

カキ養殖海域における小型球形ウイルスの分布に関する研究

分担研究者 坂本征則 広島県保健環境センター

研究協力者 福田伸治 高尾信一 徳本静代 広島県保健環境センター微生物第二部

研究要旨

1999/2000年シーズンはカキ24検体、海水24検体、汽水123検体およびM県産の市販生食用カキ8検体について、小型球形ウイルス(NLVs)の分布を調査した。カキおよび汽水についてはポリエチレングリコールを、海水については陽電荷フィルターおよびポリエチレングリコールを用いてNLVs粒子の回収・濃縮を行った。NLVs遺伝子はカキの66.7%、海水の29.2%、汽水の4.1%、市販生食用カキ62.5%から検出された。1997/98年、1998/99年、1999/2000年の3シーズンにおける検出率は1997/98年および1999/2000年シーズンは高く、1998/99年シーズンは低かった。NLVs遺伝子の検出率には年変動が存在し、1年おきに増減が繰り返される傾向にあった。3シーズンにおけるNLVs遺伝子の検出率は1月および2月にピークになり、検出されたNLVsのほとんどはMexicoタイプであった。NLVs遺伝子の検出は細菌学的汚染度の高い地点からであり、カキにおいてはfecal coliform MPNが230を、海水においてはtotal coliformが70を超えると、それ以下に比べ約6~7倍程度高くなることが認められた。

A. 研究目的

広島湾のカキ養殖海域におけるカキおよび海水中の小型球形ウイルス(NLVs)の分布を調査し、NLVs対策の基礎データを得る。

B. 研究方法

1 検査地点

図1に示す11地点から検体を採取した。カキおよび海水は1999年11月から2000年1月の間に8地点から毎月採取した。汽水是1999年4月から1999年1月の間に3地点から1週間間隔で採取した。また、市販生食用カキは1999年11月から12月に量販店より採取した。

2 カキ中のNLVs遺伝子の検出

養殖筏から採取した24検体のカキの中腸腺を検査材料とし、平成9年5月30日付け衛食第156号厚生省生活衛生局食品保健課長および乳肉衛生課長通知の方法に準じてポリエチレングリコール(6,000)による沈澱・濃縮を行い、CTAB法[1]によりRNAを抽出した。

PCRは衛食第156号に基づく条件に準じて行った。ただし、逆転写酵素はMMLV由来の酵素(ReverTra Ace, TOYOBO, 最終濃度10u/ μ l)を使用した。プライマーはNV35/36 \rightarrow NV81/82, SM82およびYuri52F/R, MR3/4 \rightarrow Yuri22F/Rの2系統プライマ

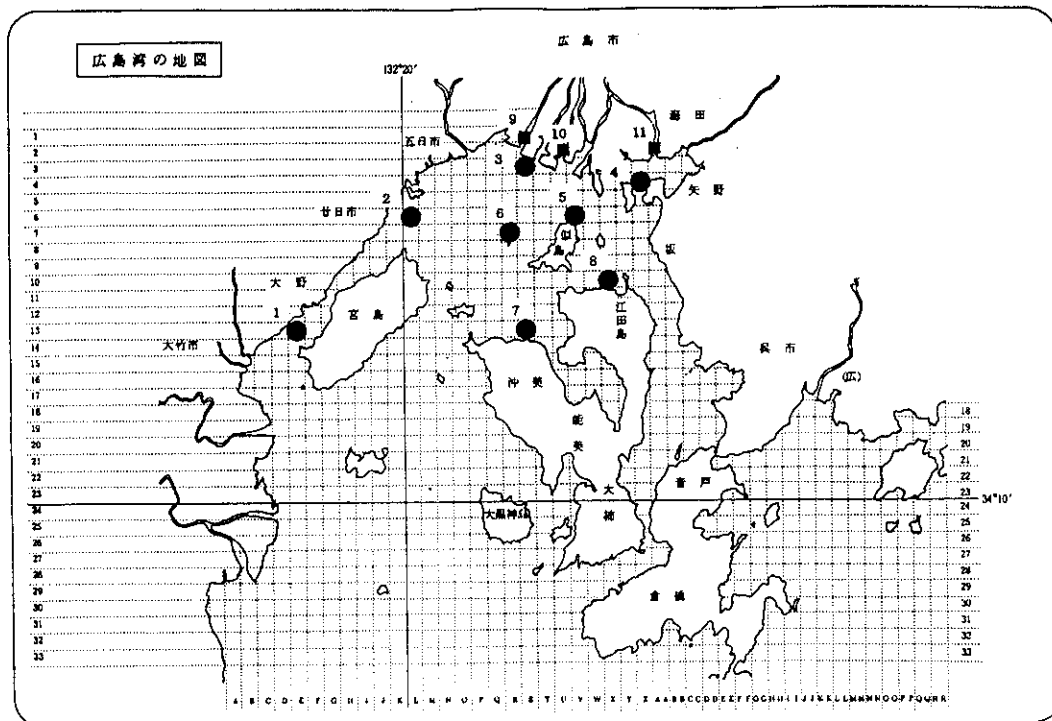


図1 検査地点

● : カキおよび海水, ■ : 汽水

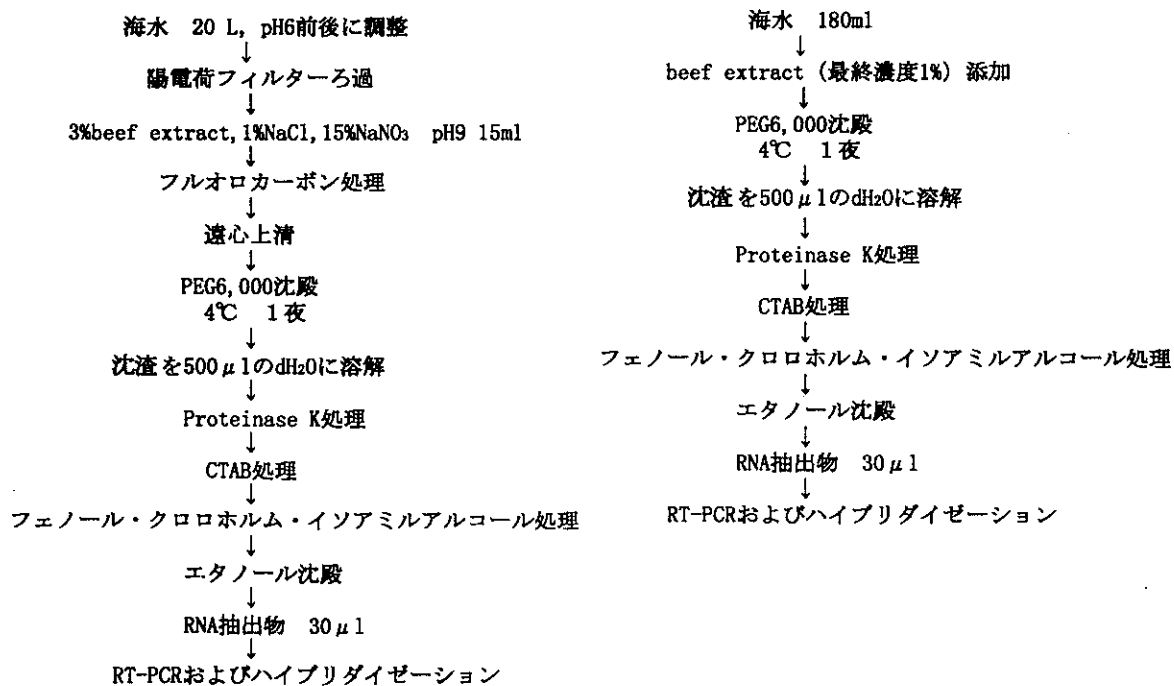


図2 海水からの RNA 抽出

ーセットを使用した。

3 海水中の NLVs 遺伝子の検出

海水 24 検体について検査を実施した。NLVs 粒子の回収は、①20 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、②180ml の海水からポリエチレングリコール（6,000）沈殿法により NLVs 粒子を回収・沈殿する方法の 2 方法により行った（図 2）。RNA の抽出は CTAB 法により行った。また、PCR はカキと同様の方法により行った。

4 汽水中の NLVs 遺伝子の検出

汽水 123 検体について、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。

5 市販生食用カキからの NLVs 遺伝子の検出

M 県産生食用カキ 8 検体について前述 2 と同様の方法で行った。

6 NLVs 遺伝子の確認

PCR で陽性を示したサンプルは、Ando ら [2] のサザンハイブリダイゼーションによるプローブ型別を行うとともに、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行った。

C. 研究結果

1 NLVs 遺伝子の検出

カキ 24 検体中 7 地点 16 検体（66.7%）から NLVs 遺伝子が検出された。NLVs 遺伝子が検出された 14 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った。NLVs 遺伝子は 11 月 4 検体、12 月 5 検体および 1 月 7 検体から検出され、1 月の検出率が高かった。NLVs 遺伝子は NV 系および Yuri 系両プライマーで 16 検体中 14 検体、NV 系プライマーのみで 1 検体、Yuri 系プライマーのみで 1 検体から検出された。

海水 24 検体中 5 地点 7 検体（29.2%）より NLVs 遺伝子が検出された。NLVs 遺伝子の 85.7% は細菌学的汚染度の高い地点からであった。NLVs 遺伝子の検出は 11 月 1 検体、12 月 2 検体、1 月 4 検体であり、カキと同様に 1 月の検出率が高かった。NLVs 遺伝子は NV 系および Yuri 系両プライマーで 7 検体中 5 検体、NV 系プライマーのみで 1 検体、Yuri 系プライマーのみで 1 検体から検出された。また、NLVs 粒子回収法別では陽電荷フィルター法のみで 5 検体、陽電荷フィルターおよびポリエチレングリコール両法で 2 検体から検出された。

汽水 123 検体中 2 地点 5 検体（4.1%）から NLVs 遺伝子が検出された。NLVs 遺伝子は 6 月 1 検体、11 月 1 検体、12 月 1 検体、1 月 2 検体であった。検出された NLVs 遺伝子は NV 系および Yuri 系両プライマーで 3 検体、NV 系プライマーのみで 2 検体であった。

市販生食用カキ 8 検体中 5 検体（62.5%）から NLVs 遺伝子が検出された。

2 1998/99 年、1997/98 年および

1999/2000 年シーズンにおける検出率の推移

図 1 に示す養殖海域 8 地点から採取した検体について、1997/98 年シーズン（1 昨年シーズン）、1998/99 年シーズン（昨シーズン）および 1999/2000 年シーズン（本シーズン）におけるカキからの NLVs 遺伝子の検出率を比較した。1 昨年シーズンの検出率は 13.8%であったが、昨シーズンは 9.4%、本シーズンは 66.7%であり、1 年おきに検出率が増減する傾向を示した。

また、海水においても 1 昨年シーズンは 18.8%、昨シーズンは 0.0%、本シーズンは 29.2%と同様の傾向を示した。

3 遺伝子型に関する検討

1999/2000 年シーズンに検出した 62 株のサザンハイブリダイゼーションによるプローブ型は 55 株が P2-A プローブと反応（genogroup II）したが、7 株はどのプローブ型とも反応しなかった。

無作為に選んだ 22 株（P2-A プローブと反応）のシーケンスを行った（図 3）。1 昨年シーズンの主流であった NLVs のタイプと同様で、本シーズンも Mexico タイプであった。また、M 県産カキも Mexico タイプであった。

4 NLVs 遺伝子の検出と汚染指標菌との関係

3 シーズンに得られた 86 検体について、Logistic model を用いて解析した。

1) カキにおける NLVs 遺伝子の検

出と fecal coliform

食品衛生法の生食用カキの基準である fecal coliform MPN が 230 を超える場合とそれ以下の場合を比較したときの odds 比は 6.3 であり、230 を超えると、NLVs 遺伝子の検出率が約 6 倍高くなることが認められた。

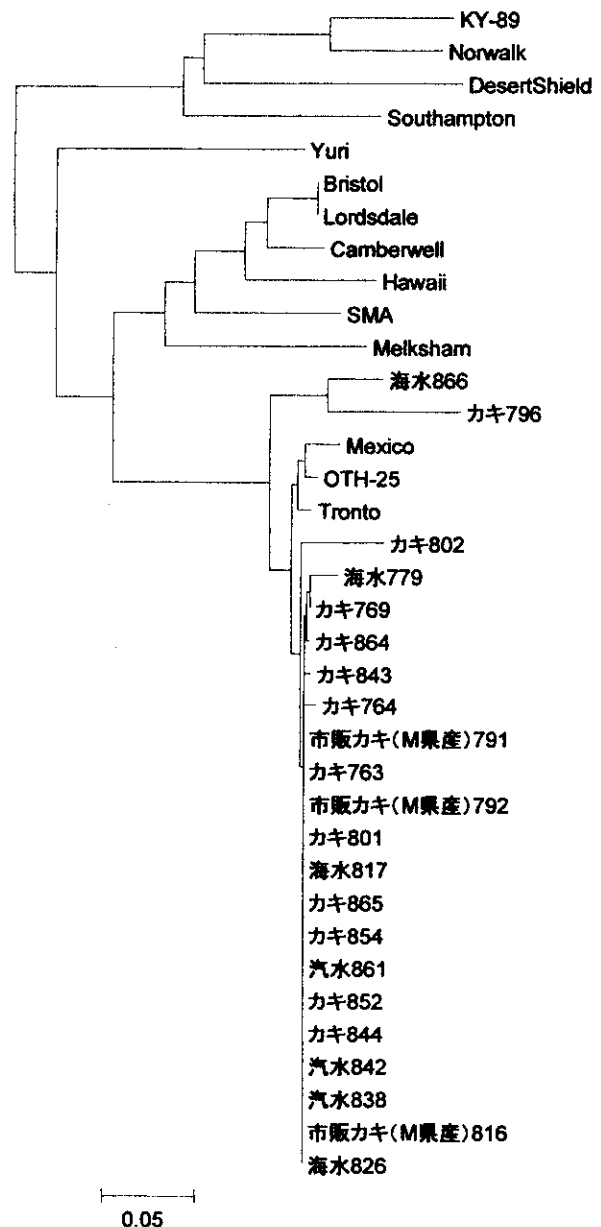


図 3 系統図

2) 海水における NLVs 遺伝子の検出と total coliform

食品衛生法の加工基準に定める coliform MPN が 70 を超える場合とそれ以下の場合を比較したときの odds 比は 7.4 であり, 70 を超えると NLVs 遺伝子の検出率が約 7 倍高くなることが認められた。

D. 考察

1997/98 年から 1999/2000 年の 3 シーズンにおけるカキおよび海水の NLVs の検出率をみると, 年変動が存在し, 2 年周期で検出率の増減が繰り返されることが示唆された。この年変動はヒトにおける流行の変動と一致していた。3 シーズンにおける検出率は 1999/2000 年シーズンが最も高かったが, 検出したカキの 87.5% は広島県の定める指定外海域であり, 生食用として出荷できない海域からであった。また, NLVs 遺伝子の検出と汚染指標菌との間には相関が認められ, 細菌学的汚染指標は NLVs の汚染指標の一助となると思われる。

3 シーズンに広島湾内のカキおよび海水から検出された NLVs のほとんどは Mexico タイプであり, Mexico タイプが主流を占めていることが示唆された。これは使用しているプライマーの選択性による結果であるのか明確ではないが, 乳幼児等の下痢症からは Hawaii タイプも検出されており, これとは若干異なっている。

NLVs 遺伝子の検出率は 1 月および 2 月に高くなる傾向を示し, ヒトにおけ

る傾向とは若干異なり, ヒトにおける流行のピーク後にカキおよび海水からの検出がピークになることが示唆された。

E. 結論

1999/2000 年シーズンにおける NLVs 遺伝子はカキの 66.7%, 海水の 29.2%, 汽水の 4.1%, M 県産食用カキ 62.5% から検出された。1997/98 年から 1999/2000 年の 3 シーズンにおける NLVs の検出率の増減は 1 年おきに繰り返されており, 検出された NLVs は Mexico タイプが主流であった。NLVs 遺伝子の検出と汚染指標菌には相関が認められ, カキでは fecal coliform MPN が 230 を, 海水では total coliform が 70 を超えると, それ以下に比べ NLVs 遺伝子の検出率が約 6~7 倍高くなることが認められた。

F. 参考文献

- [1] Jiang X., Wang J., Graham D. Y. and Estes M. K. : Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2529-2534, 1992.
- [2] Ando T., Monreo S. S., Gentsch J. R., Jin Q., Lewis D. C. and Glass R. I. : Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 33, 64-71, 1995.

分担研究報告書

ELISA、電子顕微鏡法及び RT-PCR による Norwalk virus の検出

分担研究者 大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所 微生物試験室長
協力研究者 山下育孝、吉田紀美、近藤玲子

研究要旨：最近、Norwalk virus による胃腸炎の診断用 ELISA キット（SRSV 抗原検出 ELISA キット）が開発され、市販化の検討がなされている。本研究はこの ELISA の有用性を検討するため、電子顕微鏡法(EM)及び RT-PCR との比較を行った。その結果、RT-PCR に次いで検出数が多く、EM より優れた検出感度を示し、食中毒事例の患者の診断には簡便で有用な方法であることが示された。また、食中毒事例と散発例の患者からの Norwalk virus の血清型の分布に差異がみられ、血清型により流行形態が異なる可能性が示唆された。さらに、カキ関連食中毒事例では、同一事例、同一人から複数の血清型株が検出された。

A. 研究目的

ウイルスによる食中毒事例数が全食中毒発生数の約 20%を占めていることが明らかにされ、これを受けて平成9年5月30日に食品衛生法の施行規則が一部改正され、小型球形ウイルス等(SRSV)のウイルスが食中毒の原因物質として認知されるに至った。また、いわゆる SRSV は毎年冬季に小児および成人に流行する嘔吐下痢症の原因ウイルスとして知られており、感染症対策上重要な病原ウイルスである。

遺伝子構造の解明や、分子生物学的研究の進展により、SRSV がカリシウイルス科に属することが明らかになった。ヒトに胃腸炎をおこすカリシウイルスは二つの属に分けられ、それぞれの属名は現在国際ウイルス命名委員会において論議中で、暫定的に Norwalk-like virus 属及び Sapporo-like virus 属と呼ばれている。Norwalk-like virus 属の Norwalk virus (NV) が散発例及び食中毒の原因として主に流行しており、Sapporo-like virus 属の Sapporo virus (SV) は乳幼児の下痢症に関連して検出されることが多い。

NV はさらに Genogroup 1 (G1) と Genogroup 2 (G2) の二つの遺伝子型に分けられ、前者は少なくとも5種、後者は少なくとも7種の血清型に分けられると考えられている。このような抗原性及び遺伝子塩基配列の多様性のため、NV の標準法的検出法の開発は難しく、未だ確立されていない。最近、これらの血清型株のカプシド領域遺伝子をバキュロウイルスに組み込み、発現させたウイルス様粒子に対する免疫血清を作製し、それを用いた ELISA 法による NV 検出キットの開発が進んでいる。そこで、従来から我々が

用いている EM 及び RT-PCR と新しく開発中の ELISA を比較し、ELISA の有用性について検討した。

B. 研究方法

1.材料：ウイルス性食中毒に関連した材料は、1995年4月から1999年4月の間に発生した6例の食中毒事例の患者及び調理従事者の糞便計44例を用いた。地域の散発性胃腸炎の材料は、1994年から1999年4月の間、松山市の1小児科医院外来患者から、EM と RT-PCR で検出したカリシウイルス陽性糞便を用いた。

2.方法：糞便からのウイルス検索は EM 及び RT-PCR で行った。RT-PCR は Yuri プライマー系(プライマー MR3/4 を 1st PCR に用い、齋藤らの設定したプライマー Yuri 22F/R を nested PCR に用いた)と、NV プライマー系(プライマー 35/36 を 1st PCR、NV81/82, SM82 を nested PCR に用いた)を併用した。PCR 陽性例については、Ando らのジゴキシゲニン標識プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションを行い、PCR の確認とプローブ型別結果を得た。プローブ型 P1A は G1 に属し、P1B、P2A、P2B は G2 に属す。

ELISA による血清型別は SRSV 抗原検出 ELISA キットの試作品(デンカ生研製)を用いた。本キットは G1 の3種の血清型、G2 の4種の血清型を検出・同定できる。しかし、本キットには今のところ 1997/98 年に流行した Tront 株類似株やその他 2-3 種の流行株に対する検出系は含まれていない。

C. 結果 及び 考察

食中毒事例の患者及び調理従事者の糞便材料から EM、RT-PCR、ELISA の 3 法を用いて NV の検出を行った。検査方法別の検出率を表 1 に示したが、全体の検出率では EM が 43%、RT-PCR が 61%、ELISA は 55%であり、ELISA が EM より高い検出率を示した。特に事例 3 では ELISA の方が RT-PCR に比べて検出率が高く、ELISA が患者糞便の病原検査にはほぼ十分な検出感度を持つことが示された。

表 2 には ELISA 法の結果とプローブ型、EM 結果を示した。ELISA の結果は 3 回に分けて検査を行ったので、OD インデックス（検体の吸光度／陽性対象の吸光度）で示した。0.2 以上を陽性と判定したが、G1 及び G2 の同じ Genogroup 内では交差反応がみられるので、同じ Genogroup 内で最も OD インデックスが大きいものを陽性とした。6 事例のうち事例 2 では酢ガキ、事例 A では焼カキの摂食が報告されており、カキ関連食中毒と考えられた。その他の事例は原因食品が不明であった。事例 2、事例 B では同一集団から、それぞれ 3 種、4 種の血清型が検出され、また、プローブ型もそれぞれ 2 種、3 種検出された。一方、その他の食中毒事例では、それぞれ単一の血清型、プローブ型が検出された。このことはカキ関連の食中毒の場合は、多種類のウイルス株が関与すること示している。摂食したカキから検出されたウイルス株と患者からのウイルス株を比較し、感染経路を探索するには注意が必要である。図 1、図 2 に生カキ関連食中毒事例とその他の食中毒事例の ELISA 結果を示したが、両者の差異が明瞭に現れている。

散発性胃腸炎からの EM 或いは RT-PCR でカリシウイルス陽性例について ELISA を行った（表 3）。少数例の結果にもかかわらず、今回の ELISA キットに含まれている 7 種すべての血清型株が検出され、地域において多様な株が混在して流行していることが推測された。血清型別ができた 24 例中 G1 の血清型は 3 例のみで、ほとんどは G2 の血清型であった。特に Camberwell 株に近縁の 104 株タイプに判定されたものが 16 例で過半を占め、調査期間中ほとんど毎シーズン検出された。これらのことは、最近流行している NV の主流が Camberwell 株タイプであったことを示唆している。型別不能例が 20 例あったが、そのうち 6 例はプローブ型 P2A、3 例は P1B でともに本キットには含まれていない血清型と考えられている株であった。さらに、プローブ型別不能、PCR 陰性例が併せて 9 例含まれており、これらは NV では

ない可能性もある。今後、新たな血清型の検出系を追加できれば、この ELISA は散発性胃腸炎患者の診断にも十分に有用であると考えられた。

散発事例、食中毒事例のプローブ型と血清型の関係を表 4 に示した。散発例では希であった G1 に属する株が、食中毒事例では G2 とほぼ同程度の多さで検出された。また、散発例の過半を占めた 104 株タイプが、食中毒事例では全く検出されなかった。これらのことは、ウイルス株によって流行形態が異なる可能性を示唆している。

ウイルス性食中毒には地域で流行している多様なウイルス株が関与しており、また、食品からのウイルスの検出が極めて困難という問題がある。また、カキ等の生食による食中毒と調理中の食品の二次汚染によるものの 2 つの食中毒発生様式が考えられる。さらに、食品を介さない糞口感染による食中毒様集団発生を起こすことがある。そのため、ウイルス性食中毒の原因解明には、摂食調査等の詳細な疫学的調査と共に、遺伝子シーケンスやハイブリダイゼーション等による原因ウイルスの詳細な解析が重要になっている。今回用いた SRSV 抗原検出 ELISA キットは反応時間が約 4 時間と迅速性に優れ、血清型等の疫学的情報も得られるため、食中毒対応の最前線である保健所でも実施し得る有用な試験法であると考えられた。

D. まとめ

1. 食中毒の原因としての NV の遺伝的、抗原的多様性が示された。
2. 食中毒事例から検出されるウイルスと散発例からのウイルスとでは、由来により血清型の分布に差異がみられ、ウイルス株によって流行様式が異なる可能性が示唆された。
3. 生カキ関連食中毒事例からの NV は、その他の事例と比べて、プローブ型、血清型の分布が異なっていた。
4. RT-PCR、ELISA、EM の順に検出率が高く、ELISA が食中毒事例及び散発例のウイルス検出法として有用であることが示された。

F. 研究発表

学会発表

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：ウイルス性食中毒及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ブ型と血清型の分布。第 47 回日本ウイルス学会、1999、11、横浜市

表1 検査法別カリシウイルス検出状況

事例no.	電子顕微鏡法	RT-PCR	SRSV-ELISA
	陽性数 / 検査数	陽性数 / 検査数	陽性数 / 検査数
1	3 / 7	6 / 12	0 / 2
2	3 / 10	6 / 10	5 / 10
3	3 / 7	3 / 7	5 / 7
4	6 / 10	8 / 10	4 / 8
A	3 / 5	2 / 5	3 / 5
B	3 / 10	8 / 10	6 / 10
	21 / 49	33 / 54	23 / 42
	42.8%	61.1%	54.8%

表2 食中毒事例のELISA結果とプローブ型

事例	検体no.	124	258	Chiba	104	76	47	7k	血清型	プローブ型	EM
1	N-11	0.05	0.05	0.06	0.03	0.02	0.05	0.01	-	P1B	+
	N-2	0.00	0.02	0.02	0.15	0.10	0.02	0.03	-	P1B	+
2	98-2338	0.04	0.03	0.05	0.09	0.04	0.14	0.37	7k	P1B	-
	98-2339	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-
	98-2340	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.04	0.03	-	-	-
	98-2341	0.04	4.54	0.03	0.01	0.01	0.03	0.02	258	P2B	-
	98-2342	0.07	6.15	0.06	0.11	0.40	0.03	0.15	258, 76	P2B	+
	98-2343	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.08	0.02	-	P2B	-
	98-2344	0.04	0.72	0.05	0.04	0.02	0.03	0.71	7k, 258	P1B	+
	98-2345	0.04	0.05	0.07	0.52	1.48	0.04	0.01	76	P2B	+
	98-2346	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.03	-	-	-
	98-2347	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-	-	-
3	99-571	0.29	1.32	9.32	0.13	0.22	0.12	0.10	Chiba	P1A	-
	99-572	0.08	0.22	1.48	0.02	0.01	0.08	0.03	Chiba	-	-
	99-573	0.14	0.43	5.46	0.00	0.01	0.00	0.00	Chiba	P1A	+
	99-574	0.04	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	-	-	-
	99-575	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-
	99-576	0.19	1.46	7.09	0.05	0.03	0.07	0.01	Chiba	-	+
	99-577	0.17	0.87	10.95	0.01	0.02	0.01	0.01	Chiba	P1A	+
4	99-1005	0.01	0.01	0.01	0.04	0.19	0.02	0.01	-	P2B	+
	99-1006	0.04	0.05	0.05	0.02	0.60	0.02	0.01	76	P2B	+
	99-1007	0.03	0.02	0.06	0.07	8.20	0.08	0.04	76	P2B	+
	99-1008	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.46	0.00	0.01	76	P2B	-
	99-1009	0.07	0.06	0.03	0.10	0.05	0.11	0.07	-	-	-
	99-1010	0.08	0.03	0.04	0.03	0.03	0.11	0.03	-	-	-
	99-1011	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	-	P2B	-
	99-1012	0.16	0.03	0.07	0.05	2.92	0.08	0.04	76	P2B	+
A	MHC-1	0.02	2.26	0.00	0.02	0.01	0.03	0.03	258	-	+
	MHC-2	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.23	7k	P1B	+
	MHC-3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	-	-	-
	MHC-4	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	-	-	-
	MHC-6	0.11	0.21	1.86	0.24	0.77	4.73	0.05	47, Chiba	P2B,P2A	+
B	MC-1	0.98	0.05	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	124	-	-
	MC-2	0.06	0.01	0.04	0.02	0.05	0.05	0.02	-	-	-
	MC-3	1.26	0.12	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	124	P1A	+
	MC-4	0.43	0.03	0.02	0.02	0.01	0.04	0.01	124	P1A	+
	MC-5	0.23	0.12	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01	124	-	-
	MC-6	0.06	0.06	0.03	0.01	0.02	0.10	0.04	-	-	-
	MC-7	0.90	0.05	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	124	P1A	-
	MC-8	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.15	0.04	-	-	-
	MC-9	0.68	0.44	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	124	-	+
	MC-10	0.01	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	-	-	-

ODインデックス = 検体の吸光度 / 陽性対照の吸光度

図1 生力キ関連食中毒事例のELISA結果

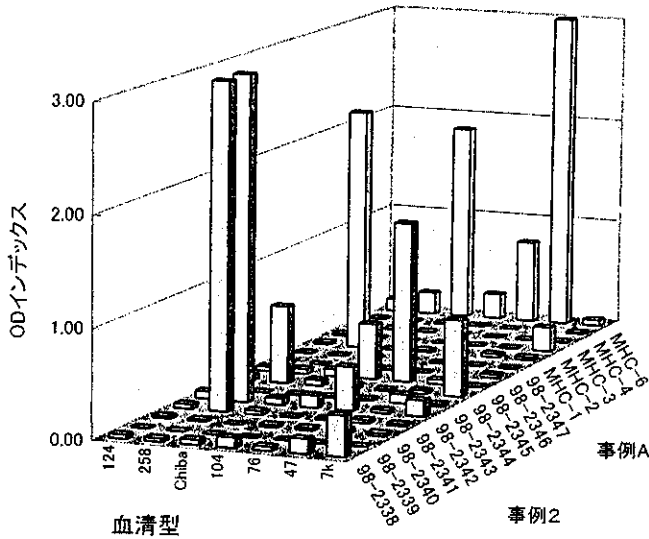


図2 その他の食中毒事例のELISA結果

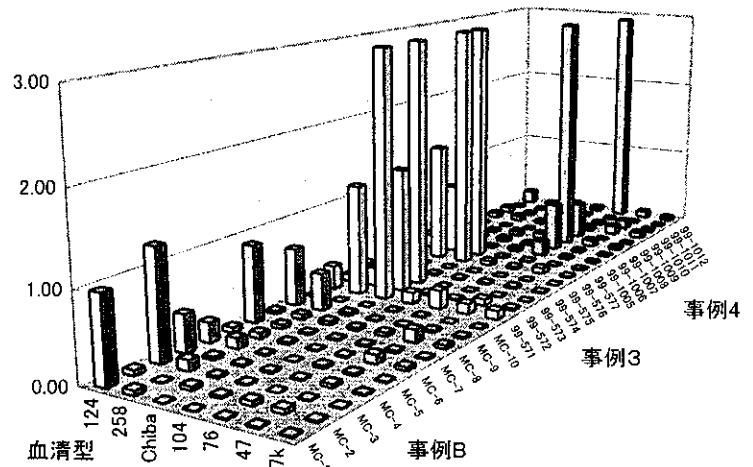


表3 散発性胃腸炎からのカリシウイルスの血清型別分布

流行時期	Genogroup 1			Genogroup 2				型別不能	計
	124	258	Chiba	104	76	47	7k		
1994.1-3							3	2	5
1994/95		1		2		1		1	5
1995/96			1	1				2	4
1996/97	1			6				6	13
1997/98				3	1			6	10
1998/99				4				3	7
計	1	1	1	16	1	1	3	20	44

型別不能株の内訳: P2A-6株 P1B-3株 P2B-2株
 プローブ型別不能-3株 PCR陰性-6株

表4 発生状況別のプローブ型と血清型の関係

	プローブ型	Genogroup-1			Genogroup-2				ELISA 陰性	計
		124	258	Chiba	104	76	47	7k		
散発事例	P1A			1						1
	P1B				1			3	3	7
	P2A								6	6
	P2B				15	1	1		2	19
	同定不能	1	1						4	6
	PCR陰性								5	5
	小計	1	1	1	16	1	1	3	20	44
食中毒事例	P1A	3		3						6
	P1B		1					3	2	6
	P2A								0	0
	P2B	2	1			6	1		3	13
	同定不能	3							2	5
	PCR陰性		1	2					12	15
	小計	8	3	5	0	6	1	3	19	45

アストロウイルスの中和試験法の検討及び住民の中和抗体保有状況

分担研究者 大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所 微生物試験室長
研究協力者 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美

研究要旨：アストロウイルスは小児の急性胃腸炎の原因としてのみでなく、集団食中毒の原因としても重要なウイルスであるが、その検査法は一般的に普及しているとはいえない。今回はアストロウイルスの中和抗体測定法の検討を行い、住民の血清型別中和抗体を測定した。アストロウイルスでは中和の指標として細胞変性を用いられないため、中和の判定にアストロウイルス抗原検出 ELISA を援用した。各血清型株に対するウサギ免疫血清では、中和抗体は血清型特異性を示し、交差反応はみられなかった。また、1型と2型に対する住民の中和抗体保有状況は、血清型により著しい差異を示した。1型抗体は小児期から多く、全体で61%の陽性率であったが、2型抗体は非常に希で、陽性率6%であった。この血清疫学的データは、同地域において検出されたアストロウイルスの血清型分布と一致していた。

A. 研究目的

アストロウイルスはヒトの急性胃腸炎の原因ウイルスの一つで、小児の患者からはロタウイルス、カリシウイルスに次いで腸管アデノウイルスと同程度の頻度で検出される。また、時に大規模な集団発生の原因として報告されており公衆衛生上無視できないウイルスである。特に1991年の大阪府で発生したアストロウイルス6型による大規模胃腸炎集団発生は、6千人を超える患者発生数であったと推定された。

アストロウイルスは国内では検査法が一般的でなく、直径が約30nmの球形ウイルスであるため電子顕微鏡法では検出が難しいためか、その検出報告が少ない。しかし、アストロウイルスはカリシウイルスと違って培養細胞でウイルスの増殖が可能であり、ウイルス診断用抗体の作製も比較的容易にできる。我々はアストロウイルスの全ての血清型株と反応するモノクローナル抗体を作製し、アストロウイルス検出ELISA法を開発するとともに、1型から7型までの各血清型に対するウサギ免疫血清を用いたアストロウイルス血清型別法を開発し、地域における散发性アストロウイルスの血清型の分布を明らかにしてきた。

本研究では、アストロウイルスの中和抗体測定法を検討して血清学的診断法を確立し、さら

に地域の血清疫学調査を行うことにより、アストロウイルスの血清型別の流行状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

アストロウイルスの培養法：WillcockらのCaCo-2細胞によるアストロウイルス培養法に準じて行った。すなわち培養7日目のCaCo-2細胞に1:5-1:10希釈したウイルス液を接種し、ふらん器内で2時間吸着した。その後Hanks BSSで2回洗浄し、5ug/mlトリプシン、100unit/mlペニシリン及び100ug/mlストレプトマイシンを添加したEagles MEM培地を細胞維持液として加えて、37℃炭酸ガスふらん器で3-5日間培養した。

抗アストロウイルス抗体の作製：アストロウイルス3型を免疫したBalb/cマウス脾臓細胞と、マウスミエローマSP2/0細胞を融合し、3回の限界希釈法でアストロウイルス群抗原特異モノクローナル抗体(MAb-3A3)を作製した。また、1型から7型までの各血清型株に対するウサギ免疫血清を作製した。免疫源にはCaCo-2細胞で増殖させたウイルスをCsCl密度平衡遠心で精製したものをを用いた。

アストロウイルスの定量：アストロウイルス抗原検出ELISAを用いて行った。ウイルスの定

量は、アストロウイルス感染 CaCo-2 細胞培養の Lysate を階段希釈して、ELISA により直接 Lysate 中の抗原量を測定する方法と、ウイルス感染細胞培養の Lysate を 10 倍階段希釈したものを 96 ウェルマイクロプレートの培養細胞に接種、培養後各ウェルのウイルスの増殖の有無を ELISA により調べ、感染価を求める方法で行った。

アストロウイルス中和抗体価測定：トランスファープレート上で作製した 25ul の血清希釈列に等量の 100TCID₅₀/25ul のウイルス液を加え、振とう後 37℃で 2 時間、4℃で一夜中和後、96 ウェルの細胞に接種した。4 時間の吸着後、8 連マニホールドアスピレーターを用いて Hanks BSS で 2 回洗浄し、5ug/ml トリプシン添加 MEM を細胞維持液として加え、37℃で 5 日間培養した。各ウェルの培養上清はアストロウイルス抗原検出 ELISA でウイルスの増殖の有無を調べた。100TCID₅₀ のウイルス対照ウェルの吸光度を基準とし、その 20%以下に抑制したウェルを中和反応陽性と判定した。同一希釈のウェルの 50%以上が中和される最大血清希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。中和抗体の測定には、取扱が容易な LLC-MK2 細胞を用いた方が有利であるので、アストロウイルス各型株の LLC-MK2 細胞への馴化を試みた。1 型と 2 型ウイルスは比較的簡単に LLC-MK2 細胞へ馴化できたので、上記の方法で中和試験を行った。他の型については現在馴化のため数代継代中である。

(倫理面への配慮)

マウス、ウサギを用いた免疫血清の作製に際し、実験動物をエーテル、またはクロロホルムで全身麻酔後心臓採血を行い、動物に無用の苦痛を与えないよう配慮した。

C. 研究結果

アストロウイルス各血清型標準株に対するウサギ抗血清を用いて、1 型と 2 型ウイルスに対する中和抗体価を測定した。その結果、表 1 に示すとおり、1 型ウイルスは抗 1 型血清とのみ反応し、2 型から 7 型までの抗血清とは全く交差反応はみられなかった。同様に 2 型ウイルスについても抗 2 型血清とのみ特異的に反応し、その他の型の抗血清とは反応しなかった。この成績は中和抗体が血清型特異的であることを示している。

次に、1998 年度伝染病流行予測用に採取・保存していた住民血清 126 検体を用い中和試験を行った。その結果を表 2、図 1 に示した。アストロウイルスに対する住民の中和抗体保有状況は、血清型によって著しい差異を示し、全体の 1 型抗体保有率が 61%であったのに比べ、2 型はわずかに 6%であった。1 型の抗体陽性率は 0-1 歳群では 6%と低かったが、2-3 歳群では 47%とほぼ半数が感染の既往を示した。7-9 歳群では 68%、10 歳以上では 80%以上が抗体を保有しており、1 型の高い浸淫度がうかがわれた。一方 2 型に対しては 0-1 歳群、4-6 歳群に少数の抗体保有者を認めたが、20 歳代群、30 歳以上群でも 10%前後の抗体陽性率で、2 型はほとんど流行していないことが示された。

D. 考察

アストロウイルスの増殖には、CaCo-2 細胞を用いても LLC-MK2 細胞を用いても細胞維持液に 5-10ug/ml のトリプシンの添加が必要である。この濃度のトリプシンは細胞をかなり強く変形させ、培養器からの細胞剥離を進行させる。そのためウイルスによる細胞変性を指標にした中和試験は困難である。そこで、アストロウイルス群特異モノクローナル抗体 MAb-3A3 を用いたアストロウイルス抗原検出 ELISA により、中和の成否を判定する方法を検討した。ウイルス対照の吸光度を 5 分の一以下に抑制したウェルを中和陽性とする判定基準を設けたが、ELISA による中和の判定は明瞭で、目視で十分判定可能であった。散発性の急性胃腸炎の約 10%はアストロウイルスが原因とされているが、アストロウイルスの流行実態に関する研究は多くない。我々は松山市の 1 小児科医院を中心に、長期間継続的小児急性胃腸炎の病原検索を行い、アストロウイルスの血清型別検出状況を明らかにした(表 3)。当該地域内で 7 型を除き 1 型から 6 型までの血清型株が検出され、多様な血清型が混合して流行していることがわかった。調査期間を通じてアストロウイルス 1 型が最も多く検出され、次いで、4 型、3 型が多く検出された。5 型は多くはないものの 1997 年、1998 年に連続して流行がみられた。2 型、6 型は十数年来希にしか検出されなかった。これらの結果を、今回得られた 1 型と 2 型の中和抗体保有状況と比較すると、非常に良く一致しており血清疫学的にも血清型別アストロウイルスの流行状況が推測

された。すなわち、1型は最も普遍的に流行しており小児期の早い時期に多くが感染し、抗体を獲得していることが示され、一方、2型は当地区ではほとんど流行しておらず、時に散発的に出現していることがわかった。このことは、2型に対する感受性者が蓄積していることを意味し、食中毒等の集団発生の危険性があることを示唆している。今後、他の血清型についても中和抗体保有状況を明らかにし、ウイルス検出状況との相関を検討したい。

今回用いたウサギの抗血清は、ELISAでは他の血清型との間に非常に高い交差反応を示したが(data not shown)、中和試験では血清型間の交差反応はほとんどみられなかった。このことは、一般的な免疫方法で作成したポリクローナル抗血清で中和試験によるアストロウイルスの同定ができることを示唆しており、診断用抗血清の供給が容易であると考えられた。

なお、種々の血清型株に感染既往のあるヒト血清では、中和試験においても血清型間交差性が現れる可能性があるため、アストロウイルス胃腸炎の患者血清を収集し、ヒト血清における中和抗体の血清型特異性を検討する必要がある。

E. 結論

- 1.LLC-MK2細胞、CaCo-2細胞を用い、アストロウイルス抗原検出ELISAを援用することにより、アストロウイルス中和抗体を測定することが可能になった。
- 2.アストロウイルス各血清型標準株に対するウサギ抗血清では、中和抗体の血清型特異性が示された。
- 3.住民の中和抗体保有状況は、血清型により著しい差異を示し、1型の抗体保有率が61%に比し、2型では6%に過ぎなかった。この結果は同地域で検出された血清型別アストロウイルスの分布と一致していた。

F. 研究発表

1.論文発表

Oseto, M., Yamashita, Y., Yoshida, K., Kondo, R., Asai, T., Inouye, H., Nakano, S., Ishimaru, Y., Serotypes of Astrovirus Isolated from Children in Sporadic Gastroenteritis Cases in Ehime Prefecture 1981-1997. *Jpn.J.Infect.Dis.*,52,134-135 (1999)

表1 抗アストロウイルスウサギ血清の中和抗体価

ウイルス型	ウサギ抗血清						
	抗Ast-1	抗Ast-2	抗Ast-3	抗Ast-4	抗Ast-5	抗Ast-6	抗Ast-7
Ast-1型	12800<	<40	<40	<40	<40	<40	<40
Ast-2型	<40	12800	<40	<40	<40	<40	<40

表2 アストロウイルス中和抗体保有状況

年齢区分 (歳)	検査数	1型抗体陽性数		2型抗体陽性数	
			(%)		(%)
0-1	16	1	6	1	6
2-3	17	8	47		0
4-6	17	6	35	3	18
7-9	19	13	68		0
10-14	13	11	85		0
15-19	13	13	100	1	8
20-	15	12	80	1	7
30-	16	13	81	2	13
計	126	77	61	8	6

図1 アストロウイルス中和抗体保有状況(1:10以上)

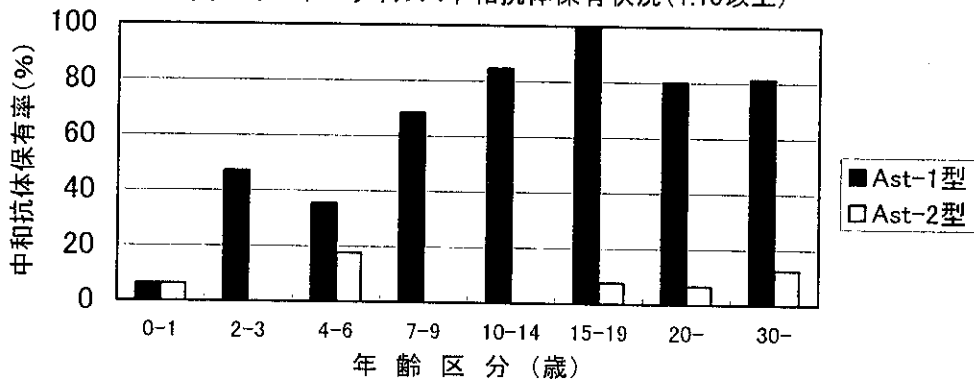


表3 アストロウイルスの流行型の年次推移

年次	血清型別アストロウイルス検出数							合計
	1型	2型	3型	4型	5型	6型	7型	
1981年	2			1				3
1984年	2			1				3
1985年	1	1	3	2				7
1986年	2							2
1987年	5		1	1				7
1988年	6		2	4				12
1989年	9			1				10
1990年	1		1	1				3
1991年				3	1			4
1992年	3			1	3			7
1993年	1			8				9
1994年	7							7
1995年	3		4			1		8
1996年	2	2	4					8
1997年	6			1	3			10
1998年	1				1			2
合計	51	3	15	24	8	1	0	102
(%)	50.	2.9	14.7	23.5	7.8	1.	.	100

分担研究報告書

ELISAによるNLVの検出に関する研究

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所主任研究員

研究要旨：7種類のVLPsに対するウサギ免疫血清による抗原検出ELISAについて、千葉県内の食中毒事例、小児散発事例の検体を用いてその検出感度を比較した。食中毒11事例57名中7事例25名（43.8%）がELISA陽性となった。EMは8事例33名（57.9%）からウイルス粒子を検出し、PCRは11事例50名（87.7%）、1stPCRでは8事例32名（56.1%）が陽性であった。小児散発事例では、22名中9名（40.7%）がELISA陽性となった。EMは12名（54.5%）からウイルス粒子を検出し、PCRは22名（100%）、1stPCRでは13名（59.1%）が陽性であった。ELISAの検出率はEM、PCRより低かったが、キットに含まれていない遺伝子型を除くと、EMおよび1stPCRの検出率にほぼ匹敵した。これらのことからELISAは、NLVの迅速検査法として有用であることが示された。

A. 研究目的

平成9年の食品衛生法の改正により、Norwalk-like virus (NLV) は食中毒の原因物質に位置づけられ、これまで原因不明に終わっていた事件の多くがNLVによるものであることが明らかになった。現在、NLVは増殖系がみつかっていないことから、ウイルスの検出は電子顕微鏡によりウイルス粒子を検出するか、NLV遺伝子を検出するかによって行われているが、NLVは行政指導の対象となったことから迅速簡便な検査法の開発が望まれている。近年、組換えバキュロウイルス発現系を用いて、NL

Vのウイルス様中空粒子（VLPs）の産生が可能となった。今回、武田らの開発したVLPsに対する免疫血清を用いた抗原検出用ELISAについて、千葉県内の食中毒事例および小児散発事例の検体を用いてその有用性を検討した。

B. 研究方法

平成10年4月～平成11年6月までに千葉県内で発生した食中毒11事例の患者57名と、平成10年11月～平成11年3月までの小児散発事例22名から得た糞便を検査材料として用いた。

NLV抗原検出用ELISAは、組

換えバキュロウイルスで発現した7種類のVLPsを免疫原として作製したウサギ血清を捕獲抗体として、ペルオキシダーゼ標識した抗VLPsウサギ血清を検出抗体とするサンドイッチELISAで行った。なお、VLPsは、Genogroup I (GI)で、124 (Norwalk-like virus)、258 (Southampton-like virus)、CV (Chiba virus)の抗原で発現させた3種類、Genogroup II (GII)で、76 (Hawaii-like virus)、104 (Lordsdale-like virus)とr47とr7の4種類である。また、同じ検査材料について、電子顕微鏡法(EM)および構造蛋白領域のGI、GII特異的プライマーを用いたRT-PCRを行った。

C. 研究結果

食中毒11事例の57名の検査結果を表1に、3検査法の検出率を表2-1に示した。ELISAでは、7事例25名(43.8%)が陽性となった。その中でGIの陽性は2事例17名で、r258とrCVに反応した。GIIの陽性は5事例8名で、1名を除いて全てr104に反応した。一方、EMでは8事例33名(57.7%)からウイルス粒子を検出した。PCRでは11事例50名(87.7%)が陽性で、またこの中で1st PCRから陽性は8事例32名(56.1%)であった。ELISAは、PCRおよびEMより検出率が低かった。これは本キットに含まれていない遺伝子型(DSV, MX, SM)の事例が含ま

れているためと思われる、これらの事例を除いた6事例42名では、ELISAは23名(54.8%)、EMは25名(59.5%)、PCRは35名(83.3%)、1st PCRでは25名(59.5%)が陽性となり、ELISAはEMおよび1st PCRとほぼ同等の検出率を示した(表2-2)。

散発事例の結果を表3に示した。ELISAでは22名中9名(40.9%)が陽性であり、これらは全てGIIのr104に反応し、GIに反応したものはなかった。一方、EMでは22名中12名(54.5%)からウイルス粒子を検出し、PCRでは22名(100%)、1st PCRでは13名(59.1%)が陽性であり、ELISAの検出率は、EM、1st PCRより低かった。これは遺伝子解析の結果、本キットに含まれていない遺伝子型MX型が7名と多かったためと思われる。また遺伝子解析からLV型は10名であったが、ELISAでは9名陽性でr104の感度が良好であった。

今回の検査材料で、表1の遺伝子型がCV型の事例11の25検体と、LV型の18検体(表1の事例4, 7, 10の7検体と表3の11検体)についてELISA, EM, PCR3法における一致率を求めた(表4-1, 4-2)。rCVのELISAは、25検体中11検体陽性で検出率は44%であった。なお、EMおよびPCR陽性の6検体およびPCRのみ陽性の

8検体は陰性であった。ELISAとEM, ELISAとPCRの一致率は、63%、36%と低かった。rLVのELISAは、18検体中15検体陽性で検出率は83.3%と高く、2nd PCRのみ陽性の3検体も陽性であった。ELISAとEM, ELISAとPCRの一致率は86%、81%といずれも高く、r104の検出感度が良好であることが認められた。

D. 考察

今回、7種類の抗VLPs免疫血清を用いたNLV抗原検出用ELISAについてその検出率を比較した。ELISAは、キットの抗原型と検体の遺伝子型が一致していれば、EMおよび1st PCRの検出率にほぼ同等の結果が得られることが示された。特に、r104のELISAは、1st

PCR陰性で2nd PCR陽性の検体も陽性となり検出感度が良好であった。これらの結果から、本ELISAは、簡便、迅速かつ経済的で、EM法に代わる検査法として有用であると考えられた。抗原検出用ELISAは血清型特異性が高いため、それぞれの血清型の免疫血清を用いる必要がある。今後さらにMX, DSV, SMなどの血清型を追加することによってEM以上の検出率が得られると思われる。

E. 結論

NLV抗原検出用ELISAについてその検出率を比較したところ、キットの抗原型と検体の遺伝子型が一致していれば、EMおよび1st PCRの検出率にほぼ同等の結果が得られることが示された。

表1 食中毒事例検査成績

事例	原因施設	検査数	EM陽性数	PCR陽性数*	遺伝子型+	ELISA陽性数								
						GI				GII				
						r128	r258	rCV	r7	r47	r76	r104	r104	
1	小学校	8	5	6 (4)	SOV	0	6	0						
2	レストラン	1	1	1 (1)	DSV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	ホテル	2	2	2 (2)	SM				0	1#	0	0	2	
4	飲食店	1	0	1	LV				0	0	0	0	1	
5	施設	5	4	5 (3)	MX				0	0	0	0	0	0
6	飲食店	6	0	6	MX/SOV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	飲食店	1	0	1	LV				0	0	0	0	1	
8	ホテル	2	2	1	SOV	0	0	0	0	0	0	0	2	
9	民宿	1	1	1 (1)	DSV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	飲食店	5	2	3	LV				0	0	0	0	2	
11	小学校	25	16	23 (21)	CV	0	0	11	0	0	0	0	0	0
	計	57	33	50 (32)		0	6	11	0	0	0	0	8	

* PCR陽性数: () は1st PCRでの陽性数 (再掲) # : r47, r104と反応

+遺伝子型: SOV;Southampton virus, DSV; Desert Shield virus, CV; Chiba virus

SM;Snow Mountain virus, LV; Lordsdale virus, MX; Mexico virus

表2-1 食中毒事例(11事例)の
3検査法の検出率の比較

検査法	検出率	(%)
ELISA	25/57	(43.8)
EM	33/57	(57.7)
PCR	50/57	(87.7)
PCR(1st)	32/57	(56.1)

表2-2 食中毒事例(6事例)*の
3検査法の検出率の比較

検査法	検出率	(%)
ELISA	23/42	(54.8)
EM	25/42	(59.5)
PCR	35/42	(83.3)
PCR(1st)	25/42	(59.5)

*検出遺伝子型SOV, CV, LVの事例

表3 散発事例の検査成績

採取月	検査数	EM 陽性数	PCR 陽性数*		ELISA 陽性数					
			GI	GII	GI#	r7	r47	r76	r104	
11	4	N.D.	4	2(2)	0	0	0	0	0	0
12	4	2	1	3(1)	0	0	0	0	0	1
1	7	5	2	7(4)	0	0	0	0	0	4
2	3	2	0	3(2)	0	0	0	0	0	1
3	4	3	1(1)	3(3)	0	0	0	0	0	3
計	22	12	8(1)	18(12)	0	0	0	0	0	9

* PCR陽性数: () は1st PCRでの陽性数 (再掲)

#: r128, r258, rCV のELISA

表4-1 遺伝子型CV, LV の3検査法による比較

CV (25検体)		ELISA			
		+	-		
E M	+	7(1)	6	+	PCR
		3	0	-	
	-	1	8(2)	+	
		0	0	-	

LV (18検体)		ELISA			
		+	-		
E M	+	10(1)	2(1)	+	PCR
		2	0	-	
	-	3(3)	1(1)	+	
		0	0	-	

()内は2ndPCRでの+

表4-2 3検査法による陽性検体の一致率

	CV	LV
ELISA & E M	63%	86%
ELISA & PCR	36%	81%
E M & PCR	52%	67%
ELISA & EM & PCR	28%	56%

日本の各地から検出されたNorwalk-like Virusesの遺伝子型について

分担研究者 西尾 治 (国立公衆衛生院 衛生微生物学部)

研究要旨

Norwalk like Viruses (NLVs) の遺伝子型は多く存在する。そのため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り、遺伝子配列を決定する必要がある。そこで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NLVsの遺伝子型を決定した。NLVsの多くはG2で、G1は少なかった。遺伝子型はG1が5種類、G2は9種類が認められた。1998年頃まではMexico類似が、1999年はCamberwellが九州地区で出現し、2000年にはYuriが多く見られている。各年により、主流の遺伝子型が異なる傾向にある。診断用プローブは上記の15種類を作製し、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。新潟県での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。

A. 研究目的

Norwalk like Viruses (NLVs) は遺伝子型が多様で、遺伝子診断に困難なことが多い。現実にPCRで増幅されたDNAの確認試験にハイブリダイゼーション法で確認試験を行うことにしている。しかし時としてハイブリダイゼーション法で反応しないものも見られる。このことはNLVsの遺伝子配列とプローブの配列が一致しない事によると考えられる。そこで、日本および近隣国での現在の流行しているNLVsの遺伝子配列を調べることは確認試験用のプローブを作製し、その信頼性を高める上で極めて重要である。

さらにわが国におけるNLVsの流行する遺伝子型に推移が見られる。それに対応するプライマー、プローブ等の改良が常に不可欠である。また感染経路を明らかにする際に分子疫学的解析が決め手となる。そこで今回は日本各地で1995年から2000年間に日本各地の牡蠣関連下痢症、および乳幼児

下痢症患者から検出されたNLVs の遺伝子配列を調べる事にした。

B. 研究方法

検査材料：1995年から1999年のNLVsは北海道1件、青森2件、岩手1件、山形3件、新潟6件、栃木3件、千葉5件、群馬1件、埼玉5件、長野2件、山梨3件、神奈川2件、静岡2件、石川1件、岐阜1件、愛知2件、福井2件、滋賀1件、和歌山2件、鳥取12件、島根2件、岡山1件、広島1件、香川3件、愛媛10件、徳島1件、福岡14件、鹿児島1件、佐賀3件、熊本4件の97件を用いた。

2000年のNLVsは長野市5件、長野県9件、神奈川県2件、川崎市7件、静岡県3件および岡山県産カキ2件および石川県産カキ1件の29件を用いた。

PCR法：二枚貝は中腸腺を、PBSで10から20%乳剤としたのち、10,000rpm、20 min遠心し、その上清を30%シュークロースに重層、35,000 rpm、180 min遠心し、そのpellet