

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、 及びベッドサイド抗原検出システムの開発

所属 国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究者 武田 直和

分担研究者

福士 秀悦 株式会社 BML 研究開発1部

小嶋 慈之 株式会社 BML 研究開発1部

片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス製剤部（現在ウイルス第二部）

要旨 ノーウォークウイルス (NLV) のゲノム全長の塩基配列を既報の8株の他に、新たに10株決定し、データベース化した。NLV 全長塩基配列をアライメントし SimilarityPlot で解析した結果、ORF1 と ORF2 のジャンクション領域から下流約 200 – 300 塩基がゲノムの中で最も保存された領域であることが明らかになった。この領域に設計した核酸検出用プライマー&プローブを用い、TaqMan PCR による NLV 核酸の高感度定量検出系を検討したところ十分に実用可能な成績を示した。さらに、この領域に設計した構造蛋白質領域増幅用のプライマーセットで、増幅した PCR 産物の塩基配列を利用した分子系統解析によって NLV の genotyping が可能であることを見いだした。この genotyping によって現在までにデータベース上に報告されていた NLV は 19 種類の genotype に分類された。GI の 4 種類、GII の 7 種類でウイルス様中空粒子 (VLP) を作製し、抗体 ELISA を確立した。7 種類の VLPs について高力価血清を作製し抗原 ELISA を確立した。このシステムで調べた VLP の抗原性の違いは、genotype の違いを反映していた。今後次々と出現すると予想される新たな血清型を示すに対応するには、すべての血清型に共通して存在するアミノ酸配列の探索が必要不可欠である。NLV の全アミノ酸配列の解析を行い、構造蛋白質の一部が最も保存されていることが明らかにした。この部分の合成オリゴペプチドを免疫して得られた抗血清は手持ちのすべての血清型の VLP に反応し、すべての血清型を検出可能な抗 NLV モノクローナル抗体作成への展望を開いた。

1.研究目的

NLV 感染症の全貌を明らかにするためには、従来のように集団食中毒患者の排泄物、食品だ

けでなく、健常者排泄物や、下水、海水などの環境要素をも対象とした NLV の調査が必要である。しかし、現在も増え続けている NLV の血清型、遺伝子型が NLV 検出システムの構築を困難な物にしている。本研究は、増え続ける新たな NLV 株の全ゲノム塩基配列を決定し、データベースを構築すると共に全ての NLV 株を網羅し、特殊な機器を必要としないペットサイド抗原検出システム、及び下水、海水など環境要素に含まれる微量な NLV を濃縮し、超高感度かつ定量的に NLV 核酸を測定するシステムを構築することを目指す。本研究期間を通じて行われる NLV ゲノム全長塩基配列のデータベース構築は、NLV の遺伝子構造及び特徴を明らかにし、分子レベルでのウイルス複製機構の解明、病原性発現機構の解析を推進する原動力となる。

本年度は、データベース上に報告のない新たな NLV 株の全塩基配列を複数本決定し、それらを用いた解析により高感度核酸定量検出法に使用するプライマー及びプローブを設計し検討することを目的とした。また、構造蛋白質を昆虫細胞に発現させて得られる NLV 中空粒子 (VLP) を用いた ELISA システムを構築し、NLV の血清型と genotype との関係調べることを目的とした。さらに、多種類の血清型に共通する NLV のアミノ酸配列を探し、それを利用して作成した抗体を評価することを目的とした。

2.研究方法

(1) 全塩基配列の決定とデータベースの構築

患者糞便より核酸を抽出し、RNA 溶液を得た。各検体より抽出した RNA は、oligo dT をプライマーに用いた逆転写反応後に、Long-PCR を施行し、そこで得た増幅産物の塩基配列を primer walking 法によりダイレクトに決定した。ゲノムの 5' 末端および 3' 末端配列の決定は、RACE 法により行った。決定した塩基配列は DDBJ に登録し、データベース化した。

(2) 検体採取。高度保存領域の検索、プライマー及びプローブの作製

1997 年から 2000 年にかけて、埼玉県内で発生した非細菌性胃腸炎患者糞便検体のうち EM 法により NLV 粒子が確認された 79 検体および、カキを食して胃腸炎になった患者 M.S. の糞便 1 検体、2001 年に和歌山県内で発生した集団胃腸炎患者の糞便検体を採取した。これらの検体の一部分を全塩基配列解析に使用した。

核酸データベース上に存在した既報の全長配列 Norwalk virus (NLV68)、SouthernptNLVirus (SO)、BS5、Lordsdale virus (LD)、Camberwell virus (CW) Hawaii virus (Hawaii)、MD145-12 strain (MD145)に加え、分担研究者の決定した全長塩基配列 Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U201, U25, Chiva virus (Chiba) SzUG1, WUG1-11 を対象として用いた。Clustal W を用いて核酸のアライメントを施行し、木村らの 2 パラメーター法によって distance を算出し分子系統解析を行い、対象とした 18 本の全長塩基配列を genogroup I (GI) と genogroup (GII) の 2 グループに分別した (GI: 6 株、GII: 12 株)。これらを group ごとに clustal W で再度アライメントし、Plot Similarity analysis を用いて GI, GII 別に株間で塩基配列が高度に保存されている領域を検索した。

遺伝子が最も高度に保存されていた領域 (ORF1-ORF2 junction region) を内包する塩基配

列を核酸データベース上から約 60 株収集し、新たに GENETYX-Mac version 11 でアライメントし、NLV GI 増幅用プライマー及び検出用プローブ、NLV GII 増幅用増幅用プライマー及び検出用プローブを設計した。検出用 probe には TaqMan PCR による蛍光検出に対応する蛍光色素 FAM を 5'末端に TAMRA を 3'末端にそれぞれラベルした。これらと、ORF1-ORF2 junction region 領域を pT7Blue plasmid vector にサブクローニングしたプラスミドクローンの 10 倍希釈系列を作成し、TaqMan PCR を検討した。

(3) 組換え中空粒子の作出と高力価血清の作製

ウイルス性胃腸炎患者の糞便から、RNA を抽出し、ORF2 に設計した SKG1F&SKG1R 又は SKG2F&SKG2R 設計したプライマーを用いて構造蛋白（キャプシド領域）のアミノ末端約 300 塩基を増幅した。得られた増幅産物はダイターミネータ法によるサイクルシーケンシングで塩基配列を決定し、分子系統解析によって GI と GII さらに genotype に分類した。新たな genotype に分類された株、もしくは今までに VLP を作出したことの無い株について、抽出した RNA を鋳型に RT-PCR で構造蛋白の全領域を増幅し、組換えバキュロウイルス発現系による VLP 作出を試みた。組換えバキュロウイルスの作製にはバキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 あるいは pVL1393 を使い、増幅した構造蛋白の全領域をクローニングして組み込んだ。リポフェクショ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。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°C 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 VLP を CsCl ならびに蔗糖密度勾配遠心で精製した。

抗体 ELISA は、組換えバキュロウイルスで発現された VLP 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 抗体を用いて施行した。

抗原 ELISA は、組換えバキュロウイルスで発現された VLP 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 として構築し、施行した。

(4) 免疫血清の作製。単クローン抗体の作製

本研究によって決定された NLV の塩基配列を用いてすべての genotype に共通して保存されているアミノ酸配列を検索した。高度保存領域のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドをペプチド合成機で合成した。合成ペプチドを精製し、KLH でコンジュゲート後、ウサギ (NZW) およびマウス (BALB/c) に免疫し、抗血清を得た。様々な血清型のキャプシド蛋白質領域を持つ組み換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞 Tn5 に感染させ、4 日後に感染細胞を回収し、塩化セシウムを用いた超遠心により VLP を精製した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により VLP を分離後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。ウサギあるいはマウスの抗血清と HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体あるいは HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて VLP を検出した。

3. 研究成果

全塩基配列の決定、データベースの構築

既報の NLV と異なる新たな遺伝子型である 10 株 (GI: SzUG1, WUG1, GII: Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U205, U25) の全塩基配列を決定した。既報の株 (GI: Norwalk virus, SouthamptoNLVirus, BS5 virus, Chiba virus および GII: Lordsdale virus, Camberwell virus, Hawaii virus, MD145-12 strain) に今回われわれが新たに決定した株を含め、NLV 全塩基配列のデータベースを構築した。これらを group ごとに (GI: 6 株、GII: 12 株) アライメントした結果、塩基配列が保存されている部分と多様性に富んでいる領域がいくつか認められた。これまで NLV の塩基配列は多様性に富むと考えられていたが、全塩基配列の平均ホモロジーは 70%以上であった。最も高度に保存された領域は ORF1 と ORF2 のジャンクション領域から ORF2 の N 末端 300 塩基ほどの領域であった。全塩基配列を複数本決定することにより、初めて NLV の全体像をとらえることに成功した。

検体採取、高度保存領域の検索、プライマー及びプローブの作製

新たに設計したプライマー及びプローブの TaqMan PCR における感度と特異性を評価するために、NLV の GI、GII それぞれのプラスミドコントロールの希釈系列に対する検出感度を調べたところ GI、GII それぞれ $10^7 \sim 10^1$ コピーの間で Ct と相関性があり (検出限界はどちらも 10^1 コピー/1 反応)、この範囲内で定量測定が可能であることが示された。なお、データは示さないが、GI、GII 間での交差反応は認められなかった。

本研究で用いたプライマー及び蛍光プローブは、TaqMan PCR において非特異な増幅産物には反応せず、標的 PCR 増幅産物にしか反応しなかった。TaqMan PCR は、PCR 増幅産物を反応チューブから取り出すことなく、蛍光強度の変化に基づいた NLV 特異的 PCR 増幅産物のみをリアルタイムに定量する事が可能であった。

組換え中空粒子の作出と高力価血清の作製

本研究の成果から genotyping に最適な領域を明らかにし、構造蛋白質領域の塩基配列を用いた genotyping によって合計 19 種類の血清型の存在を予想した。これらの内、すでに VLP 作成を終えていた GI の 6 種類と GII の 8 種類、合計 14 種類を除き、GI の r 645 (Desert Shield-like virus)、GII の r809 (Mexico/Toronto-like virus)、r754 (Snow Mountain-like virus) および r10-35 の合計 4 種類の genotype の VLP を発現させた。これで合計 11 種類の VLP の産生に成功した。

抗体 ELISA については、発現した 11 種類の VLP 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 法あるいはウェスタンブロット法による解析から血清学的に異なる NLV が多数存在することが確認されているが、11 種類の VLP と抗血清を用い、抗原の交差性を ELISA 法で調べた。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 VLP は全て互いに異なる genotype に属するだけでなく、抗原的にも異なると考えられた。すなわち、構造蛋白質領域の塩基配列を用いた genotyping は、NLV の抗原性を予測し得ることが明らかになった。

抗原 ELISA については、7 種類の NLV 抗原を型別できる抗原 ELISA 法を確立した。同種の VLP 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 VLP 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 NLV 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。

免疫血清の作製。単クローン抗体の作製

我々が新たに全塩基配列を決定した NLV 9 株と、既報の配列を対象に、ゲノム全長にわたってアミノ酸配列を詳細に解析した結果、最も高度に保存された領域は GI, GII とともに ORF2 の NS domain 近傍に存在していることが明らかになった。この領域近傍のアミノ酸配列を 71 株決定し、高度に保存されているアミノ酸配列を調べた。GI, GII それぞれの最も保存されている配列をもとに、GI 特異的アミノ酸配列を持つオリゴペプチドとして (1) QGEFTISPNT および、(2) SRPYQLKPVGTA、GI, GII の両方に対して共通するアミノ酸を持つオリゴペプチドとして (3) GEPTVSPRN および (4) VPTVSCRVLTR を合成した。これらのオリゴペプチドをウサギ (NZW) およびマウス (BALB/c) に免疫して得られた抗血清を用い、パキューロウイルスを用いて作製した様々な血清型の VLP に対する反応性をウエスタンブロットで検討した。その結果、GI 特異的オリゴペプチドに対する抗血清は GI の VLP に特異的に反応し、GI, GII 両方に共通するオリゴペプチドに対する抗血清は GI, GII 両方に反応した。NLV 非感染の下痢症患者の糞便 (ロタウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスに感染、ワクチン予防接種による下痢を含む) の懸濁液には反応しなかった。これらの結果から、今回作製した NLV オリゴペプチドに対する抗血清は NLV に対し特異的に反応することが明らかとなった。

4. 考察

NLV 遺伝子を効率良く増幅し検出する方法を確立するためには、さまざまな遺伝子型の NLV ゲノム全長の塩基配列データの集積が必須である。本研究では、新たに NLV 9 株の全塩基配列を決定し、これまでに報告されている株を含めて NLV ゲノム全長データベースの構築を行った。このデータベースを利用した塩基配列解析により、NLV ゲノムで最も塩基配列が保存されている領域や、逆に多様性に富んだ領域が明らかになった。我々が明らかにした ORF1 と ORF2 のジャンクション近傍の高度保存領域は、ORF1 と ORF2 が重なっている領域を含んでいる。さらに、NLV の ORF2 はサブゲノミック mRNA により翻訳されると考えられ、ORF2 の直前の塩基配列は ORF2 の転写などに重要な役割をもった塩基配列を含んでいる可能性がある。本領域は核酸の変異に対して前述のような二重の制約がかかり高度に保存された領域になっていると思われる。

この領域内に設計したプライマーおよび蛍光プローブは、TaqMan PCR において高感度かつ

高い特異性を示した。また、TaqMan PCR は、PCR 増幅産物を反応チューブから取り出すことなく、蛍光強度の変化に基づいたリアルタイム定量が可能である。TaqMan PCR は従来の RT-PCR 法のように電気泳動あるいはサザンハイブリダイゼーションなどによる増幅産物の定性が不要なことから、RT-PCR 法では問題となる増幅産物による実験設備や試薬類の汚染（コンタミネーション）の可能性が少ないと考えられた。

NLV は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域や Capsid 領域の部分的な塩基配列を用いた解析により GI と GII それぞれの genogroup に多種類の subgroup や血清型が存在することが報告されている。本来、ウイルスの genotyping, subtyping を行うためには、genotype, subtype が互いに異なると予想される完全長のゲノムシーケンスを複数用いて、全長にわたる分子遺伝学的解析を行い、ゲノムリコンビネーションを考慮に入れたうえで typing に適した領域を選択する必要がある。本研究により構築された NLV ゲノム全長の塩基配列データベースはさまざまな遺伝子型、血清型を含んでおり、分子遺伝学的解析にもとづいて構築された構造蛋白質領域の genotyping 法は、今後の NLV 感染症の分子疫学に大きく貢献すると思われる。

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。この点については、全塩基配列の解析結果より得られた ORF1, 2 ジャンクション領域に設計したプライマープローブセットを用いた TaqMan PCR を実用化すれば、あくまでも EM 法が標準法ではあるものの、解決されると思われる。今回開発に成功した抗原 ELISA は迅速性、容易さ、費用の点から多量の検体を短時間で検査する目的には最適である。問題点は検出感度は 10^6 粒子程度と PCR に比べてであることと、VLP を供給し得ないタイプを検出できないことである。我々が構築した genotyping 法に基づいたデータベースの作製と提供を進め、あらたな genotype に対する VLP を作成し抗原抗体 ELISA システムをより充実させてゆくとともに、TaqMan PCR と併用しながら後述する共通抗原部位を用いて作成したモノクローナル抗体による簡便な検出系の開発を急がなければならない。

本研究では、NLV 株の全塩基配列解析をもとにゲノム上、保存されている領域を解析し、ORF2 の NS domain の一部が高度に保存されていることを発見した。この部分に相当する合成オリゴペプチドを免疫することによって得られた抗血清は GI および GI, GII の両方に特異的に反応した。今後、合成オリゴペプチドに対するモノクローナル抗体の作製を行い、検出用抗体の安定した供給を目指すとともに、GI, GII 特異的あるいは GI, GII 両方を同時に検出できる系の構築を進めていく予定である。

5. まとめ

新たに NLV10 株の全塩基配列を決定し、既知の配列も含めて全塩基配列のデータベースの構築を行った。NLV の全塩基配列を解析した結果、NLV 遺伝子の高度保存領域を同定し、RT-PCR による高感度検出系のためのプライマー、プローブの設計を行った。これらを用いた TaqMan PCR は、NLV cDNA プラスミドを用いた検討において優れた検出感度、特異性、定量性を示した。今後、実用化に向けて実検体を用いた検討を行う必要がある。構造蛋白質をクローニングし、

昆虫細胞に発現させて得た VLP により、抗原検出 ELISA、抗体検出 ELISA を構築した。Genotyping 法との比較から、genotype は抗原性の違いを良く反映していることが明らかになった。VLP ELISA の検出感度を向上させるためには新たな genotype に対応した VLP 作出を続ける必要がある。NLV のすべての genotype を抗原抗体反応で検出するためには、genotype に共通して存在するアミノ酸配列の探索が必要不可欠である。本研究では、NLV の全アミノ酸配列の解析を行い、キャプシド蛋白質の一部が最も保存されていることを明らかにした。この部分の合成オリゴペプチドを免疫して得られた抗血清は様々な genotype の VLP に反応したことから、NLV に対する共通抗体として、抗原抗体反応を用いた NLV 検出系に応用可能であると考えられた。さらにモノクローナル抗体の作製を行い、簡便な NLV 検出系の構築を進めていく必要がある。

6. 研究発表

学会発表

- 1) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、星野文則、片山和彦、武田直和 Norwalk virus ゲノムリコンビネーションの解析 第42回日本ウイルス学会、2001。

論文発表

- 1) Shigeyuki Kojima, Tsutomu Kageyama, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama., Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., Journal of Virological Methods vol 100 p107-114, 2002.

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社