多数の医療機関に還元出来るのみならず諸外国との共同研究にイニシアチブをもって行うことが出来、さらにウイルス性下痢症の予防にも多大の貢献が出来ると考える。

E. 結論

ウイルス性下痢症の主原因であるカリシウイルス属のNorwalk-like virusesに対するモノクローナル抗体の作製に成功した。この抗体は genogroup I, genogroup IIウイルスの共通エピトープを広範囲に認識するものである。これらの抗体を用いたELISA 診断方法がほぼ確立された。さらにカリシウイルス属のSapporo-like virusesに対するモノクローナル抗体の作製も出来た。この抗体を用いたELISA 診断方法も確立中である。PCR法に比べ安価、多検体処理能の高い本診断方法は広く臨床的に応用されると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hale, A.D., Tanaka, T.N., Kitamoto, N., Ciarlet, M., Jiang, X., Takeda, N., Brown, D.G.W and Estes, M.K.
Identification of an epitope common to genogroup I Norwalk-like viruses.
(Accepted for publication in Journal of Clinical Microbiology)
- 2) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi

Jiang and Mary K. Estes

Oral administration of the recombinant Norwalk virus-like particles produces the most efficient monoclonal antibodies
(Submitted for publication)

- 3) Noritoshi Kitamoto, Tomoyuki Tanaka, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Shuji Nakata, Xi Jiang and Mary K. Estes
Cross-reactivity among several recombinant Calicivirus-like particles with monoclonal antibodies.
(Submitted for publication)

2. 学会発表

- 1) Morino, Y., Tanaka, T., Kitamoto, N., Estes, M.K., Nakagomi T. and Nakagomi O.
Molecular epidemiology of rotavirus infection which initiated from the AU-1 genogroup in the southern part of Japan.
33rd US-JAPAN Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28, 1999, Maryland, USA
- 2) 北元憲利、田中智之、名取克郎、武田直和
リコンビナントヒトカリシウイルス粒子に対する単クローン抗体の交差性
第47回日本ウイルス学会、横浜、1999