

20000520

厚生科学研究費補助金

新興再興感染症研究事業

食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 武 田 直 和

目 次

I. 総括研究報告書	
食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究	1
武田直和	
II. 分担研究報告書	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧	45
IV. 研究成果の刊行物・別冊	47

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

食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所室長

研究要旨 13 種類の遺伝子型（結果的に 13 種類の血清型）の NV 構造蛋白を中空粒子として発現し、抗体 ELISA を構築した。Genogroup に特異的な単クローン抗体とポリクローン抗体を併用することによって、12 種類の血清型を検出できる ELISA をキット化し、冬季のウイルス検出に供した。食品中から感度よく NV を検出するため、磁気ビーズをもちいた innocapture RT-PCR 法を試みた。GI に属す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。大腸菌で機能を有するプロテアーゼを発現した。SV の遺伝子検出と疫学調査をおこなった。アストロウイルス抗原検出 ELISA を援用した中和試験法で抗体保有状況を調べた。輸入海産物のウイルス学的汚染度を明らかにした。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感染防御に有効な血中 IgG、便中 IgA 抗体を誘導することができた。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診断マニュアルを作成して国内の機関に配布した。

分担研究者		近藤玲子	愛媛県立衛生環境研究所 ウイルス科長
田中智之	堺市衛生研究所 所長		
谷口孝喜	藤田保健衛生大学医学部 教授	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所 主任研究員
栄 賢司	愛知県衛生研究所微生物部 部長	吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所 主任研究員
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究 微生物試験室 室長	杉枝正明	静岡県環境衛生科学研究所 主幹
篠崎邦子	千葉県衛生研究所ウイルス研究室 首席研究員	藤井理津志	岡山県環境保健センター保健科学部 専門研究員
西尾 治	国立公衆衛生院衛生微生物学部 室長	葛谷光隆	岡山県環境保健センター保健科学部 研究員
名取克郎	国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官	山下照夫	愛知県衛生研究所微生物部 主任研究員
染谷雄一	国立感染症研究所ウイルス第二部 研究員	牛島廣治	東京大学医学部 教授
協力研究者		A. 研究目的	
鎌田公仁夫	デンカ生研ウイルス試薬製造部 研究員		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 例がノーウォークウイルス（SRSV あるいは小型 球形ウイルスと同義語、1999 年の国際ウイルス命 名委員会でノーウォークウイルスに統一された）
北元憲利	姫路工業大学環境人間学科 教授		
小林慎一	愛知県衛生研究所微生物部 主任研究員		

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、ノーウォークウイルスのヒトで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、ウイルスの生態を詳細に解析できる手法を確立する必要がある。

電子顕微鏡に代わる抗原 ELISA を完成させ、キット化することによって 3-4 時間で結果が得られるようになり、迅速な行政対応が可能になる。抗体 ELISA はこれまで原因不明として処理されていた事例において、病原体を血清側から確認することを可能にする。病原体の同定は、PCR 産物の塩基配列を直接決定し、遺伝子系統解析から判断するのが最も確実で迅速であることが明らかになってきている。シーケンサーが相当普及した現在、定着しつつある基本的な手法である。これを支援するためのデータベースの整備と各研究機関からアクセスできるネットワークを構築することによって、各検査機関のレベルで分子系統解析が可能になる。統一した検査法を堅持するため、RT-PCR のプライマーおよびハイブリダイゼーションのプロンプを整備する。わが国が世界に誇る検査技術レベルを高度に維持し、研究者間でのデータの相互比較を容易にするため、RT-PCR を含めこれらの検査法、解析法をマニュアル化する。

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) 磁気ビーズの調製：Dynabeads M-280 sheep anti-Rabbit IgG (ダイナル社) 約 1mg に対して精製抗 NV 抗体 50 μ g を室温で 1 時間反応後、洗浄し、0.1% BSA を含む PBS(PBS/0.1%BSA) で 1mg/ml となるように調製した。NV 抗原陽性検体として食中毒患者から採取された糞便を用いた。

(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 マウスに免役し、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ーベクターに組み込み、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) RT-PCR による SV 遺伝子検出：ポリメラーゼ領域（札幌医科大学、辰巳らの設計）および構造蛋白領域（千葉県衛生研究所、岡田らの設計）をターゲットにしたプライマーを用いた。

(7) アストロウイルスの中和抗体測定：ウイルスを型特異的抗血清で中和後、細胞に接種した。その後、培養上精のアストロウイルスを抗原 ELISA で検出した。

(8) ロタウイルス人工中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中空粒子と二重人工中空粒子を作製した。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。

(9) 輸入魚介類

2,000 年 4 月から 2001 年 2 月の間に搬入された貝類で、原則的に毎月 5 検体を採取した。貝類は韓国産の赤貝 28 件、ハマグリ 12 件、とり貝 3 件、北朝鮮産の平貝 9 件、ハマグリ 1 件および中国産のハマグリ 3 件、アサリ 1 件計 57 件を用いた。エビ類は 7 月と 8 月に採取し、全てブラックタイガーで、インド産 8 件、フィリピン産 6 件、インドネシア産 5 件、タイ産 2 件、スリナムおよびベトナム各 1 件、計 23 件を用いた。

(10) 大腸菌もよるプロテアーゼの発現

チバウイルスの ORF1 にコードされるプロテアーゼを大腸菌プラスミドベクターに組み、種々の発現プラスミドを構築した。N 末端に His-tag を付加したプロテアーゼは精製後、抗原として用い、ウサギ抗プロテアーゼ抗血清を得た。

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 13 種類の遺伝子型（結果的に 13 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 12 種類の血清型を検出できる ELISA をキット化し、国内 30 の機関に配布し、冬季のウイルス検出に供した。

(2) NV 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。構造蛋白に対する抗血清（ポリクローナル抗体）を併用することによって、より高感度かつより特異性の高い抗原検出 ELISA 法が確立できた。

(3) NV 抗体 ELISA 法の確立

組換えバキュロウイルスを用いて NV 構造蛋白の発現を試み、GI の 5 株、GII の 12 株の計 17 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) サッポロウイルス (SV) RT-PCR 法の確立

主に乳幼児に感染し、乳児院や保育園等の施設内で集団感染をおこすと考えられていた SV が、成人に多発した急性胃腸炎からも高率に検出された。

(6) 磁気ビーズを用いた Immunocapture RT-

PCR法による食品中のNVの検出

組換えバキュロウイルスで発現された4種類のNVの中空粒子に対する抗体を結合した磁気ビーズを作製し、その濃縮効果および特異性について検討した。その結果、抗NV抗体を結合した磁気ビーズの濃縮性および特異性とも高く、またRT-PCR阻害物質が多量に含有するカキの抽出液からもNVを回収することができた。

(7) 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。

(8) 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。

(9) アストロウイルスの中和抗体保有状況

住民の抗体保有状況は血清型によって大きく異っていた。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

12種類のNV抗原を型別できるELISA法を用いて約30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) 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度

わが国が輸入している海水産物のウイルス学的汚染度を調べた結果、二枚貝類にはNVに汚染されているものが存在した。今後、食品の衛生確保のために、規模を拡大し監視する必要がある。

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経粘膜ワクチンへの応用

組換えバキュロウイルスを用いてVP2とVP6の共発現を行い、人工空一重殻粒子を産生した。VP2とVP6からなる空粒子を粘膜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。

(2) NV治療薬の開発

分子設計に基づく創薬の試みとして、NVの一種であるチバウイルスに由来するプロテアーゼに注目し、大腸菌で発現させた。プロテアーゼ認識配列を含む融合タンパク質が大腸菌内で切断されていたことから、大腸菌で発現させたチバウイルスプロテアーゼは酵素活性と基質特異性を保持していたと考えられた。

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
第一版に、以下の検査法を追加し、平成12年7月、

福島県郡山市で開催された衛生微生物技術協議会 21 回研究会において配付した。

- ・ RPHA 法による C 群ロタウイルスの検出
- ・ アストロウイルスの分離・同定検査
- ・ 酵素抗体法によるアストロウイルス抗原の検出
- ・ アストロウイルス RT-PCR 法
- ・ アイチウイルスの検査法

さらに、以下の検査法を追加し、平成 12 年 10 月、愛知県名古屋市で開催された第 12 回ウイルス性下痢症研究会において配付した。

- ・ アデノウイルスの検査法

(2) ウイルス性下痢症技術研修会

平成 13 年 1 月～2 月に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、本研究の班員および協力研究員が主催者、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 13 種類の血清学的に異なる 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 12 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 4 種類の NV GI と、7 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 380 以上の機関に配布し、本年度の流行で評価した。また、13 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、これを用いた抗原 ELISA を構築し、患者糞便材料を測定した。GII ウイルス都は全く反応せず GI 特異的なもの、これとは逆に GI ウイルス都は全く反応せず GII 特異的なクローンが得られ、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。

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。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。輸入海産物は予想されたように NV の汚染をうけていた。リスク・アセスメントへおよび規格基準の策定のデータとして、今後も積み重ねが必須である。

SV が必ずしも乳幼児だけに感染するのではなく、年長小児や成人にも流行しうるおそれのあることが明らかになった。まだ全ての遺伝子型が検出されているわけではないので、早急に遺伝子解析を推し進める必要がある。

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な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、本年度改定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

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、NV の検出はほぼ確立した。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 検出法は早急に開発する必要がある。SV が新たな問題として登場し、SV の遺伝子解析を推進する必要性が生じてきた。ロタウイルスの有効な予防法がみつき、NV 治療薬

開発の足がかりもできた。輸入海産物の衛生確保のために、監視体制を整備する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tuteja R, Li TC, Takeda N, Jameel S. Augmentation of immune responses to hepatitis E virus ORF2 DNA vaccination by codelivery of cytokine genes [In Process Citation]. *Viral Immunol* 2000;13:169-178
2. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with 105-kilodalton cellular binding protein, a Candidate Receptor Molecule for Virus Attachment. *J. Virol.* 2000;74:11589-11597
3. Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Complete nucleotide sequence of the Chiba virus Genome and functional expression of the 3C-like protease in escherichia coli. *Virology* 2000;in press
4. Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N. Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J. Med. Virol.* 2000;in press
5. Li T-C, Takeda N, Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2000;in press
6. Li F, Riddell MA, Seow HF, Takeda N, Miyamura T, Anderson DA. Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein. *J Med Virol* 2000;60:379-386
7. Li T-C, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Kiso K, Mast EE, Miyamura T, Takeda N. A Empty virus-like particle-based enzyme-linked

immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 2000;62:327-333

8. Kobayashi S, Sakae K, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y. Serotype-specific antigen ELISA for detection of Chiba virus in stools. *J. Med. Virol.* 2000;62:233-238

9. Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Ishiko H, Kamada K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. Expression of recombinant capsid proteins of Chiba virus, a Genogroup II Norwalk-like virus (NLV), and development of an ELISA to detect the viral antigen. *Microbiol. Immunol.* 2000;44:687-693

10. Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, Kamada K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:3492-3494

11. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DGW, Estes MK. Identification of an epitope common to genogroup 1 Norwalk-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:1656-1660

2. 学会発表

1. Ishiko H, Hashimoto O, Takeda N. Rapid detection of Norwalk-like viruses in fresh oysters. In: 100th General Meeting, American Society for Microbiology. Los Angeles, 2000 May 21-25

2. Ishiko H, Shimada Y, Takeda N. Phylogeny and RT-PCR identification of human enteroviruses based on VP4 sequence. In: 5th Asia-Pacific Congress of Medical Virology. Bali, Indonesia, 2000 June 26-28

3. Li T-C, Takeda N, Suzuki Y, Ami Y, Miyamura T. Recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine. In: IASL-APASL Joint Meeting 2000. Fukuoka, Japan, 2000 June 2-7

4. Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *E. coli*. In: 34th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-US Cooperative Medical Science Program. Inuyama, Japan, 2000 July 20-22

5. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DWG, Estes MK. Identification of an epitope common to genogroup 1 Norwalk-like viruses. In: Annual Meeting of American Society for Virology. Fort Collins, Colorado, 2000 July 8-12

6. Sugitani M, Sheikh A, Moriyama M, Komiyama K, Arakawa Y, Li T-C, Takeda N, Ishaque M, Hasan M, Suzuki K. Sporadic acute and fulminant hepatitis in Bangladesh—significance of hepatitis E and B. In: 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Atlanta, USA, 2000 April 9-13

7. Anderson D, Li F, Riddle M, Seow H-F, Takeda N, Miyamura T. Subunit ORF2.1 vaccine induces antibody against immunodominant epitopes in the HEV capsid protein. In: 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Atlanta, USA, 2000 April 9-13

8. 染谷雄一, 武田直和, 宮村達男: チバウイルスゲノムのクローニングとウイルス由来プロテアーゼの性質. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000 12月.

9. 李 天成, 網 康至, 須崎百合子, 武田直和, 宮村達男: ELISA 法による HEV 抗原の検出と診断への応用. 第48回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10月.

10. 染谷雄一, 武田直和, 宮村達男: チバウイルスゲノムの全塩基配列の決定と 3C 様プロテアーゼの大腸菌での機能的発現. 第48回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10月.

11. 八橋 弘, 辻研一郎, 大畑一幸, 松本武浩,

大黒 学, 井上長三, 古賀満明, 矢野右人, 李 天成, 宮村達男, 武田直和: 散発性急性肝炎における HEV の関与. 第 4 回日本肝臓学会大会, 神戸, 2000 10 月.

12. 片山和彦, 小嶋慈之, 影山 努, 福士秀悦, 武田直和, 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 鈴木善幸: Norwalk-like viruses genome 全長を用いた分子系統解析によって得られた genotyping 法. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

13. 小林慎一, 鈴木康元, 柴 賢司, 名取克郎, 武田直和: 食中毒患者から検出されたノーウォークウイルスの遺伝子解析. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

14. 島田康司, 細矢光亮, 斎藤博之, 柴 賢司, 武田直和, 石古博昭: コクサッキーウイルス A 群の遺伝子系統解析による迅速同定. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

15. 小嶋慈之, 片山和彦, 影山 努, 福士秀悦, 武田直和, 篠原美千代, 内田和江, 島田康司: 新たに全塩基配列を決定しえた 9 株を用いた Norwalk-like viruses genome の解析. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

16. 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 小嶋慈之, 片山和彦, 影山 努, 福士秀悦, 武田直和: 新たに構築した Norwalk-like viruses (NLVs) の検出法と既報の RT-PCR 法との比較. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

17. 影山 努, 小嶋慈之, 福士秀悦, 片山和彦, 武田直和, 篠原美千代, 内田和江, 島田康司: 蛍光プローブを用いた Norwalk-like viruses の高

感度検出法の開発. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

18. 橋本 治, 武田直和, 石古博昭: 三カ年におけるカキからの NLVs の検出とその遺伝子解析. 第 48 回日本ウイルス学会総会, 津, 2000 10 月.

19. 小林慎一, 柴 賢司, 鈴木康元, 宮崎 豊, 鎌田公仁夫, 佐藤俊則, 名取克郎, 武田直和: SRSV の抗原検出 ELISA. 衛生微生物技術協議会第 21 回研究会, 郡山, 2000 7 月.

20. 名取克郎, 武田直和, 宮村達男, 小林慎一, 柴 賢司, 鎌田公仁夫, 佐藤俊則, 篠崎邦子, 岡田峰幸, 勢戸祥介: Norwalk virus の血清型と抗体検査. 衛生微生物技術協議会第 21 回研究会, 郡山, 2000 7 月.

21. 石古博昭, 島田康司, 武田直和: VP4 塩基配列に基づいたヒトエンテロウイルスに型鑑別と遺伝系統解析. 第 7 回日本遺伝子診療学会, 2000 6 月.

22. 中込 治, 中田修二, 大石 功, 大瀬戸光明, 柴 賢司, 川本尋義, 武田直和, 田中智之, 牛島廣治: カリシウイルス科ウイルスの名称と使用法についての提言. 第 41 回日本臨床ウイルス学会, 広島, 2000 5 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 12 年度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

新しいカリシウイルス抗原検出 ELISA 法

分担研究者	田中智之	堺市衛生研究所	所長
研究協力者	北元憲利	姫路工業大学	環境人間学科教授
	武田直和	国立感染症研究所	ウイルス第二部室長
	名取克郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部主任研究員

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たモノクローナル抗体が作製された。これらの抗体から genogroup I および genogroup II に広く交差する抗体の存在が確認された。これまで、これらのモノクローナル抗体を用いて抗原検出 ELISA 法の確立を試みが、感度の点で問題点を残した。今回、カリシウイルスカプシド蛋白に対する抗血清（ポリクローナル抗体）を併用することによって、より高感度かつより特異性の高い抗原検出 ELISA 法が確立できた。PCR法との一致率は約 71% にみられ、流行事例におけるスクリーニングキットとしては有用であると考えられる。

A. 研究目的

カリシウイルス〔旧称小型球形ウイルス（SRSV）〕は、感染性胃腸炎の原因ウイルスのみならず集団食中毒による急性胃腸炎事例の主な原因ウイルスである。ウイルスの持つ抗原性の多様性から多数の血清型が存在していることが明らかになった。しかし、これら事例に対してウイルス学的診断はウイルス遺伝子の検索、主に PCR 法にてなされているのが現状である。PCR 法はウイルス遺伝子学的診断と言う長所を持つものの、迅速性、経済性に数多くの課題を残している。

これらの点を改善すべく、これまでバキュロウイルスにて発現したりコンビナントウイルス様粒子（VLPs）に対するモノクローナル抗体を用いた酵素抗体（ELISA）法の開発に取り組んできた。

今回、VLPs に対するウサギ抗血清（ポリクローナル抗体）を併用することによって、PCR 法と良い相関性を持った抗原検出 ELISA 法を開発することが出来た。

B. 研究方法

1. モノクローナル抗体の作製は以前に報告した（厚生科学研究費補助金総合研究報告書（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 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 平成 12 年 4 月）。

使用したマウスへの免疫、脾細胞の抽出はエーテル麻酔下でなされ、実験動物への倫理は配慮され、尊厳は保たれている。

2. ELISA 法は、96 穴 ELISA 用プレートに、これまでに作製されたモノクローナル抗体を固相した。Genogroup I には #3912、genogroup II には #14 の抗体を使用した。#3912 は Norwalk-like VLPs に、#14 は 49-like VLPs を免疫原として得られたモノクローナル抗体である。

モノクローナル抗体との反応性については上記の報告書に記載した。このプレー

トを用いて臨床材料（糞便けん濁液）と 37℃, 2時間反応、洗浄後、酵素標識ポリクローナル抗体を、同様に反応させた。このポリクローナル抗体には genogroup I, genogroup II を特異的に認識する抗体を数種類混合している。洗浄後、基質で呈色し分光光度計にて測定した。

3. 上記の方法で感度検査を、各種 VLPs を用いて検討した。それらは rNV, r258, r124, rCV, rMX, r47, r76, r104, r7 である。陰性検体の 3SD をカットオフ値とした。

4. 臨床材料は下記の 11 施設にて収去されたものを用いた。これらの材料は基本的には PCR 法にてウイルス遺伝子を決定された 536 検体、その中で電子顕微鏡法でウイルス粒子の確認できた 214 検体を用いた。

検体供与施設：（敬称 略）
秋田衛生研究所（斎藤博之）
千葉県衛生研究所（篠崎邦子、岡田峰幸）
愛知県衛生研究所（栄 賢司、小林慎一）
岐阜県保健環境研究所（猿渡正子）
三重県科学技術振興センター（西香南子）
大阪府立公衆衛生研究所（山崎謙治）
大阪市立環境科学研究所（瀬戸祥介）
堺市衛生研究所（田中智之）
岡山県環境保健センター（濱野雅子）
愛媛県立衛生研究所（大瀬戸光明）
熊本市立環境総合研究所（松岡由美子）

C. 研究成果

1. VLPs を用いた感度検査では r258, r76 では 1.25ng, rNV, r124, rCV, r7, r47 は 2.5ng の検出感度であったが、しかし、rMX, rSMV は 40ng 以上必要とした（図 1）。

2. EM によるウイルス粒子検出結果と ELISA 法との検出一致率 134/214 検体で 63% にみられた（表 1）。一方、PCR 法との一致率では 367/536 検体で 69% にみられた（表 2）。しかし、この 536

検体の中で PCR 法陰性の検体も測定した 7 施設 369 検体についてみると 287/369 検体で 78% の一致率を示した。表 2 の成績から PCR 法陽性 ELISA 法陰性が 151 検体（28%）に存在した。一方、PCR 法陰性 ELISA 法陽性は 18 検体（3%）であった。21 例（4%）には Genogroup I, genogroup II ウイルス抗原検出プレートの両方で陽性であった。

D. 考察

現行のカリシウイルスの診断方法は PCR 法に頼り、経済性、迅速性の点でまだまだ改良すべき点が多い。何よりも一つの感染事例において原因微生物の特定には迅速性と特異性が求められるが、PCR 法では前者の点で欠けていると言える。

これまでの研究成果からカリシウイルスには表面抗原の共通性が示唆されていた。以前より我々はこの共通抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた ELISA 法による診断方法の確立を試みてきた。ELISA 法による診断は、多検体が同時に測定できる、2-4 時間で測定結果が得られる迅速性を持つ、などの長所がある。

これまではモノクローナル抗体を固相抗体および検出抗体としたサンドイッチ ELISA 法として開発してきた。しかし、この方法は特異性は高く見られたが検出感度は低い欠点があった。モノクローナル抗体自身は、例えば #抗体 #3901 はカプシド蛋白の C 末端に存在する genogroup I 共通の 74 個のアミノ酸のエピトープを認識することが分かり、それを用いた抗体は genogroup I を高感度で検出できることも判明されていた。

一方、名取らは VLPs 免疫ウサギ抗血清をそれぞれ固相抗体、検出抗体として同様のサンドイッチ ELISA 法を開発していた。しかし、検出感度は高いものの、背景反応が高く擬陽性反応の否定

が難しい検体が存在していた。

今回これらの2つの方法を総合的に検討した結果、固相抗体として genogroup 特異的の高いモノクローナル抗体を使用し、また検出抗体には酵素標識したウサギ抗血清を使用する抗原検出系が良いとの結論に至った。この新しいモノクローナル・ポリクローナル抗体サンドイッチ ELISA 法は、PCR法との一致率を70%に向上させることが出来た。

しかし、いくつかの検討課題が残されている。第一は約3割のPCR法陽性ELISA法陰性検体の評価である。今回は多施設検査結果の集積であるため、統一的な評価は難しい。同一施設で同一検体の測定評価が今後なさねばならないと考える。第二はこれらの点を踏まえて、さらに数多くのウイルスの共通抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とそれを用いたELISA法の開発である。第三は今回の検査対象材料は患者便であるが、収去食物等からの検出の可能性について検討する必要がある。

抗原抗体反応性の現象からのみ見ると現時点でカリシウイルスの共通抗原を認識する固相抗体として用いた Genogroup II のモノクローナル抗体は、僅かだが genogroup I VLPs と反応することが分かっている。今回の成績でも genogroup I, II 同時に検出された検体がみられた。しかし、これは検査目的によって解消できるものである。すなわち、今回のELISA法の開発は、感染事例に対し迅速性を持ってカリシウイルス感染事例と判断することを目的としている。

従って、陽性・陰性の判定が重要であって genogroup の決定までを、初期段階では必要としないという目的で開発されたものである。

以上の検討事項を改善しつつ、今後この測定システムを用い、カリシウイルスの浸淫度を調査していくつもりである。

E. 結論

モノクローナル抗体とカプシド蛋白に対する抗血清（ポリクローナル抗体）を併用することによって、より高感度かつより特異性の高い抗原検出 ELISA 法が確立できた。

F. 研究発表

1. 論文

(1) Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DW, Estes MK. Identification of an epitope common to genogroup I "Norwalk-like viruses" JCM 2000, 38(4):1656-60

2. 学会発表

(1) A.D.Hale, T.N.Tanaka, N.Kitamoto, M.Ciarlet, X.Jiang, N.Takeda, D.W.G.Brown, and M.K.Estes. Identification of an epitope common genogroup I "Norwalk-loke viruses" ASV Meeting, 2000.

表 1

		ELISA法	
		+	-
EM	+	97	48
法	-	28	27
		一致率 134/214= 63%	

表 2

		ELISA法	
		+	-
P			
C	+	279	151
R	-	18	88
法			
		一致率 367/536= 69%	

Sensitivity of newly dev

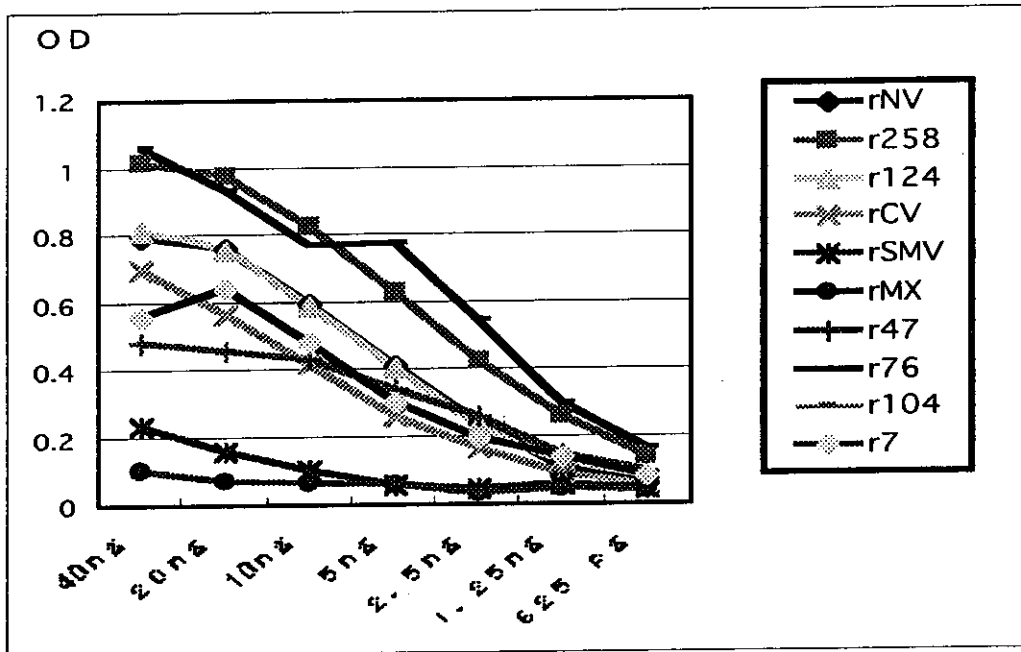


图 1

平成 12 年度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

食品由来のウイルス性感染症の検出、予防に関する研究

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

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) 大腸菌由来易熱性トキシン(LT) の変異型 135 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 が誘導された。2) Th1 および Th2 関連サイトカインの発現、CTL 活性の顕著な上昇が観察された。3) 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。特に、mLT135 との併用の場合に顕著であった。これらの結果は、人工粒子と粘膜アジュバントの併用による粘膜免疫の感染防御がきわめて有効であることを示す。

A. 研究目的

ヒトロタウイルスは、主として乳幼児に散発的に嘔吐下痢症を起こす病原ウイルスであるが、食品、水を介しての乳幼児、学童に集団発生（時として大規模な）ないし散発的に下痢を誘発する。特に、開発途上国では、年間 80 万人以上もの死亡を記録している。また先進国においても、重篤な例も多く、医療経済的に重要視されている。また、最近は上述の A 群ロタウイルスに加え、食品、水を介した伝播が主となる C 群そして B 群ロタウイルスの感染が地球規模で拡大している。このロタウイルスに対する予防としては、ワクチン開発が最も効果的と考えられる。1998 年に米国で初めて開発され認可された tetravalent RRV-HRV リアソータントワクチンは、大規模な投与の結果、腸重積症という重篤な副作用のため 1 年足らずで中止となった。

こうした背景のもと、新たなワクチン開発の試みが期待される。ここでは、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、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体液性および細胞性免疫の面から検討した。

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 (G1, 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)、リコンビナント 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 mLT H44A, 変異型 mLT135, 変異型 mLT-L112K, コレラ菌易熱性毒素 CT およびその変異型 mCT-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 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ と各アジュバント 10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ の混合液を使用した。血清および便中の IgG(IgG1 および IgG2a の両サブクラス)、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。

In vitro 感染系での検討は KU 株およびサルロタウイルス SA11 株をヒト大腸癌由来上

皮細胞 (CaCo2 細胞、HT29 細胞) 感染させた。ケモカインおよびサイトカイン mRNA は RT-PCR により、また、ケモカインおよびサイトカインの発現は ELISA キットにより検出した。

C. 研究結果

- (1) ヒトロタウイルス一重殻人工空粒子 VP2/VP6 のみの経鼻接種では免疫原性がきわめて弱い、野生型および変異型 LT の併用によるマウス鼻腔内接種では、血中および便中にロタウイルス特異的 IgG (IgG1 および IgG2a の両サブクラス)、IgA 両抗体の顕著な産生がみられるとともに、CTL を含めた細胞性免疫も誘導された (Fig. 1)。特に変異型 135 の併用で顕著であった。
- (2) 免疫したマウス脾臓リンパ球から Th1 (IFN- γ , IL-2) および Th2 (IL-4, IL-10) 関連サイトカインをコードする mRNA の発現が観察された (Fig. 2)。
- (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 の併用では、便中ウイルス量の激減を観察した。
- (4) *In vitro* の感染実験系では、HT-29 cells から IL-15、TGF- β などの Th1 関連サイトカインや炎症関連のサイトカインの分泌を観察した。CXC ケモカインである IL-8、GRO- α および CC ケモカインである RANTES およびサイトカイン TNF- α 、GM-CSF の mRNA が顕著に誘導された。また、それらの蛋白質産物の発現も観察された。

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

に防御能) を示した点は、今後の粘膜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。GALT 領域におけるサイトカイン、サイトカイン mRNA の動態、CTL の結果は、粘膜アジュバントと人工空粒子の免疫により、体液性および細胞性免疫の双方が誘導されることが確認され、しかも感染防御に有効であることが示された。本検討で用いた抗原 (VP2/VP6) が中和抗原ではないにもかかわらず、粘膜アジュバントとの併用で効果的な感染防御が観察されたことは、この感染防御は特に細胞性免疫と関連があることを示唆した。

E. 結論

マウスでの経鼻接種において、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ることにより、体液性および細胞性免疫の双方が高められ、感染防御が成立することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. I. Adah, W. Abel, M. Oseto, K. Kuzuya, and K. Taniguchi: First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. *J. Med. Virol.*, 2001 (in press)

Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., and Shigeta S.: Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.*, 2001 (in press)

N. Kobayashi, TN Naik, Y. Kusuhara, T. Krishnan, A. Sen, SK Bhattacharya, K. Taniguchi, MM Alan, T. Urasawa, and S. Urasawa: Sequence analysis of structural

and non structural proteins of a human group B rotavirus detected in Calcutta, India. *J. Med. Virol.*, 2001 (in press)

K. Kojima, K. Taniguchi, S. Matsuno, S. Urasawa: Rearrangements generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Res.* 67: 163-171, 2000

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

2. 学会発表

陳 宏之, 前野芳正, 吳 惠霞, 辻 孝雄, 楠原康弘, 佐々木 潤, 肥後匡子, 谷口孝喜: ヒトロタウイルス人工空一重殻粒子 (VP2/VP6) のマウス粘膜免疫による感染防御効果 第48回日本ウイルス学会総会、三重, 2000

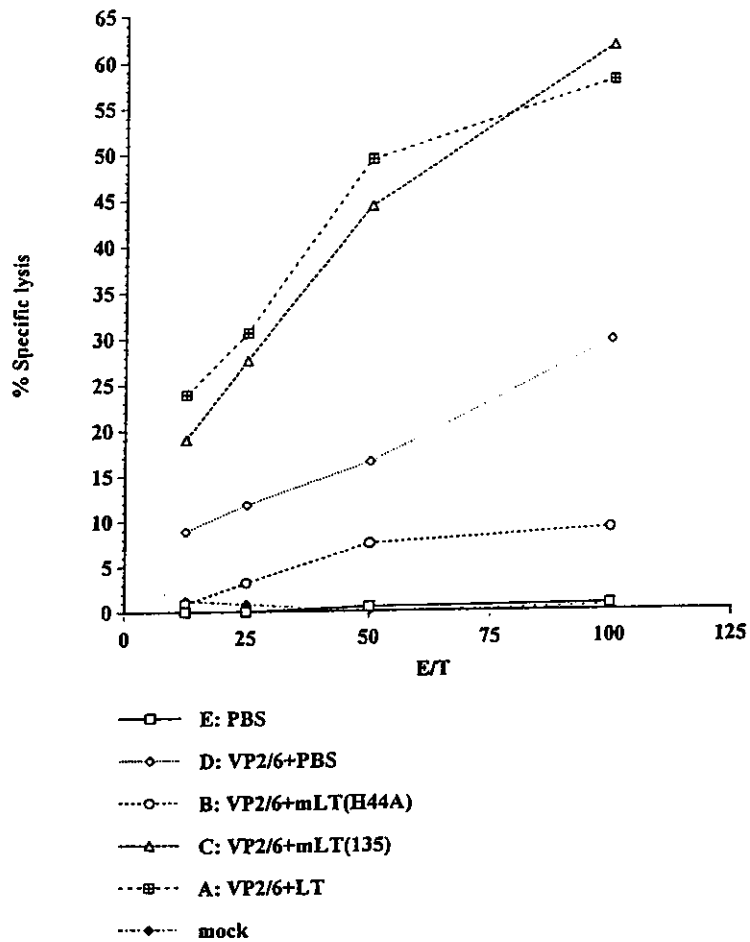


Fig. 1 Specific lytic activities of CTL from mice immunized intranasally against P815 target cells infected with human rotavirus KU.

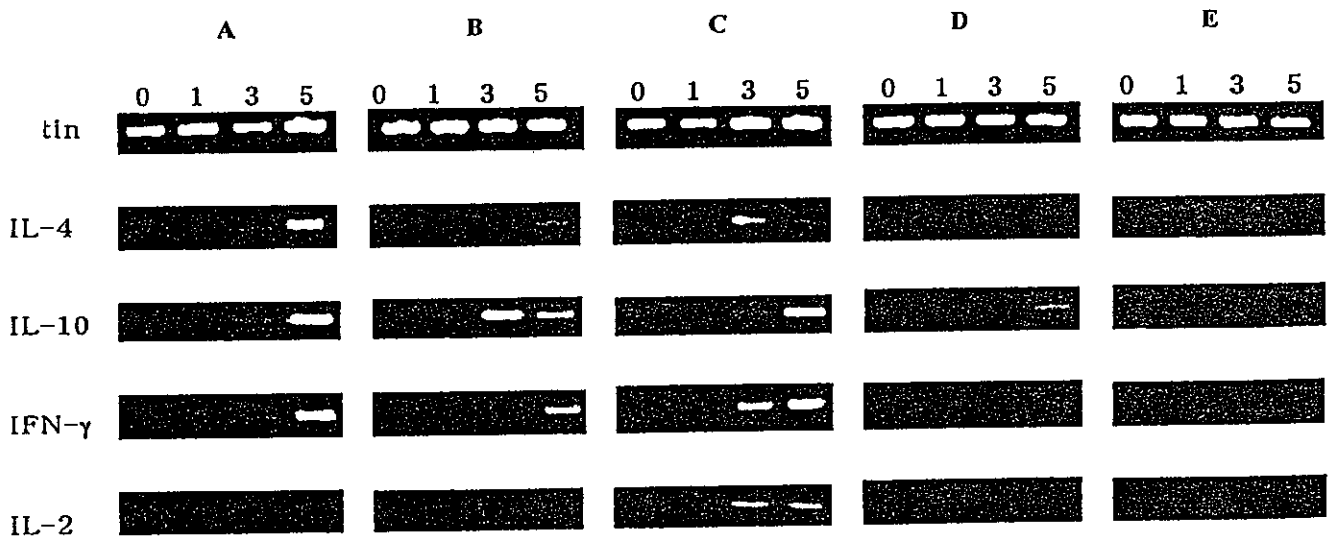


Fig. 2 Expression of cytokine mRNA after in vitro restimulation of splenocytes from immunized mice. Splenocytes were isolated from mice immunized intranasally and were then inoculated with rotavirus KU at MOI of 1. The mRNA for Th2 cytokines (IL-4, IL-10) and Th1 cytokines (IFN-γ, IL-2) were detected by semi-quantitative RT-PCR in splenocytes on 0, 3, and 5 days after virus inoculation. A: VP2/6-VLPs+LT, B: VP2/6-VLPs+mLT (H44A), C: VP2/6-VLPs+mLT (135), D: VP2/6, and E: PBS.

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

食品中のノーウォークウイルスの検出の試み
—磁気ビーズを用いた Immunocapture RT-PCR 法—

分担研究者 榮 賢司 愛知県衛生研究所 微生物部部长
協力研究者 小林慎一 愛知県衛生研究所 微生物部研究員

研究要旨 組換えバキュロウイルスで発現された 4 種類のノーウォークウイルス (NV) の中空粒子に対する抗体を結合した磁気ビーズを作製し、その濃縮効果および特異性について検討した。その結果、抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズの濃縮性および特異性とも高く、また RT-PCR 阻害物質が多量に含有するカキの抽出液からも NV を回収することができた。今後、食品中の NV 検出検査法の確立に向けて、磁気ビーズを用いた NV 抽出法は有用な手段と考えられた。

A. 研究目的

ノーウォークウイルス (NV) は、ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスである。食中毒の感染源および感染経路の究明には食中毒患者や推定原因食品からの病原体の検出が必須である。しかし、NV は未だ培養が不能なウイルスであるために、その検出検査には NV 遺伝子を検出する RT-PCR 法が汎用されている。この RT-PCR 法を用いることで患者や調理人の糞便検体から比較的容易に NV 遺伝子を検出できるようになったが、食品や食材についてはウイルス汚染量が少ないために多量の食品を処理する必要があり、さらに多種類の食品を取り扱う際にはコンタミネーションの問題にも注意しなければならない。また、カキなどの食品によっては PCR 阻害物質が共存することがあり、PCR の効率を高めるために PCR 阻害物質の除去が課題となっている。

近年、遺伝子型の異なる NV からバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子 (Virus-like particles: VLPs) の

作製が可能となり、また VLPs を免疫源とすることで VLPs に対する抗体も得られている。そこで、簡便かつ迅速な食中毒原因食品からの NV 検出法の確立に向けて、抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズの特異性および濃縮効果について検討した。

B. 研究方法

組換えバキュロウイルスで発現した 4 種類の VLPs をそれぞれウサギに免疫することで抗 NV 抗体を作製した。4 種類の VLPs の内訳は、Genogroup I (GI) で r645 (Desert Shield-like virus) と rCV (Chiba virus) の 2 種、Genogroup II (GII) で r76 (Hawaii-like virus) と r104 (Camberwell/ Lorsdale/ Bristol-like virus) の 2 種である。Dynabeads M-280 sheep anti-Rabbit IgG (ダイナル社) 約 1mg に対して精製抗 NV 抗体 50 μ g を室温で 1 時間反応後、洗浄し、0.1% BSA を含む PBS (PBS/0.1% BSA) で 1mg/ml とするように調製した。NV 抗原陽性検体として食中毒患者から採取された糞便を用いた。

1 検体当たり 50 μ g の抗 NV 抗体結合ビーズを 37°C で 1 時間反応後、洗浄し、精製水 100 μ l に懸濁させた後、Trizol 試薬(ギブコ社)で RNA を抽出した。逆転写酵素で cDNA を作製後、NV の構造タンパクを増幅するプライマーで PCR 反応を行い、電気泳動により標的バンドの有無を確認した。

C. 研究結果

1ml, 10ml, 50ml の PBS/0.1%BSA に NV 陽性 10%糞便乳剤 100 μ l のを添加した検体から磁気ビーズを用いることで、すべての検体から NV を回収することができ、磁気ビーズの NV 濃縮効果を確認することができた。また、4 種類の遺伝子型の異なる糞便検体を添加した検体からは、それぞれの型特異抗体を結合した磁気ビーズを用いた系から検出されたことから、磁気ビーズの型特異性は高いと考えられた。カキ 1 個体から調製した中腸腺抽出液 0.5ml に NV 陽性糞便 100 μ l を添加した検体からも NV を検出することができた。従って、食品の NV 検査において食品中の夾雑成分や PCR 阻害物質の除去に磁気ビーズは有用と考えられた。

D. 考察および結論

食中毒の原因究明において、感染経路や感染源の特定および予防対策のためには食中毒原因食品からのウイルス検出は重要である。NV の迅速な検査法として、RT-PCR 法と ELISA 法が実施されている。食中毒に関与した食品や水などのウイルス検査には検出感度の観点から ELISA の適用は困難であり、RT-PCR 法が最適と考えられる。しかし、食中毒の検査では多数かつ多量の検体を処理する必要があり、また抽出段階での RNA 損失を抑えることや検体間でのコンタミネーションを避けるためにも簡便な食品からの NV 遺伝子検出法を確立する必要がある。そこで、抗 NV 抗体を結合し

た磁気ビーズの濃縮効果および特異性を検討した結果、良好な結果が得られた。今回の検討はモデル実験であり、また添加回収実験は定性的な結果であるが、食品の NV 検出検査法に NV 抗体結合ビーズは有用な手段であると考えられた。

NV は遺伝学的に多様性の大きいウイルスであるので、食品検査のためには何種類の抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズを準備する必要があるのかについては今後の検討課題である。また、GI NV と GII NV のグループ特異的な単クローン抗体が報告されているので、単クローン抗体を結合した磁気ビーズを作製し、その有用性についても検討したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi S., Sakae K., Natori K., Takeda N., Miyamura T., and Suzuki Y. Serotype-Specific Antigen ELISA for Detection of Chiba Virus in Stools. *J. Med. Virol.*, 62:233-238, 2000

2) Kobayashi S., Sakae K., Suzuki Y., Shinozaki K., Okada M., Ishiko H., Kamata K., Suzuki K., Natori K., Miyamura T., and Takeda N. Molecular Cloning, Expression, and Antigenicity of Seto Virus Belonging to Genogroup I Norwalk-Like Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 38(9), 3492-3494, 2000.

3) Kobayashi S., Sakae K., Suzuki Y., Shinozaki K., Ishiko H., Kamata K., Suzuki K., Natori K., Miyamura T., and Takeda N. Expression of Recombinant Capsid Proteins of Chitta Virus, a Genogroup II Norwalk-Virus, and Development of an ELISA to Detect the Viral Antigen. *Microbiol. Immunol.*, 44(8), 687-693, 2000

学会発表

1) 小林慎一、栄 賢司、鈴木康元、宮崎豊、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直