

20030528

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法の高度化、実用化に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田直和

平成16(2004)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法の高度化、実用化に関する研究	
武田直和	-----1
II. 分担研究報告書	
1. ノロウイルス抗検出 ELISA 法の実用化	
田中智之	-----13
2. 食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究	
谷口孝喜	-----19
3. 下水中のアイチウイルスの消長と新たな遺伝子型の検出	
榮 賢司	-----24
4. 食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究	
大瀬戸光明	-----30
5. Norovirus の施設内の集団発生について	
篠崎邦子	-----38
6. 食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究	
斎藤博之	-----45
7. 食品由来下痢症ウイルスの分子疫学に関する研究	
松岡 由美子	-----52
8. 食品由来ウイルス検出法の検討と評価	
入谷 展弘	-----55
9. ウチムラサキ貝からの A 型肝炎ウイルス検出における前処理方法の検討	
西尾 治	-----66
10. ノロウイルスおよびサポウイルス中空粒子の発現と高力価免疫血清の作製	
名取克郎	-----74
11. Sapovirus (SaV) ゲノム全長塩基配列の解析	
片山和彦	-----78
12. Sapovirus (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現ならびに部位特異抗体の作製	
岡 智一郎	-----91
13. ノロウイルスと血液型物質との結合に関する研究	
白土 東子	-----95
III. 研究成果の刊行に関する一覧	-----99
IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----102

厚生労働科学研究研究費補助金

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法の高度化、実用化に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 16 (2004) 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法の高度化、実用化に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室長

研究要旨 ノロウイルス（NoV）抗原 ELISA が実用の域に達した。本年度に発現できた 3 株を加えると、GI で 6 株、GII で 19 株の抗原および抗血清が作製できた。血清学的には GI で 6 種、GII で 11 種、計 17 種である。サポウイルス（SaV）においても GI に属す 1 株で VLPs の発現に成功し高度免疫血清を作製した。患者および貝からの RT-PCR による遺伝子検出は同定および疫学解析な手法として確立していることを確認した。A 型肝炎ウイルスの濃縮と定量的検出が確立できた。免疫磁気ビーズで下水からアイチウイルスを濃縮し、新たな遺伝子型を検出した。SaV の高感度核酸検出システムを構築する際、ターゲットとする領域を特定した。SaV も NoV と同様、ウイルス粒子の抗原性が多様である可能性が示唆された。SaV ORF1 および ORF2 領域に対する特異抗体を作製した。NoV の結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とする NoV もあることが明らかになった。NoV の同定における SSCP 解析の有効性を明らかにした。RV で配列非依存的な遺伝子増幅法を確立した。ウイルス性下痢症検査マニュアル第 3 版を作成した。

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 千葉県衛生研究所主席研究員
斎藤 博之 秋田県衛生科学研究所
主任研究員
松岡由美子 熊本市環境総合研究所研究員
入谷 展弘 大阪市立環境科学研究所
研究員
西尾 治 国立感染症研究所室長
名取 克郎 国立感染症研究所主任研究官
片山 和彦 国立感染症研究所主任研究官
岡 智一郎 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

岩上 泰雄 堺市衛生研究所
三好 龍也 堺市衛生研究所
内野 清子 堺市衛生研究所
吉田 永祥 堺市衛生研究所
北元 憲利 姫路工業大学
和久田光毅 藤田保健衛生大学
長嶋 茂雄 藤田保健衛生大学
佐々木 潤 藤田保健衛生大学
實方 剛 鳥取大学農学部

山下 照夫 愛知県衛生研究所
小林 慎一 愛知県衛生研究所
伊藤 雅 愛知県衛生研究所
梶島 由佳 愛知県衛生研究所
藤浦 明 愛知県衛生研究所
岡田 峰幸 千葉県衛生研究所
東方 美保 福井県衛生環境研究センター
飯塚 節子 島根県保健環境科学研究所
山本 保男 徳島県保健環境センター
新屋 拓郎 熊本市環境総合研究所
改田 厚 大阪市立環境科学研究所
久保 英幸 大阪市立環境科学研究所
勢戸 祥介 大阪市立大学
山口 卓 国立感染症研究所
秋山 美穂 国立感染症研究所
Grant A. Hansman 東京大学
近藤 玲子 愛媛県立衛生環境研究所
山下 育孝 愛媛県立衛生環境研究所
豊嶋 千俊 愛媛県立衛生環境研究所

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとり益々脅威となってきた。ノロウイルス（NoV）による集団食中毒や A 型肝炎ウイルス（HAV）による集団急性肝炎など、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになってきたことが

背景にある。発生状況を正確に把握し、その結果を国民、行政機関、および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、本感染症を制圧する上で重要な施策のひとつである。本感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝と NoV、二枚貝と HAV の組合せ以外は原因食品や原因物質を特定できるに至っていない。さらに、関与するウイルスが極めて多彩であるため、ターゲットが絞りにくい点も理由にあげられる。食品由来ウイルス感染症からは、上記の二つのウイルスのほか、サポウイルス (SaV)、ロタウイルス (RV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV) が検出される。いずれも RNA を遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要がある。また、本感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要がある。

本研究では、(1) 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る、(2) 原因食品からの抗原検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いた濃縮法を導入し、検出効率の向上を目指す、(3) 環境からの抗原検出には生化学、電気化学的手法で濃縮を行うと共に、各種膜分離技術を応用して効率の向上を計る、(4) 個々のウイルスについてその検査材料別に検査法を把握しその検出限界を明らかにすることを目的とする。ウイルス性食中毒のリスク評価には感染価を測定することが必須であり、そのための培養細胞を用いた培養系の確立が急務である。これに向けた基礎実験を並行して行う。これらの成果を基に、本感染症に関与するウイルスが食品を汚染するまでの経路を明らかにすることにより、検査法とその検出限界が明確になる。また、検出法をマニュアルとして広く普及することによって、国内における検査法の標準化が可能になる。

B. 研究方法

(1) NoV 抗原検出 ELISA

GI を特異的に認識する単クローン抗体 NLV3912 と GII を特異的且つ広範囲に認識する単クローン抗体 NS14 を抗原捕獲抗体とし

て混合し、マイクロプレート上の 1 穴に固相した。GI 検出抗体として r124, r258, rCV, r645 の 4 血清、GII 検出抗体として r104, r809, r18-3, r336, r754, r1876, r485, r47, r7K, r10-25 の 10 血清を用いた。非特異反応を抑えるため、糞便検体に正常マウス血清、および正常ウサギ血清を添加した。

(2) NoV の一本鎖高次構造多型解析 (Single Strand Conformation Polymorphism: SSCP 解析)

ピオチン化プライマーを用い平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「NoV の検出法について」に準拠して RT-PCR を行なった。増幅産物を SSCP バッファで希釈して熱変性後、SSCP ゲルにアプライし、ゲル温度を 24℃ に保ちながら泳動した。電気泳動終了後、ゲル中の PCR 産物をナイロン膜へ転写し、ピオチン化学発光検出キットを用いて SSCP パターンを検出した。

(3) NoV およびその他の下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析

NoV と SaV は糞便の電子顕微鏡法 (EM) 及び RT-PCR で行った。これらのウイルスの遺伝子解析は、PCR 産物のダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定し NJ 法で系統樹解析を行った。また一部クローン化後塩基配列を決定した。RV とアデノのウイルスの検出は市販の EIA キットを用いた。AstV 検出も RT-PCR 法で行った。

(4) 単一プライマーを用いた RV 塩基配列非依存性 PCR

RV RNA の 5' 末端をリン酸化し 3' 末端をアミノ化した任意の配列をもつプライマー A とウイルスゲノムを T4 RNA リガーゼにて反応し、未反応リンカーを除去後、プライマー A と相補的なプライマー B を用いて逆転写酵素反応を行った。この cDNA を鋳型としてプライマー B による PCR を行った。

(5) AiV の検出

流入下水の遠心上清、および処理下水の限外濾過濃縮の遠心上清を材料とした。AiV 抗血清を吸着させた磁気ビーズを下水と反応後回収し、ウイルス RNA を抽出した。RT-PCR を用いて AiV 遺伝子を増幅し、クローン化してその塩基配列を調べた。

(6) HAV の検出

リアルタイム PCR 法は、ABI PRISM 7000 でコピー数を定量した。本法におけるコピー数

の測定は、1件につき3回行い検出結果の検討を行った。また、RT-PCRで遺伝子を増幅後、VP1/2A領域の164塩基について塩基配列を決定し、UPGMA法により系統樹を作成した。

(7) 組換えバキュロウイルスを用いた NoV および SaV 中空粒子 (VLPs) の作製
構造蛋白領域 (ORF2) の 5' 末端から約 300 塩基の解析によって VLPs 発現候補株を選出した。候補株について ORF2 の約 1650bp、あるいは ORF2 から 3' 末端のポリ A までの約 2300bp 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。Tn5 細胞に感染後、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。

(8) NoV 抗体検出 ELISA
精製した VLPs を抗原として 98 穴マイクロプレートにコーティングした。患者あるいは健康人血清をこのマイクロプレート上で 2 倍段階希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗ヒト IgM、および抗ヒト IgG を反応させた。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。

(9) SaV がコードするポリペプチドの発現と抗体の作製
SaV の ORF1 および ORF2 ポリペプチドに対応する 16 種類の遺伝子領域を PCR 法によって増幅し、それぞれヒスチジンタグ融合タンパク質およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現した。上記発現タンパク質のうち、ORF1 の異なる領域に対応する 8 種類および ORF2 に対応する 1 種類、合計 9 種類のヒスチジンタグ融合タンパク質を 8M 尿素変性条件下で TALON affinity resin (Clontech 社) を用いて精製した後、4M 尿素/PBS に透析した。精製したリコンビナントタンパク質を、ウサギに免疫し、抗血清を得た。各抗血清の特異性は、免疫に用いた 9 種類のリコンビナントタンパク質を SDS-PAGE し、ウェスタンブロット法によって検討した。

(10) 唾液中の型物質と NV VLPs との結合
20 歳代から 60 歳代の日本の成人男女から採取した唾液を採取後、直ちに 100℃、10 分

間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B 各型物質の有無を赤血球凝集阻止反応により調べ、それぞれのサンプルの血液型を判定した。唾液と VLPs との結合は Saliva-VLP binding assay (ELISA-based) にて検出した。

(11) NoV 高感度 RT-PCR
RT-PCR 法と抗原検出 ELISA を用いて原因 NoV の遺伝子型を同定し、これと同じ遺伝子型の NoV 抗体結合磁気ビーズを調製した。食品の表面を精製水で洗い流した後、遠心して上清を回収した。抗体結合磁気ビーズを加えて反応させた後、磁気ビーズから RNA を抽出した。糞便検査と同様の方法で RT-PCR を実施した。
(倫理面への配慮)

唾液の使用は、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会での承認、提供者からのインフォームド・コンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究

(1) NoV および SaV 中空粒子の発現と高力価免疫血清の作製

NoV においては 14 種の血清型の異なる株の VLPs 発現と高力価免疫血清の作製を終えている。しかし NoV は遺伝学的にも血清学的にも多様であり、血清学的に異なると予測される株がみいだされて来た。それらの VLPs 発現を試み、血清型が異なる新たな 3 株の VLPs および免疫血清が作製できた。また、SaV においても遺伝子型 I (GI) に属す 1 株で VLPs の発現に成功し高度免疫血清を作製した。

(2) NoV 抗原検出 ELISA の確立

測定系に用いるマウス単クローン抗体とウサギ抗体が、ヒト糞便中に存在する様々な蛋白と非特異的反応を起こし、それが ELISA 法陽性/RT-PCR 法陰性の非特異反応結果として認められてきた。糞便検体に正常マウス血清、正常ウサギ血清を添加することにより、非特異反応を抑え、測定感度、特異度が著しく向上した。この測定系もちいて、食中毒事例の糞便材料を測定した。3 衛生研究所でそれぞれの測定したところ、ELISA 法と RT-PCR 法の一致率は 82%、感度は 62%、特異性は 99%であった。この結果が

ら、ELISA 法を NV 診断キットとして申請出来る段階に至ったと考えられた。

(3) 磁気ビーズを用いた AiV の検出

流入下水 98 件中 82 件 (83.7%) から AiV 遺伝子が検出された。12 月から 5 月には 45 件全てからウイルス遺伝子が検出された。

処理下水 98 件は全例陰性であった。PCR 産物の塩基配列を調べたところ、82 件中 81 件

(98.8%) からは A 型、1 件 (1.2%) からは B 型の遺伝子が検出された。さらに、5 件

(6.1%) からは標準株との相同性が 83% で、いずれの型にも属さない新型の遺伝子が検出された

[2] 遺伝子増幅による食品からの定量的ウイルス検出法の確立、および濃縮法に関する研究

(1) ウチムラサキ貝からの HAV 検出における前処理方法の検討

HAV 陽性のウチムラサキガイを用い、リアルタイム PCR 法で定量的検討を行った。超遠心法、ポリエチレングリコールによる濃縮法

(PEG 濃縮法)、貝類の中腸腺の内溶液を用いる方法 (内容液法) の 3 種類の前処理を行なった結果、超遠心法が最も高い値のコピー数が得られ、他の 2 つの方法に比べ優れていた。超遠心法と比較すると、ポリエチレングリコールによる濃縮法では 4~43%、内容液方法では 3~11% のコピー数が得られた。

(2) 二枚貝からの NoV および SaV の検出

地カキ、うば貝から NoV および SaV の検出をおこなった。その結果、地カキ 17 検体中 3 検体から、うば貝 12 検体中 4 検体から NoV が検出された。SaV は検出されなかった。下痢症患者から分離された NoV の遺伝子解析をおこない比較したところ、地カキ、ウバ貝から検出された NoV 遺伝子型と下痢症患者から検出された遺伝子型は一部では一致したが、二枚貝からは遺伝子型の異なる NoV が検出された。

[3] 検出系の確立に向けた基礎研究

(1) RV 塩基配列非依存性 PCR の確立

Lambden らの方法を改変し、塩基配列非依存の単一プライマーを用いた PCR とその後のクローニングを行い、配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法を確立した。A 群ロタウイルスの SA11 株、T-152 株 (G 血清型: G12) および B 群ロタウイルスの SKA-1 株由来 dsRNA を用い、11 本

すべての RNA に対する PCR 産物を得た。本法を用い、T-152 株の NSP1 遺伝子のクローニングを行い全塩基配列を決定したところ、これまで報告されている NSP1 遺伝子との相同性はきわめて低いことが判明した。本法は、末端配列決定に 5' Race 法や 3' Race 法を別々に行う必要がなく、また、分節 RNA ごとに増幅を行う必要もない。A 群~C 群ロタウイルス、さらに、dsRNA をゲノムとして有するピコビルナウイルスのゲノム解析にも応用でき、きわめて有用と思われる。

(2) SSCP 解析を活用した NoV の同定

NoV の流行、あるいは集団感染などの危機管理において行政対応に直接役立つ情報を素早く把握する手法として種々の事例について SSCP 解析を検討した。最大 50 検体の PCR 産物の遺伝子配列の異同を 1 日半で比較することができるため、集団感染等の危機管理局面での行政判断に必要な情報の早期把握に役立つものと考えられた。

(3) 完全長ゲノムを用いた SaV の遺伝子解析

複数株の SaV ゲノム全長塩基配列を決定し、分子進化遺伝学的手法を用いた解析で SaV のゲノム全体像を把握することを試みた。SaV ゲノムで最も塩基配列が保存されている領域を明らかにし、高感度核酸検出システムを構築する際、ターゲットとする領域を特定した。SaV の分子系統解析により、少なくとも遺伝学的に異なる 3 つのグループが存在することを明らかにした。また、構造蛋白質領域に核酸塩基配列、アミノ酸配列ともに相同性の低い領域が存在することを明らかにした。SaV も NoV と同様、ウイルス粒子の抗原性が多様である可能性が示唆された。さらに、NoV と同様に非構造蛋白質と構造蛋白質コード領域の境界でゲノムの組換えが起きていることが示唆された。

(4) SaV 蛋白の発現ならびに部位特異抗体の作製

大腸菌を用いて SaV の ORF1 および ORF2 に対応する 16 種類の領域についてポリペプチドの網羅的な発現を試み、15 種類について発現を確認した。そのうち SaV の ORF1 のそれぞれ異なる領域に対応する 8 種類、および ORF2 に対応する 1 種類、合計 9 種類の組換えタンパクを用いて、SaV ゲノムのほぼ全域 (ORF1 の 83%、ORF2 の 100%) にわたり部位

特異抗体を作製した。また、アミノ酸モチーフ(YGDD)から SaV の RNA ポリメラーゼ(RdRp) に対応する領域については、可溶性の GST 融合タンパク質が得られたため、この融合タンパク質を用いて酵素活性の検討を行い、RdRp 活性を検出することに成功した。

[4] 培養系の確立に向けた基礎研究

(1) NoV と血液型物質との結合に関する研究

NoV が血液型物質(型物質)を認識するとの報告がなされている。しかし、プロトタイプである Norwalk virus/68 のみ、またはそれを含まほんの数株でしか解析が行われていない。そこで、型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討した。GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の VLPs を用い、唾液中の型物質との結合を ELISA にて解析した。その結果、GI の 4 株、また GII の 7 株の VLPs は用量依存的に唾液と結合し、これらの株の結合に型物質が関与していることが示唆された。一方、GII において唾液中に全く結合しないウイルスが 4 株、また、その結合量が唾液中の型物質と相関しない株が 1 株認められ、結合に型物質以外の因子を必要とするウイルス株の存在が示唆された。

[5] 下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析に関する研究

(1) NoV 検出法の検討と評価

大阪市で検出された NoV について、プローブ型別および Capsid N/S 領域の遺伝子型別を行った。平成 14 年度に大阪市で検出された NoV は、P2B 型が主流であった。しかし、P2B 型には少なくとも 8 種類の遺伝子型が存在しており、特に 1 種類の遺伝子型が優勢になるような流行ではなく、様々な種類の遺伝子型が混在した流行であった。Capsid N/S 領域における遺伝子型別では、少なくとも 21 種類(GI/7 種類、GII/14 種類)の遺伝子型に分類された。遺伝的多様性を示す NoV 流行を詳細に解析していくためには遺伝子型別が有用であると考えられた。

(2) 施設内の集団発生の解析

2003 年 4 月から 2004 年 1 月までに千葉県内で NoV 集団発生事例が 19 事例あった。発生場所は、社会福祉施設、保育所、学校、病院など集団生活の場での発生が 13 事例(62%)と多かった。社会福祉施設、保育所での集団

発生事例 8 事例についてその感染経路を検討した。1 事例は食中毒を疑った事例であったが、7 事例は、患者発生のピークがなだらかで、ピークの数日前から患者がみられ、さらに職員にも発症者がみられるという特徴から、人一人感染による集団発生であることが推定された。また、1 事例は入所者 10 名と職員 1 名から検出した NoV の塩基配列が一致した。

(3) 散発性の急性胃腸炎原因ウイルスの流行状況調査

2003 年 1 月から 2003 年 12 月の間に 452 例の散発性急性胃腸炎の原因検索を行い、カリシウイルスが 109 例検出され、その内訳は NV78 例、SaV31 例であった。その他のウイルスでは RV が 56 例(そのうち C 群 RV13 例)、AstV16 例、アデノウイルス 15 例が検出された。2003 年は SaV の増加傾向が注目された。また、2003 年 12 月には、幼稚園において SaV による胃腸炎の集団発生があった。園児 118 名中 55 名が発症し、職員は 11 名中 2 名発症した。患者発生状況は突発的でクラス別集積性もみられず、食中毒が疑われたが、給食等の疫学調査の結果から食中毒と断定するには至らなかった。集団発生事例から検出された SaV 株と同時期地域で流行していた株の遺伝子配列は極めて類似していた。

[6] ウイルス性下痢症検査マニュアルの整備

(1) 第 3 版の作成と配布

2 版の内容に加えて 3 版では新たに SaV の遺伝子検出法と NoV の定量法の二つを追加した。平成 15 年 7 月の第 24 回衛生微生物技術協議会、および 11 月の第 15 回ウイルス性下痢症研究会で配布した。

D. 考察

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究

NoV および SaV を免疫学的手法で検出する上でその基礎は高力価血清の作製であるが、そのためには中空粒子の流の作製が不可欠である。NoV の遺伝子系統解析によれば現在までに GI は 14、GII は 17 のクラスターに分類されると考えられ、そして各クラスターは血清学的にも異なると思われる。本年度に発現できた 3 株を加えると、GI で 6 株、GII で 19 株の抗原および抗血清が作製できたこ

とになり、血清学的にはGIで6種、GIIで11種、計17種である。これらの抗原、抗血清の保持によってNVの血清学的関係が次第に明らかになり、さらに患者材料からの簡便な検出法である抗原検出ELISA法の改良の進展が期待される。また大量に作製できるVLPsはNoV抗原として下痢症、胃腸炎患者の血清学的診断に使われている。一方、SaVのVLPs発現量は非常に少なく、NoVの100分の1以下であった。発現効率を上げるべく検討中でありSaVの血清学的研究は今後の課題である。

改良ELISAは、感度、特異性それにRT-PCR法との一致率は、一昨年度、昨年度の方法に比べ、著しく向上した。感染性胃腸炎の散発事例においても、食中毒の流行事例においても、十分対応できる診断方法と考える。これまでも強調してきているが、ウイルス性食中毒と細菌性食中毒の鑑別は、極めて重要で、予後対応は大きく異なってくる。さらに、その鑑別に要する費用は大きい。今回のELISA法は、初期に搬入される検査検体が多ければ多いほど鑑別診断は容易で且つ経済性を示し、diffuse outbreakの感染事例に十分対応できる測定キットと考える。感度をより向上させるため、また、広範囲な感染原のウイルス株を検出するためにも、現有のモノクローナル抗体に加えて、他の抗原決定基を認識する抗体の作製が必要であると考えている。

NoV同様、AiVでも高力価血清を用いた磁気ビーズ法が環境中からのウイルス濃縮に有効であることが証明された。今回のAiV遺伝子の検出成績から、本ウイルスの流行は冬期にあると思われた。冬季に流行しカキ等の食品を介して感染を繰り返し人の抗体保有率も上昇して行くものと考えられる。

AiVは同一の血清型ウイルスでも塩基配列の差(3CD領域で10%)によりA型とB型に分けられる。我が国の分離株はほとんどがA型に属する。一方B型は東南アジアでの感染例から分離されたものが属する。今回検出された遺伝子は殆どがA型であり、我が国の流行ウイルスがA型であることが確認された。海外感染例から検出されるB型は、98件中1件のみであり、わが国ではほとんど流行していないと思われた。

[2] 遺伝子増幅による食品からの定量的ウイルス検出法の確立、および濃縮法に関する研

究

ウチムラサキ貝を用い超遠心法、PEG濃縮法および内容液の前処理方法によるHAV検出について、リアルタイムPCR法によりHAV検出コピー数を定量した。各方法の優劣について検討した結果、超遠心法は他の2つの方法に比べて良好な成績が得られた。内容液を用いた方法は、簡便ではあるがウイルスの回収率は低いことから、他の濃縮法が行うのが難しい大型の貝類にのみ用いることにするのが適切であると考えられた。

熊本市域に流通している地カキ、うば貝からSaVは検出されなかった。これは、市中でNoVに比べてSaV感染者が少ないことを反映しているのではないかと考えられた。一方、二枚貝からは遺伝学的に異なるNoVが検出された。食品検体と患者検体での検出NoV遺伝子型が完全に一致しないのは、患者検体数が少ないことによる問題なのか人のウイルスに関する感受性の問題かは不明であった。しかし今後調査を続けていくことで、遺伝子型の検出パターンの違いは解明されることが考えられた。

[3] 検出系の確立に向けた基礎研究

RV配列非依存の単一プライマーを用いたPCRは配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法である。末端配列の決定に5' Race法や3' Race法を別々に行う必要がなく、また、分節RNAごとに増幅を行う必要もない。A群のみならず、B群やC群ロタウイルスのゲノム解析にも応用でき、今後のRV遺伝子解析に有用である。

NoVの解析はシーケンスを決定して比較する方法が一般的であるが、数週間~数ヶ月を要するため行政側との時間軸のずれが大きく、個々の局面で有効な情報を提供するという目的には向いていない。遺伝子解析が必要となるような事例は検体数も多いのが普通であるから、行政対応に役立てるためには多くのNoVの遺伝子の異同をシーケンスせず短期間に比較する手法の導入が必要になる。行政判断で重要なのは複数のNV遺伝子が「同じかどうか」であり、その情報を迅速に把握する手法としてSSCP解析を用いることは意義があるものと考えられた。

SaVのゲノム全長のうち最も塩基配列が保存された領域は、構造蛋白質領域の直前であり、NoVのORF1-ORF2ジャンクション領域(リ

アルタイム PCR の標的領域)に相当していた。この領域には、本研究で解析した SaV 株全てで 100%近く保存された 100 塩基ほどの領域が存在し、NoV 同様、高感度 SaV 核酸検出法の絶好の標的領域となると思われた。また、本研究で SaV ゲノムのほぼ全域をカバーする SaV 部位特異抗体が作製できた。今後、SaV 抗原検出に最適な手法を確立する上で有用な材料が作製できた。

[4] 培養系の確立に向けた基礎研究

今回、NoV GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の VLPs を用い、血液型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討した。その結果、GI の 4 株、また GII の 7 株の結合には血液型物質が関与していること、GI 株の結合には、H 型物質が重要であること、GII 株の結合には GI とは異なり、H 型物質以外の型物質が重要であること、結合に血液型物質以外の因子を必要とするウイルス株が存在することが明らかになった。血液型物質の NoV 感染における役割を明らかにするとともに、第 2 のレセプターの存在についても検討したい。

[5] 下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析に関する研究

遺伝的多様性を示す NoV 流行を詳細に解析していくためには、Capsid N/S 領域の遺伝子型別による解析が必要であること、老人保健施設や保育所など介護を伴う施設では、なんらかの原因で NV 患者が発生すると人—人感染により感染が拡大する可能性が高く、ウイルス感染を制御する事が難しく長期化しやすいことが示された。人—人感染は糞口感染と空気感染(吐物が空气中に飛散しエアロゾルになる)によって起こると考えられ、保育所では屋内の遊戯室で園児が嘔吐した後患者発生し、糞口感染だけでなく乾燥した吐物が飛散し次ぎの感染を生じる可能性も推測された。施設内で NoV を拡大させないための対策は、汚物によって汚染された環境の消毒、患者に接触したときの手洗いを徹底するなどの衛生管理が重要であると考えられた。今後、集団生活の場で患者が発生した場合の処置方法をマニュアル化する必要がある。

[6] ウイルス性下痢症検査マニュアルの整備

本年度改定したマニュアルによって、ウイルス性下痢症検査の標準プロトコールが完成した。ウイルス性食中毒の検査に、常に実

験台の脇において活用されることが期待される。今後は Web 上で公開し、改正、修正等、迅速な対応ができるよう整備したい。

本年度は、「環境からの抗原検出に生化学、電気化学的手法で濃縮を行うと共に、各種膜分離技術を応用して効率の向上を計る研究」は不十分であった。来年度の課題である。

E. 結論

NoV 抗原 ELISA が実用の域に達した。より広範に検出するために VLPs と単クローン抗体研究を推進する必要がある。患者および貝からの RT-PCR による遺伝子検出は一般的な手法として確立している。HAV の濃縮と定量的検出が確立できた。磁気ビーズは Aiv の濃縮にも効果的であった。SaV の遺伝子解析と抗体調製が大きく進展した。NoV の結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とする NoV もある。NoV を多数解析するには SSCP が有効である。RV で配列非依存的な遺伝子増幅法を確立した。ウイルス性下痢症検査マニュアル第 3 版を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* 2004;78: 3817-3826.
2. Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 2004;48: 201-204.
3. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K: Co-Existence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Norovirus Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2004: in press.
4. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda

- N, Sakae K: Isolation and Identification of a Novel Human Parechovirus. *J. Gen. Virol.* 2004: in press.
- 5 Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42: 1305-1307.
 - 6 Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, Katayama K: Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus Poly(A)- and Primer-independent RNA Polymerase of Norovirus. *J. Virol.* 2004;78: 3889-3896.
 - 7 Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch. Virol.* 2003;148: 1659-1670.
 - 8 Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41: 1548-1557.
2. 学会発表
1. Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. IVth World Congress on Vaccines and Immunology (WCVI), Tsukuba, Japan, 2004 Sep 30-Oct 3.
 2. Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. PLANT-DERIVED VACCINES AND ANTIBODIES: POTENTIAL AND LIMITATIONS, Veyrier du Lac, France, 2004 March 21-24.
 3. Takeda N, Katayama K, Hansman G, Shirato H, Oka T, Ogawa S, Utagawa E, Natori K, Miyamura T: Genetic and Antigenic Diversity of Noroviruses. Workshop on Emerging Enteric Viral Diseases 2003 Nov 20.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Tomoyuki Tanaka, Tatsuya Miyoshi, Noritoshi Kitamoto, Yasuo Iwagami, Kiyoko Uchino, Katsuro Natori, Kunio Kamata, Xi Jiang, Mary K. Estes, Takeda N: Immunoreactive proteins in human feces may cause nonspecific reactions in a Norwalk virus antigen detection ELISA. 37th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, USA, 2003 Aug 18-20., 2003 Aug 18-20.
 7. Kazuhiko Katayama, Haruko Shirato-Horikoshi, Tomoichiro Oka, Tatsuo Miyamura, Takeda. N: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. 37th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, USA, 2003 Aug 18-20., 2003 Aug 18-20.
 8. 片山和彦、Hansman Grant、岡 智一郎、牛島廣治、宮村達男、武田直和 新たに全塩基配列を決定し得た Sapovirus (SV) 4株を用いたゲノム塩基配列の解析 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 9. Hansman Grant、片山和彦、牛島廣治、武田直和 Genetic Classification and Expression of a Novel Sapovirus

- Genogroup 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
- 10 岡 智一郎、小川智子、Hansman Grant、牛島廣治、福士秀悦、影山 努、高井玲子、白土（堀越）東子、片山和彦、武田直和、宮村達男 サポウイルス (SV) ガコードするポリペプチドの網羅的発現 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 11 田中智之、三好龍也、岩上康雄、内野清子、北元憲利、鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和 ノロウイルス抗原検出 ELISA 法における非特異的反應の解析 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 12 Hansman Grant、片山和彦、牛島廣治、武田直和 Molecular Characterization of a Novel Recombinant Norovirus 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 13 影山 努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、篠原美千代、内田和江、岡 智一郎、武田直和、片山和彦 Norovirus の多様性およびその疫学的な意義について 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 14 高井玲子、福士秀悦、影山 努、小嶋慈之、星野文則、名取克郎、武田直和、片山和彦 Norovirus 濃縮法の検討 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 15 白土（堀越）東子、名取克郎、鎌田公仁夫、影山 努、岡 智一郎、片山和彦、宮村達男、武田直和 Norovirus と血液型物質との結合 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 16 福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井玲子、星野文則、岡 智一郎、武田直和、片山和彦 Norovirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発現と酵素活性について 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 17 小嶋慈之、影山 努、高井玲子、星野文則、福士秀悦、武田直和、片山和彦 Norovirus VLP の遺伝子デリバリーベター化への試み 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 18 片山和彦、岡 智一郎、白土東子、小嶋慈之、影山 努、高井玲子、福士秀悦、宮村達男、武田直和 Norovirus (NV) Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析 日本ウイルス学会、第 51 回学術集会、京都、2003 年 10 月
 - 19 入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、青木孝祐、西尾 治、武田直和、村上 司、葦城昇次、改田厚、綾田 稔、小倉 壽 平成 14 年度に大阪市で検出された Norwalk virus のプローブ型別および遺伝子型別 平成 15 年度地研近畿支部ウイルス部会研究会、和歌山、2003 年 9 月 12 日
 - 20 勢戸祥介、綾田 稔、小倉 壽、入谷展弘、久保英幸、青木孝祐、名取克郎、武田直和 Alphtron type NV について 衛生微生物技術協議会第 24 回研究会、福岡、2003 年 7 月 10-11
- 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法の高度化、実用化に関する研究

平成 15 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
斎藤 博之
松岡由美子
入谷 展弘
西尾 治
名取 克郎
片山 和彦
岡 智一郎
白土 東子

平成 16 (2004) 年 4 月

平成 15 年度厚生労働省新興・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法の高度化、実用化に関する研究」

「ノロウイルス抗検出 ELISA 法の実用化」

研究班員 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 岩上泰雄、三好龍也、内野清子、吉田永祥 (堺市衛生研究所)

北元憲利 (姫路工業大学環境人間学部)

名取克郎、武田直和 (国立感染症研究所 ウイルスⅡ部)

榮 賢治 (愛知県衛生研究所)

大瀬戸光明 (愛媛県衛生研究所)

研究概要: 非特異的反応の見られたこれまでのノロウイルス抗原検出 ELISA 法を改良し、RT-PCR 法との一致率の向上、感度および特異性の向上を目指した。食中毒事例や散発性ノロウイルス感染症の検体を、3 衛生研究所で合計 511 検体を用いて測定した結果、RT-PCR 法との一致率は 82% まで向上した。加えて、感度、特異性もそれぞれ 62%、99% を示した。RT-PCR 法との一致性や感度、さらに簡便性、経済性を考えると、本検出方法は、ノロウイルス感染症診断キットとしての価値がある。抗原多様性の多いノロウイルスを網羅して検出すべく、より広範囲な交差反応する単一抗体の作製をさらに試みている。

A: 研究目的

これまでノロウイルス、*Norovirus* 測定について簡便な酵素抗体法 (ELISA 法) の開発に携ってきた。測定系における、大きな問題点を、昨年この班会議で報告した。すなわち、測定系に用いるマウスモノクローナル抗体とウサギ抗体が、ヒト糞便中に存在する様々な蛋白と非特異的反応を起こし、それが ELISA 法陽性/RT-PCR 法陰性の非特異反応結果として認められてきた。糞便検体に正常マウス血清、正常ウサギ血清を添加することにより、非特異反応を抑え、測定感度、特異度が著しく向上した。この測定系をも

ちいて、食中毒事例の糞便材料を測定した。この結果から、ELISA 法をノロウイルス診断キットとして申請出来るまでの段階となった。

一方、現在用いられている genogroup I (GI), genogroup II (GII) を特異的かつ広範囲に認識するモノクローナル抗体 (GI; NV3912, GII; NS14) の反応域をさらに拡大するために、すなわち、より広範囲にノロウイルス株を検出するために、遺伝子系統樹より、このモノクローナル抗体との反応性の低いウイルス株を選択した。このウイルスからウイルス様粒子 (VLPs) の作製とモノクローナル抗体の作

製を試みた。

B. 研究方法

ELISA 法の測定系は既に昨年の報告書に報告している。しかし、今年度は GI, GII モノクローナル抗体を別々のウエルに固層する代わりに 1 ウエルに固層した。測定材料は、散发発生事例の感染性胃腸炎患者便と食中毒集団発生事例の便検体を用いた。当衛生研究所の 113 検体、愛知衛生研究所の 219 検体、愛媛県衛生研究所の 179 検体、合計 511 検体である。検査感度の比較対照にもちいた RT-PCR 法は、ウイルス性下痢症診断マニュアルに従って、GI, GII カプシド領域のプライマーを用いた。

ノロウイルスの VLPs の作製は以下のとおりである。

RT-PCR 法により 陽性と確認された糞便検体 (V-63 : GII) を発現のためのウイルス材料として用いた。

ノロウイルスのカプシド蛋白をコードする ORF2 の 5 末端から 3 末端のポリ A までの約 2300bp を RT-PCR 法により増幅後、クローニングして組換えバキュロウイルスを作製した。この組換えウイルスを sf-9 細胞にて継代して増殖させた後、Tn-5 細胞に感染させ VLPs を発現させた。発現させた VLPs を濃縮し、SDS-PAGE により VLPs 蛋白の確認と電子顕微鏡による VLPs の観察を行い、VLPs 発現の確認を行った。発現した VLPs を精製後、マウスに免疫し抗体の作製を行った。また、武田らが作製した VLPs (GI : r124, GII : r7k, r445, r104, r809) とその抗血清との交叉反応を ELISA 法により調べ、今回発現

した株の血清型を検討した。

(倫理面への配慮)

モノクローナル抗体作製のためのマウスは、実験動物倫理委員会の承認の下に、マウスに配慮して行っている。

C. 結果

1) ELISA 法の測定結果

3 衛生研究所でのそれぞれの測定結果を表 1 から表 3 にまとめた。

5 1 1 総検体の結果を表 4 にまとめた。表 4 の結果から、ELISA 法と RT-PCR 法の一致率は 82%、感度は 62%、特異性は 99%であった。

2) VLPs の生成結果

作製された VLPs は SDS-PAGE により、約 58k Da の目的とするバンドを確認した。また、電子顕微鏡でも中空粒子が観察された (図 1)。V63 VLPs と武田らの作製した抗血清との反応性を図 2 および図 3 に示した。V63 VLPs を用いて作製した抗血清と武田らの作製した VLPs の反応性を図 4 に示した。この結果、今回発現した V63 VLPs と比較対照に用いた 5 株の VLPs に対する交叉反応性は低かった。V63 VLPs を免疫原として特異的モノクローナル抗体の作製から、数種類のクローンを得た。現在、その解析と腹水化を行っている。

D. 考察

改良 ELISA 法は、感度、特異性それに RT-PCR 法との一致率は、一昨年度、昨年度の方法に比べ、著しく向上した。感染性胃腸炎の散发事例においても、食中毒

の流行事例においても、十分対応できる診断方法と考える。

これまでも強調してきているが、ウイルス性食中毒と細菌性食中毒の鑑別は、極めて重要で、予後対応は大きく異なってくる。さらに、その鑑別に要する費用は大きい。今回の ELISA 法は、初期に搬入される検査検体が多ければ多いほど鑑別診断は容易で且つ経済性を示し、diffuse outbreak の感染事例に十分対応できる測定キットと考える。感度をより向上させるため、また、広範囲な感染原のウイルス株を検出するためにも、現有のモノクローナル抗体に加えて、他の抗原決定基を認識する抗体の作製が必要であると考えている。

今回、作製された VLPs と比較に用いた株の交叉反応性は低く、これらとは異なった血清型であると考えられた。既にモノクローナル抗体を作製しているが、この V63 株の抗原性の解析とともに、現有の抗原測定 ELISA キットの固層抗体に添加していけるかどうか、検討を行っていく予定である。

さらに、GI ノロウイルスを特異的かつ広範囲に認識するモノクローナル抗体も同様の strategy で作製する予定である。その GI ノロウイルス候補として W23 ウイルスの VLPs の作製を行っている。

D. 結語

今回、新たに構築されたノロウイルス抗原測定 ELISA 法は、RT-PCR 法との一致率 82%、測定感度 62%、測定特異性 99%を持つ測定キットである。散发性ノロウイルス感染症や食中毒事例の診断に十

分対応できるキットである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 田中智之. ノーウォーク様ウイルス
日本検疫医学雑誌 2003. 5: 15-25

2) 田中智之、岩上泰雄、内野清子、三好龍也、吉田永祥、北元憲利、武田直和. ノロウイルス抗原検出 ELISA キットの評価

医学と薬学 2003. 50: 709-714

2. 学会発表

1) 田中智之。ウイルス性下痢症の最近の話題。大阪府医師会医学会講演会。大阪市、平成 15 年 5 月 22 日

2) 内野清子、岩上泰雄、吉田永祥、三好龍也、前田章子、西尾 治、田中智之。リアルタイム PCR 法を用いた NV 検査について。

衛生微生物技術協議会第 24 回研究会
福岡市、平成 15 年 7 月。

3) Tomoyuki Tanaka, Tatsuya Miyoshi, Noritoshi Kitamoto, Yasuo Iwagami, Kiyoko Uchino, Natori Katsuro, Xi Jiang, Mary K. Estes, and Naokazu Takeda

Immunoreactive proteins in human faeces may cause nonspecific reaction in a Norwalk virus antigen detection ELISA. XXXVII Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, July 18-20, Houston, Texas, 2003

4) 田中智之、三好龍也、岩上泰雄、内野清子、北元憲利、鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和。ノロウイルス抗原検出 ELISA 法における非特異的反応の解析。第 51

回日本ウイルス学会学術集会・総会 京都 2003. 10.

5). 前田章子、内野清子、田中智之。2002年 Echo13 型ウイルス感染に関する血清疫学的検討。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、2003. 10.

6). 北元憲利、生田和良、加藤陽二、小林隆幸、若宮伸隆、田中智之、宮本博行、加藤四郎。痘瘡発症事例の際の迅速・簡便診断法の可能性。

第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、2003. 10.

7) 田中智之。カリシウイルスについて (ELISA についての話題もまとめて)。

第 15 回ウイルス性下痢症研究会、京都、2003. 10.

8) 田中智之。ウイルス性下痢症一原因としてのノロウイルスー
大阪小児栄養消化器病懇話会。大阪市、2003. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 本研究で開発したキットを「NV 抗原診断 ELISA キット」として申請中。2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 堺市衛生研究所測定成績

		RT-PCR 法		合計
		+	-	
ELISA 法	+	29	2	31
	-	22	60	82
合計		51	62	113

一致率: 79%,
感度: 57%, 特異性: 97%

表 3 愛媛県衛生研究所測定成績

		RT-PCR 法		合計
		+	-	
ELISA 法	+	61	1	62
	-	39	78	117
合計		100	79	179

一致率: 78%,
感度: 61%, 特異性: 99%

表 2 愛知県衛生研究所測定成績

		RT-PCR 法		合計
		+	-	
ELISA 法	+	61	0	61
	-	30	128	158
合計		91	128	219

一致率: 86%,
感度: 67%, 特異性: 100%

表 4. 集計測定結果

		RT-PCR 法		合計
		+	-	
ELISA 法	+	151	3	154
	-	91	266	357
合計		242	269	511

一致率: 82%,
感度: 62%, 特異性: 99%

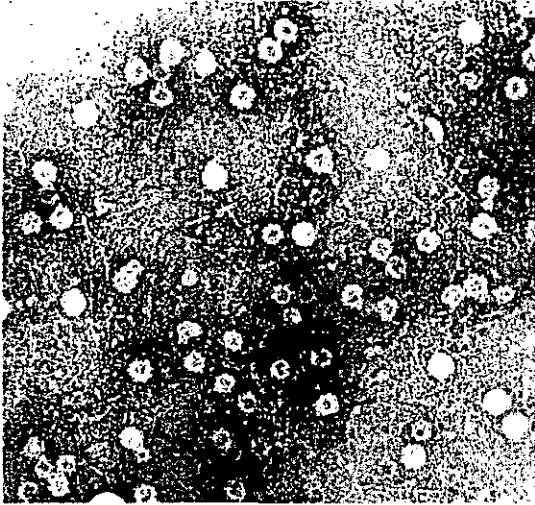


図 1. V63 VLPs の電子顕微鏡写真

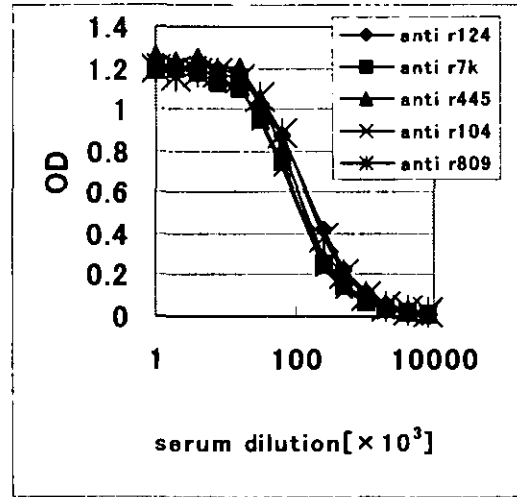


図 3 ホモ系における抗体価測定結果

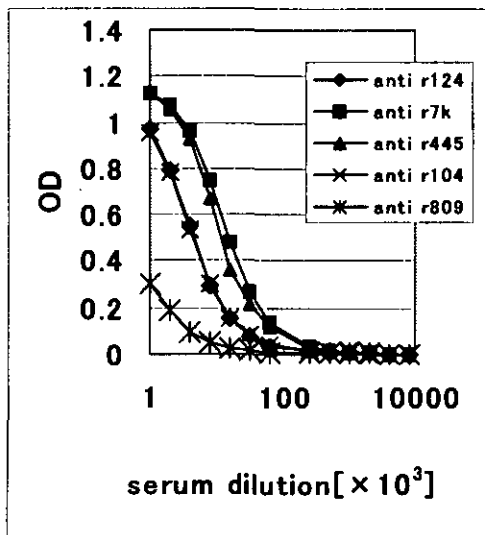


図 2 V63 VLPs に対する抗体価測定結果

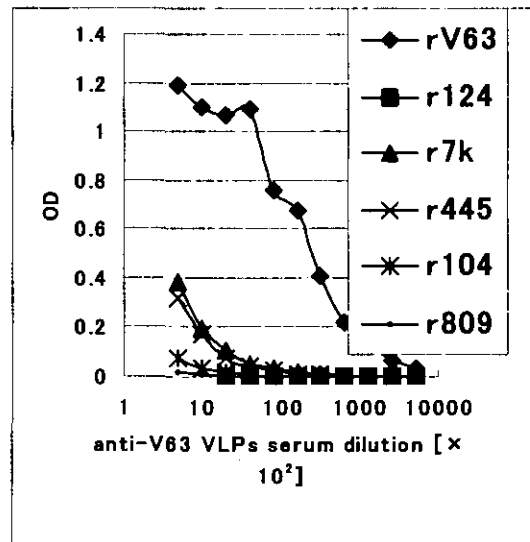


図 4 Anti-V63 VLPs 抗体価測定結果

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法の高度化、実用化に関する研究

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

我々は、Lambden らの方法を改変し、塩基配列非依存の単一プライマーを用いた PCR とその後のクローニングを行い、配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法を確立した。

A 群ロタウイルスの SA11 株、T-152 株（G 血清型：G12）および B 群ロタウイルスの SKA-1 株由来 dsRNA を用い、11 本すべての RNA に対する PCR 産物を得た。

本法を用い、T-152 株の NSP1 遺伝子のクローニングを行い全塩基配列を決定したところ、これまで報告されている NSP1 遺伝子との相同性はきわめて低いことが判明した。

本法は、末端配列決定に 5' Race 法や 3' Race 法を別々に行う必要がなく、また、分節 RNA ごとに増幅を行う必要もない。A 群～C 群ロタウイルス、さらに、dsRNA をゲノムとして有するピコビルナウイルスのゲノム解析にも応用でき、きわめて有用と思われる。

1) 研究目的

ヒトロタウイルスには、A 群、B 群、C 群が知られている。これまで、きわめて多数の遺伝子の塩基配列が決定されているが、その多くは、5' および 3' 末端配列に相補的な共通プライマーを用いて得られた PCR 産物をもとに塩基配列が決定されており、5' および 3' 末端配列は、プライマー由来の配列がそのまま記載されている。我々は、Lambden ら（1992）により開発された方法を改変し、塩基配列非依存の単一プライマーを用いた PCR とその後のクローニングを行い、配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法により、ロタウイルス遺伝子の塩基配列を決定することを、目的とした。

2) 材料と方法

A 群サルロタウイルス SA11 株、A 群ヒトロタウイルス T152 株および B 群ブタロタウイルス SKA-1 株を用いた。Lambden ら（1992）の方法に準じた。5' 末端をリン酸化し 3' 末端をアミノ化した任意の配列をもつ

primer A とウイルスゲノムを T4 RNA Ligase にて Ligation 反応し、未反応 linker 除去後、primer A と相補的な primer B を用いて逆転写酵素反応を行った。ここで得られた cDNA を鋳型として primer B による PCR を行い、アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミド電気泳動にて反応態度を確認した。目的とする分節 RNA に対応した DNA 断片をゲルから切り出し、DNA を抽出、TA Vector を用いてクローニングした（図 1）。

3) 結果

1) A 群ロタウイルスの SA11 株、B 群ロタウイルスの SKA-1 株由来 dsRNA を用い、11 本すべての RNA に対する PCR 産物をアガロースゲルで確認できた（図 3）。ポリアクリルアミド電気泳動では、各分節 RNA に対応する DNA が明瞭に分離できた（図 2）。

2) タイで検出した G12 の T152 株は、ユニークな NSP1 遺伝子を有することが、ノーザンブロットングにより明らかとなった（図 4）。そこで、本法を T152 株の遺伝子のク