

Table 7. Specificity of ail primer for detection of Y. enterocolitica (2).

Strains	Type/serovar/source / No.	ail 1-2
Gram positive bacteria		
<u>S. aureus</u>	1- Ent A producer	--
	2- B producer	--
	3- C producer	--
	4- D producer	--
	5- E producer	--
	6- H producer	--
	7- TSST-1 producer	--
	8- MRSA	--
<u>B. cereus</u>	1- emetic type	--
<u>B. cereus</u>	2- diarrheal type	--
<u>B. cereus</u>	3- IFO 13484	--
<u>B. subtilis</u>	PCI 219	--
<u>B. licheniformis</u>	1- ATCC 43888	--
<u>B. pumilus</u>	from air	--
<u>C. botulinum</u>	E toxin producer	--
<u>C. perfringens</u>	Hobbs type 13	--

Table 8. Sensitivity of PCR with ail 1-2 primers for detection of Y. enterocolitica from vegetables.

Materials <sup>1)</sup>	CFU of <u>Yersinia</u> detected with primer	
	Cont.	Expt.
TE buffer	—	10 <sup>4</sup>
Lettuce	—	10 <sup>5</sup>
Parseley	—	10 <sup>5</sup>
Cabbage	—	10 <sup>3</sup>
Sprouts	—	10 <sup>5</sup>
Leek	—	10 <sup>5</sup>
Welsh onion	—	10 <sup>5</sup>
Turfed stone leef	—	10 <sup>4</sup>
Carrot	—	10 <sup>3</sup>
Tomatoes	—	10 <sup>3</sup>
Watermelon	—	10 <sup>3</sup>
Melons	—	10 <sup>3</sup>

1) Various materials samples were inoculated at different levels of Y. enterocolitica

Table 9. Sensitivity of PCR with ail 1-2 primers for detection Y. enterocolitica from vegetables foods.

Materials <sup>1)</sup>	CFU of <u>Yersinia</u> detected with primer	
	Cont.	Expt.
TE buffer	—	10 <sup>4</sup>
Vegetable salad	—	10 <sup>4</sup>
Boiled spinach	—	10 <sup>3</sup>
Spinach butter saut	—	10 <sup>4</sup>
OKAKA salad	—	10 <sup>5</sup>
Pumpkin salad	—	10 <sup>5</sup>
Seafood salad	—	10 <sup>3</sup>
Potatoe salad	—	10 <sup>5</sup>
Mashed potato	—	10 <sup>3</sup>
Fried potato	—	10 <sup>3</sup>
Vegetable soup	—	10 <sup>3</sup>
Apple juice	—	10 <sup>5</sup>
Orange juice	—	10 <sup>5</sup>
Sea food sauces	—	10 <sup>4</sup>

1) Various materials samples were inoculated at different levels of Y. enterocolitica

Table 10. Sensitivity of PCR with ail 1-2 primers for detection Y. enterocolitica from various foods.

Materials <sup>1)</sup>	CFU of <u>Yersinia</u> detected with primer	
	Cont.	Expt.
TE buffer	—	10 <sup>4</sup>
Raw beef	—	10 <sup>3</sup>
Raw pork	—	10 <sup>5</sup>
Raw chicken	—	10 <sup>5</sup>
Raw liver	—	10 <sup>3</sup>
Roast beef	—	10 <sup>4</sup>
Hamburger	—	10 <sup>3</sup>
Milk	—	10 <sup>3</sup>
Yoghourt	—	10 <sup>3</sup>
Cheeses	—	10 <sup>3</sup>
Liquid egg	—	10 <sup>5</sup>
Thickly baked egg	—	10 <sup>3</sup>

1) Various materials samples were inoculated at different levels of Y. enterocolitica

Table 11. Sensitivity of PCR with ail 1-2 primers for detection Y. enterocolitica from swabs, blood and faeces.

Materials <sup>1)</sup>	CFU of <u>Yersinia</u> detected with primer	
	Cont.	Expt.
TE buffer	—	10 <sup>4</sup>
swabs from a table	—	10 <sup>3</sup>
blood	—	10 <sup>3</sup>
faeces	—	10 <sup>5</sup>

1) Various materials samples were inoculated at different levels of Y. enterocolitica

Table 12. Bacterial growth and detection of ail-gene<sup>1)</sup> in different cultures of *Y. enterocolitica*.

Cultured medium			Initial CFU <sup>2)</sup>	4hr-culture:	6hr-culture:	8hr-culture:	24hr-culture:
				CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)
BHI broth							
37°C	Supplement	+	2.0	1.7(-)	2.8(-)	3.5(-)	9.1(+)
		-	2.0	3.1(-)	3.3(-)	4.7(+)	9.4(+)
25°C	Supplement	+	2.0	2.6(-)	3.0(-)	3.2(-)	9.3(+)
		-	2.0	2.6(-)	2.8(-)	3.9(-)	9.3(+)
-----							
Trypticase soy broth(TSB)							
37°C	Supplement	+	2.0	1.5(-)	2.6(-)	3.6(-)	9.3(+)
		-	2.0	2.7(-)	3.1(-)	4.1(+)	9.0(+)
25°C	Supplement	+	2.0	2.2(-)	2.9(-)	3.1(-)	9.2(+)
		-	2.0	2.7(-)	3.0(-)	3.7(-)	9.1(+)

1) PCR with primer ail 1-2. 2) Colony forming units per ml of culture.

Table 13. Bacterial growth and detection of ail-gene<sup>1)</sup> in TSB cultures of foods inoculated with Y. enterocolitica .

Cultured medium			Initial CFU <sup>2)</sup>	4hr-culture:	6hr-culture:	8hr-culture:	16hr-culture:
				CFU(PCR) <sup>3)</sup>	CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)
Lettuce							
37°C	Supplement	+	2.0	1.5(-)	3.8(-)	4.7(-)	9.8(+)
		-	2.0	2.1(+)	2.9(+)	4.2(+)	9.3(+)
25°C	Supplement	+	2.0	2.2(-)	2.8(+)	3.5(+)	9.8(+)
		-	2.0	2.1(-)	2.3(+)	3.8(+)	9.6(+)
Sprouts							
37°C	Supplement	+	2.0	2.2(+)	3.2(+)	4.0(+)	9.6(+)
		-	2.0	2.6(+)	3.7(-)	4.7(+)	8.9(+)
25°C	Supplement	+	2.0	2.3(+)	2.9(+)	3.0(+)	9.8(+)
		-	2.0	2.2(+)	2.3(+)	3.6(+)	9.6(+)
Welsh onion							
37°C	Supplement	+	2.0	2.0(-)	2.4(+)	3.3(+)	9.3(+)
		-	2.0	2.2(-)	2.9(+)	4.2(+)	8.1(+)
25°C	Supplement	+	2.0	1.7(-)	2.6(+)	2.2(+)	9.1(+)
		-	2.0	2.1(-)	1.9(-)	2.9(-)	9.6(+)
Watermelon							
37°C	Supplement	+	2.0	1.9(+)	3.5(+)	4.0(+)	9.3(+)
		-	2.0	3.0(+)	3.4(+)	4.9(+)	9.2(+)
25°C	Supplement	+	2.0	1.8(+)	2.6(+)	2.9(+)	9.2(+)
		-	2.0	2.3(+)	2.7(+)	3.1(+)	9.0(+)
Potato salad							
37°C	Supplement	+	2.0	2.7(+)	3.4(+)	4.8(+)	9.7(+)
		-	2.0	3.0(+)	3.8(+)	4.8(+)	8.3(+)
25°C	Supplement	+	2.1	2.7(-)	3.1(-)	3.8(-)	8.5(+)
		-	2.1	2.9(-)	3.4(-)	3.7(-)	8.8(+)

Table 14. Bacterial growth and detection of ail-gene<sup>1)</sup> in TSB cultures of foods inoculated with *Y. enterocolitica* .

Cultured medium		Initial	4hr-culture: 6hr-culture: 8hr-culture: 16hr-culture:				
			CFU <sup>2)</sup>	CFU(PCR) <sup>3)</sup>	CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)
Orange juice							
37°C	Supplement	+	2.0	1.0(+)	2.9( +)	4.3( +)	9.5( +)
		-	2.0	1.3(+)	3.2( +)	3.8( +)	8.4( +)
25°C	Supplement	+	2.1	1.8(-)	3.0( -)	3.4( -)	9.0( +)
		-	2.1	2.9(+)	3.2( +)	3.4( +)	9.3( +)
Raw pork							
37°C	Supplement	+	2.0	2.9(+)	4.3( +)	5.3( +)	10.1( +)
		-	2.0	2.8(+)	4.0( +)	5.4( +)	10.0( +)
25°C	Supplement	+	2.1	3.0(+)	3.3( +)	3.6( +)	8.1( +)
		-	2.1	3.0(-)	3.5( -)	4.4( -)	8.1( +)
Raw liver							
37°C	Supplement	+	2.0	2.9(-)	4.3( +)	5.2( +)	9.0( +)
		-	2.0	2.9(-)	4.1( +)	5.3( +)	9.1( +)
25°C	Supplement	+	2.1	2.9(+)	3.2( +)	3.6( +)	8.0( +)
		-	2.1	3.1(-)	3.6( -)	4.2( -)	8.2( +)
Milk							
37°C	Supplement	+	2.0	2.9(+)	4.0( +)	4.6( +)	9.7( +)
		-	2.0	3.2(+)	4.0( +)	4.9( +)	8.1( +)
25°C	Supplement	+	2.1	3.0(-)	3.6( -)	4.0( -)	9.1( +)
		-	2.1	3.1(-)	3.6( -)	4.4( -)	9.2( +)
Liquid egg							
37°C	Supplement	+	2.0	2.6(+)	3.7( +)	4.3( +)	9.6( +)
		-	2.0	2.5(+)	3.7( +)	4.2( +)	9.6( +)
25°C	Supplement	+	2.1	3.1(-)	3.3( -)	3.8( -)	9.3( +)
		-	2.1	3.0(-)	3.6( -)	3.7( -)	9.5( +)



Table 15. Bacterial growth and detection of ail-gene<sup>1)</sup> in TSB cultures of swabs and faeces inoculated with Y. enterocolitica.

Cultured medium			Initial CFU <sup>2)</sup>	4hr-culture: CFU(PCR) <sup>3)</sup>	6hr-culture: CFU(PCR)	8hr-culture: CFU(PCR)	16hr-culture: CFU(PCR)
<b>Faeces</b>							
37°C	Supplement	+	2.0	3.0(-)	3.7(+)	5.1(+)	9.6(+)
		-	2.0	2.6(-)	3.8(+)	4.8(+)	8.0(+)
25°C	Supplement	+	2.1	3.0(-)	3.3(-)	3.7(-)	8.3(+)
		-	2.1	2.9(-)	3.3(-)	3.5(-)	8.0(+)
<b>Blood</b>							
37°C	Supplement	+	2.0	2.9(-)	3.7(-)	4.8(-)	9.6(+)
		-	2.0	2.8(-)	3.8(-)	5.2(+)	9.6(+)
25°C	Supplement	+	2.1	3.0(-)	3.3(-)	3.9(-)	9.2(+)
		-	2.1	3.0(-)	3.5(-)	4.7(-)	9.3(+)
<b>Swabs</b>							
37°C	Supplement	+	2.4	2.7(-)	2.9(+)	4.1(+)	9.1(+)
		-	2.4	2.8(+)	3.1(+)	4.7(+)	8.9(+)
25°C	Supplement	+	2.4	2.7(-)	2.8(-)	3.1(-)	8.9(+)
		-	2.4	2.8(-)	2.8(-)	3.6(+)	9.2(+)

1) PCR with primer ail 1-2. 2) colony forming units per ml of culture.

Table 16. Detection of Prf-gene<sup>1)</sup> and survivors from various foods inoculated with 10<sup>6</sup> cfu/ml of Y. enterocolitica after heating at 55 °C for 25 min .

Food	Cont.	Before heating	after heating
		CFU <sup>2)</sup> (PCR) <sup>3)</sup>	CFU(PCR)
Spinach soak	—	6.2 (+)	1.0> (+)
Vegetables soup	—	6.1 (+)	1.0> (+)
Raw beef	—	6.1 (+)	1.0> (+)
Raw pork	—	6.1 (+)	1.0> (+)
Raw chicken	—	6.1 (+)	1.0> (+)
Cheeses	—	6.1 (+)	1.0> (+)

1) PCR with primer ail 1-2.

2) Colony forming units per ml of culture.

Table 17. Effect of repeated freezing-heating<sup>1)</sup> treatments on PCR<sup>2)</sup> assays of foods contaminated with Y. enterocolitica .

Food	Times					
	Cont.	0	1	2	3	6
		CFU <sup>3)</sup> (PCR) <sup>4)</sup>	CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)	CFU(PCR)
Spinach soak	—	6.4 (+)	6.3 (+)	6.1 (+)	6.0 (+)	6.0 (+)
Raw beef	—	6.2 (+)	6.1 (+)	6.1 (+)	6.0 (+)	5.2 (+)
Raw pork	—	6.1 (+)	5.8 (+)	5.8 (+)	5.6 (+)	4.9 (+)
Raw chicken	—	6.1 (+)	6.1 (+)	6.1 (+)	6.1 (+)	4.9 (+)

1) freezing: 20min at -80 °C and heating :2min at 60 °C. 2) PCR with primer ail 1-2.

3) Colony forming units per ml of culture.

4) A: Direct detection B: Detection after rinsing of sediment



Fig.1 Electrophoresis patterns of PCR amplification products of Y. enterocolitica with each primer.  
M:marker(Hind III-digested  $\phi$ 174) 1:virF 1-2  
2:ail 1-2 3:Yad A1-2 4:in 1-2 5:rfb B1-2  
6:rfb C1-2 7:YC 1-2 8:YE 1-2 9:YP 3-4  
10:Yad A2-Yad A3

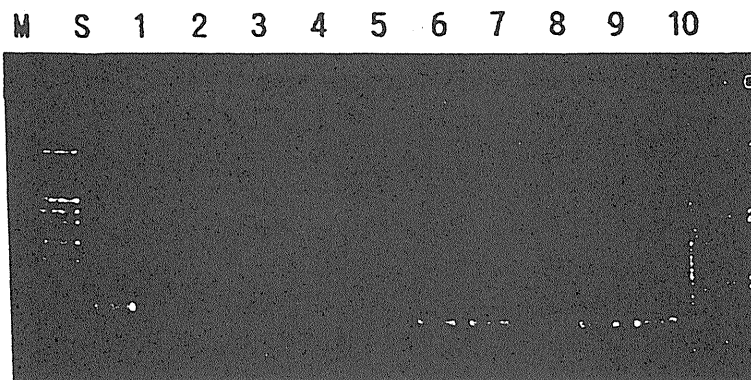


Fig.2 Detection of pathogenic Y. enterocolitica with  
by the PCR assay with the ail 1-2 primer. M:Size  
marker(Hind III-digested  $\phi$ 174) S :Y. enterocolitica  
1 ~5:Non pathogenic Y. enterocolitica 6 ~10  
pathogenic Y. enterocolitica 1:04 2:05 3:06  
4:013 5:UT 6:03 7:05 8:08 9:09 10:013

新しいノーウォーク様ウイルス検出 EIA の開発

分担研究者	武田直和	国立感染症研究所	ウイルス第二部室長
協力研究者	名取克郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部主任研究員
	田中智之	堺市衛生研究所	所長
	鎌田公仁夫	デンカ生研株式会社	研究員

研究要旨

バキュロウイルス発現系を用いて血清型が異なる 12 種類のノーウォーク様ウイルスで中空粒子を作出した。これらを免疫して高力価血清（ポリクローン抗体）、および単クローン抗体を作製した。単クローン抗体を抗原捕獲用抗体に、ポリクローン抗体を検出用抗体にして抗原検出 EIA を確立した。感度と特異性に極めて高い抗原検出法が確立できた。RT-PCR 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有用であると考えられた。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス[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 RT-PCR でされている。RT-PCR 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、これまで組換えバキュロウイルスにて発現したリコンビナントウイルス様粒子 (VLP) に対するポリクローン抗体を用いた酵素抗体法

(EIA)の開発に取り組んできた。

今回、新たに VLP に対する単クローン抗体を併用することによって、RT-PCR と良い相関性を持った抗原検出 EIA を開発することが出来た。

B. 研究方法

1. 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。

2. 単クローン抗体の作製

Genogroup II の r47 VLP を BALB/c マウスに免疫・細胞融合後、定法どおり単クローン抗体を得た。免疫方法は従来の腹腔内、皮下投与と異なり経口的投与単独、

或いは両者の併用投与後に脾細胞と融合した。融合細胞のスクリーニングは中空粒子固相プレートを用いた ELISA を用いた。使用したマウスへの免疫、脾細胞の摘出は倫理規定に従い、エーテル麻酔下でなされ、実験動物への倫理配慮、尊厳は保たれている。3. 酵素抗体法(EIA)

96 穴 ELISA 用プレートに、これまでに作製された単クローン抗体を固相した。Genogroup I には#3912、genogroup II には #14 の抗体を使用した。#3912 はノーウオーク様ウイルスのプロトタイプであるノーウオークウイルス/68 VLP を、#14 は r47 VLP を免疫原として得られた単クローン抗体である。このプレートを用いて臨床材料（糞便けん濁液）と 37°C, 2 時間反応、洗浄後、酵素標識ポリクローン抗体を、同様に反応させた。このポリクローン抗体には 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。

#### 4. 検出感度

感度検査を、各種 VLP を抗原に用いて検討した。それらは rNV、r258、r124、rCV、rMX、r47、r76、r104、r7 の 9 種類である。陰性検体の 3 SD をカットオフ値とした。

#### 5. 臨床材料

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 RT-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

VLP 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、rMX、rSMV は 40ng 以上必要であった。

EMによるウイルス粒子検出結果と EIA との検出一致率は 63%(134/214)であった。一方、RT-PCR との一致率は 69%(367/536) にみられた。また、この 536 検体の中で、RT-PCR 陰性の検体も測定した 7 施設 369 検体についてみると 78% (287/369) の一致率を示した。

RT-PCR は陽性、EIA が陰性であったものが 151 検体 (28%)、その逆に RT-PCR が陰性、EIA で陽性になったものが 18 検体 (3%) あった。21 例 (4%) は Genogroup I, Genogroup II の両方のウイルス抗原検出プレートで陽性であった。

#### D. 考察

現行のノーウオーク様ウイルスの診断方法は RT-PCR 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、RT-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ノーウォーク様ウイルスには表面抗原の共通性が示唆されており、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 EIA による診断方法の確立を試みてきた。EIA 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。

これまでは単クローン抗体を固相抗体および検出抗体としたサンドイッチ EIA として開発してきたが、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。単クローン抗体自身は、例えば #3901 は構造蛋白の 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明らかになり、それを用いた抗体は Genogroup I を高感度で検出できることが明らかであった。

一方、ポリクローン抗体をそれぞれ固相抗体、検出抗体としたサンドイッチ EIA では、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 特異的の高い単クローン抗体を使用し、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。この新しい単クローン・ポリクローン抗体サンドイッチ EIA によって、RT-PCR との一致率を 70% にまで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 RT-PCR 陽性、EIA

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し、同一施設で同一検体の測定評価が必要であるが、今回の EIA では検出できない血清型がまだ数多く存在する。これらの VLP を作製し、抗血清を準備する必要がある。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単クローン抗体の作製とそれを用いた EIA 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。

#### E. 結論

単クローン抗体を抗原捕獲用抗体に、ポリクローン抗体を検出用抗体にして抗原検出 EIA を確立した。感度と特異性に極めて高い抗原検出法が確立できた。

#### 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. 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
2. 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
3. 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
  4. 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
  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, 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
  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 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 Bangladeshi-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, 栄 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, 栄 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, 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, 栄 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, 栄 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

### 小麦中残留マラチオンの酵素分解物の検索

#### 研究要旨

小麦に含まれるコリンエステラーゼ阻害活性を有する<sup>1)</sup>有機リン系農薬、マラチオンを食品衛生法に基づく告示法に従って測定した場合、その測定値が実際の存在量に比べて著しく低く見積もられることを昨年度報告した<sup>2)</sup>。また、この報告の中で、原因として小麦中の酵素グルタチオンレダクターゼ (GR) の可能性を示した。しかし、その分解物についてはまだ判明しておらず、公衆衛生上の観点から、この分解物の同定は重要であると考え本年度調査を行った。調査方法として、「①ラベル化マラチオンによる分解物の分画 GR と<sup>14</sup>Cマラチオンの反応液を経時的に取り、HPLC を用いて 2 条件で分取し、各画分の放射能を測定した。②非ラベル化マラチオンによる分解物の同定と経時変化 GR とマラチオンの反応液を経時的に取り、LC/MS で分解物の同定と経時変化を測定した。」の 2 つのステップで調査を行った。

RI 実験で放射能の増加した画分は主に 2 つであった。そのひとつは、LC/MS の結果から  $\beta$  位のカルボキシエチルエステルが加水分解したマラチオン  $\beta$ -モノカルボン酸とマラチオンのメトキシル基のメチル基が外れたデスメチルマラチオンであることが判明した。

#### A. 研究目的

一昨年度、穀類に使用される多数の農薬を、超臨界流体抽出法 (SFE) で抽出し、GPC 及び Sep-Pak<sup>R</sup> フロリジルでクリーンアップした後、HPLC (フォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器付き) 又は GC (FPD, FTD, ECD, MS) で測定する一斉分析法を作成した際に、小麦中のマラチオンとフェントエートが、現在の告示試験法に基づいた測定法では著しく低い測定結果となることが判明した。昨年度は、その原因を検索し、抽出前に試料を膨潤させるために加える水によって、小麦中の酵素がこれら農薬を分解するためであることを明らかにした。しかし、その際生成する分解物についての知見は得られておらず、公衆衛生上の問題ともなりうることから、本年度は分解物の特定を行った。実験では、RI 標識マラチオンを小麦由来の GR で分解したものを高速液体クロマトグラフで分離、分取し、各フラクションを液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、放射能の高い画分を決定した。そして、非標識マラチオンを同様に小麦由来の GR で分解したものを、高速液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS) で測定し、保持時間と特徴的な m/z から、先の放射能の高い画分に相当する物質の特定を行った。

#### B. 研究方法

##### ① 試薬

液体シンチレーター用カクテル剤、ウルチマゴールド<sup>TM</sup> はパッカー社製、グルタチオンレダクターゼ (GR, EC 1.6.4.2、小麦杯由来、0.05 units/mg) は Sigma 社製、<sup>14</sup>Cマラチオン溶液 (3.426 mg/ml トルエン溶液、構造は図 1 を参照) はアマシャム製のものを用いた。限外ろ過は Amicon 社の Centriplus YM-10 を用いて行った。マラチオン標準品は、和光純薬より入手した。

参照物質 (Desmethyl malathion、Desmethyl malathion acid sodium salt、Potassium O,O'-dimethyl phosphorodithioate、Potassium O,O'-dimethyl phosphoro- -thioate、malathion acid potassium salt) の合成原料として potassium ethylxantate と O,O-dimethyl hydrogen phosphite