

表 1. 平成 14 年度にノロウイルスが検出された非細菌性胃腸炎事例

事件番号	発生月/年	発生場所	推定原因 ^a	患者数/喫食者数	検査数	NV 陽性数	プローブ型	遺伝子型
02065	4/02	*	3	2/5	2	1(GI)	P1A	Winchester
02172	9/02	給食施設	1	5/28	5	5(GI, GII)	P1A	ND
02189 _b	11/02	*	3	2/3	2	2(GII)	P2B	Hillingdon, Toronto, Chitta
02198 _b	12/02	*	3	3/25	3	3(GII)	P2B	Chitta
02202	12/02	*	3	4/5	1	1(GII)	P2B	Bristol
03006 _b	1/03	*	1	1/1	1	1(GII)	P2B	Bristol
03008	1/03	飲食店	1	28/35	1	1(GII)	P2B	Toronto
03009	1/03	*	1	3/3	2	2(GI, GII)	GII	Hillingdon
							P1A	Winchester
							P1B	ND
							P2B	Hillingdon
03011 _b	1/03	*	1	1/1	1	1(GI)	GI	Winchester
03012	1/03	ホテル	1	77/295	12	9(GI, GII)	GII	Winchester
							P1B	ND
							P2B	Hillingdon, Toronto, KU82GII
03017 _b	1/03	*	3	10/13	9	8(GII)	P1B	Seacroft
03020	2/03	*	1	3/3	1	1(GI)	P1A	Chiba
							SOV	ND
03021	2/03	*	1	2/2	2	2(GII)	P2B	Toronto, Hawaii
03022	2/03	飲食店	1	5/5	4	4(GI, GII)	GII	Winchester
							SOV	Southampton
							P2B	Toronto, KU82GII
03024 _b	2/03	*	3	6/15	5	3(GII)	P2B	Hillingdon
03026	2/03	*	1	26/331	2	2(GI, GII)	P1A,	Chiba
							SOV	ND
							P2B	Hillingdon
03027 _b	2/03	*	1	2/2	1	1(GII)	GII	Hillingdon
03028 _b	2/03	*	1	3/3	1	1(GII)	P2B	Hillingdon
03034	2/03	*	1	3/3	3	3(GI, GII)	P1A,	Winchester,
Chiba							SOV	ND
							UT/GI	Sindlesham
							P2B	Hillingdon, Toronto
03035	2/03	*	1	6/6	2	1(GII)	P2B	KU82GII
03036	2/03	*	1	3/5	1	1(GII)	P2B	Toronto
03037	2/03	*	3	3/15	3	2(GI)	P1A	SzUG1
03039	2/03	飲食店	1	5/9	4	3(GI, GII)	P1A,	Chiba
							P2B	Fayetteville, Amsterdam
03040 _b	3/03	飲食店	3	5/9	4	2(GII)	P2B	Amsterdam
03042 _b	3/03	飲食店	2	20/47	1	1(GII)	GII	Amsterdam
03047	3/03	*	3	2/8	1	1(GI, GII)	P1A	Norwalk68,
							P2B	Amsterdam
03048 _b	3/03	*	3	*/*	1	1(GII)	GII	Seacroft
03050	3/03	*	2	27/62	7	4(GII)	P2B	KU82GII
03053	3/03	*	3	11/50	3	1(GII)	P2B	Toronto
03054 _b	3/03	*	1	3/6	2	2(GII)	P2B	Hillingdon
03055	3/03	イベント	2	157/283	2	2(GII)	P1B	Seacroft

a : 1.共通食にカキを含む, 2.食品, 3.不明

b : 他の年が関連しており、他にも患者から NV を検出している

c : 特定不可

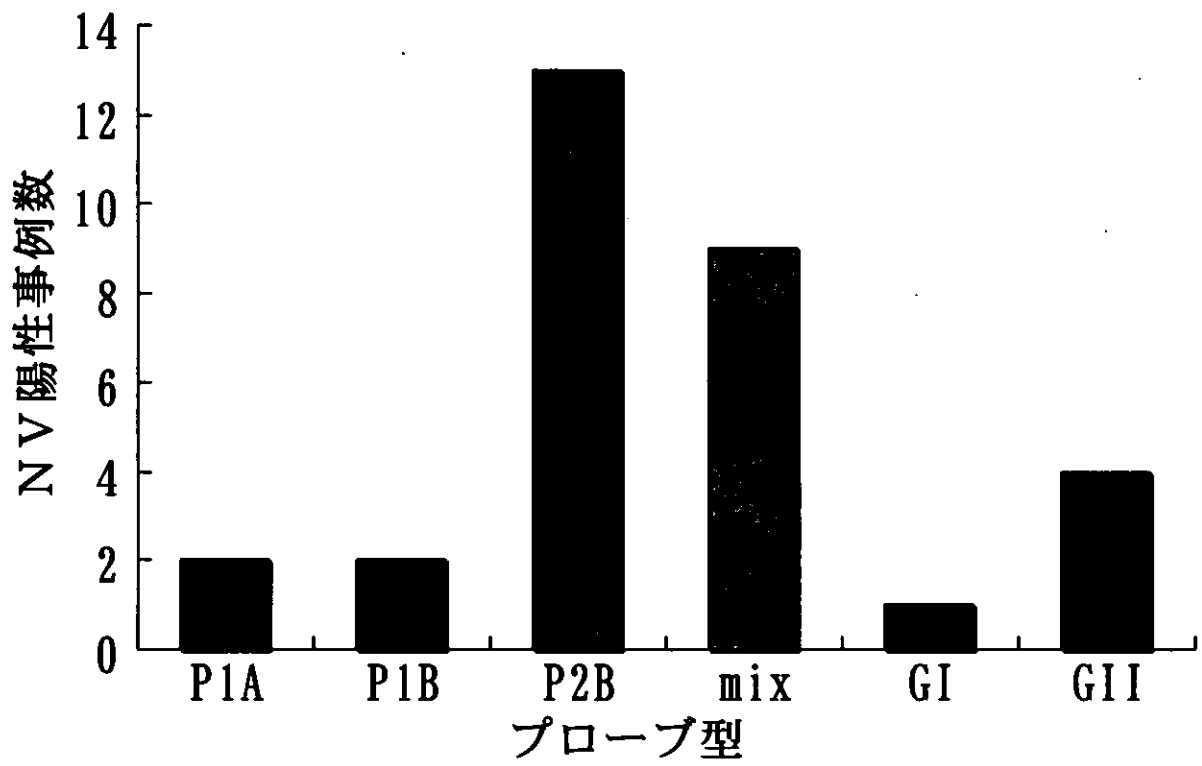
ND : not determined, UT : untype

表 2. ノロウイルスのプローブ型および遺伝子型の関係

Genogroup	プローブ型	Capsid N/S 領域における遺伝子型 ^a
GI	P1A	GI/1 (Norwalk68) , GI/5 (SzUG1) , GI/7 (Chiba) , GI/8 (Winchester)
	SOV	GI/4 (Southampton)
	Untype	GI/3 (Sindlesham) , GI/9 (Desert Shield)
GII	P1B	GII/8 (Seacroft) , GII/11 (Idaho Falls)
	P2A	GII/2 (Toronto)
	P2B	GII/1 (Bristol) , GII/2 (Toronto/Arg320) , GII/4 (Melksham) , GII/5 (Hillingdon) , GII/6 (Chitta) , GII/7 (Hawaii) , GII/10 (Amsterdam) , GII/14 (Fayetteville) , GII/15 (KU82GII)
	96065	GII/3 (Leeds)
	untype	GII/9 (Alphatron) , GII/12 (M7)

a : 平成 14 年度に検出された NV 株の遺伝子型は太字で示した。

図 1.



☒ 2A.

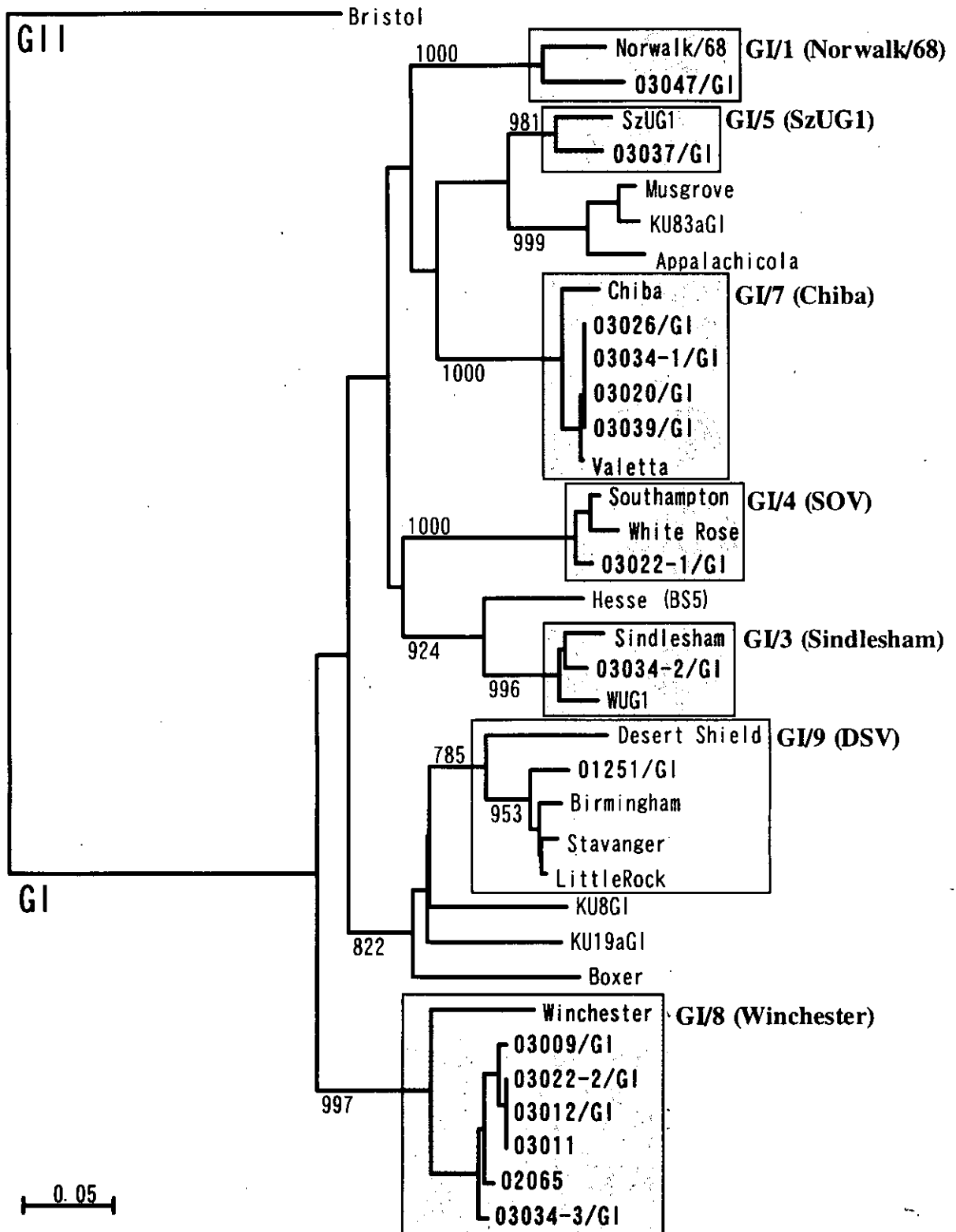


图 2B.

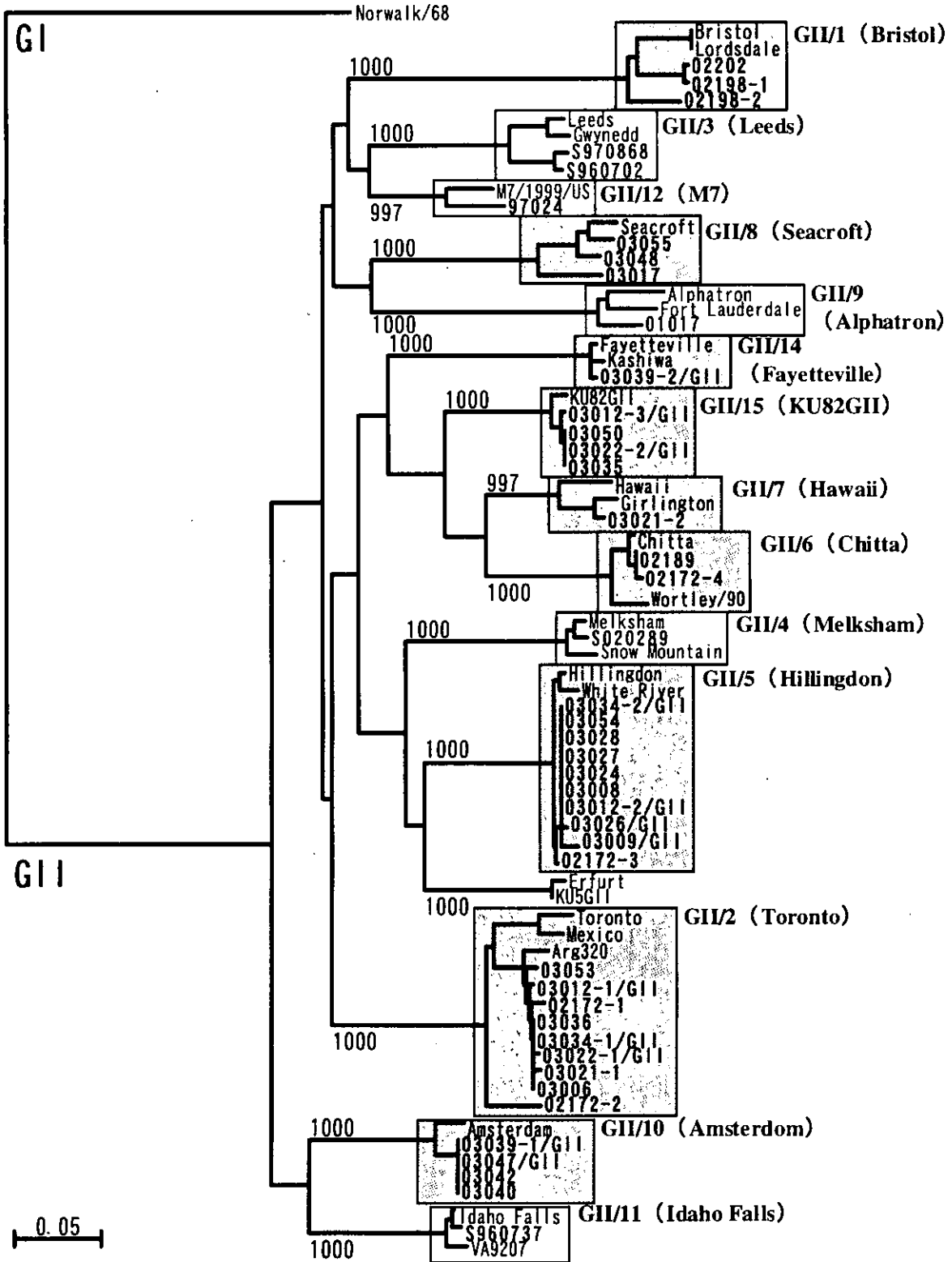




Figure Legends

図 1. 平成 14 年度に非細菌性胃腸炎事例から検出したノロウイルスのプローブ型
複数のプローブ型の NV が検出された事例は mix と表した。リアルタイム PCR のみで
陽性であり、プローブ型別できなかつた事例は GI または GII と示した (表 1、事例
番号 03008、03011、03027、03042、03048)。

図 2. 大阪市で検出された GI (A) および GII (B) NV 株の分子系統樹
分子系統樹は Capsid N/S 領域 (GI: 290 塩基、GII: 278 塩基) において近隣接合 (NJ)
法で作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示
した。大阪市で検出された NV 株が含まれるクラスターには、Katayama らの分類に基
づいて遺伝子型番号をつけた。

-  : 平成 14 年度に検出された NV 株が含まれるクラスター
-  : その他の NV 株が含まれるクラスター

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

分担研究者	西尾 治	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	山口 卓	国立感染症研究所感染症情報センター 現 財団法人日本冷凍食品検査協会
	秋山 美穂	国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨

リアルタイム PCR 法において、A 型肝炎ウイルス (HAV) 陽性のウチムラサキガイを用い、超遠心法、ポリエチレングリコールを用いた濃縮法 (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 つの前処理方法によるウイルス検出について、リアルタイム PCR 法で定量的検討を行った。その結果、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%、内溶液方法では 3~11% のコピー数が得られた。内溶液を用いた方法は、簡便ではあるがウイルスの回収率は低いことから、超遠心法およびポリエチレングリコールを用いた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。

A. 研究目的

貝類からの HAV の検出にはウイルス量が少ないことから、最も優れた前処理方法で行わなければならない。そこで現在、貝類等からのウイルス検出には超遠心法、PEG 濃縮法、内溶液法の 3 種類の方法が用いられている。そこで、リアルタイム PCR 法において、大型の貝であるウチムラサキ貝を用い、3 つの前処理方法によるウイルスの回収量について検討した。また、RT-PCR 法での HAV 検出も行い、リアルタイム PCR 法の検出を比較検討し、最も優れた方法を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

HAV 陽性の中国産ウチムラサキ貝 9 個を用い、そのうち 4 個を超遠心法と PEG 濃縮法の比較に、残り 5 個を超遠心法と内容液法の比較に用いた。

ウチムラサキ貝の中腸腺を摘出し、その中腸腺を 2 分割して、一方を超遠心法、もう一方を内溶液法または PEG 濃縮法で前処理を行った。

前処理方法 ①超遠心法

摘出した中腸腺に PBS を加え粉碎、10% 乳剤を作製し、10,000rpm. 20 分間冷却遠を行った。超遠心用遠心管に 30% ショ糖溶

液を遠心管量の10%程度入れ、そこに遠心上清を重層し、40,000rpm. 120分間冷却遠心を行った。液層を除去し、遠心管壁をPBSで洗浄後、水分を濾紙で除去した。MEMを150 μ l加え、沈査を再浮遊させた。

前処理方法 ②PEG濃縮法

摘出した中腸腺にPBSを加え粉碎、10%乳剤を作製し、10,000rpm. 20分間冷却遠心を行った。上清を遠心管にとり、PEG 6,000を8%、NaClを2.1g/100mlになるように加え、室温で2時間攪拌した。10,000rpm. 20分間冷却遠心を行い、液層を除去し、遠心管壁をPBSで2回洗浄後、水分を濾紙で除去した。MEMを150 μ l加え、沈査を再浮遊させた。

前処理方法 ③内容液法

中腸腺を遠心管にとり、ガラス棒で潰し、-70 $^{\circ}$ Cで凍結させ、40 $^{\circ}$ Cの温水で融解させた。10,000rpm. 20分間冷却遠心を行い、上清をチューブにとった。

各前処理方法を行った後、10,000rpm. 20分間冷却遠心を行い、上清をRNA抽出に用いた。RNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、抽出RNAは、DNase処理後、random hexamer (Amersham Pharmacia)を用いてSuperscript II (Invitrogen)で逆転写し、cDNAを合成した。

リアルタイムPCR法は、プライマーがHAV+449/HAV-557、プローブがHAV+482-P-FAMを用い、ABI PRISM 7000でコピー数を定量した。リアルタイムPCR法におけるコピー数の測定は、1件につき3

回を行い、3回を平均したコピー数で検出結果の検討を行った。

RT-PCR法のプライマーは、1st PCRではHAV+2799/HAV-3273、Nested PCRではHAV+2907/HAV-3162を用いた。RT-PCR法の増幅産物は、ダイレクトシークエンスを行い、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。

C. 研究結果

各前処理方法におけるリアルタイムPCR法による中腸腺1g当りのコピー数およびRT-PCR法によるHAV検出結果を表1.に示した。

リアルタイムPCR法において検出された中腸腺1g当たりのコピー数は、超遠心法9件が320~3300コピーの範囲、PEG濃縮法4件が120~360コピーの範囲、内容液法5件が20~100コピーの範囲であった。

検体番号1~4番の超遠心法とPEG濃縮法の比較について、超遠心法で検出されたコピー数を100%とした時のPEG濃縮法で検出されたコピー数の検出率を図1.に示した。PEG濃縮法では、超遠心法で検出されたコピー数の4~43%が検出された。

検体番号5~9番の超遠心法と内容液法の比較についても同様に図2.に示した。内容液法では、超遠心法で検出されたコピー数の3~11%が検出された。

RT-PCR法では、超遠心法は9件全て(100%)、PEG濃縮法は4件中2件(50%)、内容液法は5件中2件(40%)からHAVが検出された(表1)。

表1. 各前処理法におけるリアルタイム PCR による中腸腺 1g 当りのコピー数
および RT-PCR 法による HAV 検出結果

超遠心法と PEG 濃縮法の比較

No.	超遠心法		PEG 濃縮法	
	copies/g	RT-PCR 法	copies/g	RT-PCR 法
1	1400	+	350	-
2	3300	+	120	-
3	2000	+	360	+
4	600	+	260	+

超遠心法と内溶液法の比較

No.	超遠心法		内溶液法	
	copies/g	RT-PCR 法	copies/g	RT-PCR 法
5	830	+	88	+
6	2000	+	67	-
7	320	+	20	-
8	770	+	62	-
9	3200	+	100	+

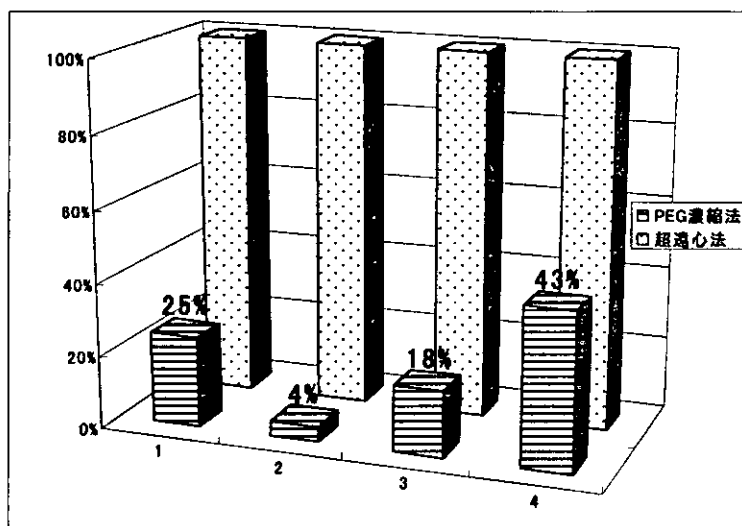


図1. 超遠心法で検出されたコピー数を 100%とした PEG 濃縮法のコピー数検出率

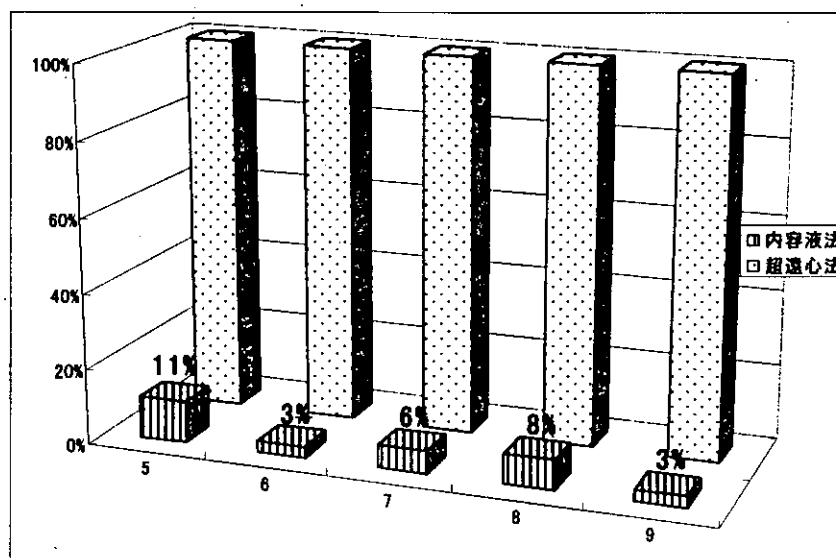


図2. 超遠心法で検出されたコピー数を100%とした内容液法のコピー数検出率

各前処理方法のRT-PCR法検出結果についてのリアルタイムPCR法で検出された中腸腺1g当たりのコピー数は、超遠心法ではRT-PCR法陽性が320~3300コピーの範囲の9件全て、PEG濃縮法ではRT-PCR

法陽性が260コピー、360コピー、陰性が120コピー、350コピー、内容液法ではRT-PCR法陽性が88コピー、100コピー、陰性が20コピー、62コピー、67コピーであった(表2)。

表2. RT-PCR法結果におけるリアルタイムPCR検出コピー数(copies/g)

前処理方法	RT-PCR法	
	+	-
超遠心法	320, 600, 770, 830, 1400, 2000, 2000, 3200, 3300	なし
PEG濃縮法	260, 360	120, 350
内容液法	88, 100	20, 62, 67

前処理方法が超遠心法の9件は、RT-PCR法の増幅産物を用いたダイレクトシーケンシングで塩基配列が決定し、VP1/2A領域の系統樹(UPGMA法)を図3.に示した。遺伝子型は9件全て1A型であり、検体番

号1、2、4、5、6、8が同一配列、3、9、7が同一配列であり、検出されたこれら2つの塩基配列は3塩基が異なるのみであった。

[GENETYX-MAC V11.0]

Method: UPGMA

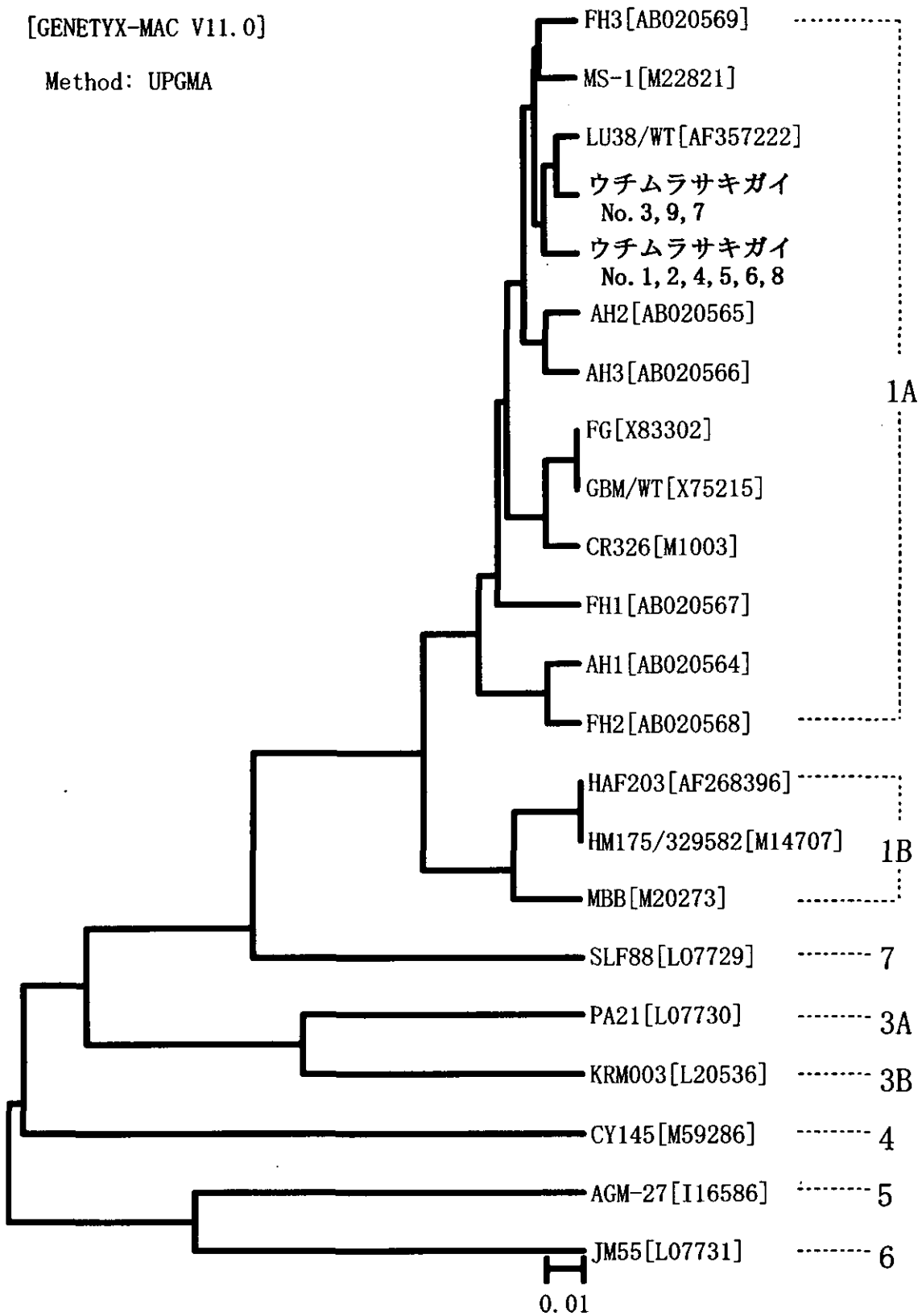


図3. ウチムラサキ貝から検出された HAV VP1/2A 領域の系統樹

D. 考察

大型の貝であるウチムラサキ貝を用いた超遠心法、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、各方法の優劣について検討した。その結果、超遠心法と PEG 濃縮法の比較では、4 件中 1 件が超遠心法で検出されたコピー数の 4%を示したが、3 件は 18%~43%を示し、リアルタイム PCR 法においてのコピー数測定時の誤差範囲内に入ると考えられ、PEG 濃縮法は、超遠心法とほぼ同等なコピー数が得られることが示された。超遠心法と内容液法の比較では、5 件全てについて超遠心法のほぼ 10%あるいはそれ以下のコピー数であった。内容液法は簡便ではあるが、超遠心法およびポリエチレングリコールに比べ、を用いた濃縮法が行えない場合の大型の貝類にのみ用いることが適切であると考えられた。

また、RT-PCR 法では、リアルタイム PCR 法でのコピー数が 88 コピーから陽性が見られ、100~350 コピーの間では陰性と陽性の両者が見られ、360 コピー以上では全て陽性となり、RT-PCR 法においてもコピー数が高い値になるほど検出率が上がるため、効率の良い前処理方法の選択が適切であると考えられた。内容液法では 88 コピー、100 コピーの低いコピー数でも RT-PCR 法で陽性を示し、リアルタイム PCR に比べ RT-PCR 法の方が前処理方法の違いにより、検出結果に影響を受けにくいと考えられた。このことは RT-PCR 法に用いる酵素が 1 種類に対し、リアルタイム

PCR では 2 種類であるため、抽出時に不純物が含まれると RT-PCR 法よりも反応が抑制されやすいことによると考えられた。

超遠心法は、リアルタイム PCR 法において他の 2 つの方法に比べると高いコピー数が得られ、また、RT-PCR 法およびダイレクトシーケンス法においても良好な成績が得られたことから、貝類では超遠心法で前処理を行うことが望ましいと考えられた。

中国産のウチムラサキ貝から検出された HAV の遺伝子型は 1A 型であり、アジアで通常見られる遺伝子型である。

E. 結論

リアルタイム PCR 法において、超遠心法と PEG 濃縮法では同等なコピー数が得られた。内容液法は超遠心法と比べ、10%以下のコピー数しか得られなかった。内容液法は、超遠心法およびポリエチレングリコールを用いた濃縮法が行えない場合の大型の貝類にのみ用いることが適切であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tomoko Nishida, Hirokazu Kimura, Mika Saitoh, Michiyo Shinohara, Masahiko Kato, Shinji Fukuda, Tetsuya Munemura, Toshiyuki Mikami, Ayumi Kawamoto, Miho Akiyama, Yumiko Kato, Kanako Nishi, Kunihisa Kozawa, Osamu Nishio: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese

Oysters. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69: 5782-5786.

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 Minh City, Vietnam. J Med Virol. 2003, 69: 588-594

Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. : Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. J Virol Methods. 2003, 114: 37-44.

2. 学会発表

新川奈緒美、秋山美穂、西尾治：吐物による感染が推察された Norovirus 集団胃腸炎事例、第 44 回臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月 26-27 日

杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、西尾治：Norovirus 感染により排泄されるウイルス量について、第 44 回臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月 26-27 日

森 伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、西尾治、岡部信彦：2002 年に感染症発生動向調査へ報告された A 型肝炎のまとめ、第 44 回臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月 26-27 日。

顔海念、柳生文宏、沖津祥子、西尾 治、牛島廣治：下痢症ウイルスの迅速診断法の開発—RT-multiplex PCR 法を用いた糞便検体からの、ノロウイルス (GI, GII), サボウイルス, アストロウイルスの同時検出。第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：全国各地で発生したノロウイルス (NV) による食中毒事例について、第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染状況。第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾 治：カキ及び養殖海域 NV 汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査。第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田厚、春木孝祐、西尾 治、綾田稔、小倉壽：平成 14 年度に大阪市で検出された Norwalk virus の遺伝子型別。第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤
本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、山口卓、
長谷川斐子、西尾 治：輸入生鮮魚介類
におけるウイルス汚染状況について。第
51 回日ウイルス学会、京都、2003 年 10
月 27-29 日

平成15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

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 片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

Grant A. Hansman 国立感染症研究所ウイルス第二部 研究生

小林慎一 愛知県衛生研究所ウイルス部 主任研究員

研究要旨

ノロウイルス (NV)、サポウイルス (SV) は依然として組織培養細胞および実験動物等で培養増殖が出来ないウイルスである。このことはこれらのウイルスの基礎研究および血清学的研究に支障を来していた。NV においては遺伝子組換えバキュロウイルス発現系を用いて形状および抗原性が変わらない中空粒子 (VLPs) が大量に作製できるようになり、ウイルス抗原や免疫血清が得られウイルス学的研究および患者からのウイルス検出法の開発等に利用されるようになった。我々はすでに NV 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 NV 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出されて来た。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、SV においても遺伝子型 I (G-I) 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。

A. 研究目的

ウイルスが原因と考えられる集団食中毒や施設内集団発生の胃腸炎が多く報告されている。原因ウイルスの同定には遺伝子検出法が用いられているが作業可能な実験室に限られている。簡便な方法として患者材料からの ELISA 法による病原体の検出法や、高力価免疫血清を利用した原因食品からのウイルス検出法などが開発されつつある。遺伝子検出・系統解析の進展によって、我々がすでに作製した株と血清学的に異なると思われる新たな NV 株が見い出された。それらの株

の VLPs 発現、高度免疫血清の作製を行なった。また、我が国においては未だ VLPs の発現には成功しておらず、大量の抗原および抗血清の入手は困難であった SV 株についても VLPs 発現を試み、G-I に属す 1 株で抗原および抗血清の作製が可能になった。

B. 研究方法

NV 株； 下痢症患者あるいは生力キから検出された NV 遺伝子の構造蛋白領域 (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 1 6 5 0 bp、あるいは ORF2 から 3' 末端の Poly-A までの約 2 3 0 0 bp 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 5 8 K 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。

SV 株; 胃腸炎患者からみい出された SV 株の構造蛋白をコードする領域を PCR で増幅し、組換えバキュロウイルスを作出して NV 同様に VLPs 発現を試みた。

C. 研究結果

NV 株; 遺伝子系統解析から G-I で 1 株、G-II で 4 株の発現候補株が選出され ORF2 あるいは ORF2+3 の遺伝子が増幅できた。遺伝子をクローニングしたのち組換えバキュロウイルスを作出して VLPs 発現を試みた結果、G-I=1 株 (# 8)、G-II=2 株 (NG1, NG15) で VLPs の発現が認められた。G-II の 2 株では構造蛋白の発現が確認できなかった。発現 VLPs を精製してウサギで免疫血清を作製した。すでに作製済みの NV 抗原、抗血清との ELISA 法による交叉反応試験の結果、新たに発現できた株は異なった血清型に分類された。

SV 株; SV のくわしい遺伝子系統解析が片山らによってなされ、SV においても G-I、G-II で数株の血清学的に異なると考えられる株の存在が示唆された。G-I に属す MC114

株、G-II の MC10, MC2, C12 および Sakyou 株の計 5 株で構造蛋白領域を増幅して NV 同様にバキュロウイルス発現系で VLPs の発現を試みた。MC10 では SV の構造蛋白である 6 0 K 蛋白の発現は認められなかったが、他の株では VLPs が電子顕微鏡で確認できた。しかしながら発現量は非常に少なく、得られる精製 VLPs の量は抗原および免疫原として使用するには困難であった。唯一、MC114 株で 50 ~ 150 ug の精製 VLPs が得られウサギで抗血清を作製できた。現在、高発現を示す組換えバキュロウイルスの作出を検討中である。

D. 考察と結論

NV の遺伝子系統解析によれば現在までに G-I は 1 4、G-II は 1 7 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、G-I = 6 株、G-II = 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 G-I = 6 種、G-II = 11 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 NV 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。

SV の VLPs 発現量は非常に少なく、NV の 100 分の 1 以下であった。MC114 株では約 100 ~ 200 ug の精製 VLPs を得ることができ、高力価免疫血清を作製できた。他の株では発現効率を上げるべく検討中であり SV の血清学的研究は今後の課題である。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) 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総会、2003 年 10 月、京都。

2) 高井玲子、福土秀悦、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」、第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月、京都。

3) 白土（掘越）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 と血清型物質との結合」、第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月、京都

2. 誌上発表

1) M. Tamura, K. Natori, M. Kobayashi, T. Miyamura, N. Takeda : Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. Arch. Virol. 148:1659-1670, 2003

2) Shinichi Kobayashi, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kenji Sakae : Immunomagnetic Capture RT-PCR for Detection of Norovirus from Foods Implicated in a Foodborne Outbreak. Microbiol. Immunol. 48:201-204, 2004

List of VLPs

VLPs	Genogroup	Cluster
1) r124	G-I	Norwalk
2) rCV	G-I	Chiba
3) r258	G-I	Southampton
4) r645	G-I	Desert Shield
5) rW18	G-I	W18
6) r#8	G-I	#8
1) r104	G-II	Lordsdale
2) r7K	G-II	94m7K
3) r445	G-II	94m7K
4) r47	G-II	97K47
5) r76	G-II	Hawaii (76)
6) r485	G-II	Hawaii (485)
7) r754	G-II	Snow mountain
8) r10-25	G-II	10-25
9) r809	G-II	Mexico
10) rSh5	G-II	Mexico
11) r18-3	G-II	Mexico
12) r336	G-II	Mexico
13) r1152	G-II	Mexico
14) r026	G-II	026
15) rNG-15	G-II	Now going
16) rU25	G-II	U25
17) rMC24	G-II	U25
18) rHiro	G-II	Hawaii
19) rKoma7	G-II	Now going
20) rNG-1	G-II	NG-1
21) rAlph23	G-II	Alphatron

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」
分担研究報告書

Sapovirus (SaV) ゲノム全長塩基配列の解析

分担研究者 片山和彦 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨

Sapovirus (SaV) は、Norovirus (NoV) に近縁なカリシウイルス科に属するウイルスで、小児の散発性非細菌性下痢症の病原ウイルスの一つである。現在、ゲノム全長塩基配列が決定された SaV は Cowden 株、Manchester 株、Bristol 株の3株のみである。このため、SaV の疫学的研究、基礎的研究は NoV に比べ遅れている。本研究は複数株の 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。

A. 研究目的

Sapovirus (SaV) は、Norovirus (NoV) に近縁なカリシウイルス科に属するウイルスで、小児の散発性非細菌性下痢症の病原ウイルスの一つである。現在、ゲノム全長塩基配列が決定された SaV は Cowden 株、Manchester 株、Bristol 株の3株のみである。ブタから分離された Cowden 株を除くと、人に感染した株はデータベース上に Manchester 株、Bristol 株しかな

く、SaV ゲノムの特徴を十分に解析できない。このため、SaV の疫学的研究、基礎的研究は NoV に比べ遅れているのが現状である。本研究は、新たに散発性ウイルス下痢症患者より検出した9株の SaV のゲノム全塩基配列を決定し、その特徴や heterogeneity の解析を行い、SaV の診断法や分子疫学、基礎的研究の基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

Manchester 株、Bristol 株の核酸アライメントから Sapo4130S 5' -MRA AAY GCC TAC AAA YTG GC-3' , 5' -Sapo4290S-GTT GGY ATH AAC ATG GAC WST KWC C-3' , Sapo5058A-5' -GCG AGA GCC TGG TCA TAG TT-3' を合成し、SaV 検出用プライマーとした (Manchester 株の 5' 末端塩基を 1 としてプライマーの 5' 末端の塩基がどこに位置するかを数字で表記した。また、S はセンスプライマーを、A はアンチセンスプライマーを意味する)。SaV 検出用 primer セットを用いた semi-nested RT-PCR によって、散発性ウイルス下痢症患者糞便検体をスクリーニングした。スクリーニングで得られた SaV ゲノムの構造蛋白質部分 929 塩基対または、769 塩基対の増幅産物を direct sequence し、データベース上に既報の株と Clustal W でアライメントを行い、Kimura 2-パラメータ法で遺伝学的距離を算出した後、近隣結合法 (NJ 法) で分子系統樹を作成した (図 1)。この分子系統樹から、Manchester 株 (MC) クラスターの Mc114 株、N21 株、Thai50 株、Thai74 株、Bristol 株 (Br) クラスターの Mc2 株、ChiangMai 株、Sakaew15 株、SakaiC12 株、そして、どちらのクラスターにも属さない NK24 株の以上 9 株を選択した。選択した 9 株は、決定した塩基配列を足がかりに、上流約 5 kb を下流約 3 kb を Long RT-PCR によって増幅し、primer walking 法による direct sequence で塩基配列を決定し

た。ゲノムの 5' 末端および 3' 末端は、RACE 法によって塩基配列を決定した。決定したゲノム全長塩基配列は前述と同様に、NJ 法による系統解析を施行した。分子系統樹の分岐点検定にはブートストラップを用いた。ゲノムリコンビネーションの解析には SimPlot プログラム (http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/Version1/SimPlot_Doc_v13.html#top) を用いた。

C. 研究結果

データベース上の 2 株と我々の 9 株のゲノム全塩基配列をアライメントし、Similarity plot 解析を行った結果、核酸相同性の平均は 64.7% であり、NoV のグループ間 identity 55% よりも高い値を示した。最も identity が高かったのは 5' 末端から 5100 塩基付近、次に 1500 塩基付近と 5' 末端約 40 塩基であった。特に、5100 塩基付近には、100 塩基ほどの幅で全ての株でほぼ完全に塩基配列が保存されている領域が存在した (図 2)。NoV はゲノムの 5' 末端約 30 塩基 (特に 18 塩基) が全長塩基配列の報告されている全ての株で高度に保存されている。また、5100 塩基付近にも 5' 末端 18 塩基と同じ塩基配列モチーフが存在することが知られている。しかし、SaV は NoV と異なり、5' 末端約 40 塩基の配列と、5100 塩基付近の塩基配列の相同性は低かった (図 3)。塩基配列の相同性は 5100 塩基付近を境に低下する傾向が認められた (前半約 70%,