

図1. 輸入食品から検出されたNVの系統樹

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

ノーウォーク様ウイルス検出 EIA の開発に関する研究

分担研究者 名取克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官  
協力研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長  
鎌田公仁夫 デンカ生研ウイルス試薬製造部 研究員

研究要旨 構造蛋白領域の 5'末端（300bp）を増幅し、その遺伝子の塩基配列を解析してノーウォーク様ウイルス（NLV）を同定し、分類した。遺伝子系統解析から、いまだ発現していない Genogroup I の 1 種類、Genogroup II の 3 種類、計 4 種類のウイルスについてウイルス様中空粒子（VLP）を作製した。VLP に対する高力価血清を作製し、糞便材料から合計 12 血清型の NLV を検出する EIA を開発し評価した。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス（NLV）は小児の感染性胃腸炎、大人の急性胃腸炎の病因ウイルスで、わが国においては冬季に頻発するウイルス性集団食中毒の原因ウイルスでもある。NLV は RNA ポリメラーゼの一部、構造蛋白の一部あるいは全領域、および機能未定同定蛋白をコードする ORF3 領域の比較から、遺伝学的に大きく Genogroup I（GI）と Genogroup II（GII）の 2 群に分類される。GI には約 10 種、GII には約 20 種の遺伝学的に異なる株の存在が明らかになっている。また、各遺伝型に対応した血清型の存在が予想されており、遺伝学的検出、血清学的検出の両面において困難に直面している。さらに、NLV が増殖可能である培養細胞や実験動物はいまだ見いだされておらず、抗体検出、抗原検出の試薬も無い。

本研究では、NLV の迅速診断法の開発を目的として組換えバキュロウイルスで VLP を作出し、これに対する高力価血清を調製し、患者糞便材料から NLV を迅速に検出する EIA を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) データベースの構築：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 NLV 遺伝子を検索し、NLV 用データベースを作成した。

(2) プライマー：NLV 構造蛋白領域を増幅するプライマーを用いた。

(3) NLV の遺伝子解析と分類：NLV 遺伝子の構造蛋白領域の 5'末端（300bp）を上記のプライマーを用いて増幅し、その遺伝子の塩基配列を解析した。これらを Pileup プログラムによってこの領域のアラインメントならびに系統解析を行った。

(4) ウイルス様中空粒子の作製：構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作出し、ウイルス様中空粒子産生の有無を生化学的、免疫化学的に解析した。VLP に対する高力価抗体をウサギで作製し、抗原補足抗体として用いた。

C. 研究結果

平成 13 年 2 月現在 GenBank、EMBL、DDBJ に登録されている NLV の RNA ポリメラーゼ領域を抽出し、昨年作成したポリメラーゼ領域のデータベースに追加しこれらを統合した。200 以上の配列の比較が可能になっている。ウイルスポリメラーゼ領域の解析から、新規の NLV は遺伝子型から GI および GII の 2 種のグループに分類されることを確認した。構造蛋白領域に関しては、約 30 株の国内の NLV の構造蛋白遺伝子を増幅してその塩基配列を解読した。分子系統学的解析の

結果、GI、GII にはそれぞれ少なくとも 12 種類と 19 種類の遺伝子型が存在すると予想された。これらに対応した血清型の存在が予想された。

本年度は日本で流行した株の中から遺伝子型の異なる 4 株 (GI の 1 株、GII の 3 株) の NLV について組換えバキュロウイルスを用いて発現し、VLP を作製した。またこれらに対する高力価血清を作製した。これらの VLP は相互に血清学的に異なり、それら 4 株について NLV 抗体測定が可能となった。また、この 4 株は既存の 8 株とも血清学的に異なる株であった。12 株について抗体測定のための EIA キットを作製し、地方衛生研究所で評価してもらった。その結果、電子顕微鏡で NLV が確認されている検体については 70-80% が陽性であった。

#### D. 考察

近年、患者の糞便から効率良く NLV RNA を抽出する手法、およびプライマーの開発に伴い、世界各国で PCR による遺伝子の増幅、解析が行われている。現在 RNA ポリメラーゼ領域の塩基配列が勢力的に解析されてきているが、解析の領域によっては本来 GII であるべきウイルスが GI に分類されることもあり多少の混乱が生じてきた。NLV は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ウイルスであるから、今後構造蛋白領域 ORF2 の 5'末端 (300bp) の塩基配列データベースの充実をはかり、より有効なプライマーの開発を進めてゆく必要がある。

本年度は新しい遺伝子型の 4 株について中空粒子を作製することに成功した。これらの中空粒子を抗原にして作製した高力価血清を用いた EIA によって、この 4 株は相互に異なる血清型を示した。また、昨年度までに作製した 8 株とも異なっていた。従って、合計 12 株の中空粒子を作出することができたことになる。これらの NLV を迅速に検出するための抗原 EIA を構築し、キット化して広く評価してもらった結果、満足できる検出感度と特異性を持っていた。更なる VLP の発現、

抗血清の作製、EIA キットの開発が急務である。

#### E. 結論

NLV は現時点で培養細胞、及び実験動物で培養ができないウイルスである。また、遺伝学的にも、血清学的にも多様性をもって流行している。NLV を迅速に検出するため、本年度は新たに 4 株の構造遺伝子を組換えバキュロウイルスで発現することによってウイルス様中空粒子を作製した。これまでに発現した株を加え、合計 12 種類の血清型の検出が可能になった。

#### F. 健康危険情報

集団で発生するウイルス性食中毒の原因ウイルスとしての抗原を、糞便中から迅速に検出する方法を開発した。問題は NLV の型の多様性であるが、各型についての中空粒子を産生することにより、目的を達成しつつある。

#### 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;278 : 490-500
4. 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* 2001;in press

5. 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
  6. Li T-C, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Kisoan 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DGW, Estes MK. Identification of an epitope common to genogroup I 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, Suzaki 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 I 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: 散发性急  
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

チバウイルスプロテアーゼの大腸菌における機能的発現

分担研究者 染谷 雄一 国立感染症研究所 研究員

研究要旨 ノーウォークウイルスの一種であるチバウイルスに由来するプロテアーゼを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ると結論した。

A. 研究目的

ノーウォークウイルス感染による下痢症のみならず、種々のウイルスによる下痢症は毎年、特に冬季に多く発生し続けている。死亡に至る例は我が国ではほとんどないが、下痢症による成人労働力の低下は大きな経済的損失を生み出す。現在、ウイルス性下痢症に対して、治療薬は存在しない。水分、栄養を補給しながら、自然治癒を待たねばならない。このような状況の中、ウイルスの増殖、感染を抑制する薬物の創製が必要である。本研究では、ノーウォークウイルスに由来するタンパク質、特にプロテアーゼの構造と機能を理解し、下痢症治療薬としてのプロテアーゼ阻害剤の開発を目指す。

B. 研究方法

全遺伝子塩基配列が決定されたチバウイルスの 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

ヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ認識配列を介したグルタチオン-S-転移酵素 (GST) との融合タンパク質は、大腸菌内で GST とプロテアーゼに切断されていることが、抗プロテアーゼ抗血清および抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロットティングで明らかにされた。プロテアーゼの推定活性中心 Cys 残基を Ala に置換した変異融合タンパク質で切断が起こらないこと、また、スロンピン認識配列を介した融合タンパク質でも切断が見られなかった。更に、チバウイルス ORF1 の VPg-プロテアーゼ-RNA ポリメラーゼ領域を発現する系を構築したところ、VPg、プロテアーゼ、RNA ポリメラーゼに対応する切断産物が確認された。ここで生じたプロテアーゼ断片の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、推定される認識配列で切断が起こっていることが確かめられた。

D. 考察と結論

大腸菌で発現したチバウイルスプロテアーゼ

は酵素活性を有しており、ピコルナウイルス 3C プロテアーゼに類似した基質特異性を有していると結論される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuichi Someya, Naokazu Takeda, and Tatsuo Miyamura (2000) Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology* 278(2), 490-500.

2. 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「ウイルス性下痢症」 *Medical Practice* 17(7), 1260-1262 (2000)

3. 染谷雄一、武田直和 「SRSV と食中毒」 *週刊医学のあゆみ* 195(5), 377-381 (2000)

4. 染谷雄一 「カリシウイルス」 *ウイルス* 50(2), 173-184 (2000)

2. 学会発表

1. Someya, Y., Takeda, N., and Miyamura, T. Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *E. coli*. Thirty-fourth Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2000.

2. 「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」 染谷雄一、武田直和、宮村達男 日本ウイルス学会第 48 回学術集会・総会 (2000)

3. 「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」 染谷雄一、武田直和、宮村達男 第 23 回日本分子生物学会年会 (2000)

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 I Norwalk-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:1656-1660

2000520

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

**「研究成果の刊行に関する一覧表」**

**Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana***

Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y,  
Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S.

Antiviral Research. 2001 Jan;49(1):15-24.

**Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable  
progenies from a human rotavirus strain.**

Kojima K, Taniguchi K, Kawagishi-Kobayashi M, Matsuno S, Urasawa S.

Virus Research. 2000 Apr;67(2):163-71.

**New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a  
porcine rotavirus.**

Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K,  
Urasawa S.

Journal of Medical Virology. 2000 Jan;60(1):63-9.

**Complete nucleotide sequence of the chiba virus genome and functional  
expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*.**

Someya Y, Takeda N, Miyamura T.

Virology. 2000 Dec 20;278(2):490-500.

**Interaction of recombinant norwalk virus particles with the 105-kilodalton  
cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus  
attachment.**

Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N.

Journal of Virology. 2000 Dec;74(24):11589-97.



**Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein.**

Li F, Riddell MA, Seow HF, Takeda N, Miyamura T, Anderson DA.  
Journal of Medical Virology. 2000 Apr;60(4):379–86.

**Oral administration of hepatitis E virus–like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice.**

Li T, Takeda N, Miyamura T.  
Vaccine. 2001 May 14;19(25–26):3476–84.

**Augmentation of immune responses to hepatitis E virus ORF2 DNA vaccination by codelivery of cytokine genes.**

Tuteja R, Li TC, Takeda N, Jameel S.  
Viral Immunol. 2000;13(2):169–78.

**Identification of an epitope common to genogroup 1 “norwalk–like viruses”.**

Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DW, Estes MK.  
J Clin Microbiol. 2000 Apr;38(4):1656–60.

**Serotype–specific antigen ELISA for detection of Chiba virus in stools.**

Kobayashi S, Sakae K, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y.  
Journal of Medical Virology. 2000 Oct;62(2):233–8.

**Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk–like viruses.**

Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N.  
Journal of Clinical Microbiology. 2000 Sep;38(9):3492–4.

**Expression of recombinant capsid proteins of chitta virus, a genogroup II Norwalk virus, and development of an ELISA to detect the viral antigen.**

Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N.

Microbiol. Immunol. 2000;44(8):687-93.

**Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus.**

Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, Takeda N.

Journal of Medical Virology. 2000 Nov;62(3):327-33.

**ウイルス性下痢症  
診断マニュアル  
(第2版)**

平成12年7月

## はじめに

ウイルス性下痢症は近年先進国において公衆衛生上重要な感染症として認識されてきた疾患である。原因ウイルスは1970年以降、正確には1972年にロタウイルスが免疫電子顕微鏡下に捕らえられた以後に同定されたものばかりであるから、全て新興感染症の範疇に含まれている疾患といえる。また、本マニュアルで取り上げたウイルス性下痢症は、感染性胃腸炎として平成11年4月に施行された感染症新法において、4類感染症の小児科定点把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置づけられている。本マニュアルはまさに時を得て作成されたといえる。電子顕微鏡、ELISA、PCR等、初心者が実験台の脇において参照しながら進めていけるように記述されている。本マニュアルが関係諸機関の研究者に十分に活用され、ウイルス性下痢症の迅速診断に寄与してゆくことを期待したい。

本マニュアルは国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官、長谷川斐子（検査法の概要、A群ロタウイルスの抗原検出、ロタウイルスRNAの検出、ウイルスの分離培養）、同、松野重夫（ロタウイルスRT-PCR法）、岡山県環境保健センター、藤井理津志、葛谷光隆（RPHA法によるC群ロタウイルスの検出）、愛媛県立衛生環境研究所ウイルス科長、大瀬戸光明（下痢症ウイルスの電子顕微鏡による検出、免疫電顕法、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）、東京大学医学部教授、牛島廣治（アストロウイルスRT-PCR法）、愛知県衛生研究所、山下照夫（アイチウイルスの検査法）、ならびに国立公衆衛生院微生物学部ウイルス室長、西尾治（酵素抗体法によるA群ロタウイルスのG血清型別、カリシウイルスのRT-PCR法とハイブリダイゼーション、アデノウイルス）の諸氏によって執筆されたものである。厚く御礼申し上げるとともに、より良いマニュアル作成に今後ともご協力いただきたい。とりまとめは国立感染症研究所ウイルス第二部腸管感染ウイルス第一室が行なった。意見、感想等をお寄せいただければ幸いである。また、マニュアル作成にあたっては、平成11年度厚生科学研究費補助金、「新興・再興感染症研究事業：下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究」の援助を受けた。厚く御礼申し上げる。

平成12年7月

国立感染症研究所  
ウイルス第二部部长

宮村達男

## 目 次

はじめに

検査法の概要	1
ウイルスの分離培養	3
下痢症ウイルスの電子顕微鏡による観察（ネガティブ染色）	6
免疫電顕法（IEM 法）	10
A 群ロタウイルス抗原検出	11
酵素抗体法によるヒト A 群ロタウイルスの G 血清型別	13
RPHA 法による C 群ロタウイルスの検出	16
ロタウイルス RNA の検出（SDS-PAGE）	19
ロタウイルス RT-PCR 法	25
アストロウイルスの分離・同定検査	28
酵素抗体法によるアストロウイルス抗原の検出	31
アストロウイルス RT-PCR 法	35
アイチウイルスの検査法	39
カリシウイルスの RT-PCR 法とハイブリダイゼーション	44
アデノウイルス	55

## 検査法の概要

### 下痢症ウイルス

急性感染性下痢症は世界各地において、いわゆる“かぜ”に次ぐ高頻度で発生する感染症である。わが国でも毎年40万から60万人の急性胃腸炎の発生が推定されている。その中でウイルス性下痢症は大部分が乳幼児下痢症であり、その発生ピークは冬期である。

原因ウイルスは、ロタウイルス、カリシウイルス (SRSV)、アデノウイルス、アストロウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、インフルエンザウイルスなどが検出されている。ロタウイルスやインフルエンザに伴う胃腸炎、カリシウイルス（カキ関連の食中毒）は冬期に多く、エンテロウイルスは主として夏期に、アデノウイルス、散発例のカリシウイルス等は年間を通じて下痢患者の便から検出される。

### 検査材料の採取

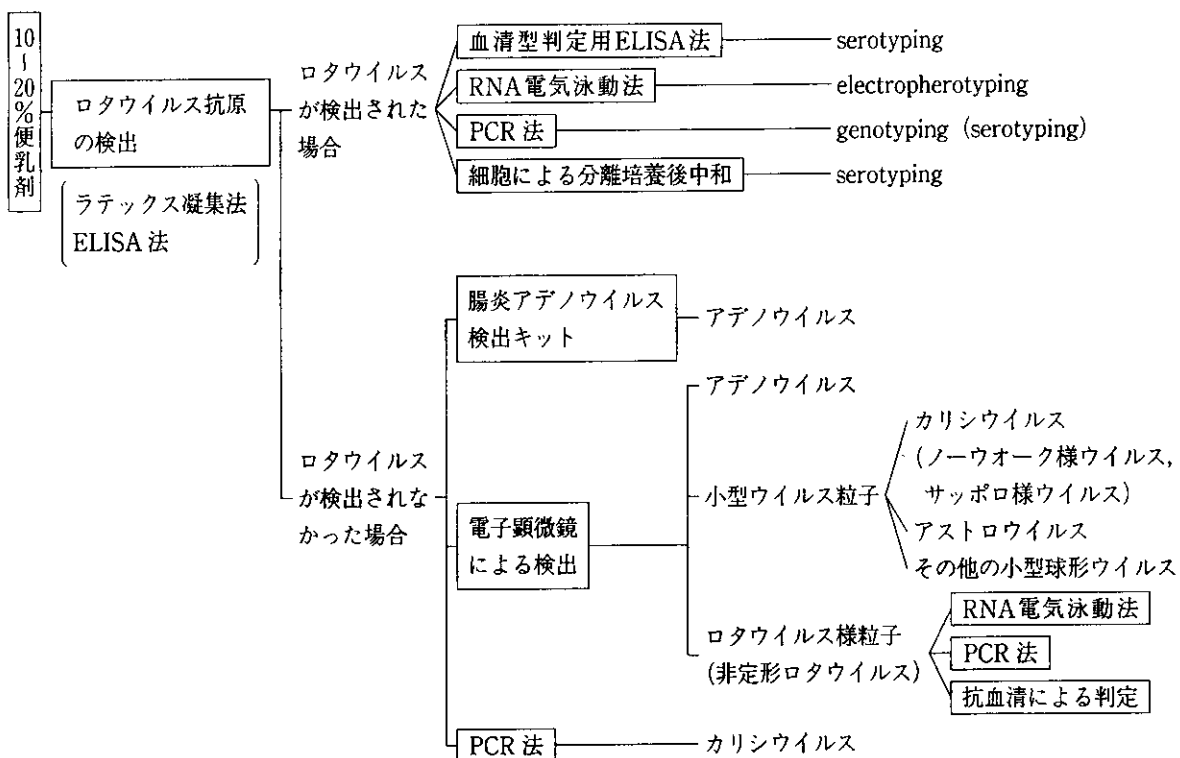
ウイルス性下痢症と疑われた患者から、なるべく多くの下痢便を早期に採取する。発症後2～3日位までの検体は検出率が高い。プラスチック製などの適切な容器に下痢便を採取し、密閉する。送付する場合は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下（ドライアイス保存）で、1日位であるならば $4^{\circ}\text{C}$ （氷中）で行う。長期保存の場合は $-80^{\circ}\text{C}$ が望ましい。凍結融解を繰り返すとウイルス粒子が破壊される。

急性期および回復期の血液を採り、血清に分離して $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結保存する。

### 検査の進め方

ウイルス性下痢症の疫学的背景を考慮にいて検査を行うようにする。冬期に乳幼児に発生した散発的な下痢症はロタウイルスの可能性が高い。現在ロタウイルスはA群からG群に分類され、群間の血清免疫学的共通抗原性はなく、ヒトではA～C群が報告されている。A群ロタウイルスが乳幼児下痢症の重要な原因で、いろいろな検出用キットが販売されているので、それらを使用してロタウイルス抗原の有無を確認してから、次の検査へ進んだ方がよい。

下痢症ウイルスの検出手順の一例を示す。



患者の便材料から10～20%乳剤を作り、低速遠心して上清を検査材料とする。A群ロタウイルス検出用キットを使用してロタウイルスの有無を確認する。

ロタウイルスが検出された場合は、ELISA法によるG血清型別(VP7)、電気泳動法によるRNAパターンの確認、RT-PCR法によるG血清型およびP血清型(VP4)別、また培養細胞を使用してウイルスの分離培養などを必要に応じて行う。

ロタウイルスが検出されなかった場合は、アデノウイルス検出キットを用いてアデノウイルスの検出や、電子顕微鏡による観察を行いウイルス粒子の検出を行う。粒子が検出された検体は免疫電顕法で鑑別同定を行う。カリシウイルス感染が疑われる検体は、直接にRT-PCR法で特異的遺伝子の検出も行われている。

下痢症をおこすウイルスはレベル2に属し、P2施設での作業である。実験室内感染には十分に注意をはらい、検査に用いた試料、器具等は終了後に必ず滅菌する。

## ウイルスの分離培養

培養細胞による下痢症ウイルスの分離培養は A 群と C 群ロタウイルス, アストロウイルスおよびアデノウイルスで成功している。下痢症がロタウイルスに起因するかどうかを検査するには前述のような方法があり, 培養細胞を用いた分離培養はほとんど行われなくなっている。しかし特別な目的や大量のウイルスを必要とする研究には分離培養を試みることになる。

A 群ロタウイルスの培養には初代サル腎細胞, MA104細胞 (アカゲザル腎由来株化細胞) が使われていた。近年 CaCo2細胞 (ヒト大腸癌由来株化細胞) を用いた C 群ロタウイルスの分離培養が報告され<sup>5)</sup>, CaCo2細胞は A 群ロタウイルスにも良い感受性を示すことが観察された。また CaCo2細胞はアストロウイルスの分離培養にも使用され, 腸炎アデノウイルスの培養には Graham293細胞が一般的に用いられている。

ここでは CaCo2細胞を用いたロタウイルスの分離方法を記す。

### 1. 器具および試薬

ガラスホモジナイザー

組織培養用ローラーチューブまたはボトル

回転培養器または振盪培養器

0.45 $\mu$ m フィルター

Eagle's MEM 培地

GIT 培地 (和光純薬株式会社)

牛胎児血清

アセチル化トリプシンまたはトリプシン III (Sigma 製)

ラテックス凝集または ELISA キット

PBS または蒸留水

HCFC-141b (ダイキン工業) またはクロロホルム

### 2. 分離方法

- 1) 10~20% 便乳剤に HCFC-141b またはクロロホルムを等量加え, 完全に混じるまで攪拌し, 3,000rpm 10分間遠心, 遠心上清を接種材料とする。
- 2) 材料中のウイルス粒子またはウイルス抗原の検出を行う (電顕, ラテックス凝集法, ELISA 法など)。
- 3) ロタウイルス陽性材料を用いる。接種材料を0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過し, 20



$\mu\text{g/ml}$  のトリプシンを等量加え、 $37^{\circ}\text{C}$  20分間処理する。

- 4) 3%牛胎児血清加GIT培地で培養したCaCo2細胞をEagle's MEM培地で2回洗い、0.2mlのトリプシン処理接種材料を少なくとも2本のチューブまたはボトル1~2本に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  1時間、吸着させる。15分毎に接種液で細胞面を被うように軽くゆする。
- 5) 接種材料を完全に取り除く。
- 6) (1~4 $\mu\text{g/ml}$ )トリプシンを含む維持培地(Eagle's MEM)1~2mlを加えて、 $37^{\circ}\text{C}$ で回転培養または振とう培養する。トリプシン濃度は使用する細胞とトリプシンのLotによって異なるので、予め試験を行い細胞が1週間程度維持できる最大量を用いる。
- 7) 6~7日間培養し、細胞変性を観察する。細胞変性の有無にかかわらず1回は必ず継代する。
- 8) 凍結融解を2回行い、同材料を接種したチューブまたはボトルの培養液をプールして、次回への接種材料とする。
- 9) 新しいCaCo2細胞へ各検体0.2mlずつ接種し、1時間の吸着後、接種材料を除いてトリプシン加維持培地を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で回転または振とう培養する。

細胞変性の出現に3~4回の継代を必要とする場合もある。ウイルスの増殖はラテックス凝集法またはELISA法で確認する。

MA104細胞を使用して分離を行う場合は、維持培地に加えるトリプシン濃度をCaCo2細胞の場合より高くした方がよいようである。また継代のたびに接種材料を必ずトリプシン処理することが必要である。初代サル腎細胞は一般には入手困難であるが、使用する場合はCaCo2細胞の方法に準じる。

アストロウイルスの分離培養は、ロタウイルスの場合とほぼ同様であるが、吸着時間を2時間にする。

#### CaCo2細胞使用上の注意事項

1. プラスチックボトルを使用した方がよい。
2. 細胞継代にトリプシンを用いない方がよい(A群およびC群ロタウイルス、アストロウイルスの分離培養の場合)。
3. 完全にシートになり、細胞が完全に分化していることを確認してから使用する。分化していないと細胞数が少ない。

#### 継代方法の例

1. 培養液を完全に除く。
2. PBS(-)+0.02%EDTA 液で2回洗う。
3. ピペットで少量の GIT 培地を細胞面に強く吹きつけ細胞を剥離させる。ピペッティングで細胞を出来るかぎり細かくする。ピペッティングをするとき、培地に FCS が入っていると泡立つので、加えない方がよい。
4. 3%FCS 加 GIT 培地で細胞を 1 : 3 ~ 1 : 4 にして新しいボトルに入れ、培養する (6~10日でフルシートとなる)。

#### 文 献

1. Taniguchi K. et al., J. Infect. Dis. 155, 1159-1166 (1987)
2. Urasawa S. et al., Microbiol, Immunol. 32, 699-708 (1988)
3. Laemmli U.K., Nature (London) 227, 680-685 (1970)
4. Gouvea V. et al., J. Clin. Microbiol. 28, 276-282 (1990)
5. 大瀬戸光明 医学のあゆみ 168(2) 177-178 (1994)

## 下痢症ウイルスの電子顕微鏡による検出（ネガティブ染色）

A群以外のロタウイルス，カリシウイルス(SRSV)，アストロウイルス等培養細胞で難増殖性のウイルス粒子検出に有効な方法である。

### 1. 器具および試薬

超遠心機と水平ローター (40,000rpm)

低速遠心機 (3,000~5,000rpm)

ホモジナイザー

電子顕微鏡

真空蒸着装置

400メッシュ銅製グリッド

電動ミキサー

高速微量遠心機

ガラスまたはプラスチック遠心管

マイクロチューブ

ピペット

HCFC-141b (ダイキン工業)

2%コロジオン溶液

2%リタングステン酸カリ溶液 (pH7.0)

30%蔗糖水溶液

0.01M リン酸緩衝液 (pH7.2)

精製水

### 2. 電子顕微鏡観察試料の作製

便材料 0.3g~1g

蒸留水または PBS 10ml

↓ Vortex  
遠心 3,000rpm 15min

遠心上清に等量の HCFC・141b を加える

↓ Vortex  
遠心 3,000rpm 15min

水相 7 ~ 8 ml を採取, 30%蔗糖水溶液に重層,

↓ 遠心 35,000rpm~40,000rpm 150min

沈渣を残して水相を除き, 約 1ml の蒸留水で沈渣を巻き上げないように洗う。

↓

沈渣に 2 ~ 5 滴の蒸留水に再浮遊 (沈渣が多い場合は高速微量遠心機で, 10,000 rpm, 1min の遠心が有効)

電子顕微鏡観察試料

\* 水様便, 軟便等便の性状により調節, 濃すぎない方がよい

### 3. 支持膜の作製

支持膜の作り方は種々の方法があるが, 例としてコロジオンとホルムバームを用いた支持膜の作製法を示す。

#### 1) コロジオン支持膜の作製

市販のコロジオン膜張器にステンレスの網板を置き, 約40℃の蒸留水を満たす。

↓

ステンレス網板の上に400メッシュの銅製グリッドを50枚程度並べる。

↓

2%コロジオン液 (酢酸アミル溶液) をパスツールピペットで1滴静かに滴下する。  
10分程度静置し膜が乾燥するのを待つ。

↓

膜張器の下のコックを緩め, 静かに水を抜いて水位を下げ, 銅製グリッドにコロジオン膜を張り付かせる。

↓

ステンレス網板ごと取り出し, 濾紙上で水切りした後, 室温で一夜乾燥させる。

↓

カーボン蒸着してコロジオン膜を補強する。カーボンの蒸着量は, 銅製グリッドの側に置いた濾紙が薄く着色する程度が良い。