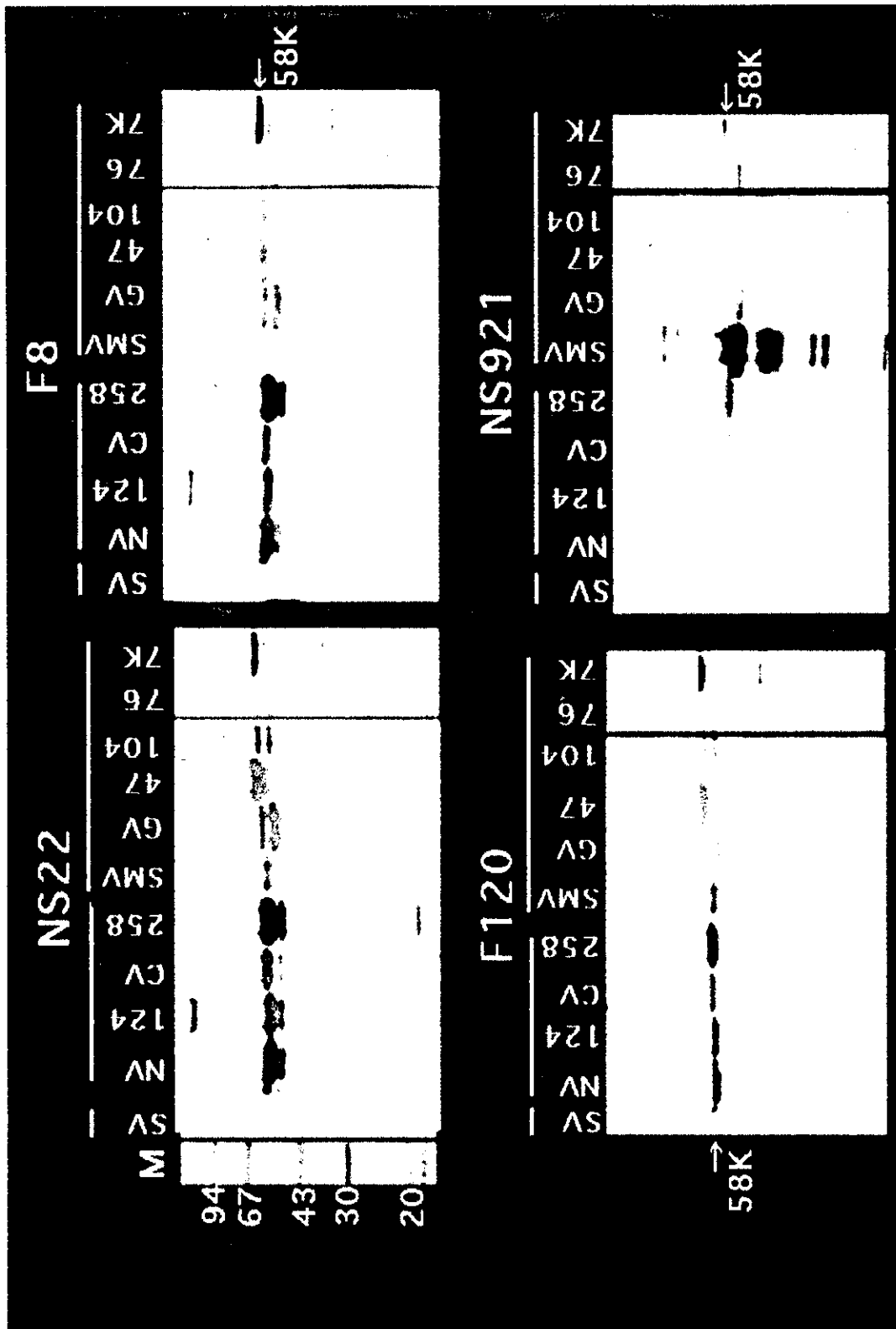


図 1. 各種VLPsに対する単クローン抗体の交差性(ELISA法による)

| グループ | 調べた抗体<br>(腹水)の数 | G-I                       |     |     |    | G-II |    |    |    |     |    |    | SV |   |
|------|-----------------|---------------------------|-----|-----|----|------|----|----|----|-----|----|----|----|---|
|      |                 | NV                        | 124 | 258 | CV | SMV  | MX | 47 | GV | 104 | 76 | 7K |    |   |
| A    | 5               | +                         | +   | +   | +  | +    | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | - |
| B    | 11              | +                         | +   | +   | +  | -    | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | - |
| C    | 3               | -                         | -   | -   | -  | +    | +  | +  | +  | +   | +  | +  | +  | - |
| D    | 22              | +                         | +   | -   | -  | -    | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | - |
| E    | 1               | -                         | -   | -   | -  | +    | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | - |
| F    | 5               | -                         | -   | -   | -  | -    | +  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | - |
| G    | 6               | -                         | -   | -   | -  | -    | -  | -  | -  | -   | -  | -  | -  | + |
| H    | 21              | 未分類 (VLPsの違いにより反応性が若干異なる) |     |     |    |      |    |    |    |     |    |    |    |   |

図 2. 各種VLPsと単クローン抗体、NS22, F8, F120, NS921  
 の反応 (ウエスタン・ブロッティング法)



## 研究要旨

バキュロウイルス発現系を利用して調製したヒトロタウイルス人工空粒子（VP2/VP6）を免疫原とし、各種粘膜アジュバント併用によりマウスへの経鼻接種を行い、以下の結果を得た。1) ヒトロタウイルス人工空粒子（VP2/VP6）のみを免疫したのでは、十分な抗体応答を惹起できなかった。2) 大腸菌由来易熱性トキシン(LT) およびコレラ菌由来易熱性トキシン(CT) をアジュバントとして併用すると、血清中および便中にきわめて高いIgG, IgAの誘導がみられた。3) 毒性のないあるいはきわめて弱い各種変異型LTの併用でも同様に血清中および便中にIgG, IgAの誘導がみられた。4) 粘膜免疫後、マウス強毒株で攻撃したところ、便中のウイルス排泄量は顕著に減少した。

### A. 研究目的

下痢症ウイルスとして最も高頻度に検出され、最も重症なロタウイルスの予防に関する基礎的データを得るため、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を検討した。ロタウイルスの感染防御には、腸管（粘膜）免疫の賦与が重要である。そこで、ヒトロタウイルスを用いてマウスでの感染免疫を解析することを目的とし、バキュロウイルス発現系を用いたヒトロタウイルス人工空粒子の調製、および各種粘膜アジュバントを用いた経鼻接種による人工空粒子の免疫原性と防御能について検討を加えることとした。

### B. 研究方法

ヒトロタウイルス人工空粒子は、全塩基配列の決定されているKU株（GI, P1A）よりバキュロウイルス発現系を用いて作成した。粘膜アジュバントとして、野生型大腸菌易熱性毒素LT（A+Bサブユニット）、Bサブユニットおよびトキシン活性がほとんどない変異型H44A、変異型135、LT-L112K、コレラ菌易熱性毒素CTおよびその変異型CT-L112Kを使用した。マウスへの鼻腔内接種には、8週齢雌マウスに人工空粒子10 $\mu$ g/10 $\mu$ lと各アジュバント10 $\mu$ g/10 $\mu$ lの混合液を使用した。血清および便中のIgG, IgA含量はELISAで測定した。約3週間隔で4回免疫後、マウス強毒株（EW）を経口感染し、防御効果を便中ウイルス量の測定で判定した。

### C. 研究結果

(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種の全構造蛋白質を発現した。そのうち、VP2とVP6あるいはVP2, VP6, VP7の共発現で自己集合した精製人工空一重殻粒子および人工空二重殻粒子を大量に得た。(2) VP2/VP6粒子のみの経鼻接種では免疫原性がきわめて弱い、粘膜アジュバント、特に変異型135、変異型H44Aの併用では、血清中および便中のIgG, IgA応答が顕著に高かった。(3) 免疫後、マウ

ス強毒株（EW）を経口感染し防御能を検討したところ、粘膜アジュバント、特に変異型135、変異型H44Aの併用では、便中ウイルス量の激減を観察した。(4) 免疫後、

妊娠させ乳のみマウスを得て、ヒトロタウイルス(KU株)、マウス強毒株（EW株）を経口感染し防御能を検討したところ、効果はほとんどみられなかった。

### D. 考察

動物とヒトロタウイルス間では、抗原性に大きな差異があり、感染免疫、防御の実験には、ヒトロタウイルスを用いて行うことが必要であり、本研究はそれが可能であることを示唆した。人工空粒子を免疫原とした場合、粘膜アジュバント、特に毒性のきわめて低い変異型LTの有用性（免疫原性とともな防御能）を示した点は、今後の本アジュバントのヒトへの応用の可能性を示した点で意義がある。現在、GALT領域におけるサイトカインmRNAの動態、CTLを検討している。免疫マウスから出生した乳のみマウスに対する動物およびヒト由来ロタウイルスに対する感染防御については、中和抗原を有するVP2/VP6/VP7の二重殻人工粒子を使用することが適切と思われる。

### E. 結論

ヒトロタウイルス人工空粒子と粘膜アジュバントを用いたマウスでの経鼻接種は、免疫原性および感染防御に効果的であることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.

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 gastroenteritis. *J. Gen. Virol.*, 80:1407-1415, 1999.

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.

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.

## 2. 学会発表

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

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

東京湾の海水およびカキ体内に存在する F 特異大腸菌ファージの実態調査

分担研究者 大垣眞一郎 東京大学大学院工学系研究科教授

研究要旨

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、1年間を通じて F 特異大腸菌ファージ濃度を測定した。沿岸域における F 特異大腸菌ファージの挙動の日中変動および季節変動を調べ、大腸菌群と比較検討した。

A. 研究目的

下水処理水の流入のある東京湾において *E.coli*、大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの存在状況調査を1年間行い、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うのが本研究の目的である。

B. 研究方法

東京湾のお台場において、1999年8月に、4時間毎に海水およびカキを採取して微生物の日中変動を調べた。また、葛西およびお台場において、1998年11月～2000年2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、電気伝導度を測定した。

*E.coli* 数、大腸菌群数、F 特異大腸菌ファージの測定法は、昨年度の分担研究報告に同じである。

C. 研究結果

日中変動を調べた8月の調査では、海水の水温、pH、電気伝導度、SS、濁度はそれぞれ、 $28 \pm 1$  (°C)、 $7.3 \pm 0.1$ 、 $25 \pm 2$  (mS/cm)、 $36 \pm 15$  (mg/L)、 $3.2 \pm 2.3$  (NTU) であった。試料中の各微生物濃

度の幾何平均値は、海水中の大腸菌群濃度が、 $2.3 \times 10^4$  (cfu/100ml)、*E.coli* 濃度が  $1.7 \times 10^3$  (cfu/100ml)、F 特異大腸菌ファージが  $5.3 \times 10$  (pfu/100ml)、カキ中の大腸菌群濃度が  $5.4 \times 10^5$  (cfu/100g)、F 特異大腸菌ファージ濃度が  $2.2 \times 10^4$  (pfu/100g) であった。また、それぞれの値の Log10 をとって求めた標準偏差はすべて 0.4 以下であり、各試料中の微生物濃度は調査中、比較的安定であったといえる。

1年間の調査期間中海水の電気伝導度は大きく変動した。電気伝導度の値が夏にかけて急激に減少した。微生物濃度の幾何平均値は、*E.coli* で  $7.8 \times 10^2$  (cfu/100ml)、大腸菌群で  $1.5 \times 10^4$  (cfu/100ml)、F 特異大腸菌ファージで  $2.4 \times 10$  (pfu/100ml) であり、10倍程度の変動を示したが、季節的な傾向は認められなかった。*E.coli* および大腸菌群については調査期間中検出限界以下のサンプルは無かったが、F 特異大腸菌ファージについては24サンプル中3サンプルが検出限界以下であった。カキ中の微生物濃度は、海水中の微生物濃度に比べて大腸菌群でも F 特異大腸菌ファージ濃度でも高い値を示した。カキ1個に存在する微生物量は、その時採取した海水 0.8L～160L 中に存在する微生物量に相当した。大腸菌より F 特異大腸菌ファージの方が海水とカキ体内の存在量の差が大きかった。

#### D. 考察

採水地点は河川水が海水と混合する感潮域であったが、日中変動がほとんどなかったことから、干満潮による海水およびカキ中の微生物濃度に与える影響がなかったといえる。また、試料を採取する時間は微生物濃度の結果にほとんど影響が無いことが分かった。

海水中の微生物はカキによって濃縮されており、F 特異大腸菌ファージの方が大腸菌群よりもよく濃縮されていることが示唆された。F 特異大腸菌ファージは大きさ、構成が HuCV やエンテロウイルスに似ていることから、ヒト腸管系ウイルスも大腸菌よりもカキに蓄積されやすい可能性が示唆された。

#### E. 結論

海水およびカキ体内における微生物濃度を調べた。海水中の微生物濃度は日中変動は小さく、一日一回の試料採取でよいことが分かった。

微生物濃度の季節変動は特に認められなかった。

F 特異大腸菌ファージは、大腸菌群よりもカキに蓄積されやすいことが分かった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

片山浩之、大垣眞一郎 (1999)

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講演集、p217-218

久山哲雄、片山浩之、大垣眞一郎 (2000)

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講演集(3月発表予定)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ELISA法によるノーウォーク様ウイルス(NLV)の検出

分担研究者 栄 賢司 愛知県衛生研究所  
協力研究者 小林慎一、鈴木康元 愛知県衛生研究所

研究要旨

7種類のノーウォーク様ウイルス(NLV)抗原を型別できるELISA法を用いて小児の散発性下痢症患者の糞便検体について抗原検出を行なった結果、433検体中2検体(0.5%)がGIグループの抗原が陽性となり、39検体(9.0%)がGIIグループの抗原が陽性となった。中でもGIIグループのCamberwell/Lorsdale/Bristol型NLVがELISA陽性NLVの約85%を占めていたことから、この抗原型のNLVが散発性下痢症患者の主要な流行株と考えられた。またロタウイルス抗原が138検体(31.9%)から検出されたが、NLVとロタウイルスの流行時期に明らかな違いが認められた。今回のELISA法は抗原性の異なるNLVを型別して検出できることから、NLV感染症の疫学的解析に応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

NLVは冬季に多発する非細菌性食中毒の主要な原因ウイルスの一つである。わが国ではNLVに起因する食中毒として、生カキの喫食が原因とされる事例が最も多く発生しているが、学校給食や弁当などを原因とした、非カキ関連の食中毒事例の発生も数多く報告されている。NLVに起因する健康被害の実態が次第に明らかにされてきたことから、厚生省は平成9年5月30日付で食品衛生法を改正し、ウイルスが食中毒病因物質として追加指定されることとなった。一方、NLVは散発性下痢症の患者からも検出されることから、感染症の原因ウイルスとしても注目されている。しかしながら、NLVの培養系は未だ確立されていないので、その検査法としては患者糞便中のウイルス粒子を電子顕微鏡で検出する方法が主流となってきた。これに対し、NLVの遺伝子構造解

明の進展に伴い、その遺伝子を検出するPCR法、および組換えバキュロウイルスにより産生されるウイルス様中空粒子(Virus-Like Particles, VLPs)を利用した診断法が近年検討されている。本研究では、抗原性の異なる7種類のNLV抗原を検出できるELISA系を用いて小児の散発性下痢症患者の糞便材料について抗原検出を行なうとともに、小児の主要な下痢原因ウイルスであるロタウイルスの流行状況と比較検討した。

B. 研究方法

1. 材料

1997年10月から99年5月の間に愛知県感染症サーベイランス事業として当所に搬入された小児の散発性下痢症患者433名の糞便を用いた。

2. 方法

NLV検出のためのELISA系は、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NLV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 (Camberwell/Lorsdale/Bristol-like virus)、r76 (Hawaii-like virus)、それにr47とr7の4種である。

ロタウイルスの抗原検出は抗ヒトロタウイルス抗体(DAKO社)およびペルオキシダーゼ標識抗ヒトロタウイルス抗体(DAKO社)を用いたELISA法で実施した。

### C. 研究結果

小児の散発性下痢症患者433名の糞便材料についてNLV抗原検出を行ない、その結果を表1に示した。433検体中2検体(0.5%)がGIグループの抗原が陽性となり、39検体(9.0%)がGIIグループの抗原が陽性となった。ELISA陽性の41検体のうち35検体(85.4%)がr104検出系で陽性を示したので、1997年から99年の2冬季にわたりCamberwell/Lorsdale/Bristol型NLVが愛知県における小児下痢症患者の主要な流行株と考えられた。

433検体についてロタウイルス抗原検出を行った結果、138検体(31.9%)が陽性となった。NLVとロタウイルスの月別の検出状況を図1に示した。NLVは11月から12月をピークとして検出され、その後次第に陽性率は低下した。一方、ロタウイルスはNLVの流行が終息する頃から検出されはじめ、2月から3月が流行のピークとなったことから、NLVとロタウイルスの流行時期には明らかな違いが認められ

た。

### D. 結論および考察

7種類のノーウォーク様ウイルス(NLV)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433検体を検査した結果、41検体(9.5%)からNLV抗原を検出するとともに、Camberwell/Lorsdale/Bristol型NLVが主要な流行株であることを明らかにできた。またロタウイルス抗原検出も合わせて実施したところ138検体(31.9%)がロタウイルス陽性であったが、NLVとロタウイルスの流行時期に明らかな違いが認められた。今回のNLV検出用ELISAは抗原性の異なるNLVを型別して検出できることから、NLV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。

### E. 研究発表

#### 1. 学会発表

1) S. Kobayashi, T. Yamashita, K. Sakae, K. Kamata, T. Satoh, K. Natori, N. Takeda, T. Miyamura and Y. Suzuki: Detection of Norwalk-like viruses by a serotype-specific ELISA based on seven antigenically distinct recombinant capsid proteins. 33rd Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28-July 1, 1999, Chevy Chase, Maryland.

2) 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:

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(1999)。



表1 小児散発性下痢症からの抗原検出ELISAによるNLV検出結果

| 検査数 | GI陽性数    |     |      | GII陽性数    |     |     |      |
|-----|----------|-----|------|-----------|-----|-----|------|
|     | r124     | rCV | r258 | r7        | r47 | r76 | r104 |
| 433 | 0        | 1   | 1    | 1         | 1   | 2   | 35   |
| 計   | 2 (0.5%) |     |      | 39 (9.0%) |     |     |      |

調査期間：1997年10月～1999年5月

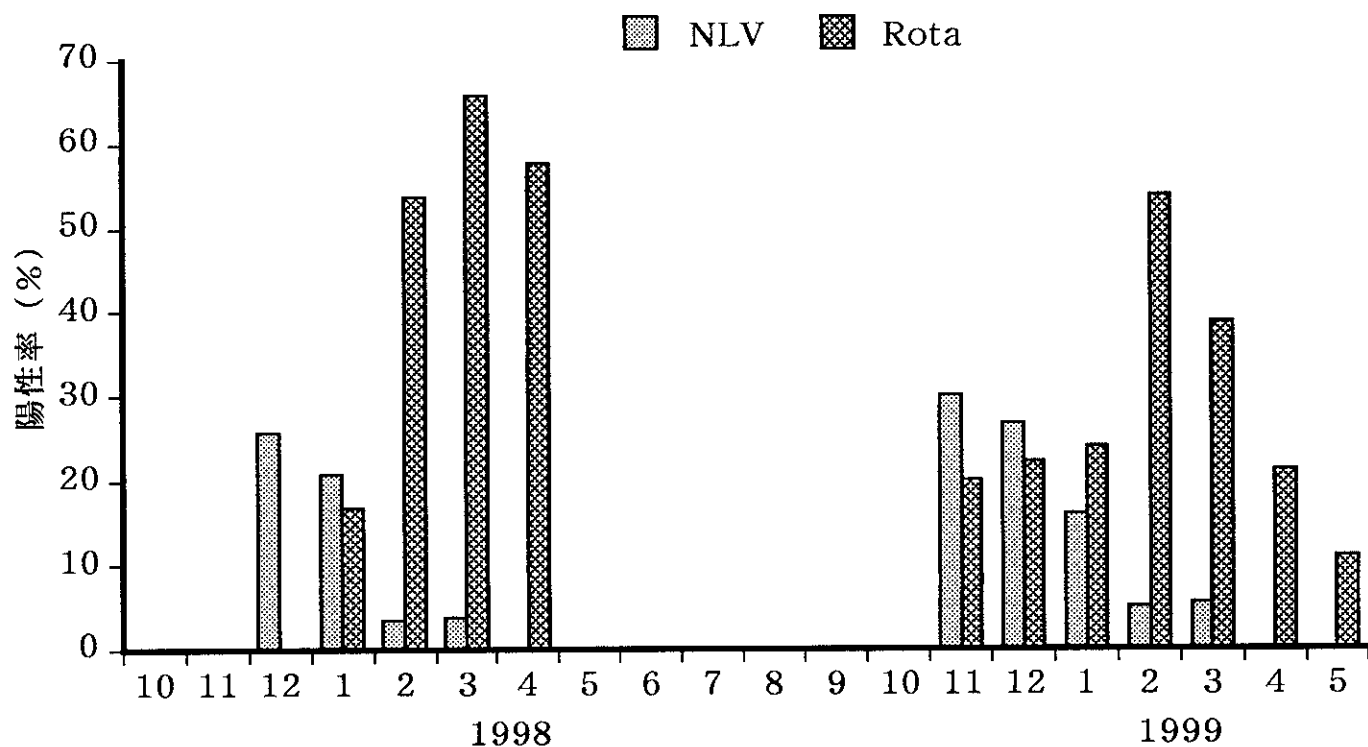


図1 NLVとRota virusの月別検出状況

Norwalk like viruses の遺伝子検出法の改良

分担研究者 柴田 伸一郎 名古屋市衛生研究所 研究員

A. 研究目的

Norwalk like viruses (NLVs)によるウイルス性胃腸炎は、昨年の CDC の疫学解析結果から細菌性の食中毒患者数を大きく上まわることが報告された。また、日本においても近年 NLVs による食中毒事例が多く報告されるようになってきた。しかしながら検査法に関しては、いぜん操作法の複雑な RT-PCR 法により検査が行われている。現状における RT-PCR 法は、結果が得られるまでに3日以上を要し、また検出感度を上げるために nested PCR を行うと、コンタミネーションを起こす危険性を上昇させてしまう。最近になって NLVs の遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込み蛋白質を発現させ抗体作製を行い、抗原抗体反応を利用した ELISA 法が国立感染症研究所の武田室長らにより開発され、幾つかの NLVs のクラスターに対応する NLVs を検出できる ELISA キットが開発されたが、検出感度はまだ RT-PCR 法の検出感度には及ばない。そのため検出できない事例が見られたり、食品の汚染検査等に利用することは今のところ困難である。以上のことから、現状の検査法の改良は必須であり、コンタミネーションの機会を減らすためにも検査法の改良が望まれるので、今回検査法の改良を試みることを目的にした。

B. 研究方法

現在ある RT-PCR 法と ELISA 法の二つの検査法の長所短所を比較検討したところ、簡便性という面では ELISA 法が勝るが、原因食品を検査しなければならない現状で、ELISA 法の改良による検出感度アップは極めて難しいで

あろうこと、また、全てのクラスタをカバーできるほど、代表ウイルス株の抗原蛋白質が発現されていないことなどを考慮すると、RT-PCR 法の改良を行うほうが現状では有利であると考へ RT-PCR 法の改良を行うことにした。

ただし RT-PCR 法の改良で問題となる点は、操作が複雑であること、nested PCR を行う際には、コンタミネーションの危険性が極めて高くなること。また、現在のところ、NLVs に関しては検出感度が正確にわかっていないこと。一番の問題は、PCR プライマーの設定しだいで検出される NLVs の種類（クラスタ）、検出率が大きく変動すること、などの問題点が存在する。これらの問題点を順次解決していくことにした。

C. 研究結果

一番の問題点であるプライマーの作成には、CDC 内部で利用可能な遺伝子情報処理ソフトウェア GCG を使用して、G1 の5つのクラスタ、G2 の8つのクラスタをカバーする約300本近い NLVs の遺伝子配列を使用して検討を行った結果、単一のプライマーペアでは全てのクラスタのウイルスを検出することは困難であることが判明したため、それぞれのクラスタに対応したプライマーを個別に作成することとした。結果的には、全てのクラスタを検出するためには、17本のプライマーを作製した。nested PCR を実施する際に新しいチューブに1st PCR で増幅されたウイルス遺伝子に移す時に、増幅された NLVs の遺伝子により汚染される可能性が高くなること、また、nested PCR を実施するのにふさわしいプライマーを作製

できなかったことから、**nested PCR** を用いずに検出感度を確保する必要に迫られた。そこでクラスタ間の違いをも克服していかに感度良く検出するかを検討する必要に迫られた。

作製したプライマーにより現状での全てのクラスタを検出できるか、さらには NLVs の検出感度は今まで測られていなかったので、検出感度、検出レンジを調べることにした。検出感度、検出レンジを調査するためにそれぞれのクラスタの代表ウイルスの 3kbp の PCR 産物をプラスミド DNA に組み込んだものをリニアにして DNA 量からウイルスコピー数を算出したものを基準として、10 倍となるように希釈を行い、ウイルス遺伝子数を調整した。そしてそれぞれのプライマーペアの検出感度を調査した。PCR 酵素は、数社のものを調査したところ Roche Molecular Biochemistry の High Fidelity PCR kit が一番検出感度が良いことが判明した。さらにこのキットを用いて検出感度、検出レンジを調査したところ、全てのクラスタで、 $10^1$  から  $10^0$  コピーを検出することができた。しかしながら 14 組 17 本のプライマーを用いて全てのクラスタについて検査をしていたのでは、あまりに膨大な数の検査をこなさなければならず、とても実践向ではない。そこで全てのプライマーを混合して PCR を実施することとした。最初はそれぞれのプライマーを等量ずつ混合し、最終濃度 50nM / each としたが、検出感度は低下してしまった。そこで試行錯誤した結果、最終濃度 300nM / each さらに一つのプライマーのみ 900nM としたところ検出感度の上昇が見られ、さらに dNTP の濃度を高くしたところ検出感度の上昇が見られた。最終的に混合プライマーを使用して **nested PCR** を行わなくとも全てのクラスタにおいて  $10^2$  コピーの遺伝子を DNA レベルでは検出することができたことがわかった。

しかしながら RT-PCR では、RNA から、PCR 法で増幅することができる DNA に転写しなお

すという逆転写の過程が必須であるが、この操作時に時として RNA を消失したり、一部を破壊してしまったりして逆転写効率の低下がおきると検出感度はさらに低下することになってしまうため、逆転写の方法についても十分に検討を行った。また、RNA を転写する時に RNA を分解するような物質の汚染を防ぐためにも全ての操作を 1 本のチューブで実施することができ One Tube RT-PCR キットの使用が有利であると考えた。逆転写(RT)ステップの転写効率調査のためには、濃度のわかっている NLVs vRNA が必要である。そこで 3kb の PCR 産物をクローニングしてあるベクターから RNA transcripts を作製し、その RNA 量から vRNA としてのコピー数を計算し段階希釈し、検出感度を決定するスタンダードとした。このスタンダードを用いる事によりウイルス数に相当するコピー数を知ることができる。また、増殖不能な NLVs の RNA を安定供給することができ、逆転写酵素や、RT-PCR キット効率を十分に調べることができる。そこで M-MLV 逆転写酵素、AMV 逆転写酵素、C. Thermo Polymerase 酵素などを検討した、さらに、C. Thermo Polymerase One Step RT-PCR kit なども検討したが結果は芳しくなかった。最終的に Roche Molecular Biochemicals の TITAN One Tube RT-PCR kit を使用することにより効率が上昇することが判明し、このキットを使用してバッファー条件、RT の反応条件、さらにその後の PCR 条件等を設定しなおしたところ検出感度の上昇が見られ、全てのクラスタで  $10^3$  から  $10^4$  コピーの検出感度を達成した。この感度では、食中毒原因食品からの NLVs 検出に用いるには感度が低い、確認検査のために行うサザンハイブリダイゼーションと組み合わせることにより一段と検出感度を上げることができることが知られており、実際に試みたところコピー数にして  $10^2$  から  $10^1$  ほど感度を上げることができることがわかった。

サザンハイブリダイゼーションにより検出感度を上げることができることから、G1、G2それぞれの全てのクラスタを検出できるプローブを作製し、One Tube RT-PCR 反応後確認検査法として G1 プローブ、G2 プローブによるサザンハイブリダイゼーション法を導入することとした。しかしながら従来のサザンハイブリダイゼーション法を用いると検査に要する時間 1.5 日程度が増加してしまう。そこで検査時間を短縮しつつも、電気泳動による移動距離も知ることができるリキッドハイブリダイゼーション法を用いることとした。この方法は、同じラボの Beliotto Geal が開発した方法であり、One Tube RT-PCR 産物の一部用いて PCR 装置を使用して短時間にハイブリダイゼーションを行う方法である。これによる時間短縮効果は大きく、一晩かけて行っていたハイブリダイゼーションを 30 分程度で終了することができる。

以上の検査法を組み合わせて実施することにより検出感度  $10^1$  から  $10^2$  コピーで確実に NLVs を検出できることが RNA transcripts を用いた実験で明らかになった。さらに、検査にかかる時間は、ハイブリダイゼーションによる確認検査まで含めても 2 日、早ければ 1.5 日であった。

実際に検査に応用した場合には、糞便からの vRNA 抽出となりインヒビターの混入なども考えられ、今まで行った実験と同様の結果が得るか不明である。そこで実際に検査材料から抽出された G1, G2 の各クラスター分類がすでに調べられたシーケンスにより確定している vRNA を用いて調査を行ったところ、従来法で検査されていた感度とほぼ同様の感度で検出できることがわかった。

#### D. 考察

One Tube RT-PCR 法を用いることにより省力化でき、さらにコンタミネーションの危険性

を保母は委譲できること、さらには、今まで検出感度に問題があったが、2<sup>nd</sup> PCR を実施しなくともほぼ同様の検出感度を達成できることが明らかになった。PCR サイクルに工夫を加えることにより従来と同様の検出感度を得られることは、新しい着目点である。さらに、リキッドハイブリダイゼーションを行うことにより、確認検査も含めて検出感度を上げることができるのは画期的である。

ただ、問題になるのは、NLVs の多様性であり、今後も最適なプライマーデザインを続けていくことが必要である。

#### E. 結論

これらのことから、今回 RT-PCR 法に改良を加えた事により、1. 従来法より早く 1.5 日から 2 日（糞便の場合）で検査結果を出すことができ、省力化も同時にできる。2. 逆転写反応、PCR 反応とも同じ反応チューブを使用してチューブの口をあけることなく実施できることから、コンタミネーションの危険性をほぼ無くす事ができる。3. 検出感度のアップと確認検査を同時に行うことができる。と言うメリットを得ることができた。4. 原因食品からの検出にも応用可能であろう検出感度を達成する事が出来た。5. 市販のキットをモディファイして利用するので、反応バッファー等試薬が安定供給され、検査実施者のスキルレベルに影響されることがほとんどなくなるなどのメリットが得られた。

#### F. 研究発表

学会発表

日米医学協力研究会（2000 年 7 月 20 日～22 日 於犬山市）発表予定

#### G. 知的所有権の取得状況

特に無し

## 小型球形ウイルスの流行経路の検討と予防対策に関する考察

分担研究者 斎藤博之 秋田県衛生科学研究所微生物部主任

**研究要旨** 小型球形ウイルス(NLV)による食中毒や集団発生を予防するための基礎的情報を収集する一環として一昨年より、「散发例」、「食中毒1類(生カキ由来)」、「食中毒2類(非カキ)」、「施設内集団発生」の4通りのケースを想定し、SSCP による遺伝子解析を行ってきた。これらを結びつける流行経路として、生カキ、海水に加えて今年度は下水(処理前、及び、処理後)からの NLV 検出を試み、同様に SSCP 解析を行った。12月に入った時点で下水中に NLV が検出され、1月・2月の下水サンプルからも検出された。下水における NLV の出現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 NLV は全く影響を受けることなく検出された。以上のことから散发例の患者(不顕性感染も含む)の糞便が下水を通過して海へ放流され、養殖場を汚染する結果として生カキによる中毒が発生するという図式が考えられる。現在の下水処理システムではNLVを除去できないため、最終的な予防対策としてはその改善ということになるだろう。

### A. 研究目的

冬季に多発する小型球形ウイルス(NLV)による下痢症は、飲食店等での生カキ摂食によって発症するケースが以前から注目されてきた。しかし、個々の事例を検討してみると、食材にカキが全く含まれていない事例(学校給食等)や老人施設や精薄施設で長期にわたって患者発生が持続する事例等があるのに加えて、病原体サーベイランスにおける一般の感染症としての側面も併せ持っている。本研究は各事例を流行様式として分類し、それらを結び付ける経路として下水、海水、生カキについて NLV 検出と SSCP による遺伝子解析を行い、環境中の侵淫経路と予防対策について検討する。

### B. 研究方法

次の検体(PCR 増幅産物)について SSCP による遺伝子解析を行った。PCR 産物は Yuri22F/R<sup>1)</sup> の 5'末端をビオチン化したプライマーで増幅した。

- 1)施設内発生例：平成 11 年5月に老人施設で発生した人→人感染と思われる事例<sup>2)</sup>。
- 2)海水、及び、生カキ：広島県保健環境センター分与された PCR 産物(平成 10 年度本研究班報告書参照)。
- 3)下水：平成 11 年9月から平成 12 年2月まで2週間おきに下水処理場の入口(流入水)と出口(放流水)で採水したもの。水サンプル1リットルにポリエチレングリコールと NaCl を

それぞれ 10%と 1M となるように加えて沈澱を回収し、ISOGEN-LS (ニッポンジーン)によりRNAを抽出した。

### C. 研究結果

各事例に関するこれまでの SSCP 解析の結果から、すでに次のようなことが判明している(平成9年度本研究報告書参照)。

- 1) 散発例: 病院外来で採取された糞便中の NLV 遺伝子を比較すると、多種類が同時に流行していることがわかる。たとえ同じ SSCP パターンの検体であっても採取地区や時期に共通要因が無く、家族内感染等を除けば基本的にランダムである。
- 2) 食中毒 1 類: カキが原因食品と考えられる食中毒では、同じ感染グループであっても、患者によって NLV の SSCP パターンは異なる。
- 3) 食中毒 2 類: カキとは無関係の食中毒では、同じ感染グループの NLV は全て同じパターンを示す。
- 4) 施設内発生例: 施設内発生例は、同じ事例から検出された NLV は同じ SSCP パターンを示すことが多い。

施設内発生例については、まれに図 1 のように複数種類の SSCP が観察されることもあるが、その場合であっても大多数は同じ SSCP を示す NLV による感染であることがわかる。

また、1 種類の DNA につき 2 本のバン

ドが出現するのが SSCP の基本原理であることを考えれば<sup>3)</sup>、海水(図 2)、及びカキ中腸腺(図 3)には雑多な NLV が含まれていることがわかる。

下水については図 4 に検出結果を示した、12 月から 2 月にかけて NLV が検出され、その時期は感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎の流行時期と一致した(図 5 「秋田市」及び「秋田中央」参照)。また、処理後の放流水であっても NLV は検出され、バンドの濃さで判断する限りむしろ濃縮される傾向が認められた。下水から検出された NLV の SSCP パターン(図 6)からは、海水と同じように雑多な NLV が含まれていることがわかった。

### D. 考察

感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎患者の増加には当然ロタウイルスやアデノウイルスによるものも含まれると考えられるが、近似的に NLV によるものと仮定すればその NLV は散発例に相当する。散発例の NLV は遺伝子的に多種類のウイルスが同時に流行していることが SSCP の結果からわかっているため、多くの家庭の便所から排泄された NLV のプールである下水にもやはり多種類の NLV が含まれる結果となる。下水中の NLV の SSCP パターンを比較すると、同じ多種類であっても採水時期によってパターンが変化してくるのがわかる(図 6)。これは同じ地域(下水処理場管轄区)であっても、流行する NLV は極めて短期間に(本研究では 2 週間)その種類が変わることを意味する。また、放流水に

も NLV が含まれていることは、下水処理の行程において NLV は除去されないとみなすことができる。むしろ濃縮される傾向があるのは、沈殿槽において水が抜かれるため、沈澱しない NLV を含んだ上澄みは逆に濃くなるのではないかと考えられる。

下水処理場におけるトラップが働かないと考えれば、排泄された NLV はそのまま海に流れ込むことになる。そのため海水から検出された NLV も多種類が混合したもの(図 2)であり、海水成分を濃縮蓄積するカキにも多様な NLV が含まれる(図 3)。食中毒 1 類において、同一の感染グループであっても患者によって検出される NLV の SSCP パターンが異なるのは、最初の段階で多様な NLV の感染を受け、さらに抗体保有状況の個人差などにより、増えやすい NLV が排泄されてくることが原因ではないかと考えられる。

一方、食中毒 2 類の場合は調理人が事前に感染(散発例、または、生カキ摂食)を受けていて、手洗い不十分のままサラダなどを調理することによって起こると考えられる。すでに一度体内でクローニングされて単一種類(またはそれに近い)となった NLV が原因であるから、同じ感染グループの患者から検出された NLV は同じ SSCP を含んでいる。施設内発生例の場合も基本的にはすでに感染した 1 人から広がると考えられるが、こちらは食品ではなく介護や汚物の後始末の段階で人から人へ直接感染するのが特徴である。原因が特定できなければ流行が長期間持続することがある。また、

これまでに分類したいずれのケースであっても排泄された NLV が再び下水を通過して海に流れ込むといった循環系を形成していることに注意する必要がある(図 7)。

## E. 結論

図 7 の循環系の中で矢印を断ち切るような方策を考えれば予防対策になる。冬季になると散発例の NLV が流行するのが最初と考えられるが、この段階での原因究明は困難で予防も手洗いの励行くらいしかない。しかし、排泄された NLV を海に入る前に除去、あるいは不活化できればカキの安全性は高まるものと考えられる。そのためには下水処理システムの改良が具体的な目標となるであろう。また、施設内発生例は最近増えつつあり一度発生すると被害が大きいので、介護職員の定期的な検便などを行い、外部から NLV を持ちこまないように気を配る必要がある。

本研究で行った下水の検査は NLV 検出に限らず、病原体サーベイランスの方法の 1 つとして有効である。通常は検査定点の病院外来から検体を採取しているが、一定のエリアのマクロな情報として下水検査も行えばデータのばらつきを補完することができると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hiroyuki Saito, Shioko Saito, Kazuko Kamada, Seizaburo Harata, Hiroyasu Sato, Morihiko 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)

2. 学会発表

1) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康. 最近の流行事例における SRSV の特徴と効果的な RT-PCR 法の検討. 第 45 回日本ウイルス学会学術集会. 1997

2) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康. SRSV に起因する食中毒における疫学指標としての SSCP 解析の検討. 第 46 回日本ウイルス学会学術集会. 1998

3. その他の発表

1) 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)

2) 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)

3) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道、鏡屋公雄、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)

参考文献

1) 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)

2) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道、鏡屋公雄、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)

3) Masato Orita, Hiroyuki Iwahana, Hiroshi Kanazawa, Kenshi Hayashi and Takao Sekiya. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2766-2770 (1989)



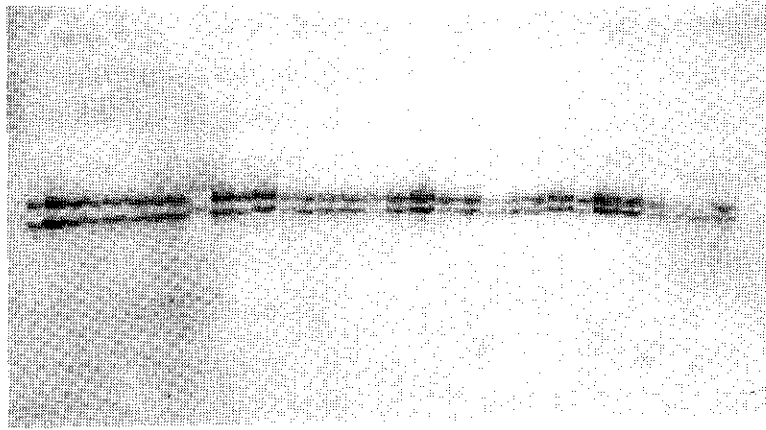
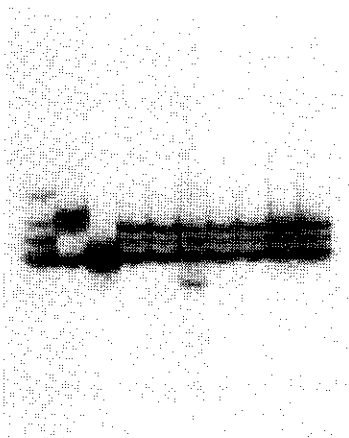
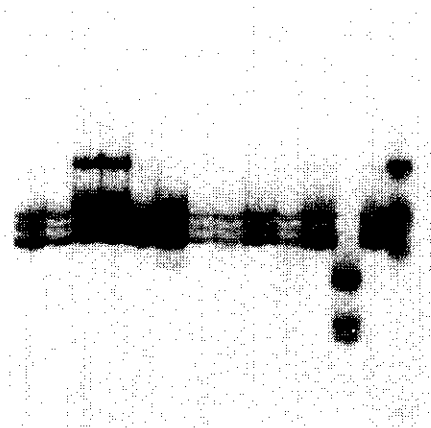


図1 老人保健施設でのNLV集団発生におけるSSCP比較。入所者と介護職員・看護婦から検出したNLVを解析したもの。詳細は参考文献2を参照。



| レーン No. | 採水年月日      | 海域 No. |
|---------|------------|--------|
| 1       | 1997.12.08 | 3      |
| 2       | 1997.12.08 | 2      |
| 3       | 1998.01.27 | 2      |
| 4       | 1998.01.19 | 3      |
| 5       | 1998.01.20 | 5      |
| 6       | 1998.01.20 | 8      |
| 7       | 1998.01.20 | 4      |
| 8       | 1998.02.17 | 4      |
| 9       | 1998.02.24 | 3      |
| 10      | 1998.02.24 | 6      |

図2 海水から検出されたNLVのSSCP解析。採水データは右表のとおり(広島県保健環境センターの提供)。レーン No.は写真左から、海域 No.は平成10年度本研究班報告書参照。



| レーン No. | 採水年月日      | 海域 No. |
|---------|------------|--------|
| 1       | 1997.11.13 | 15     |
| 2       | 1997.12.08 | 2      |
| 3       | 1997.12.08 | 3      |
| 4       | 1997.12.02 | 4      |
| 5       | 1997.12.08 | 6      |
| 6       | 1998.01.20 | 5      |
| 7       | 1998.02.17 | 8      |
| 8       | 1998.02.23 | 2      |
| 9       | 1998.03.16 | 7      |
| 10      | 1999.01.11 | 2      |
| 11      | 1999.01.11 | 7      |
| 12      | 1999.01.11 | 8      |
| 13      | 1999.01.11 | 15     |
| 14      | 1998.11.30 | 4      |

図3 カキから検出されたNLVのSSCP解析。採取データは右表のとおり(広島県保健環境センターの提供)。レーン No.は写真左から、海域 No.は平成10年度本研究班報告書参照。

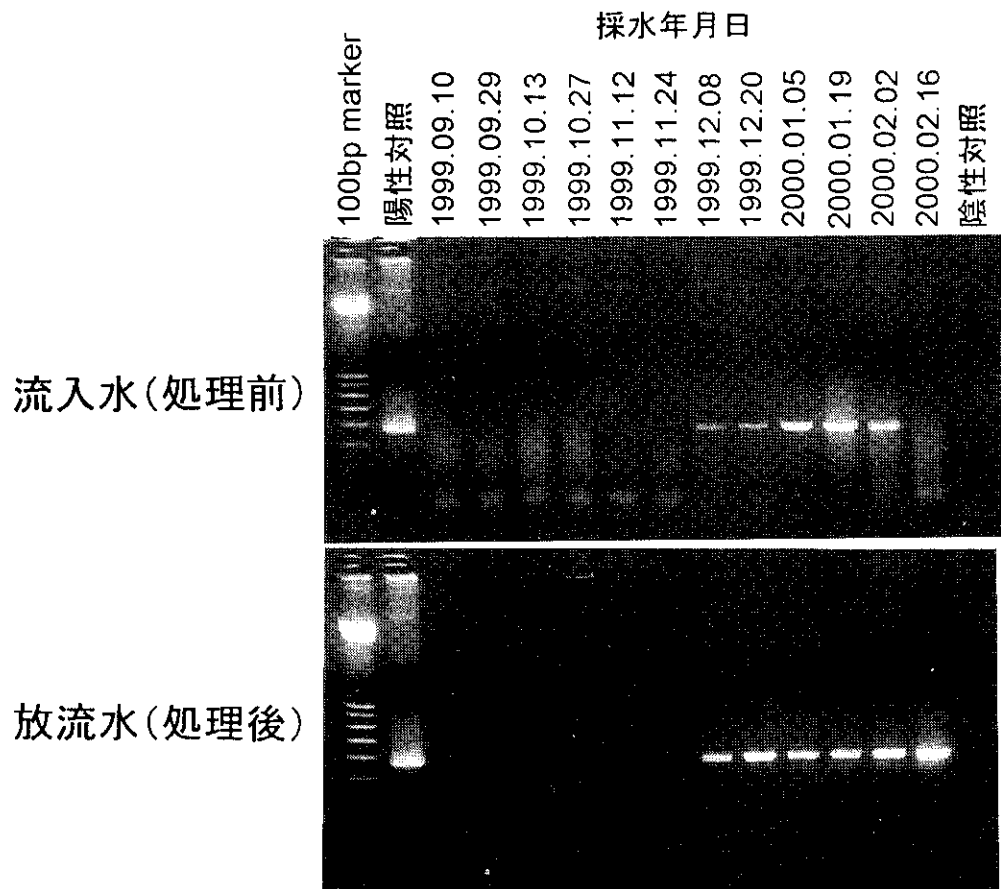


図4 下水からのNLVの検出。Yuri系 nested PCRにより増幅した。

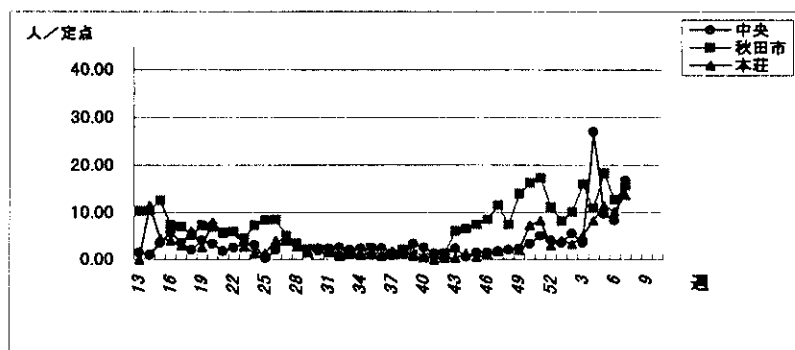


図5 感染症サーベイランス事業における感染性胃腸炎報告数の推移。図4の調査対象区域は「中央」と「秋田市」に相当する。



図6 下水から検出されたNLVのSSCP比較。左が流入水、右が放流水でレーンの順番は図4に対応する(陽性検体のみ)。

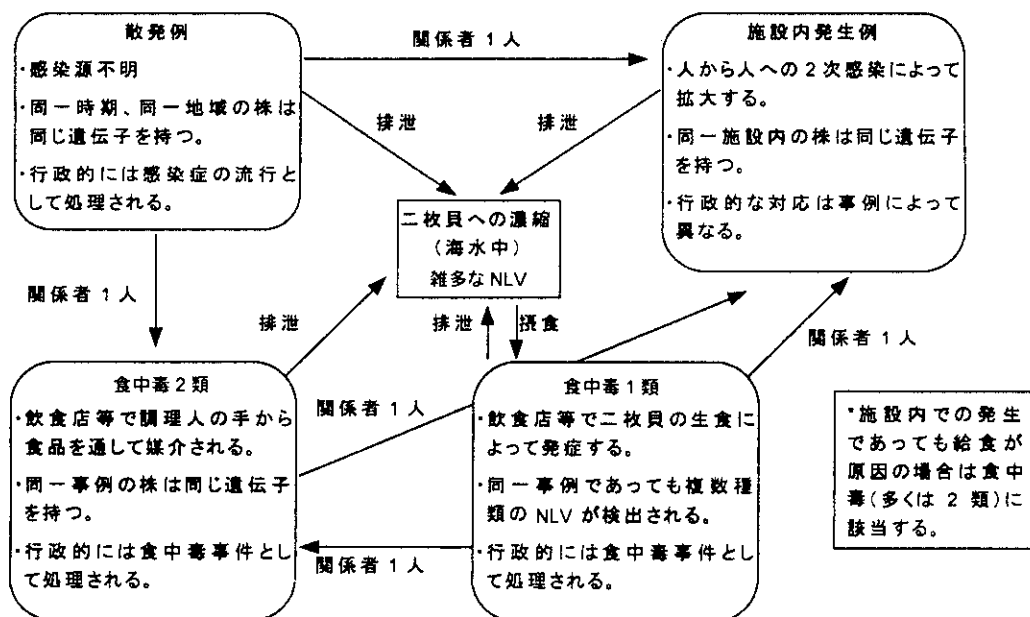


図7 NLVの循環系(予想図)