

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NLVs感染源の一つと考えられているカキからNLVs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NLVs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NLVs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NLVs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ウイルス様中空粒子 (Virus-like particles, VLPs) 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系を構築することも目的とした。NLVs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ことなどが明らかになるにつれ、NLVs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考えられる。ELISAによるウイルス抗原検出と同時にRT-PCRでNLVs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) NLVsのデータベースの構築と遺伝学的多様性の解析：遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCGのFastaプログラムによってGenBank、EMBLおよびDDBJに登録されているNLVs遺伝子がコードするRNA依存性RNAポリメラーゼ領域および構造蛋白領域を検索し、昨年度作成した我々独自のNLVs用データベースに追加登録した。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、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RNAの調製：ウイルス性胃腸炎患者の糞便を用い、リン酸緩衝液で10%乳剤を調製した。15,000 xgで20分間遠心した上清から、TRIZOL™を用いて直接RNAを抽出した。エタノールでRNAを沈殿した後、遠心法でRNAを回収した。少量のDWに溶解して使用するまで-20Cに保存した。

(3) RT-PCR：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。また構造蛋白領域

の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。

(4) 塩基配列の分子系統解析と構造蛋白全領域の増幅：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。新たに解読した配列を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比較し、分子系統解析によってGIとGIIに分類した。遺伝学的に新規に分類されたNLVsについては、抽出したRNAを鋳型にRT-PCRで構造蛋白の全領域を増幅した。

(5) カキ中腸腺からのNLVs遺伝子の検出：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、その遠心上清から超遠心法でNLVs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GIおよびGIIに特異的なプライマーを用いて増幅した。PCR産物はサザンハイブリダイゼーションで同定した。必要に応じてその塩基配列を解読し、系統解析を行った。

(6) 組換えバキュロウイルスの作製：増幅した構造蛋白の全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にクローン化した。リポフェクチン法で野生株バキュロウイルスと共にSf9細胞に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。

(7) NLVs構造蛋白の発現とVLPsの精製：組換えバキュロウイルスをMOI 5-10でSf9細胞に感染後、26.5℃で5-7日間培養した。発現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確認した。培養上清に産生された大量のVLPsをCsClならびに蔗糖密度勾配遠心で精製した。

(8) 抗NLVs抗体検出のためのELISA：組換えバキュロウイルスで発現されたVLPsを抗原とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgGあるいはIgM抗体を用いたELISA法である。

(9) NLVs検出のためのELISA系：組換えバキュロウイルスで発現された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抗体を検出抗体とするサンドイッチ型ELISAである。

C. 研究結果

わが国において、厚生省研究班および病原体検出情報で集計した1990~1994年、1997年1月~10月、及び1997年10月~1999年9月のデータから、ウイルス性集団食中毒を含む食品を介した非細菌

性胃腸炎は、実にその92, 96及び97%の事例がNLVsによって引き起こされていることが明らかになってきた。また、これらのおよそ30%は生ガキによるもので、カキが本疾患の新たな感染源になっていることもわかってきた。したがって、早急にカキの汚染状況を把握し品質管理のシステムを確立する必要がある。またウイルスはカキの中で増殖するわけではないので、NLVsの伝播経路を明らかにして、カキに濃縮されるまでの経路と汚染状況を解明してその経路を遮断する方策を示すことが必須である。さらに、半分以上の事例は原因となった食品が特定されていないか、原因が全く不明となっている。カキ以外の食品では、含まれるウイルス量が極端に微量であることが原因ウイルス検出の効率が極めて低いレベルにとどまっている第一義の理由である。したがって、より高感度なウイルス検出を開発してゆくことが必須である。平成11年度の研究成果は以下のようである。

わが国におけるNLVsの遺伝学的多様性と分子系統解析による迅速同定法の確立

糞便からNLVs 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RNA依存性RNAポリメラーゼ領域の比較からNLVsはGIとGIIの2種の遺伝子型に分類されてきた。我々のデータと米国のそれを比較すると、それぞれ7および9、合計16種類の血清型の存在が予想される。このうち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のはGIの5種類とGIIの8種類、合計13種類であった。RNA依存性RNAポリメラーゼ領域は約150株の比較が可能となった。一方、遺伝子型が異なるNLVsの構造蛋白領域の塩基配列を基に、GenBankおよびEMBLから相当する領域を抽出し、30株のデータベースを構築した。昨年度冬季の流行で国立感染症研究所で解析した30株を加え、60株の比較が可能になった。増殖のための培養細胞系やヒト以外の感染動物系がないNLVsにとって、ウイルス性集団食中毒患者糞便から増幅した塩基配列を迅速に同定するうえで有効な手段である。また組換えバキュロウイルスで発現する血清型の選択に極めて有用であった。

具体的には、1998-1999年冬季期間に4県で発生した食中毒5事例の患者糞便材料から増幅した

20検体についてRNA依存性RNAポリメラーゼの配列を解読した。プライマーは36/35あるいはNV82 (SM82) /NV81) である。遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCGを用いて作成したの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。20検体中11検体はCamberwell/Lorsdale/Bristol virusと合わせて類似の配列を、5検体はMexico virusと類似の配列を持つ、いずれもGIIに属するNLVsであった。GIに属するNLVsの検出はわずかであった。同じ検体を用いGIならびにGII NLVs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。20検体すべてで増幅が確認された。また生ガキが原因と考えられる10検体ではGIとGIIの両方で増幅が確認された。遺伝子型はGIではNorwalk virus、Southampton virus、Desert shield virus、およびChiba virusと類似の、GIIではCamberwell/Lorsdale/Bristol virus、Mexico virus、7 virus および47 virusと多岐にわたっていた。一つの糞便材料からGI、GIIの両方が増幅されてくる例は、冬季間に発生した生ガキが原因食中毒では毎年みられる現象である。

高感度RT-PCR法の確立とカキからのNLVs遺伝子検出

構造蛋白領域に新たに設計したプライマーを用い、RT-PCR法でカキの中腸腺からNLVsを検出した。この系によって実に30-35%のカキがNLVsの汚染をうけていることが昨年度の研究で明らかとなっている。また増幅産物の解析からこれまでにない感度と特異性を合せ持つ系であることも示された。さらに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ウイルス遺伝子を検出することも可能になってきた。一方、NLVsは健康人の糞便からも検出されることが本年度までの研究で明らかになり、カキ以外の食品および食品を介さないウイルス伝播経路解明への糸口がつかめてきた。

実験は、中腸腺5個をプールして1検体として行なった。昨シーズンは生カキ85検体中の30検体(35.3%)がNLVs陽性であり、その内訳はGIが5検体(16.7%)、GIIは14検体(46.7%)、GIとGIIの混合が11検体(36.7%)であった。今シーズンは278検体中65検体(23.4%)が陽性で、その内訳はGIが12検体(24.6%)、GIIは31検体(47.7%)、GIとGIIの混合が18検体(27.7%)

であった。65検体のうち解読できた54検体の塩基配列を系統解析してみると、昨年同様、GIのChiba virusに類似の配列が多く検出された。Chiba virusはすでに遺伝学的に3つに分岐していたが、さらに今シーズン、4検体でChiba virusに近いながらもいずれにも属さないと思われる塩基配列が検出された。GIIでは、昨シーズンはMexico virusに類似の配列多くが検出されたのに対し、今シーズンはポリメラーゼの解析ではP1B型に属する株、次いでamberwell/Lorsdale/Bristol virus、Mexico virusの順で検出された。

ウイルス様中空粒子の作製

昨年度はGIに属する2種類、GII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た。本年度は食中毒5事例の患者糞便材料から増幅した20検体に新たな4種類の遺伝子型が検出された。GIのr645 (Desert Shield-like virus)、GIIのr809 (Mexico/Toronto-like virus)、r754 (Snow Mountain-like virus) およびr10-35である。常法にしたがって構造蛋白の5'末端側から1.6-1.7Kbあるいはリバースプライマーにオリゴ(dT)を用いて、構造蛋白の全量域あるいは構造蛋白の5'末端からゲノムの3'末端にコードされるポリアデニル酸の約2.5kbを増幅し、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、完全長の構造蛋白と思われる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、患者から採血されたペアー血清を用い、ウエスタンブロット法で抗体応答を解析して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、VLPsが多数産生されていた。精製後、上記4種類のVLPsに対する高度免疫血清を作製した。これで合計11種類のVLPsの産生に成功した。その内訳は、GIがr124 (Norwalk-like virus)、r258 (Southampton-like virus)、r645 (Desert Shield-like virus) およびrCV16 (Chiba virus) の4種、GIIがr104 (Camberwell/Lorsdale/Bristol-like virus)、r76 (Hawaii-like virus)、r809

(Mexico/Toronto-like virus)、r754 (Snow Mountain-like virus)、r47r、r7およびr10-35の7種である。

抗体ELISA

発現した11種類のVLPsを抗原にしてIgG抗体検出系を確立した。過去20年間に免疫電子顕微鏡法、ELISA法あるいはウエスタンブロット法による解析から血清学的に異なるNLVsが多数存在することが確認されているが、11種類のVLPsと抗血清を用い、抗原の交差性をELISA法でしらべた。GI、GIIの同一グループ内では低血清希釈で互いに交差性が認められた。GI、GII間での交差性はほとんどみられなかった。血清学的に異なることが既に明らかになっている株同士の反応パターンを対照にして相互に比較した結果、これらは11種類のVLPsは全て遺伝学的に異なるのみならず、抗原的にも異ると考えられた。次に、カキが原因食品であった集団食中毒の患者から急性期と回復期の血清を採取し、血中IgG抗体を調べた。個々の血清型に対する抗体上昇は、同一事件から得られた患者血清であるにも拘らずその種類も数も全く異っており、抗体応答から原因ウイルスを特定することが困難であった。一方、病院の給食が原因となっていた集団食中毒事件では、事件ごとに原因ウイルスの血清型は異なるものの、それぞれ1種類のウイルスに対してのみ抗体上昇がみられ、原因ウイルスは容易に特定することができた。迅速診断のためのIgM検出系を構築することが緊急の課題である。

抗原ELISA

7種類のNLVs抗原を型別できる抗原ELISA法を確立した。同種のVLPsを抗原に用いた場合の感度は個々のVLPによって多少の変動はあるものの、おおむね 10^6 粒子/wellであった。血清型特異性は極めて高く、異種のVLPsとの交差性は全くみられなかった。First PCRで増幅バンドが確認され、塩基配列も解析できている糞便材料を用いてその10%乳剤を調製し、10倍階段希釈してその吸光度を調べたところ、20,000倍の希釈でも陽性となる検体がみられた。したがって患者便中には予想以上に大量のNLVsが排泄されていることが明らかになった。

このELISA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。一つの県から集められた433検体で調べたところ、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。したがって、この抗原型のNLVsが散发性下痢症患者の主要な流行株と考えられた。ELISA法は抗原性の異なるNLVsを型別して検出できることから、NLVs感染症の疫学的解析に応用可能であると考えられた。本年度発現した4種類を加え11種類の抗原を検出する系ができています。あと2種類を加えることによって抗原検出ELISAが完成する。また野菜をはじめとする原因食材からウイルス抗原を検出するため高力価血清を用いた抗原捕獲RT-PCR法の開発が進行中である。

D. 考察

RNA依存性RNAポリメラーゼはNLVsの複製にとって重要な機能を担う蛋白であり、RNAウイルスの遺伝子がコードする蛋白の中で最も塩基配列が保存されている領域であると考えられている。歴史的にも、NLVsのクローニングが初めて成功したとき、動物由来のカリシウイルスを含めた塩基配列のホモロジーの比較から最も保存されている遺伝子であることが示されていた。しかし、現在データベースに登録されているRNA依存性RNAポリメラーゼの塩基配列を解析すると、塩基のホモロジーはGIとGIIのグループ間で約50%、同グループ内でも70%程度である。またアラインメントからもプライマーとして機能しうるであろう20塩基程度連続した共通の配列を見いだすことが極めて困難である。この状況の中で試行錯誤が繰り返されてきたが、いまだに全てのGIとGIIを増幅できるものは得られていない状況と考えたとき、はたして現在使われているプライマーが的確であるかははなはだ疑問である。今回、国内の食中毒で検出されたNLVs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、1998-1999年冬季は大部分がGIIの遺伝子型であった。しかし、これらを構造蛋白を増幅するプライマーで確認すると実際にはGIも相当数検出された。カキ関連の食中毒からはGIとGII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GIIがメジャーであるとは考えにくい。むしろ現在広く使われている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。PCRの場合、使用したプライマー自身の領域の塩基配列は解析できない。プライマーの外側の領域の塩基

配列を解析し、RNA依存性RNAポリメラーゼ領域を増幅するプライマーについて再度評価する必要があるように思われる。幸い数株のNLVsで全塩基配列が明らかになっており、評価は容易になりつつある。

塩基配列からGI、GII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し、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、したがってわが国では遺伝学的に異なるNLVsが同時に流行していることが示唆されることを昨年度報告した。本年度は新たにGIIで遺伝学的に新規のウイルスが一つ検出された。また、構造蛋白領域の比較から既存の株と系統上類似するが、発現したVLPsと抗血清の交差試験から、明らかに異なる血清型と思われる株も出てきている。NLVsは現在考えている以上に血清学的にも多様であるのかもしれない。塩基配列を勢力的に解析しNLVsの流行状況をより詳細に把握する必要がある。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。

集団発生であれ散发例であれウイルス性下痢症が出た場合、はじめにすることは患者便材料からのウイルス検出である。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。今回開発に成功した抗原ELISAは既にキット化され、国内70の研究機関で今年の流行にあわせて評価が進行中である。試験は3-4時間で完了するため多量の検体を短時間で検査する目的には最適である。問題点は感度の点から使用が便材料に限られることである。RT-PCRで陽性となったカキの中腸腺から10%乳剤を調製し、この遠心上清について検査したがいまのところELISAで抗原が陽性となった例はない。100倍濃縮しても検出することができなかった。このELISAの検出感度は 10^6 粒子程度であるから10%乳剤中のウイルス濃度は 10^4 /0.1ml以下である。中腸腺の容量を考慮するとカキ1ヶに濃縮されるNLVsは 10^6 ヶ以下と考えられる。この値は的確なプライマーを用いた場合にfirst PCRで検出されるが、プライマーがあまり合わない場合nested PCRで検出されるウイルス量である。これまでの実験結果とも矛盾しない。

E. 結論

構造蛋白の塩基配列の比較から、これまでにわが国ではGIに属する5株、GIIに属する8株、合計13株の遺伝学的に異なるNLVsの存在が確認された。構造蛋白領域を増幅するプライマーは13種類全てを増幅できるプライマーであった。GIに属する4株、GIIに属する7株、合計11株の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、大量のVLPsを産生することに成功した。VLPsおよびその抗体を用いた抗体ELISAと抗原ELISAを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Hale, A. D., T. N. Tanaka, N. Kitamoto, M. Claret, 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. Kiso, E. E. Mast, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. 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 coderivery 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.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.
 - 13.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.
 - 14.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.
 - 15.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.
- ### 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.

国内学会

1. 橋本修, 武田直和, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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.

野菜等食品からのクリプトスポリジウム等原虫類囊子の検出法に関する研究
— 汚染原虫の活性評価方法の確立 —

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
協力研究者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部
野原 郁子 水道技術研究センター
泉山 信司 池田理化つくばテクニカルセンター

研究要旨：

これまでに、実験的に汚染された生鮮野菜からクリプトスポリジウムのオーシストの回収を試み、洗浄 ⇒ 連続ローターを用いた洗浄液の濃縮 ⇒ 密度勾配遠心沈殿法による精製 ⇒ 蛍光抗体染色 ⇒ 顕微鏡観察 / フローサイトメータによる検出、という一連の操作法を提案した。この操作により、最大で回収率 80% 程度にまで向上させることができた。しかしながら、他の病原微生物と異なり原虫類では培養による検出が困難で、希薄な汚染に際しては食材からのシスト検出は極めて困難と予想される。いわゆる HACCP の概念に従えば生産の各工程でリスク評価とその回避を行う必要がある。そこで、本年度は消毒や加熱処理など殺菌処理の効果判定法の確立を目指し、*G. lamblia* のシストを用いた脱囊試験方法の開発に努めた。

ジアルジア (*Giardia lamblia*) はクリプトスポリジウムと同様に食品や飲料水を介して伝播する腸管寄生性の原虫で、急性ないし慢性の下痢を初めとする腹部症状の原因となる。腸管寄生性原虫類の感染は糞便中に排出されたシストの経口摂取による。摂取されたシストが腸管に達した後に脱囊して小腸上部に定着する。脱囊は感染に係る必須の生物学的現象で、定量的な測定が可能となればシストの感染性の評価が可能である。その逆に、薬剤等による不活化作用の評価方法としても位置付けることができる。

G. lamblia のシストは感染スナネズミの糞便から集シスト法（遠心沈殿法とショ糖遠心浮遊法の組み合わせ）によって精製・回収した。脱囊条件の設定にあたってはシステイングルタチオン溶液、ウシ胎児血清、pH、および Trypsin について至適濃度条件、およびその組み合わせの検討が必要であった。本研究では 95% 以上の脱囊率が再現性を持って得られた条件をその後の実験条件とした。シスト壁には脱囊後に特有の形態変化が認められた。すなわち、栄養体の遊出後にシスト壁が著しく伸張する現象が認められた。これに伴ってシストのコントラストが著しく減じるために、微分干渉顕微鏡でのみ観察可能で、通常の光学顕微鏡での観察が困難となった。伸張したシスト壁は蛍光抗体染色によって強染されることが明らかとなった。脱囊率の測定はフローサイトメータを採用した。脱囊試験後の試料に FITC 標識マウス 抗・ジアルジア・シスト 抗体による特異染色、Propidium Iodide (PI) による色素排除試験を施した。緑色蛍光で標識された粒子をトリガー（測定タイミング）として緑色蛍光、赤色蛍光、前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC) の 4 パラメータを測定した。脱囊前後のシスト壁は [前方散乱光] 対 [側方散乱光] のドットプロット上で明らかに異なった集団として表現された。脱囊後のシストにおいては、1) 大きさのパラメータである FSC が小さくなる、2) 細胞内部の構造等のパラメータである SSC が小さくなる、3) FITC 蛍光強度が大きくなることが明らかとなった。クラスター解析 (SSC vs FSC) によれば脱囊前後のシストは各々集団を形成し、これより正確な脱囊率を算定することができた。*G. lamblia* を用いた従来の脱囊試験では脱囊率が低く有用な評価法とはなり得なかったが、今回の改良で 2log 程度の脱囊率の変化を迅速に把握することが可能となった。予備的に行ったシストの塩素不活化試験（残留塩素濃度 1 mg/ml、15°C）では、 Ct 値 = 100（塩素濃度 (mg/ml) × 接触時間 (min)）で 99% 程度の脱囊阻止効果が示された。現在、さらに高精度 (3log 以上) の脱囊阻止試験にまで応用できるよう測定方法の改良に努めている。

A. 研究目的

腸管寄生性原虫類による食品・飲料水の汚染が問題となっている。我が国では1996年に埼玉県越生町の水道を介して発生した集団感染症を契機として水道事業を中心に原虫類による汚染問題が表面化し、状況調査が行われてきた。また、原虫類による汚染防止には総合的な取り組みが必要との判断にたつて1999年4月1日から施行された「感染症新法」において、クリプトスポリジウムおよびジアルジア症が全数把握の4類感染症に指定された。

原虫類汚染対策の前提条件として検査法の確立が重要であるが、対象となる原虫類には(1)外界で増殖しない、(2)培養による検出が困難、(3)形態学的な検査法が当面考えられる唯一の方法、など検査法の確立に向けて難問が山積している。今後、速やかに操作性や検出感度の飛躍的な向上が望める状態にあるとは考え難い現状がある。したがって、引き続き検査法改良への努力を前提としつつ、同時に汚染源でのシストの不活化や除去などと云った別の視点からの対策を講じる必要があるものと考え。その際には、シストの感染性(生物学的活性)についての評価方法が重要となる。

本研究では *Giardia lamblia* のシストを用いて感染性の評価方法を検討した。汚染防除は基本的に物理的なシストの除去が重要で、これに熱処理や塩素処理などさらに不活化の工程を加えることで安全性を高める努力が求められる。これに伴い、不活化効果の判定方法が重要となる。これまでの報告では *G. lamblia* シストの不活化効果を動物への感染実験により評価している例が知られているが、この方法では多数の実験動物(スナネズミ)が必要な点と宿主個体間で感染抵抗性に違いが生ずるなどの不確定要素が介在する恐れがある。これに対して脱嚢阻止試験は、本原虫の感染から定着(寄生)に至る一連の生物学的現象の中でキーともいえる脱嚢現象をもって感染性評価の指標としようとするものである。これまでも *G. lamblia* のシストを用いた脱嚢活性試験は試みられてきたが、効率的に脱嚢活性の高いシストが得られなかったり、確実に脱嚢を誘導する実験条件が整っていなかったりして評価の信頼性が得られなかった。本研究では感染スナネズミの便からシストの精製、脱嚢条件の設

定が図られた。具体的には、定量的に活性の高いシストの入手方法、シストの分離・精製、脱嚢試験による生物活性評価の是非、フローサイトメータを用いた定量的測定方法等々の確立を行った。その結果、脱嚢試験による感染性評価方法を確立することができた。

B. 研究方法

G. lamblia

米国 ATCC より WB 株 (ATCC #30957) を入手し、TY1-S-33 培地 (増殖用培地: 0.75mg/ml ウシ胆汁添加、pH7.2) を用い準嫌氣的な条件で継代培養した。WB 株の栄養体 1×10^6 細胞を 4~5 週令のスナネズミ (*Meriones unguiculatus*, MON/Jms/Gbs) に経口投与し、翌日より検便で感染の有無を調べた。実験には排出のピーク時のシストを用いた。シストの回収に際しては排泄後の便の乾燥を避けるため、保湿剤を染ませた床敷きを用意した。集められた便は 4°C で保存し、採集から 1 週間以内にシストの分離精製を行った。嚢子の精製・回収はシヨ糖密度勾配遠心法を用いた。方法を概略すると、まず 15ml 試験管に約 5 g の便をとり、0.1% の Tween80 液を 10ml 程度加えて懸濁した。これを別の容器に移し Tween80 液で約 100ml に希釈、数分間静置して粗大な食物残渣を沈殿除去した。得られた上清を 4 枚重ねのガーゼでろ過し、回収したろ液を 300g 3 分間遠心して沈渣を得た。沈渣を約 4 倍量の Tween80 液に懸濁し、50ml 試験管に約 20ml を分注し、その管底に氷冷した 50% シヨ糖液 5ml を静かに注入して積層した。速やかに 300~400g 1 分間の遠心後、シヨ糖液と希釈液の境界面を回収した。回収液は 5 倍以上の Tween80 液で希釈した後に 1500g 5 分間の遠心分離により沈渣を回収した。次いで、上記沈渣を 15ml 用の遠沈管に取り、これに大過剰 (1ml) の 50% シヨ糖液を加えてよく攪拌し、速やかに 500g 1 分間の遠心分離を行った。液表面に集まったシストを金属性のループを用いて回収し、大過剰の精製水に再浮遊し、1500g 5 分間の遠心洗浄した。得られた精製シスト浮遊液は使用に供するまで冷蔵庫保存した。実験に際して、下記の塩素処理済み精製水に約 5×10^6 個/100 μ l となるようにシスト数を調製した。

脱囊用前処理液の調整と脱囊試験

グルコースを含まないハンクス液 (HBSS) 100ml に 1.0g の L-システイン塩酸塩および 1.0g のグルタチオンを添加し、使用まで 4°C に保存した。0.1M 炭酸水素ナトリウム水溶液を作製し、使用まで 4°C に保存した。

37°C に加温したシステイン/グルタチオン溶液と NaHCO₃ 溶液を用意し、使用の直前に 5:2 の混合比で混ぜて pH2.7 付近に調整した。これに最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清を添加した。この液 8ml に対して 0.1ml のシスト浮遊液 (~5 x 10⁵ 個/試験管) を速やかに加えて攪拌し、37°C で 3 分間作用させた。次いで、0.3ml の 1.0M 水酸化ナトリウム溶液を加えて中和し、シストを遠心回収 (1,000g 5 分間) した。得られたシストに 2.0ml の PBS を加えて 1 回遠心洗浄 (1,000g 3 分間) した。沈渣を 2ml の PBS に再浮遊し、37°C で 2 時間、保温した。次いで、0.1% Tween80 水溶液 (Tween80 液) を 2ml 加えて遠心洗浄 (1,500g 3 分間) した。沈渣を 2ml の Tween80 液に懸濁し、37°C で 30 分間、低調処理を行った。沈渣を遠心回収 (1,500g 3 分間) し、FITC 標識抗一ジアルジアシスト壁抗体を添加し、遮光して 30 分間染色した。必要に応じ PI 染色を行い、フローサイトメータおよび顕微鏡下で脱囊率を測定した。

フローサイトメータによる測定

フローサイトメータは Partec 社 PAS 型を用いた。主な仕様は、励起系は 15mW 空冷アルゴンイオンレーザー (488nm) を用い、検知機系は各種の狭帯域 (バンドパス) フィルターで選択的に分光・集光し、6 基の光電子増倍管で検出・定量するものである。本実験では、FITC の蛍光 (FL1) は 520nm のバンドパス・フィ

ルター、PI の特異蛍光 (FL2) は 610nm のロングパスフィルターで選択し、光電子増倍管のゲインは緑色蛍光については 300V、赤色の蛍光で 800V とした。これらと同時に測定した前方散乱光 (FSC、粒子のサイズを反映) のゲインは 280V、側方散乱光 (SSC、内部構造を反映) については 415V に設定した。測定に際して、被測光粒子の選択には FL1 をトリガーとして使用した。すなわち、FITC の特異蛍光を発する粒子のみを選択し、FL1 を含めた上記 4 パラメータを計測した。試料液の流速は約 2.5 μl/sec とした。測定時間を一定 (5 分間) とし、脱囊に伴う形態的および染色性の変化を測定し、測定時間から液量および囊子数を算定した。得られた測定結果はそれぞれにつきグラフ化した。フローサイトメータによる分画の確認のために一部の試料につき分画を分取して顕微鏡下での観察に供した。

FL1 で検知された粒子のヒストグラムはある強度の蛍光域を中心にして一峰性、時に二峰性の鋭いピークが形成される。このピークを挟んで適宜ゲートを設定、すなわちその範囲にある粒子のみを選択し、それらの粒子の FSC と SSC の 2 パラメータで二次元プロットを作成し、脱囊したシストとしなかったものとの割合を算出した。脱囊率は以下の式で計算した。

顕微鏡による測定

蛍光/微分干渉顕微鏡 (Axioplan2E, Zeiss) を使用した。脱囊後のシスト壁は時間と共に変形し、通常の光学顕微鏡下でのコントラストが著しく低下するため、微分干渉顕微鏡観察が必要であった。また、蛍光抗体染色により FITC の特異蛍光を発する粒子であることをあわせて確認した。脱囊率は次の式で算定した。

$$[\text{脱シスト率} (\%)] = \frac{[\text{空のシスト数} + \text{脱シスト中のシスト数}]}{[\text{空のシスト数} + \text{脱シスト中のシスト数} + \text{脱シストしなかったシスト数}]} \times 100$$

塩素による嚢子の不活化実験

基本的に上水試験法の塩素耐性試験法に準じて塩素によるシストの脱嚢不活化実験を行った。実験に用いるガラス器具等はあらかじめ2~3ppmの塩素(次亜塩素酸ナトリウム)水を加えて1~2日間放置し、塩素消費物質の除去を行った。また、実験に使用する精製水は予め含有塩素消費物質の除去を行ったものとした。方法は同濃度の塩素添加精製水を一晚放置し塩素を消費させ、その後熱処理(15分間煮沸)により残余の塩素を除去した。

別に用意した10倍濃縮のリン酸緩衝液(500mM、pH7.0)を脱塩素精製水で希釈し、所定濃度(50mM)のリン酸緩衝液を作製した。これを試薬ビンに移し、30分間2気圧121°Cの蒸気滅菌を行った。冷却後、必要があればpHの調整を行い、所定濃度(1mg/l)の塩素溶液を作製した。塩素濃度の測定は残留塩素計(HACH社)を用いてDinitro-p-phenyldiamine(DPD)法によって残留塩素濃度として測定した。塩素液を入れた試薬ビン恒温水槽に入れ、水温を15°Cに保った。嚢子保存液を適量取り、塩素液に添加・攪拌した。この時点から反応0時間とし、継時的に50mlずつ試料水を採取し、2本の試験管に40mlと10mlとに分注した。40mlの反応液には速やかに4.5mlの1%チオ硫酸ナトリウムと0.4mlの10%Tween80を加えて塩素処理を停止させた。得られた試料を脱嚢試験に供した。残りの10mlを用いてその時点における残留塩素濃度を測定した。また、同時に塩素を添加しない陰性対照実験群を設け、反応系自体による脱嚢活性への影響がないことを確認した。

(倫理面への配慮)

本研究での動物実験は当該研究所の実験動物倫理委員会へ届け出、その承認を得て行った。

C. 研究結果

シストの精製

G. lamblia WB株をTY-I-S培地中で無菌培養し、得られた栄養体約 1×10^6 細胞を4~5週令のスナネズミに経口投与し、糞便に排出されたシストを精製して実験に供した。投与後3~6日後に糞便中にシストが排出されはじめ、そ

の後約15~20日目に排出のピークとなりシスト数は 2×10^7 個/g程度に達した。排出から3週間を過ぎると脱嚢活性の低下したシストが多く排出されるようになることから、3週間以内のシストを使用することとした。シストの精製はショ糖密度勾配遠心法を繰り返し、未成熟のシストや崩壊過程にあるものを極力排除した。その結果、実験に供したシストの脱嚢活性は常に98%以上を示した。

脱嚢条件の設定

本研究では脱嚢試験の条件設定を再検討した。まず、経験的に*G. lamblia*のシストの脱嚢条件として、低pH(pH2~3)下、炭酸水素ナトリウム存在下でシステインおよびグルタチオンによる前処理が必須と考えられている。本研究ではシステイン・グルタチオン溶液(pH1.8)と NaHCO_3 溶液(pH8.0)の混合比の調整(5:2)により溶液をpH2.7付近に維持した。これに最終濃度が10%となるようにウシ胎児血清を添加することで、この間のシストの変性を防いだ。処理時間は3分間が適当で、それ以上はむしろ阻害効果が現れた。したがって、処理後に適量の水酸化ナトリウムを添加し、速やかに中和することが重要であった。以上の改良により脱嚢活性の評価方法が確立した。本法によれば脱嚢率は嚢子の採取日の違いや保存期間に大きく影響されることなく、再現性よく高い脱嚢率が得られた。脱嚢率の測定はフローサイトメータを用い、あわせて顕微鏡下での目視による測定も行った。

フローサイトメトリーによる脱嚢試験の確立

脱嚢処理の前後のシストをFITC標識蛍光抗体およびPIで染色し、フローサイトメータを用いて観察/測定した。

脱嚢前のシストでは、FL1(FITC測光)によって得られた粒子のヒストグラムは鋭いピークを有する一峰性の山形に分布し、非常に均質な粒子であることが観察された(図1a)。同様に、FSC(図1b)およびSSC(図1c)測定で得られるヒストグラムも鋭い一峰性の山形の分布を示した。FSCとSSCの2パラメータを用いた二次元プロテイングでは非常に限られた領域(シスト領域)にシスト粒子の集積が見られた(図1d)。すなわち、ジアルジアシストは非常に均質な蛍光抗体染色性を有し

ていること、また、粒形 (FLC) や内部構造 (粒子の充実度; SSC) も均質であることが示され、これらの結果は顕微鏡観察像とよく一致した。

次いで、脱囊処理後のシストを顕微鏡下で確認した後、フローサイトメータによる測定を行った。この標品の FL1 のヒストグラムは脱囊前のヒストグラム像と同様に鋭いピークの山型を呈しているが、脱囊前後で蛍光抗体に対する反応性に変化が示された。すなわち、脱囊後のシストは蛍光抗体試薬よく反応し、蛍光量が10倍以上に増強した (図 2a)。また、FSC のヒストグラムでは脱囊前のシストが形成したピークから左方移動、すなわち脱囊により FSC 値は著しく低下し、脱囊前 FSC 値の 1/50 ~ 1/100 付近をピークとしたなだらかな山形の分布に変化した (図 2b)。また、SSC のヒストグラムにおいても粒子の分布位置は左方に移動し、SSC 値として 1/10 程度に低下していることが示された (図 2c)。これを FSC と SSC の二次元ドットプロットで展開すると、脱囊後のシストは図 2d のように限定された SSC 領域内で FSC 方向に幅広い分布を示した

(脱囊シスト領域)。

脱囊前後のシストが混在する標品の FL1、FSC および SSC のヒストグラムはいずれも二峰性となっており、脱囊前後でシストの分別は異なることが示された (図 3a-c)。FSC 対 SSC 二次元ドットプロットで粒子の分布を観察すると、シスト領域と脱シスト領域が明瞭に分別された (図 3d)。確認作業としてセルソーターを用いてシスト領域と脱シスト領域に分布する粒子を分取し、顕微鏡観察したのが図 4 a (左) と図 4 b (右) で、左側の脱シスト領域から分取されたシストはすべて脱囊後のシスト壁であることが確認された。また、右側のシスト領域から得られたシストはすべて脱囊していない正常のシストであった。

顕微鏡下で目視による脱囊率の測定を行い、フローサイトメータの測定結果の比較を行った。目視ではおよそ 1,000 個のシストを目途に観察して脱囊率を算出した。比較の結果は相関計数 $r^2=0.99$ となり、フローサイトメトリーによる測定は顕微鏡と非常によく相関した (表 1)。

表 1 フローサイトメータと顕微鏡による脱囊率の比較

	フローサイトメトリー (%)	顕 微 鏡 (%)
0	91.7	97.3
11	13.5	16.7
33	1.8	1.8
62	0.8	0.1
122	0.6	0.1

Ct = 塩素濃度 (mg/l) × 時間 (min.)、 $R^2=0.99$ 。

塩素による嚢子不活化試験の一例

図 5 に *G. lamblia* 嚢子の塩素による不活化試験の測定結果の一例を示した。上述のように、FSC と SSC の二次元プロットでは脱囊後のシスト壁は左右の2区画うち左区画に分布し、脱囊しなかったシストは右区画に分布する。図 5a は塩素無処理群で、脱囊率は約 92% であった。塩素濃度 1mg/l、10 分間の処理 (Ct 値 ≒ 10) によって脱囊率は 33% 程度にまで阻害された (図 5b)。また、30 分 (Ct 値 ≒ 30) では 3.6% (図 5c)、さらに 60 分 (Ct 値 ≒ 60) の処理によって 1% 以下までに低下した (図 5d)。図 6 に塩素処理による脱囊阻止曲線を示すが、Ct = 50 付近で 99% (2log) 程度の脱囊阻止が起きるものと推定された。

顕微鏡観察では各標本で嚢子を 1,000 個程度観察しているが、Ct 値 120 以上で脱囊後のシスト壁はほとんど認められなかった。*G. lamblia* のシスト壁は脱囊後に特有の形態変化が認められた。栄養体の遊出後にシスト壁の光学的なコントラストが低下し、図 4 に示すようにシスト壁が著しく伸張する現象が認められた。また、伸張したシスト壁は蛍光抗体染色によって非常に強染された。これに相関して光学的なコントラストも低下した。この現象はフローサイトメータの測定によっても観察されており、FITC 強度のヒストグラムで通常ピークに加えて蛍光強度が 20 倍以上増強された位置に新たなピークが形成され、二峰性となっている (図 3 a)。また、伸張するにしたがっ

てFSC強度の減衰が観察された(図2b)。

D. 考 察

ジアルジア症は*Giardia lamblia*の感染によって引き起こされる下痢性疾患である。1999年4月1日から施行された「感染症新法」において、ジアルジア症は前意思に届け出義務のある4類感染症に指定されている。本症の感染経路はいわゆる糞-口感染で、人と人の接触や食品を介した小規模集団感染と飲料水を介した大規模な集団感染が知られている。米国では水を介して発生した集団下痢症の多くがジアルジアによるものとの報告もある。*Giardia*の種名については混乱があり、ヒト由来株に関しては*G. lamblia*あるいは*G. intestinalis*、他の哺乳動物から分離株された同一形態種に対しては*G. ondatrae*、*G. simondi*、*G. bovis*、など、多くの種が報告されてきた。しかしながら、これまでの報告を総合的に判断すればむしろこれらを同一種とみなすべきで、命名規約上は*G. duodenalis*という種名に先取権があるとの判断がある。この考え方の根底には本原虫種が基本的に幅広い感染スペクトルを持つとの認識があるが、その一方ですべての分離株が常に広い感染性を示すものではないという認識もある。ちなみに、本報告では*G. lamblia*(ATCC #30957)として登録されたヒト分離株を用いており、慣例的に*G. lamblia*を種名として用いることとした。この様な状況ではあるが、水道等の対策上は安全性を見越し、形態的に*G. duodenalis*とみなされる原虫に対して一律に病原性があるものとして扱うことになっている。

本研究では*G. lamblia*(WB株)を実験動物のスナネズミに感染させて嚢子を得た。スナネズミでは感染後6日以内に嚢子排出が始まり、その後3週間ほど良質な嚢子を排出することが確認された。その後は徐々に排出数が減少し、脱嚢率も低下する傾向が認められた。従って、実験にはこの間に排出された嚢子を用いることとした。

嚢子の不活化の判定基準は感染実験や、色素排斥試験、あるいは脱嚢活性で評価することが提案されている。動物への感染実験では大量の動物が必要であること、個体差に伴う宿主の抵抗性をどのように評価すべきであるか結論されていない。特に、*G. lamblia*の宿主特異性は高く、特定の株に限ってスナネズミやヌードマウスに感染が成立してい

るのみである。したがって、これらを用いた活性評価では定量性が保証される保証はない。また、色素排斥試験では適当な色素が見当たらないことが障壁となっている。これに対して、脱嚢試験は本原虫の感染に伴う必須の生物現象で、脱嚢現象が起きてはじめて寄生の成立を見る。

ところで、*G. lamblia*シストの脱嚢試験に関しては問題点が指摘されている。シストの脱嚢活性は同一の宿主由来であっても採取日によって変動することが報告されている。したがって、本研究では*G. lamblia*シストの脱嚢条件を再検討を行っている。前処理としてシストを低pH環境(pH 2~3)、炭酸水素ナトリウム存在下でシステイン・グルタチオンによる前処理が必須であったが、その際には処理溶液のpHはシステイン・グルタチオン溶液と炭酸水素ナトリウム溶液を5:2の割合で混合することによりpH 2.7付近に調整した。これに、最終濃度が10%となるようにウシ胎児血清を添加した。処理時間は3分が最適で、それ以上ではむしろ悪影響が観察された。処理後は速やかに適当量の水酸化ナトリウムを添加して中和することが重要であった。遠心回収したシストをPBSに再浮遊させ、37°Cに60分間、保存することで脱嚢を促すこととした。本方法により活性を有するシストは確実に脱嚢することが確認され、本原虫の活性評価方法が確立できたものと判断した。

次いで、多量の試料を短時間農地に測定する方法としてフローサイトメータの導入が図られた。特異的な標識が可能である標品に対しては、フローサイトメータは効率的な測定器となる事が知られている。ここでは蛍光抗体染色法による*Giardia*シスト壁の蛍光標識で確実にシストのみを計測の対象とすることができた。また、シスト壁は脱嚢の前後で標識蛍光量、前方散乱光、側方散乱光などすべてのパラメータに劇的な変化が認められ、明瞭に脱嚢活性を評価することが可能であった。これらのパラメータについて脱嚢前のシストが分布する領域をシスト領域と定め、脱嚢後のシスト壁が分布する領域を脱嚢シスト領域と定め、2領域に分布する粒子数の和を総シスト数とし、これで脱シスト領域に分布するシスト数を除せば、容易に脱嚢率が計算される。ちなみに、測定に用いるシスト数に制限はなく、各サンプル当たり

10⁴~5 個、あるいはそれ以上を用いて計数することも可能である。この点が顕微鏡下での目視と大きく異なる点で、より正確な脱囊率が得られるものと考えている。

一例として、*G. lamblia* 嚢子の塩素による不活化実験を行い、経時的に脱囊活性を測定した。実験条件は水温 15°C、pH 7.0、塩素濃度を 1.0mg/l とした。その結果、Ct 値 47 前後で 2 log 程度の不活化が起こるものと判定された。他の研究者による動物を用いた不活化率の測定では、pH 7.0 の条件で水温が 0.5°C、2.5°C、5.0°C の実験条件とした場合、Ct 値をそれぞれ 289、252、161 付近とした際に 3 log 程度の不活化率とされている。これに比べて今回の結果はその約 1/2 程度の Ct 値となっているが、水温を考慮すれば妥当な結果と考えられた。本方法は *Giardia* シストの脱囊活性、ひいては感染力の新たな評価方法として確立されたものと考えられる。今後は本方法を用いて薬剤耐性や、不活化実験の測定を行う予定である。

E. 結論

汚染防止対策上、病原微生物の検出方法の確立は必須のことである。しかしながら、原虫類の特殊性（生物学的特性から派生する困難さ）を鑑みると、農水産物あるいはその製品に関しては汚染源対策としてこれら原虫類の不活化を積極的に行うべきと考えた。この考えに沿って、本研究では不活化の評価・判定方法の確立を目指し、*Giardia lamblia* のシストを用いて感染性の評価方法を検討した。これまでの報告では *G. lamblia* シストの不活化効果を動物への感染実験により評価している例が知られているが、この方法では多数の実験動物が必要なことや宿主個体間での感染抵抗性の差などの不確定要素が介在する恐れがあった。これに対して脱囊阻止試験は、本原虫の感染から定着（寄生）に至る一連の生物学的現象の中でキートンといえる脱囊現象をもって感染性評価の指標としようとするものである。本研究では評価試験のための脱囊活性の高いシストを得ること、脱囊の誘導条件の整備と大量試料の迅速測定法を検討し、フローサイトメータを用いた定

量的測定方法等々の確立を行った。

F. 研究発表

- 1) Yagita K., Endo T. and De Jonkheere JF. (1999) : Clustering of *Acanthamoeba* isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestion patterns. *Parasitol. Res.*, 85:284-289
- 2) Jongwutiwes S., Pariyakanok L., Charoenkorn M., Yagita K. and Endo T. (1999) : Identification of *Acanthamoeba* isolates from first 2 keratitis cases in Thailand (in preparation).
- 3) Yagita K. and Endo T. (1999) : Malaria Infection in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52: 20
- 4) 増田 剛太, 市川正之, 遠藤卓郎 : クリプトスポリジウム等原虫疾患に関する情報・資料集 平成9年度厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「クリプトスポリジウム等の原虫類による食品及び環境の汚染除去と感染症対策に関する研究班」小冊子 1999
- 5) 古屋宏二、八木田健司、遠藤 卓郎、村上晋一、都築俊文、木村浩男 : クリプトスポリジウム原虫に関する研究— 糞便内 *Cryptosporidium parvum* オーシストの検出と同定のための PCR 法と免疫染色法、道衛研所報 (1997 年度) : 1-7、1999
- 6) 古屋宏二、木村浩男、中岡祐司、村上晋一、山本徳栄、遠藤 卓郎 : *Cryptosporidium parvum* オーシストの簡易分離法、臨床と微生物、25(6) : 869-871、1999
- 7) 遠藤 卓郎、八木田健司、1999 年、原虫。臨床栄養 94 : 782-786.
- 8) 泉山信司(池田理化つくばテクニカルセンター)、藤原正弘(水技研)、金子光美(摂南大学)、遠藤 卓郎、八木田健司、 : *Giardia lamblia* の脱囊条件の改良とフローサイトメータによる脱囊試験法の開発 第 59 回日本寄生虫学会東日本大会 平成 11 年 10 月
- 9) 泉山信司(池田理化つくばテクニカルセンター)、藤原正弘(水技研)、金子光美(摂南大学)、遠藤 卓郎、八木田健司 : 第 32 回日本原生動物学会大会フローサイトメータを用いた *Giardia lamblia* の脱囊判定方法 平成 11 年 11 月

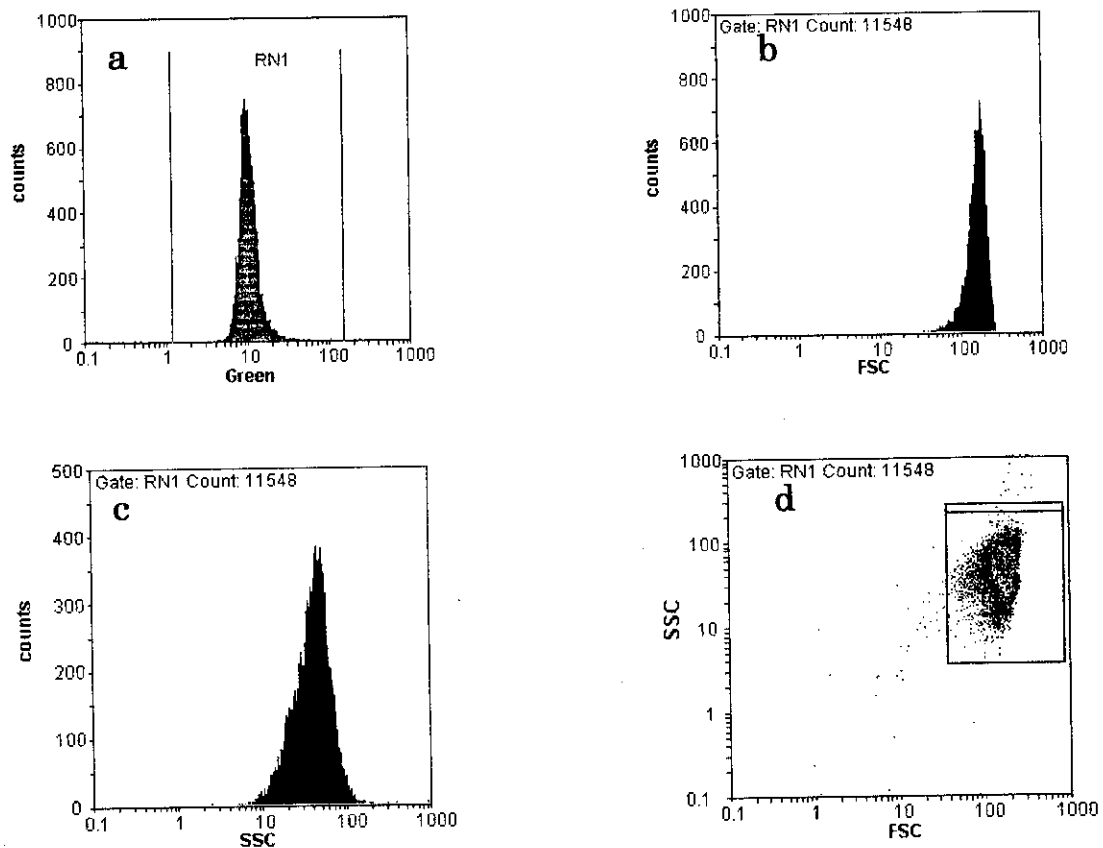


図1 脱囊前の *Giardia lamblia* シストのフローサイトメーター解析結果

a : FITC 蛍光強度のヒストグラム。b : 前方散乱光 (FSC) 強度のヒストグラム。c : 側方散乱光 (SSC) 強度のヒストグラム。いずれのヒストグラムにおいても粒子は鋭いピークを有する一峰性の山形の分布を示し、シストの均質性を表現している。d : SSC (Y 軸) と FSC (X 軸) による二次元ドットプロット。脱囊していないシストは枠で囲った領域 (シスト領域) に集中する。

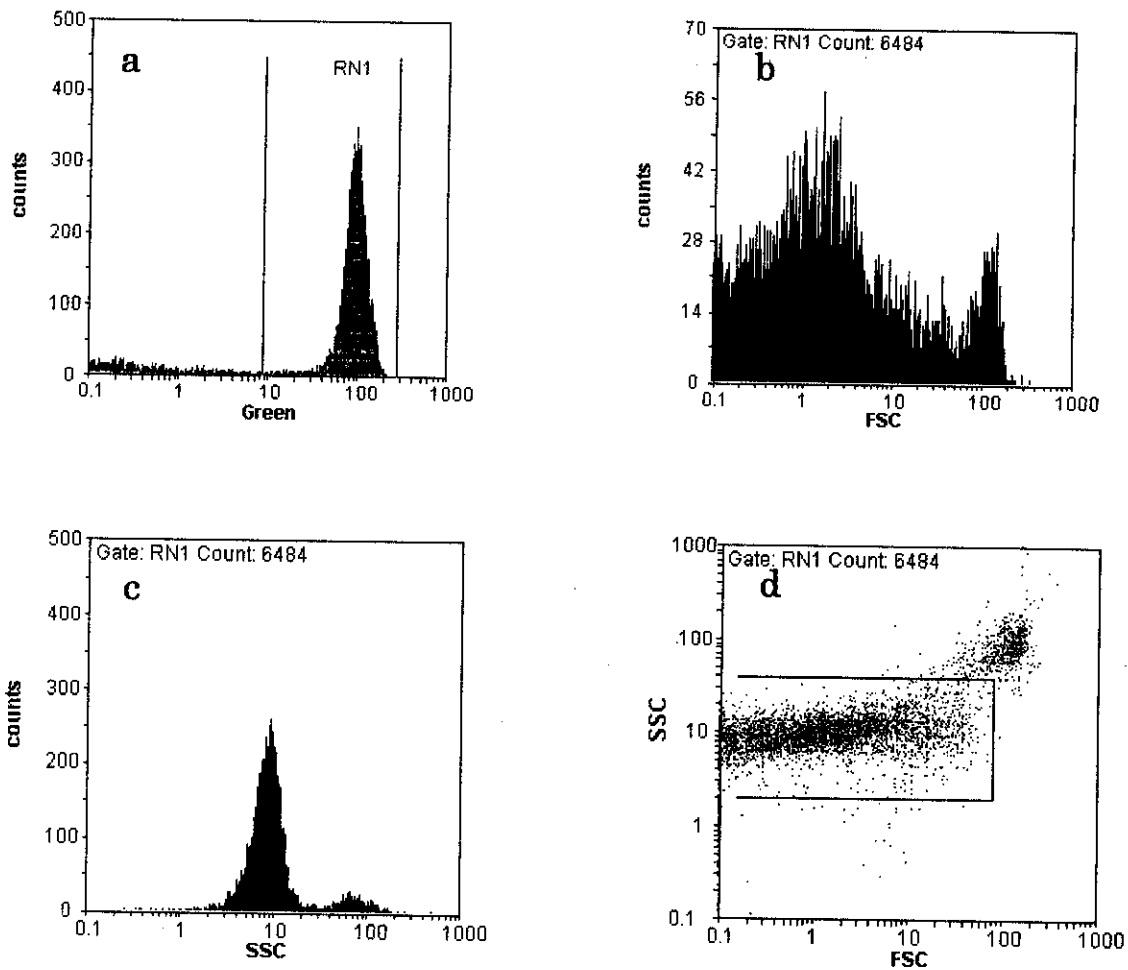


図2 脱囊後の *Giardia lamblia* シストのフローサイトメーター解析結果

a : FITC 蛍光強度のヒストグラム。FITC 標識された粒子は鋭いピークを持つ一峰性の山形の分布を示すが、脱囊前のシスト (図1 a) に比べておよそ 10 倍程度傾向量を増している。b : 前方散乱光 (FSC) 強度のヒストグラム。脱囊後のシストでは前方散乱光の著しい減衰 (1/100 程度) が起き、粒子の分布は幅広い山形を形成した。c : 側方散乱光 (SSC) 強度のヒストグラム。脱囊シストの分布形態は基本的に一峰性であるが、側方散乱光強度は 1/10 程度に減衰した。d : SSC (Y 軸) と FSC (X 軸) による二次元ドットプロット。脱囊シストは枠で囲った領域 (脱囊シスト領域) を形成する。

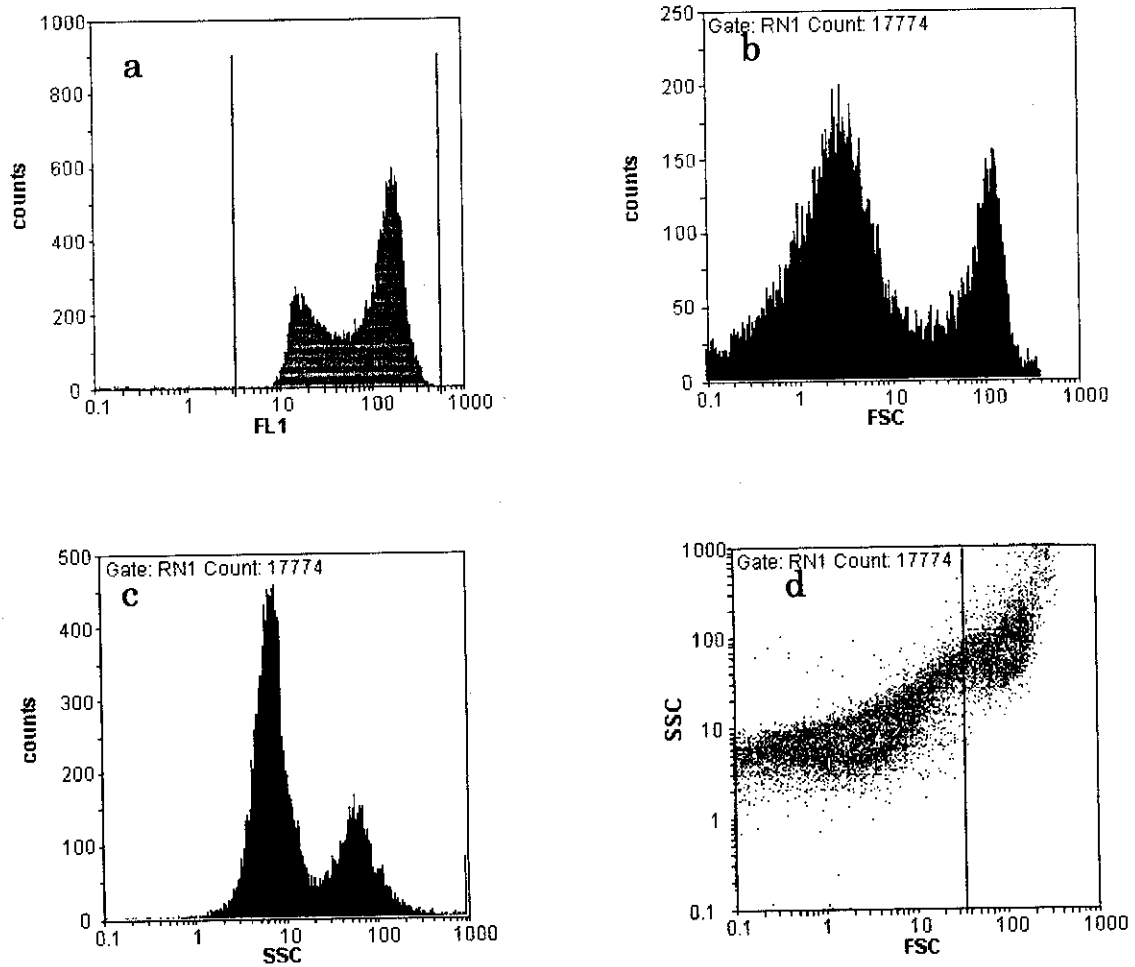


図3 脱囊前と脱囊後の *Giardia lamblia* シストが混在する標品のフローサイトメーター解析結果

a : FITC 蛍光強度のヒストグラム。FITC 標識された粒子は二峰性の分布を示す。b : 前方散乱光 (FSC) 強度のヒストグラム。粒子は二峰性の分布を示す。c : 側方散乱光 (SSC) 強度のヒストグラム。粒子は二峰性の分布を示す。d : SSC (Y 軸) と FSC (X 軸) による二次元ドットプロット。図中の線を境に左 (脱囊シスト領域) と右 (シスト領域) に粒子の集積が見られた。

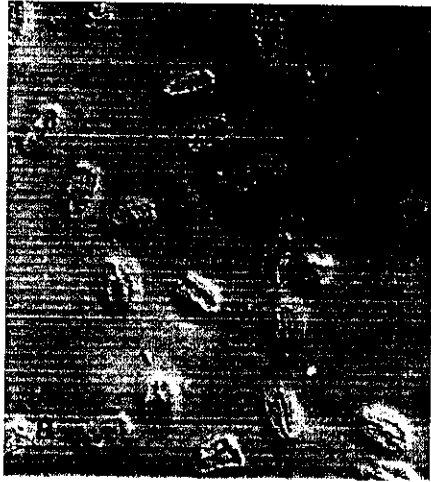


図4 シスト領域および脱囊シスト領域からのシストの分画・分取
a : 図 3d の左側の脱囊シスト領域に分布する粒子の微分干渉顕微鏡像。
脱囊後のシスト壁のみが観察される。 b : 右側のシスト領域から回収され
た粒子の微分干渉顕微鏡像。シストはすべて脱囊前のシストが観察された。

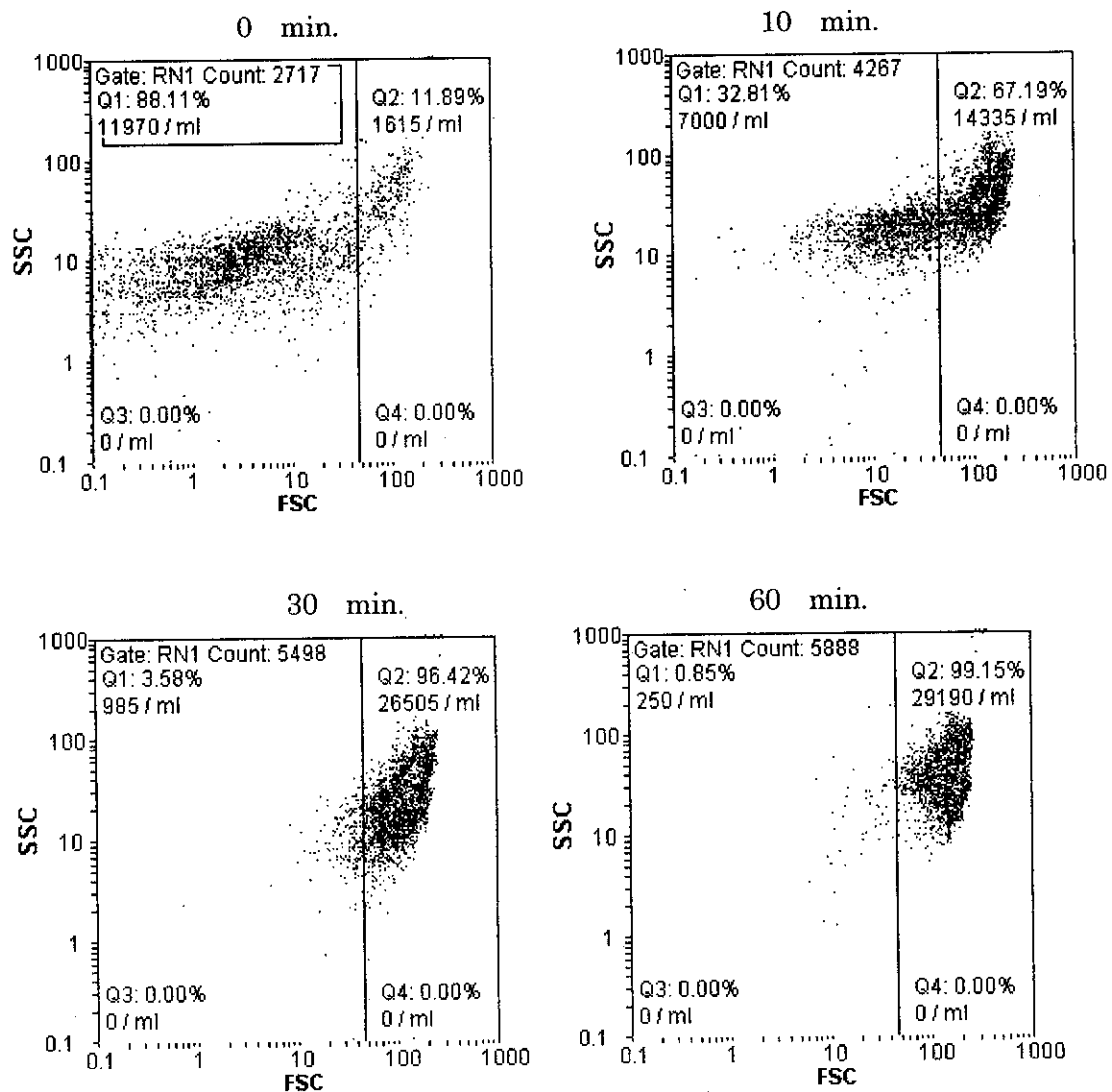


図5 塩素処理後の *G. lamblia* 嚢子のフローサイトメーター解析結果。
 a: 塩素無処理群の側方散乱光 (Y 軸)、と前方散乱光 (X 軸) のドットプロット像。b: 塩素処理 (1mg/l) 10 分 (Ct 値=10) のドットプロット像。c: 塩素処理 30 分 (Ct 値=30) のドットプロット像。d: 塩素処理 60 分 (Ct 値=60) のドットプロット像。塩素処理が進むにつれて、シストの分布が左区画から右の区画へ移動、すなわち脱嚢活性を失っていくことが分かる。

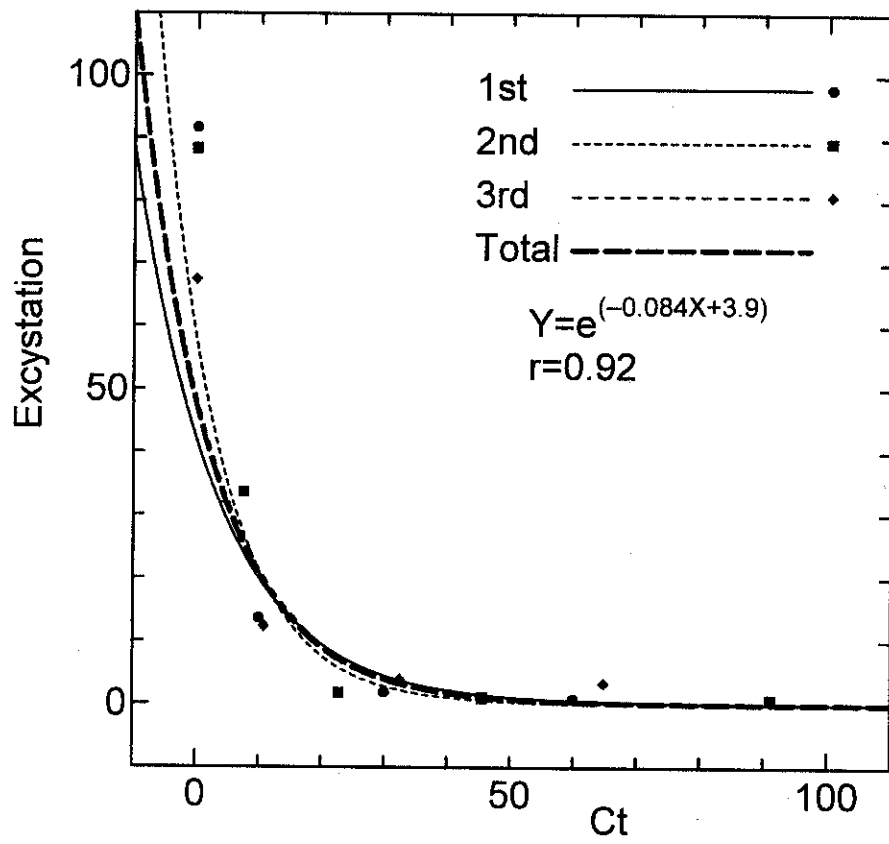


図6 塩素による *Giardia lamblia* シストの脱嚢活性阻止曲線



図7 脱囊後の嚢子壁の蛍光抗体染色像

脱囊後のシスト壁は時間と共に伸張する傾向が見られた。また、伸張するにしたがってFSC強度が減衰し、これに相関して光学的なコントラストも低下した。