

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 直 和

平成 15 (2003) 年 4 月

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	
武田直和	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. モノクローナル抗体を用いたノルウォーク様ウイルス検出 ELISA 法の確立に関する研究 －抗原検出 ELISA 法のこれまでの問題点と今後の方針－	
田中智之	----- 17
2. 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	
谷口孝喜	----- 24
3. 食中毒原因食品からのノロウイルス検出の試み	
榮賢司	----- 26
4. 散発及び集団発生胃腸炎のウイルス疫学及びリアルタイム PCR を用いたノロウイルス 検出法に関する研究	
大瀬戸光明	----- 32
5. Norovirus の感染経路に関する考察	
篠崎邦子	----- 39
6. 全国各地から検出された NV の遺伝子型と NV 感染者から排泄されたウイルス量について	
西尾治	----- 45
7. ノーウォーク様ウイルス中空粒子および抗血清の作製	
名取克郎	----- 54
8. Norwalk virus の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析	
片山和彦	----- 59
9. チバウイルス 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析と X 線結晶構造解析による 3次元立体構造の解明	
染谷雄一	----- 72
10. ノロウイルスの組織特異性を決定する因子の検討	
白土東子	----- 76
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 80
IV. 研究成果の刊行物・印刷	----- 84

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 14 年度 総括研究報告書

武田 直和

平成 15 (2002) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（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 (1)単クローン抗体を用いたノロウイルス(NV)抗原検出 ELISA を評価した。NV 中空粒子に対する特異的モノクローナル抗体を固相抗体とし、免疫ウサギ標識抗体を検出抗体とした NV 抗原検出 ELISA は、RT-PCR 法との比較検討から非特異反応は 5% と推定された。NV 抗原検出 ELISA 法のための糞便検体の前処理には、正常マウス血清、正常ウサギ血清を加えた pH8.0 のバッファー使用が、非特異反応の減少に意義ある事と考えられた。(2)ロタウイルスに対するヒト型組換え抗体を作製した。ヒト由来のフェージ抗体ライブラリーから、ヒトロタウイルスを中和するヒト型単クローン抗体を 3 種分離した。これらは、多様な血清型を示すほとんどのヒトロタウイルスを中和することから、その有用性が示された。(3)磁気ビーズを用い、食品から NV を検出する方法を検討した。NV に起因した食中毒事例において、食中毒の原因調査を目的に収去された推定原因食品からの NV の検出を試みた。磁気ビーズを用いて食品から NV を回収する方法は簡便であるが、抗原的に多様性のある NV を回収するためには、複数の抗体を準備する必要があると考えられた。(4)リアルタイム PCR を用いて NV の検出と疫学解析を行った。ウイルス性食中毒や胃腸炎集団発生の背景には、地域社会における種々なウイルスの流行があり、地域における散発性胃腸炎の流行実態の把握が必要であった。NV の診断に、リアルタイム PCR を用い、その有用性が認められた。(5)遺伝子解析に基づいて NV 感染経路を解析した。カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例についてウイルス検査を行った結果、全事例から NV を検出し NV による集団発生であったことが判明した。調理従事者便、食品について RT-PCR を行った結果、調理従事者から患者由来株の塩基配列と一致した NV を検出した。(6)食中毒事例の患者糞便、カキおよび海水から検出された NV について遺伝子型とウイルス量を調べた。急性期の患者のふん便 1g の NV 量は 1 億個以上に存在するものが多くに認められ、特に乳幼児では排泄されるウイルス量が多かった。吐物においても 1g 中に NV 量は 1,000 個～100 万個以下の範囲で汚染されており、糞便と同様に吐物も感染源として対応することが感染防止に重要である。(7)NV 中空粒子の作製と抗原 ELISA および抗体 ELISA への応用を検討した。遺伝子系統樹解析から 3 株を選別し、構造蛋白を発現して VLPs を作製した。3 株の抗原性は全て新しい血清型であった。(8)ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、作成したプラスミドクローンを用いて、哺乳類細胞内における NV ゲノムの転写翻訳機構を調べた。NV の宿主特異性は、宿主細胞内におけるゲノムの転写翻訳機構が因子の一つである可能性が示された。(9)NV 感染による急性胃腸炎に対して有効な治療薬の創出を目指し、NV のひとつ、チバウイルスが有する 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析を行った。至適温度は 26 ～ 37 °C であった。また、NaCl の存在、非存在はほとんど活性に影響しなかった。SH 試薬のひとつ、PCMB は活性を完全に阻害した。また、X 線結晶構造解析を行った。現時点で、4.5 Å 程度の解像度の結晶学的データが得られ、電子密度図の作成を行うことができた。(10)レセプター分子の同

定を目的とし、サブトラクションによる空腸特異的な cDNA クローンの単離を試み、25 種類の cDNA クローンを得た。また、NV の吸着する細胞株と吸着しない細胞株上の表面分子発現パターンを比較したところ、両細胞株間で分子の発現パターンが大きく異なることが明らかになった。(11) ウイルス性下痢症診断マニュアルの改訂版を作成した。NV の RT-PCR を改定し、NV 遺伝子の定量法とサポウイルスの RT-PCR を追加した。

分担研究者

田中智之	堺市衛生研究所所長
谷口孝喜	藤田保健衛生大学教授
栄賢司	愛知県衛生研究所部長
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究所室長
篠崎邦子	千葉県衛生研究所上級研究員
西尾治	国立公衆衛生院室長
片山和彦	国立感染症研究所主任研究官
名取克郎	国立感染症研究所主任研究官
染谷雄一	国立感染症研究所研究員
白土東子	国立感染症研究所研究員

協力研究者

北元憲利	姫路工業大学教授
小林慎一	愛知県衛生研究所研究員
近藤玲子	愛媛県立衛生環境研究所研究員
山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所研究員
吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所研究員
秋山美穂	国立感染症研究所
新川奈緒美	鹿児島県環境保健センター
勢戸祥介	大阪市立環境科学研究所 主任研究員
三好龍也	堺市衛生研究所研究員
岡智一郎	国立感染症研究所研究員

A. 研究目的

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% の事例がノロウイルス (NV) (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ロウイルスに統一された) 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、NV 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。「磁気ビーズ免疫吸着 RT-PCR 法」の開発に成功したことによって、食品由来のウイルス性感染症の大部分を占めるノロウイルスを食品から直接検出することがはじめて可能になった。原因食品からウイルスを効率よく濃縮し、RT-PCR を組合わせ高い検出効率を得られる系を開発する。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供給する。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) 単クローン抗体を用いた NV 抗原検出 ELISA

NV 抗原検出 ELISA 法は、固層抗体として Genogroup I (GI) を特異的に認識する NV#3912 抗体、また Genogroup II (GII) を特異的且つ広範囲に認識する NS#14 抗体を用いた。検出抗体には、ウサギ高力価家兔免疫血清、GI には r124, r258, rCV, r645 の 4 血清、GII には r104, r809, r18-3, r336, r754, r1876, r485, r47, r7K, r10-25 の 10 血清を用いた。

NV 抗原検出 ELISA 法の問題点を次の三つの方法にて検討した。臨床糞便検体の酸処理による反応性の検討。糞便検体は、採取された時期にもよるが、sIgA を主とする、腸管内に存在する NV 特異抗体がウイルス表面に反応していることが考えられる。そこで、材料を酸処理し、抗体の解離を試みた。具体的には、検体を pH3.0 で一時間反応後、pH7.0 に還元し ELISA 法にて測定した。

分解されたカプソマーの反応性を検討した。具体的には、pH7.0, pH8.0, pH9.0, pH10.0 の検体処理バッファーを作製し、これらを用いて糞便を通常の処理方法で処理し ELISA 法にて測定した。

ELISA 法にて測定した検体について、単クローン抗体との反応性をウエスタンブロットにて解析した。糞便検体を処理後、定法どおり電気泳動し、固相に使用せる GI、GII 特異モノクローナル抗体と反応させた。フィルム上に発光させ、現像後解析した。

現行の ELISA 法は、検出抗体に免疫家兔血清を用いているが、家兔免疫血清作製には、経済性に欠けている。そこで、これまで作られた単クローン抗体から、NV#23 抗体を検出抗体とし

ての反応性を検討した。細胞培養から無尽蔵に得られる単クローン抗体を用いることは、特異性のみならず経済性においても優れていると考える。

(2) ロタウイルスのヒト型組換え抗体の作製

HRV KU 株の精製ビリオンを抗原として、ヒトの扁桃腺、骨髄、臍帯血および末梢血から作製したファージ抗体ライブラリーからファージディスプレイ法により抗 HRV 抗体 (Fab) を単離した。中和試験は、蛍光フォーカス減少法により、抗体のウイルス蛋白特異性は、バキュロウイルス発現系で調製した VP4, VP2/6 および VP2/6/7 人工空粒子を用いた ELISA により行った。ヒト型 IgG1 への変換は、Fab の V_H および $C_L V_L$ 領域を IgG1 カセットにクローニングして行い、ヒト型 IgG1 分子は、このカセットを含む pCMV-Script 発現ベクターを CHO-K1 細胞にトランスフェクトして得た。

(3) 磁気ビーズを用いた食品からの NV 検出

Dynabeads M-450 Sheep Anti-Mouse IgG (ダイナル社) 約 1mg に対して、マウス腹水 (NS#14 抗 NV モノクローナル抗体) 100 μ l を室温で 1 時間反応させた。0.1% BSA を含む PBS (PBS/BSA) で磁気ビーズを 1mg/ml に調製した。食品 (10~15g) の表面を精製水 8 ml で食品に付着するウイルスを洗い流した後、8,000rpm で 20 分間冷却遠心後、上清を回収した。ダイフロン 1ml を遠心上清に添加・混和した後、8,000rpm で 10 分冷却遠心した。上清を回収し、50 μ g の NS#14 抗体結合磁気ビーズを 37°C で 1 時間反応させた後、PBS/BSA で洗浄した。回収した磁気ビーズを精製水 100 μ l に懸濁させた後、Trizol 試薬 300 μ l で RNA を抽出した。NV の構造タンパク領域を増幅するプライマーで逆転写反応と PCR 反応を行った。PCR 反応条件は 94°C 15 秒、55°C 30 秒、68°C 1 分の 35 サイクルとした。PCR 産物をクローニングを行なった後、オートシーケンサーで塩基配列を決定した。

(4) リアルタイム PCR を用いた NV の検出と疫学解析

糞便材料は感染症発生動向調査病原体検査定点で主に小児の感染性胃腸炎患者から採取

した糞便及び胃腸炎集団発生の患者糞便を用いた。ウイルス検索は、電子顕微鏡法 (EM) 及び RT-PCR で行った。EM は常法により疎精製した糞便材料を、2%PTA 染色後 4 万倍で観察し、下痢症ウイルスの検索を行った。NV 遺伝子の検出は、COGF/R 系プライマーと RING TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行った。SV 遺伝子の検出は、カプシド領域を増幅する SV 系プライマーを用いた nested PCR を行った。PCR 産物のダイレクトシーケンス法で遺伝子塩基配列を決定し、NJ 法により系統樹解析を行った。

(5) 遺伝子解析に基づく NV 感染経路の解析

カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例について、患者便、患者吐物、調理従事者便、食品(保存食)等を採取し検査材料とした。ウイルス検査は RT-PCR 法で行った。電顕法の検体処理でウイルスを濃縮した後、核酸を抽出した。逆転写反応は Oligo(dT)で行い、PCR のプライマーは構造蛋白領域に設定した GI、GII に特異的なものと、平成 13 年 11 月厚生労働省食品保健課通知に示された GI (COG1F/G1SKR、G1SKF/G1SKR)、GII (COG2F/G2SKR、G2SKF/G2SKR)を用いた。PCR 陽性検体は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統解析を行った。

(6) NV の遺伝子解析と定量法

食中毒様下痢症の患者糞便、食品(カキ)および海水を用いた。また NV による集団発生事例の患者糞便および吐物を用いた。糞便および吐物は磷酸緩衝液(PBS)で 10%乳剤とした。粗遠心後、遠心上清からウイルス RNA を抽出し、定法どおり cDNA 合成を行った。NV の定量は COG1F/COG1R(プロローブ: RING1-TP(A), RING1-TP(B)), COG2F/COG2R(プロローブ: RING2-TP)を用いた real time PCR で実施した。遺伝子配列の決定は NV 陽性の PCR 産物をダイターミネーター法で行い、UPGMA 法により系統解析を行った。

(7) NV 中空粒子の作製と抗原 ELISA および抗体 ELISA

PCR で増幅された NLV 構造蛋白をコードする

ORF2 の 5' 末端から約 300 ベースの塩基配列を解析し、発現候補株を選出した。候補株について ORF2 の約 1,650bp、あるいは ORF2 から 3' 末端の Poly-A までの約 2,300bp を増幅してクローニング後、組換えバキュロウイルスを作出した。組換えバキュロウイルスを Tn-5 細胞に感染させ 5 日間培養後、電気泳動による 58K 蛋白の確認と電子顕微鏡による中空ウイルス粒子の観察によって VLPs の発現を調べた。VLPs が発現できた株については濃縮・精製後ウサギで抗血清を作製した。すでに作製できた VLPs 抗原と抗血清と共に ELISA 法で交叉反応試験を行ない抗原性を検討した。

(8) NV 全長クローンの解析

5' 末端にキャップ構造を付加した RNA と、付加しない RNA を合成し、哺乳類細胞にトランスフェクションした。また、細胞内で U201 ゲノムを転写させるため、CAG プロモーター下流に T7RNA polymerase をクローニングした pCAGT7poly を哺乳類細胞にコトランスフェクションした。同時に T7RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクチニアウイルスを感染させ、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給し、ウイルス RNA を大量に細胞内で合成させた。トランスフェクション後の細胞は、37°C の CO₂ インキュベーターで 24 時間、及び 48 時間培養した後、抗 ORF1 抗体、抗 ORF2 抗体、抗 ORF3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで U201 蛋白質の発現を確認した。

(9) NV プロテアーゼの構造解析

チバウイルス 3C 様プロテアーゼをコードする遺伝子を N 末端あるいは C 末端に His タグが付加するよう大腸菌発現ベクターに組み込んだ。大腸菌に導入後、可溶性画分より HisPro あるいは Pro-His を精製した。また、プロテアーゼ活性検出のための基質として、ヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ認識切断配列を介した GST-GFP 融合タンパク質、および、チバウイルスの 3CD 領域の N 末端に His タグを付加し、更にプロテアーゼ活性を消失させた His3CD-C139A タンパク質を用いた。GST-GFP は大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)

-RIL/pT7GST-GFP の可溶性画分より精製した。
His3CD-C139A は BL21-CodonPlus (DE3)

-RIL/pT7His3CD-C139A の可溶性画分より精製した。活性の検出は、反応液を SDS-PAGE で分離することにより行った。N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼをコードするプラスミド (pT7HisPro) を大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)- RIL 株に導入し、IPTG 添加により発現を誘導した。菌体を超音波破碎後、超遠心により可溶性画分を調製した。この画分より目的タンパク質 (HisPro) を精製した。結晶化は、2 M 硫酸アンモニウム、5 % イソプロパノールを含む試薬で行った。得られた結晶を用いて SPring-8 にて結晶学的データの収集を行った。

(10) NV の組織特異性

空腸剖検材料より mRNA を抽出し、cDNA を合成した。PCR-Select cDNA Subtraction で PCR によるサブトラクションを行い空腸特異的な cDNA を単離した。サブトラクトする側の組織として今回は同一個体由来の回腸を用いた。サブトラクションにより得られたクローンの塩基配列を決定し、ヒト cDNA を対象としたデータベース検索を行った。ウイルスが吸着しない細胞を選択するため、ウイルス様中空粒子と各種細胞株との結合を Binding assay により解析した。血清学的に異なる 2 種類の NV (7k/94 株、47/97 株) の ORF2 組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn-5 に接種し非標識、³⁵S 標識 VLP (r7VLP、r47VLP) を調製した。動物細胞株として、付着性の細胞 2 株、浮遊性の細胞 5 株を用いた。ロウウイルスの吸着する細胞と吸着しない細胞上の表面分子発現量は、NV の吸着しない細胞上の表面分子の発現パターンを Flow cytometry により検討し、ウイルスの吸着する細胞上のそれと比較した。156 種類の抗体を用い、136 種類の CD 分子について検討した。

(11) ウイルス性下痢症診断マニュアルの整備

分担研究者 (西尾 治、片山和彦、篠崎邦子) が、NV の RT-PCR に改良法、NV 遺伝子の定量法、サポウイルスの RT-PCR、について執筆した。

C. 研究結果

(1) 単クローン抗体を用いた NV 抗原検出 ELISA の確立と評価

既に開発された NV 中空粒子に対する特異的モノクローナル抗体を固相抗体とし、免疫ウサギ標識抗体を検出抗体とした NV 抗原検出 ELISA 法の評価と特異性の向上を検討した。RT-PCR 法との比較検討から非特異反応は 5% と推定された。この非特異性の解消に、糞便検体の様々な前処理を試みた。その結果、前処理バッファを pH8.0 のアルカリ側で使用することが一つの方法と考えられた。糞便検体と、固相モノクローナル抗体、抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体の反応性をウェスタン・ブロット法で解析した。その結果、ヒト糞便中には、NV 構造蛋白の 59kD より大小さまざまな反応蛋白がみられた。NV 抗原検出 ELISA 法のための糞便検体の前処理には、正常マウス血清、正常ウサギ血清を加えた pH8.0 のバッファ使用が、非特異反応の減少に意義ある事と考えられた。

(2) ヒト型組換え抗体によるロタウイルスの中和に関する研究

ロタウイルス感染の予防・治療を目的として、ヒト由来のファージ抗体ライブラリーから、ヒトロタウイルスを中和するヒト型単クローン抗体を分離した。得られた 3 種の抗体 (1-2H、2-3E、2-11G) は、それぞれ P[4]+P[8]、P[6]+P[8]、および G1 特異的であった。1-2H および 2-3E 抗体は VP4 を、2-11G 抗体は VP7 を認識した。Fab フラグメントから IgG1 分子へ変換後も、抗体の性状は変わらなかった。これらのヒト型抗体は、多様な血清型を示すほとんどのヒトロタウイルスを中和することから、その有用性が示された。

(3) 磁気ビーズを用いた食品からの NV 検出法の開発

NV (NV) に起因した食中毒事例において、食中毒の原因調査を目的に収去された推定原因食品からの NV の検出を試みた。食品から抽出したウイルス溶液を超遠心機で濃縮する方法と抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズを用いて、食品から NV を回収する方法で NV の検出検査を実

施した。磁気ビーズを用いて食品から NV を回収する方法は簡便であるが、抗原的に多様性のある NV を回収するためには、複数の抗体を準備する必要があると考えられた。

(4)リアルタイム PCR を用いた NV の検出と疫学解析

ウイルス性食中毒や胃腸炎集団発生の背景には、地域社会における種々なウイルスの流行があり、地域における散发性胃腸炎の流行実態の把握が必要である。調査した地域においては、春季にロタウイルス、秋から冬季にかけて NV の流行が認められた。また、NV の流行様態が例年と異なり、夏季の NV 検出や冬季流行の早期開始等の特徴があった。遺伝子解析では全て Genotype II、Lordsdale 株に近縁の株であり、本年の特徴的な流行は、ウイルス側の要因によるものとは考えられなかった。NV の診断に、リアルタイム PCR を用い、その有用性が認められた。

(5)遺伝子解析に基づく NV 感染経路の解析

カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例についてウイルス検査を行った。その結果、全事例から NV を検出し NV による集団発生であったことが判明した。系統解析の結果、遺伝子型は GI の DSV、G II の LV、SMV、HWV、MX であった。調理従事者便、食品について RT-PCR を行った結果、調理従事者から患者由来株の塩基配列と一致した NV を検出した。しかし、食品は全て RT-PCR 陰性であった。

(6)NV の遺伝子解析と定量法に関する研究

食中毒事例の患者糞便、カキおよび海水から検出された NV (NV) について遺伝子型を調べた。検出件数では G2 が G1 より 3 倍多く、G1 では 7 つの遺伝子型が、G2 では 11 の遺伝子型が検出された。急性期の患者のふん便 1g の NV 量は 1 億個以上に存在するものが多くに認められ、特に乳幼児では排泄されるウイルス量が多い。吐物においても 1g 中に NV 量は 1,000 個～100 万個以下の範囲で汚染されており、ふん便と同様に吐物も感染源として対応することが感染防止に重要である。

(7)NV 中空粒子の作製と抗原 ELISA および抗体 ELISA への応用

培養増殖が出来ない NV (NV) の抗原を得る手段として、遺伝子組換えバキュロウイルス発現系を利用して NLV のウイルス様中空粒子 (VLPs) の作製を行なってきた。高濃度の NV 抗原が得られ、また高度免疫血清の作製が可能になったことによりそれらを用いた NV 検出法の開発およびウイルス学的研究の進展をみた。しかし NV は遺伝学的にも血清学的にも多様なウイルスであり、遺伝子解析が進むにつれ新たな遺伝子型また血清型を持つ株の存在が示唆された。遺伝子系統樹解析からそれらを選別して VLPs の発現を試み、3 株について VLPs が作製できた。抗原性の検討結果は 3 株はそれぞれ新しい血清型であることを示した。

(8)NV 全長クローンの解析と疫学への応用

ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、作成したプラスミドクローンを用いて、哺乳類細胞内における NV ゲノムの転写翻訳機構を調べた。哺乳類細胞に完全長のゲノム RNA を導入しても、5' 末端に修飾を施さない RNA は翻訳されないことが確認された。また、細胞内で組み換えワクチニアウイルスを用いて、5' 末端にキャップが施された RNA 大量に供給した場合、NV ゲノム RNA の ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が翻訳されるが、それ以降の ORF2 及び ORF3 は翻訳されないことが明らかになった。ORF2 及び ORF3 をコードする約 2.3 Kb の NV-RNA を細胞内に供給すると、ORF2 に加え ORF3 も翻訳されることも明らかになった。NV の宿主特異性は、宿主細胞内におけるゲノムの転写翻訳機構が因子の一つである可能性が示された。

(9)NV プロテアーゼの構造解析と創薬への応用

NV 感染による急性胃腸炎に対して有効な治療薬の創出を目指し、NV のひとつ、チバウイルスが有する 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析を行った。3C 様プロテアーゼによる切断活性の至適 pH は 9.0 から 9.5 とアルカリ側で、至適温度は 26 ～ 37 °C であった。また、NaCl の存在、非存在はほとんど活性に影響しなかつ

た。SH 試薬のひとつ、PCMB はプロテアーゼと 1 : 1 で結合し、活性を完全に阻害することが分かった。3C 様プロテアーゼの立体構造解明に向け、X線結晶構造解析を行った。現時点で、4.5 Å 程度の解像度の結晶学的データが得られ、電子密度図の作成を行うことができた。

(10) NV の組織特異性に関する研究

レセプター分子の同定を目的とし、サブトラクションによる空腸特異的な cDNA クローンの単離を試みたところ、25 種類の cDNA クローンを得た。これらの中には細胞表面分子も 6 種類含まれていた。次いで、NV が吸着しない細胞を用いて空腸特異的な cDNA の発現、スクリーニングを行うため、ウイルスが吸着しない細胞の同定を試みたところ、浮遊性の培養細胞株にはほとんど吸着しないことが明らかになった。また、NV の吸着する細胞株と吸着しない細胞株上の表面分子発現パターンを比較したところ、両細胞株間で分子の発現パターンが大きく異なることが明らかになった。

(11) ウイルス性下痢症診断マニュアルの整備

NV の RT-PCR を改定し、NV 遺伝子の定量法とサポウイルスの RT-PCR を追加した改訂版を作成した。

D. 考察

すでに構築された NV 抗原検出 ELISA 法の感度の向上と、非特異的反応の原因を究明すべく、いくつかの点について検討を加えた。糞便検体の前処理で sIgA を取り除く酸処理を試みたが、期待された成果は得られなかった。pH3.0 は不十分な処理 pH なのか、今後の検討課題である。次に、カプソマーに解離する目的で、検体および VLPs のアルカリ処理を行った。糞便検体は pH8.0 処理で最も高い OD 値を示す傾向が見られた。しかし、解離されやすいと思われた VLPs に差が認められなかったのは、予想外であった。一方、これまでの NV 抗原検出 ELISA 法では、RT-PCR 法との検出一致率は約 69% であった。中でも ELISA(+)/PCR(-) の非特異的反応と考えられる率は 5% にみられた。特に、固相系に用いられるマウス抗体、検出系に用いられるウサギ抗

体との反応性も WB 法で認められた。今後の ELISA 法においても、さらに構築中の新しい抗原検出 ELISA 法 Ver3 においても、正常マウス血清、正常家兎血清を糞便検体前処理バッファーに加えることは、意義ある事と考える。現行の ELISA 法は、尚、改良点は残すものの、NV 感染症事例時でのスクリーニング検査として意義を持っている。また、現行の NV 抗原検出 ELISA 法を診断的検査方法に昇格させるべき改良を重ねていかねばならないと考えている。

ロタウイルスに対して得られたヒト型抗体は、幅広いヒトロタウイルス株を中和することから、その有用性が高いと思われる。今後、各抗体に対する抵抗性変異株を作成して中和エピトープの解析を行うとともに、乳のみマウスを利用した *in vivo* での感染防御効果および下痢治療効果を検討したい。

食品や環境中で NV は増殖しないので食品などを汚染しているウイルス量は微量と考えられる。したがって、食品中のウイルスを検出するためには効率よく食品から原因ウイルスを回収し、回収したウイルスを高感度に検出する方法が必要である。磁気ビーズを用いた NV 検出法は操作が簡便でかつ NV の濃縮効果を期待できる有用な方法であるが、ビーズに結合させる抗体を用意する必要がある。食品から NV を回収するにはポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズの方が適していると思われるが、抗原的多様性の大きい NV に対応するためには、複数のポリクローナル抗体を準備する必要がある。新たな抗体の作成は今後の課題である。

散発性胃腸炎から NV を検出するために、リアルタイム PCR を実施した。リアルタイム PCR は、TaqMan プローブを用いることにより、確認テストと定量を同時に行うことになるため、従来と比べて著しく迅速性が向上した。また、ウイルスの定量も可能になった。小児の散発性胃腸炎の糞便と成人の食中毒等集団発生例の糞便に含まれるウイルス量は、ほぼ同程度であることが示された。糞便 1 g 中には 10^5 から 10^{10} コピーの大量のウイルスが含まれていると推定され、糞便の汚染源としての重要性が再認識

された。従って海水や河川水の汚染防止にはし尿下水処理システムの改良、調理中の食品汚染防止には手洗いの徹底が重要である。

カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例のウイルス検査を行ったところ、ノロウイルスによる集団発生であったことが判明した。遺伝子検査の結果、調理従事者1名から患者由来株の塩基配列と一致する配列が検出された。このことは、調理従事者が施設内で感染を受けた結果とも考えられる。また、一方、不顕性に感染を受けていた調理従事者を介して食品が汚染された可能性も推測される。

昨年度の厚生労働省に届けられた食中毒事例、ウイルスによるものは約15%で、カキ事例がその半数近く占めている。本研究においても食中毒事例の患者から多く検出された遺伝子型がカキからも検出されており、カキと食中毒との関連性が示唆された。また、海水から検出された遺伝子型も患者およびカキから多く検出された遺伝子型もMX型であった。カキの汚染は海水からのものであり、今後海水のウイルス汚染についてもさらに詳細に監視する必要がある。急性期患者のふん便の半数以上には1g中に1億個以上含まれていることが明らかになったが、乳幼児では排泄されるウイルス量が多い傾向が見られた。NVは100個以下で感染・発病することが知られており、急性期患者便の極めて少量で多くの人を発病させる量に汚染されていることが示された。また、吐物においてもふん便ほどは大量でないものの、多くのウイルスに汚染されており、吐物を介しての感染拡大事例も報告されている。したがって、感染拡大防止には吐物も感染源としての、ウイルス学的な処理が必要である。

本年度に発現できた株を加えると、GIで5株、GIIで15株、血清型ではGIで5種、GIIで9種のNV抗原および抗血清を持つことができた。新たな血清型のVLPs抗原の発現によって抗原検出ELISA法のNLV検出率の向上が期待できる。Alphatron virusは抗体検査から日本において他のNV程に広く浸潤していないと考

えられる。Alphatron virusは新しいGenogroupとは言いがたくGIIに属すと考えられた。

NVでは、細胞内でサブゲノムRNAが転写されるかどうか明らかにされていないため、どのようにORF2およびORF3が翻訳されるのかも不明である。ワクチニアウイルスを用いた系で、pT7U201fullをトランスフェクションした細胞内にORF2のシグナルが認められなかったことは、ORF1を翻訳可能なゲノムRNAを細胞内に導入しても、ORF2の翻訳が起こらないことを示唆していた。pT7-U201ORF23をトランスフェクションした細胞の場合、メカニズムは不明だがORF2とORF3が翻訳されることが明らかになった。今後、ノーザンブロットングでサブゲノムRNAの確認をする必要があるが、NVの場合、サブゲノムRNAの転写、翻訳にORF1から供給されるウイルス蛋白質以外の宿主蛋白質が必要とされるのかも知れない。NV感染部位とされるヒト腸管上皮細胞で検討する必要があるが、細胞によってサブゲノムの転写翻訳に差があるなら、これがNVの宿主特異性を決定する一つの因子なのかもしれない。

チバウイルス3C様プロテアーゼの活性測定に用いた今回の条件では、長時間の反応にもかかわらず、基質の切断が完全には行われなかった。実際に反応が遅いこと、あるいは、実験条件が必ずしも至適でなかったことが考えられる。PCMBが酵素分子とモル比で1:1で存在するときに完全に酵素活性を阻害したことは酵素1分子あたり1箇所のPCMB高親和性結合部位があることを示唆している。3C様プロテアーゼの活性中心はCys139残基であるので、この側鎖SH基であると思われる。

NVが付着性の細胞株に吸着することは他のグループによる報告と一致する。これに対して、これまで検討されてこなかった浮遊性の細胞株にはほとんど吸着しないことが明らかになった。今回、MT-2で発現の高い分子が43選択されてきた。しかし、この中にサブトラクションで得られた25種類のクローンは含まれず、今回はレセプター分子を絞り込むことは出来なかった。今後、この43種類の細胞表面分子

中に NV の吸着に関与する分子が含まれていないかを検討する。具体的には、それぞれの表面分子に対する抗体を用いてウイルス結合の阻害効果を検討する。

E. 結論

NV 抗原検出 ELISA 法が感染症事例でのスクリーニング検査として有効である。ロタウイルス感染の予防・治療を目的として、ヒト由来のファージ抗体ライブラリーから、ヒトロタウイルスを中和するヒト型モノクロナール抗体を分離した。磁気ビーズを用いた NV 検出法は操作が簡便で、かつ NV の濃縮効果を期待できるため、原因食品や環境由来検体からのウイルス検出に有用な方法である。リアルタイム PCR を用いた解析から、小児の散発例及び成人の集団発症例とも急性期糞便中には 1g 当たり 10^5 から 10^{10} 個程度のウイルスが含まれていることが推定された。吐物にも大量のウイルスが含まれている。ふん便および吐物はヒトを介して食品が汚染されないようにすることが食中毒発生の防止の基本である。ELISA キットに用いた抗体の種類はまだすべての NV 血清型に対する抗体を含んでいないことに起因する。新たな血清型の VLPs 抗原の発現によって抗原検出 ELISA 法の NLV 検出率の向上が期待できる。Alphatron virus は日本でも存在することが認められたが、新しい genogroup とは言いがたく G-II に属すと考えられた。初めて NV3C 様プロテアーゼの性状が明らかになった。今後、X線結晶構造により、活性中心の原子レベルでの理解が可能になる。サブトラクションの結果空腸特異的なクローンが 25 個得れた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron

microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.

2. Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: 5949-5958.
3. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66: 721-724.
4. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
5. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
6. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 2459-2465.
7. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002;299: 225-239.

8. Ishko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.
9. Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology* 2002;45: 136-141.
10. Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. :Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City, Vietnam. *J Med. Virol.* 2003, 69:588-94.
11. Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, and Taniguchi K. : Cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies against human rotavirus recovered from phage-display library. (Submitted for publication)
12. Sasaki J, Taniguchi K: The 5' -end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol* 77:3542-3548, 2003
13. Adah MI, Wade A, Oseto M, Kuzuya K and Taniguchi K: First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. *J Med. Virol* 66:269-275, 2002
14. Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, Kobayashi N and Taniguchi K: Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 40:13390-13394, 2002.
15. Adah M. I. Abel W., Oseto M., Kuzuya K., and Taniguchi K. : First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. *J. Med. Virol.*, 66:269-275, 2002
16. Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, Nakagomi O, Terada M, and Shigeta S. : Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMS03) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:420-424, 2002
17. 田中智之、斎藤博之、原 みゆき、東方美保、武田直和. 嘔吐下痢症の対応と予防. *健康* 2003, 2, 42-44.
18. 内野清子、岩上泰雄、田中智之. モノクローナル抗体による免疫学的検出法. *日本臨床* 2002. 60(6), 1188-1193
19. 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄、西尾治、秋山美穂 : 愛媛県において 10 月から流行したノーウオークウイルス様ウイルス胃腸炎. *病原微生物検出情報*, 24 : 9-10 (2003)
20. 西尾 治、加藤由美子 : PCR 産物のマイクロプレートハイブリダイゼーションによるノーウオークウイルスの確認および遺伝子型別について、*日本臨床*、2002
21. 古田敏彦、竹内寛行、東谷市郎、西尾 治 : 大アサリの喫食を原因とするノーウオーク様ウイルスと A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—浜松市、*病原微生物検出情報*、23、119-120、2002
22. 西尾 治、秋山美穂、長谷川斐子、古屋由美子、大瀬戸光明、杉枝正明 : 輸入生鮮魚介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況、*病原微生物検出情報*、23、274-275、2002
23. 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、川本尋義、西尾 治、久保英幸、村上 司、蓑城昇次、瀧野 薫、小倉 壽 : 河川水からの Norwalk virus の検出、*生活衛生*、46、137-143、2002
24. 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、西尾 治、久保英幸、村上 司、蓑城昇次、瀧野 薫、綾田 稔、小倉 壽 : リアルタイム PCR 法を

- 用いた Norwalk virus 検出法の評価、大阪市立環境科学研究所報告、64、6-10、2002
25. 西尾 治、新川奈緒美：ノーウオーク様ウイルスによる集団発生、日本医事新報No. 4105、5-9、2002
 26. 西尾 治、西 香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木 宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：(1)、2003 印刷中
 27. 古田俊彦、秋山美穂、加藤由美子、西尾 治：ノロウイルス（ノーウオークウイルス）と A 型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例、感染症学雑誌、77(2)、89-94、2003
 28. 福田美和、川田一伸、矢野拓也、杉山 明、中山 治、西尾 治、関根大正、櫻井悠朗：養殖カキのウイルス浄化試験、感染症学雑誌、77:2、95-102、2003
 29. 名取克郎 「組換え抗原を用いた血清診断」日本臨床；60、2002 年
 30. 片山和彦：ノーウオークウイルス診断法の進歩、ワールドフォーカス No. 43 p1-2、2003
 31. 片山和彦：新世紀の感染症学：カリシウイルス、日本臨床 p468- 474、2003.
 32. 白土東子、片山和彦：新世紀の感染症学：ノロウイルス、日本臨床 p475-479、2003.
2. 学会発表
 1. Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda T: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
 2. Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan 11-13.
 3. Yatsushashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan : National hospital report. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan11-13.
 4. Yatsushashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan -Incidence and Comparison of HEV Markers between Japan and Bangladesh-. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002, Taipei, Taiwan, 2002 Sept 26-29.
 5. Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-Based Assay for the Detection and Genogrouping of Norwalk-Like Virus in Stools using Genogroup I and II-Specific Monoclonal Antibodies. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, 2002 May 20-23.
 6. Li T-C, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, R H., Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Human Polyomavirus BK Generated by Recombinant Baculoviruses. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
 7. Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses" based on phylogenetic analyses of 18 full genome sequences. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
 8. Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequemce of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002

- July-27-Aug 1.
9. H. Ushijima, L. Li, H. Shimizu, T. P. Lan, S. Okitsu, O. Nishio, J. K. Seo, J. G. Sim. : Molecular epidemiology of adenovirus among children with Diarrhea in Japan, Vietnam and Korea. The Japan-United states Cooperative Medical Science, July. 16-28, 2002 P11, Matumoto, Japan
 10. Ushijima H, Zhou Y, Okitsu S, Zhu L, Ishihara K, Nishio O. : Molecular epidemiological study of diarrheal viruses in Japan from 1996-2000 and gene analysis of rotavirus serotype G9.4th China-Japan International Congress of Virology , 26-28, Jun, 2002, (Kun Ming, China
 11. Ushijima H, Li L, Lan DTP, Okitsu S, Nishio O, Seo, JK, Sim JG. : Molecular epidemiology of adenovirus among children with diarrhea in Japan, Vietnam, and Korea. 36th Joint Meeting Conference on Viral Disease, 16-18, Aug, 2002, Matumoto
 12. Doan TPL, Okitsu S, Nishio O, Pham TD, Nguyen HD, Ushijima H. : Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease, 10-13, Nov. 2002, Pattaya, Thailand
 13. H. Ushijima, H. Kono, YM Zhou, DTP Lan, S. Peerakome, N. Maneekarn, S. Okitsu, O. Nishio. : Recent trend of rotavirus infection in Japan, Thailand and Vietnam. VII International Congress of Virology, 2002, July, Paris
 14. A. Kawamoto, N. Matsumoto, T. Hosoi, O. Nishio. : Epidemiology investigation of Norwalk virus detected in humans, environment and oysters. VII International Congress of Virology, 2002, July, Paris
 15. 松原尚子、片山和彦、白土東子、岡 智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井礼子、星野文則、宮村達男 バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
 16. Masaru Tamura, Katsuro Natori, Masahiko Kobayashi, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammalian cells 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
 17. 李 天成、武田直和、宮村達男 HEV そのウイルス学 宮川庚子記念研究財団ワークショップ「日本の E 型肝炎」、横浜、2002 年 10 月 26 日
 18. 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏 HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
 19. 石古博昭、三浦里香、島田康司、山崎修道、武田直和 VP4 塩基配列に基づく系統解析によって、ヒトライノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
 20. 内野清子、岩上泰雄、三好龍也、吉田永祥、前田章子、田中智之、鎌田公仁夫、北本憲利、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
 21. 影山 努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、白土東子、岡 智一郎、片山和彦、武田直和 Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製 第 50 回日本ウイルス学会学

- 術集会、札幌、2002年10月16-18日。
22. 勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田 稔、小倉 壽、青木孝祐 大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 23. 植木 洋、有田富和、後藤郁男、佐藤千鶴子、渡邊 節、沖村容子、秋山和夫、山本俊夫、白石廣行、武田直和 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出した NV の遺伝子解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 24. 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、青木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田 稔、小倉 壽 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 25. 白土（堀越）東子、片山和彦、田村 克、名取克郎、岡 智一郎、武田直和、宮村達男 ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 26. 片山和彦、白土（堀越）東子、岡 智一郎、小嶋慈之、影山 努、福士秀悦、武田直和 Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 27. 李 天成、武田直和、宮村達男 BK ウィルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 28. 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男 E 型肝炎ウイルス (HEV) ウィルス様中空粒子 (VLP) をベクターとして用いた経口ワクチンの開発 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
 29. 武田直和 Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性 第14回ウイルス性下痢症研究会、札幌、2002年10月15日
 30. 小林慎一、榮 賢司、宮崎 豊、田中智之、名取克郎、武田直和 Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日。
 31. 田中智之、内野清子、岩上泰雄、吉田永祥、鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日。
 32. 岩上泰雄、内野清子、鎌田公仁夫、北元憲利、阪本瑠子、家永信彦、武田直和、田中智之。小児下痢症の腸管内ウイルス重感染の可能性 第43回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002年6月。
 33. 岡田峰幸、篠崎邦子、大瀬戸光明：Sapporo virus の検出及び分子疫学的解析。第43回日本臨床ウイルス学会、秋田市、2002、6月。
 34. 大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、杉枝正明、古屋由美子、藤本嗣人、長谷川斐子、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：輸入魚介類のウイルス汚染実態調査。第50回日本ウイルス学会、札幌市、2002、10月。
 35. 西尾 治：ウイルス性食中毒の病因、臨床ウイルス学会、第42回日本臨床ウイルス学会、2002.6.6-7、秋田市
 36. 西尾 治：ウイルス性食中毒、第134回日本獣医学会学術集会、2002.9.19-21、岐阜市
 37. 西尾治、秋山美穂、加藤由美子：リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出について、第76回日本感染症学会、2002.4.11-12、P.251、東京
 38. 大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、杉枝正明、古屋由美子、藤本嗣人、長谷川斐子、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：輸入魚介類のウイルス汚染実態調査、第50回日本ウイルス学会、2002.10.16-18、P.178、札幌

39. 古屋由美子、原みゆき、片山丘、今井光信、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：イカ塩辛が原因の Norwalk virus による食中毒事例、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌
40. 西田知子、三上稔之、沖村容子、篠原美千代、西香南子、川本歩、木村博一、杉枝正明、大瀬戸光明、春木考祐、鈴木宏、西尾治：国内産および韓国産カキのノーウォークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの汚染状況、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌
41. 杉枝正明、大瀬戸光明、福田伸治、川本歩、木村博一、三上稔之、西田知子、新川奈緒美、西香南子、古屋由美子、西尾治：全国各地で発生したノーウォークウイルス (NV) による食中毒事例について、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 180、札幌
42. 松原尚子、片山和彦、白土東子、岡智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井玲子、星野文則、宮村達男：バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現、第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 14 年 12 月 11 日
43. 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「ノロウイルス (ノーウォーク様ウイルス) 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と生化学的性状の解析」日本薬学会第 123 年会 2003 年 3 月、長崎

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

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 14 年度 分担研究報告書

分担研究者 田中智之
谷口孝喜
榮 賢司
大瀬戸光明
篠崎邦子
西尾 治
名取克郎
片山和彦
染谷 雄一
白土東子

平成 15 (2002) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

モノクローナル抗体を用いたノルウォーク様ウイルス検出 ELISA 法の
確立に関する研究
－抗原検出 ELISA 法のこれまでの問題点と今後の方針－

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

共同研究者 北元憲利 (姫路工業大学 環境人間学部)

共同研究者 名取克郎、武田直和 (国立感染症研究所 ウイルス II 部)

研究要旨 既に開発されたノルウォークウイルス様粒子 (NV-VLPs) に対する特異的モノクローナル抗体を固相抗体とし、免疫ウサギ標識抗体を検出抗体とした NV 抗原検出 ELISA 法の評価と特異性の向上を検討した。RT-PCR 法との比較検討から非特異反応は 5%と推定された。この非特異性の解消に、糞便検体の様々な前処理を試みた。その結果、前処理バッファを pH8.0 のアルカリ側で使うことが一つの方法と考えられた。糞便検体と、固相モノクローナル抗体、抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体の反応性をウェスタン・ブロット法で解析した。その結果、ヒト糞便中には、NV カプシド蛋白の 59kD より大小さまざまな反応蛋白がみられた。以上より NV 抗原検出 ELISA 法のための糞便検体の前処理には、正常マウス血清、正常ウサギ血清を加えた pH8.0 のバッファ使用が、非特異反応の減少に意義ある事と考えられた。

A. 研究目的

これまでモノクローナル抗体を用いたノロウイルス (NV) 抗原検出 ELISA 法を開発し、その実用性について検討してきた。また、全国地方衛生研究所においても、その実用成績について評価してきた。

多検体測定、測定方法の簡便さ、短時間測定は感染事例のスクリーニングテストとして有用であることが判明したが、RT-PCR 法と比較して、

特異性、感度に改良の余地を認めざるを得なかった。

そこで、今年度は、特異性、感度の阻害因子を検討するとともに、いくつかの改良点について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. ELISA 法の構築

前年度の報告にもあるが、NV 抗原検出 ELISA 法は、固層抗体として