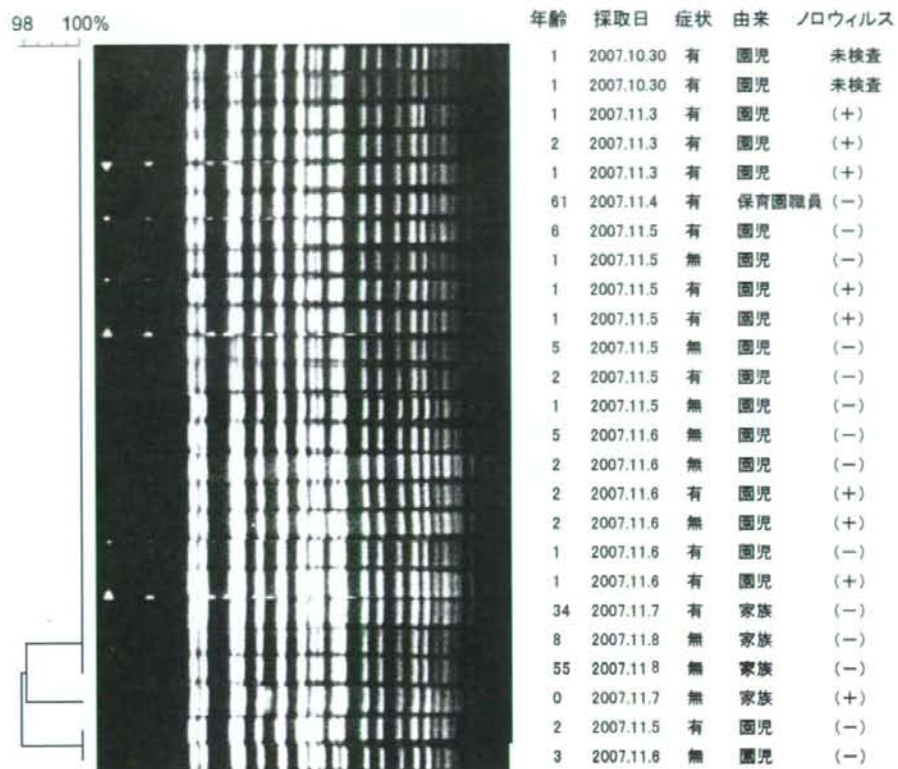


表 3. O-111 とノロウイルス (NV) の検出状況および臨床症状

No.	年齢	O-111	NV コピー数/糞便 1g	NV 遺伝子型	下痢	嘔気 嘔吐	腹痛	発熱
1	1	(+)	(+) $5.1 \times 10^{10}$	ND*	●	●		●
2	2	(+)	(+) $2.1 \times 10^7$	GII/4	●	●		●
3	2	(+)	(+) $3.0 \times 10^7$	GII/4	●	●		●
4	1	(+)	(+) $5.6 \times 10^8$	GII/4	●			●
5	1	(+)	(+) $5.1 \times 10^8$	ND*	●	●		
6	1	(+)	(+) $4.2 \times 10^6$	ND*	●	●		
7	1	(+)	(+) $1.4 \times 10^9$	ND*	●		●	
8	0	(+)	(+) $4.5 \times 10^5$	ND*				
9	2	(+)	(+) $1.4 \times 10^7$	ND*				
10	1	(+)	(-)	ND*	●			
11	2	(+)	(-)	ND*	●			
12	61	(+)	(-)	ND*		●		●
13	34	(+)	(-)	ND*		●		
14	2	(+)	(-)	ND*			●	
15	6	(+)	(-)	ND*			●	
16	1	(+)	(-)	ND*				
17	1	(+)	(-)	ND*				
18	2	(+)	(-)	ND*				
19	3	(+)	(-)	ND*				
20	5	(+)	(-)	ND*				
21	5	(+)	(-)	ND*				
22	8	(+)	(-)	ND*				
23	55	(+)	(-)	ND*				
24	0	(-)	(+) $1.0 \times 10^8$	ND*	●			
25	0	(-)	(+) $4.3 \times 10^7$	ND*	●			
26	1	(-)	(+) $9.8 \times 10^8$	ND*	●			
27	1	(-)	(+) $6.7 \times 10^8$	ND*	●			
28	1	(-)	(+) $5.4 \times 10^9$	ND*	●			
29	21	(-)	(+) $2.7 \times 10^8$	GII/4				
30	6	(-)	(-)	ND*	●	●		●
31	3	(-)	(-)	ND*		●		

ND\*: Not done

図2. EHEC O111分離株のPFGEパターン(Xba I)



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

2008年に発生したセレウス菌による2例の食中毒事例について

研究協力者 大分県衛生環境研究センター  
緒方喜久代 若松正人 成松浩志

## 研究要旨

2008年、大分県において2例のセレウス菌による食中毒事例が発生した。それらの分離菌株について、パルスフィールド電気泳動法(以下、PFGE)による分子疫学的解析を行い、その細菌学的相同性検討における有用性を検討した。また、PCR法によるセレウリド合成酵素遺伝子(以下、CRS遺伝子)保有の検査についても検討した。その結果、PFGEによる分子疫学的解析は、セレウス菌食中毒事例においても分離菌株の細菌学的相同性の検討に有用であり、PCR法によるCRS遺伝子保有の検査は、セレウス菌の嘔吐毒産生性のスクリーニング法として有効な手段と考えられる。

## A. 事例の概要

### (1) 事例1

平成20年8月7日、B市内の職場に勤務する者からT保健所に対し、「昼食に飲食店から焼きそばを出前してもらい食べたところ、数名が嘔吐等の症状を呈している」旨の連絡があり、T保健所は直ちに調査を実施した。聞き取り調査により、12時から13時に前日の焼きそばを摂食した4人全員が数時間後に吐き気、嘔吐、悪寒の症状を呈していたことが判明した。検査は、患者便3検体、食品(原材料)5検体について実施した。

### (2) 事例2

平成20年9月21日、福岡県保健医療介護部保健衛生課から食品安全・衛生課に対し、「福岡県内の店舗で販売されたおはぎ等を摂食した者が嘔吐・下痢等の症状を有している旨の情報を探知し、調査したところ、当該おはぎ等の製造施設が大分県K町であることが判

明した。」旨の連絡があり、S保健所は直ちに調査を実施した。聞き取り調査により、K町内の菓子製造業者が製造したおはぎ等を福岡県内2店舗および大分県内2店舗で購入・摂食した者のうち、福岡県在住者23名および大分県在住者4名の計27名が食中毒様症状を呈したことが判明した。検査は、患者便3検体、食品(残品)5検体について実施した。

## B. 研究方法

### 1. 分離および同定

症状や発症時間から黄色ブドウ球菌、セレウス菌について微生物検査必携に準拠し<sup>1)</sup>、培養検査を実施した。分離されたセレウス菌についてはデンブレン分解能およびPCR法によるCRS遺伝子保有の確認検査を行った。

### 2. PFGE法

分離菌株13株について、Liuらの方法に準じてプラグを作成し<sup>2)</sup>、制限酵素 *Sma* I

(30U)で30℃ 18時間消化後、CHEF DR III (Bio-Rad)を使用し、12℃、電圧 6V/cm、スイッチタイム 1-10秒で10時間、10-55秒で8時間の電気泳動を行った。サイズマーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 PulsNet Standard Strain を用いた。

## C. 研究結果

### 1. 分離状況および分離菌株の性状

#### (1) 事例 1

患者便 2 検体、食品(原材料)のぶた肉、玉ねぎ、カマボコからセレウス菌が検出された(表 1)。デンプン分解能陰性株は、すべて CRS 遺伝子を保有していた。患者便からは、嘔吐型セレウス菌と同時に下痢型セレウス菌も検出された。

#### (2) 事例 2

食品(残品)のおはぎ、よもぎもち、よもぎまんじゅう、丸めたあんこ、パット入りあんこからセレウス菌が検出された(表 2)。デンプン分解能陰性株は、すべて CRS 遺伝子を保有していた。

### 2. PFGE 型別

食中毒事例ごとに CRS 遺伝子保有株は、同一の PFGE パターンを示した(図 1)。食中毒事例 1 では、患者便から嘔吐型セレウス菌と同時に下痢型セレウス菌も検出されたが、それぞれ異なる PFGE パターンを示した。

## D. 考察

一般的に嘔吐毒産生株はデンプン分解能陰性とされているが、実際の嘔吐毒産生性の確認には培養細胞等による嘔吐毒の検査が必要である。しかし、培養細胞の準備や結果観察に熟練が要求され、迅速性や汎用性に

欠ける<sup>3)</sup>。そのため、PCR 法による CRS 遺伝子保有を確認する方法が導入され、迅速化に貢献している。デンプン分解能と PCR 法を組み合わせることにより、高い確率で嘔吐型セレウス菌を確認することができ、食中毒原因菌究明に役立つものと考えられる。一方、セレウス菌は環境中に広く存在する菌であるため、疫学的調査に科学的根拠を与えるためには、細菌学的比較は欠かせない。しかし、血清型別や生化学的性状試験が一般的ではなく、簡便かつ的確に比較する方法がない。今回、事例ごとや嘔吐型セレウス菌、下痢型セレウス菌で PFGE パターンが異なる結果が得られたことから、分離菌株間の比較に PFGE 法が有用な解析法であると考えられた。

## E. 研究発表

なし

## G. 参考文献

- 1) 厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版. 日本公衆衛生協会
- 2) Liu, P.Y., S.C. Ke, and S.L. Chen. Use of Pulsed-field Gel Electrophoresis To Investigate a Pseudo-Outbreak of *Bacillus cereus* in a Pediatric Unit. *J. Clin. Microbiol.* (1997) 35: 1533-1535
- 3) 江下倉重、内村眞佐子: セレウス菌嘔吐毒検査法の検討. 千葉県衛生研究所年報, 54, 70-72 (2005)

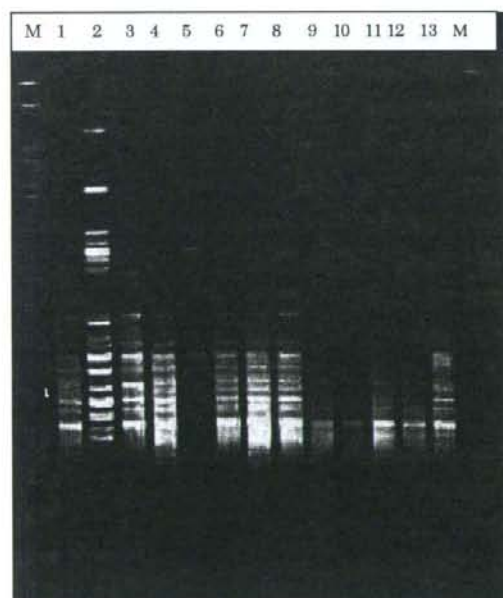
表1 食中毒事例1から検出されたセレウス菌

No.	由来	デンプン分解能	CRS 遺伝子の保有	備考
1	患者便	-	+	
	患者便	+	-	エンテロトキシン検出
2	患者便	-	+	
	患者便	+	-	エンテロトキシン検出
F4	ぶた肉	-	+	菌数 30/g
F5	玉ねぎ	-	+	菌数 30/g
F6	カマボコ	-	+	菌数 870/g

表2 食中毒事例2から検出されたセレウス菌

No.	由来	菌数/g	デンプン分解能	CRS 遺伝子の保有	備考
1	おはぎ	$2.7 \times 10^4$	-	+	
2	よもご入りあんこ餅	$2.9 \times 10^7$	-	+	黄色ブドウ球菌 $9.6 \times 10^4$ /g コアグラールセIV型、エンテロトキシンA産生
3	よもぎ万十	$5.7 \times 10^2$	-	+	
4	丸めたあんこ	$7.5 \times 10^4$	-	+	
5	バット入りあんこ	$3 \times 10^3$	-	+	

図1



*S. Braenderup*(H9812)

- 1.食中毒事例1患者便 1-1
  - 2.食中毒事例1患者便 1-2(下痢型)
  - 3.食中毒事例1患者便 1-5
  - 4.食中毒事例1患者便 2-1
  - 5.食中毒事例1患者便 2-8(下痢型)
  - 6.食中毒事例1食品 F4-1
  - 7.食中毒事例1食品 F5-1
  - 8.食中毒事例1食品 F6-1
  - 9.食中毒事例2 食品 1-12
  - 10.食中毒事例2 食品 2
  - 11.食中毒事例2 食品 3
  - 12.食中毒事例2 食品 4
  - 13.食中毒事例2 食品 5
- S. Braenderup*(H9812)

平成 20 年度 厚生労働省新興再興感染研究事業  
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」  
研究分担報告書

組換えサポウイルス粒子および単クローンの作製とその応用

研究分担者 武田 直和 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

**要旨** サポウイルス(Sapovirus, SaV)の遺伝子型と抗原性の関係を明らかにするために、SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVの組換え粒子(VLPs)を発現し、高力価血清ならびに単クローン抗体を作製した。VLPsとその抗血清の交差反応性を抗原ELISAで解析した結果、遺伝子群特異的単クローン抗体、遺伝子型特異的単クローン抗体、および全てのSaV VLPと反応する単クローン抗体が得られた。

研究協力者 田中智之(堺市衛生研究所)、北元憲利(兵庫県立大学) 岡 智一郎(国立感染症研究所)

**A. 研究目的**

ヒトカリシウイルスはノロウイルス属(Norovirus, NoV)およびサポウイルス属(Sapovirus, SaV)に分類され、両者はさらに多数のGenogroup(G)に分類されている。NoV感染の検出法として、現在、遺伝子学的検出法と免疫学的検出法が用いられている。両者を比較した場合、遺伝子学的方法(PCR法)は、感度および特異性の点で優れており、リアルタイムPCR法などを用いれば、かなり迅速性も増してきてはいる。しかし、操作が煩雑で手間と技術が必要とされている。一方、免疫学的方法は感度の点で遺伝子学的方法にはやや劣るものの、迅速、簡便で経済的にも優れ、多検体が同時に検出できる一次スクリーニングには適している。この免疫学的手法に、より広範囲に交差反応する単クローン抗体を加えれば、さらに感度が高くなることが期待される。

SaVも頻度は低いものの、感染性胃腸炎の重要な原因ウイルスとして知られている。SaVはNoV同様、遺伝子学的には極めて多様で、現在までにGenogroup IからVまで5つのグループに分類されている。こ

のうちヒトからはGI、GII、GIV、GVの遺伝子群が検出され、さらにこれら遺伝子群にはいくつかの遺伝子学的に異なる遺伝子型が存在する。SaVに関しては、遺伝子学的な検出法はあるものの、免疫学的な診断法が確立されているとはいえない。そこで、今回はSaVの簡便・迅速・経済的・多検体検出可能な診断法を開発する目的で、SaV VLPsの作製とそれらに対する単クローン抗体の調製を試みた。

**B. 材料と方法**

SaVによる集団発生事例から患者糞便を採取し、10%乳剤を調製した。さらに定法どおり、RNA抽出、cDNA合成、PCRによる増幅と遺伝子解析、系統解析による遺伝子型の同定、構造蛋白領域の増幅とクローニング、組換えバキュロウイルスの作製と構造蛋白発現を経てVLPsを作製した。ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法でVLPsを精製して免疫源として用いた。交差反応は免疫源を固相化した抗体ELISA法、高力価血清を固相化した抗原ELISA、およびウエスタンブロット法で検討した。

**C. 結果**

1) 系統樹解析

発現に用いるSaVの遺伝子型を同定するために

VPIからpoly(A)までのゲノムRNA3'末端の約2.6kbをRT-PCRで増幅し、その塩基配列を決定した。本研究で構築した日本版カリシネット (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/calici/>) を利用して得られた配列の分子系統解析を行い、発現する遺伝子型が、GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVであることを確認した。SaV GIVとGVに関しては現在までに検出された遺伝子型は一つである。

#### 2) SaVの抗原性

GI/1に対して5クローン、GI/5に対して3クローン、GII/3に対して2クローン、GIV/1に対して2クローン、およびGV/1に対して8クローンの単クローン抗体を得た。GI/1、GI/5、GII/3、GIV/1およびGV/1を固着化したELISA法により各抗体の反応性を調べたところ、交叉反応性が異なるクローンが存在することが分かった。

#### 遺伝子型特異的な単クローン抗体

SaV VLPs株に特異的な抗体、すなわち、GI/1に対する抗体として4クローン、GII/3に対する抗体として2クローン、GIV/1に対する抗体として2クローン、GV/1に対する抗体として7クローンを得た。

#### 遺伝子群特異的な単クローン抗体

GI/5に対する2クローンはGI/1およびGI/5に交叉反応を示すことからGenogroup特異的と考えられた。

#### 全てのSaV VLPsと反応する単クローン抗体

GI/5に対する1クローンは、全てのGenogroupの株に交叉反応性を示した。

#### D. 考察

SaVの全ての遺伝子群間で交叉反応を示す単クローン抗体が得られた。ただ、株の違いにより多少反応性の強弱があり、特にGIIに対しては反応性が弱い傾向がみられた。前回、別の時期に作製された同株のGII/3(Syd53)について検討した際にもその傾向がみられ、また、VLPsがハーフサイズに切れやすい傾向がみられている。この単クローン抗体はSaVの共通領域を認識したとみられるが、その領域は変

化しやすいか、コンフォメーションなエピトープ領域なのかもしれない。今後、ほ乳動物のベクターで作製されたGII-VLPsを使用して検討する予定である。

GIに特異性のある抗体を得ることができたが、GI/1およびGI/5の2株で調べただけであり、GIに特異的かどうかはさらにGIの株を増やして検討する必要がある。遺伝子群に特異的な抗体を用いれば、既存のノロウイルスの診断キット(GIおよびGIIを区別)のように遺伝子群の鑑別診断に利用することも可能である。

#### D. 結論

1. SaVGI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVのVLPsを発現し、遺伝子型特異的、遺伝子群特異的単クローン抗体を作製した。

#### E. 研究業績

##### 1) 論文発表

- Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2009. Ultimate Mutational Analysis of Norovirus 3C-like Protease. *J Biochem*: in press.
- Okamoto R, Arita T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T, 2009. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jan J Infect Dis*: in press.
- Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Hansman GS, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2009. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol*: in press.
- Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T, 2009. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of

sapovirus strains between 2002 and 2007 in the Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol*: in press.

Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF, 2008. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 14: 1169-71.

Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N, 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82: 10756-67.

Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62.

Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T, 2008. Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61: 504-6.

Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y, 2008. Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46: 2406-9.

Hansman GS, Oka T, Takeda N, 2008. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res* 137: 261-5.

## 2) 学会発表

Shirato H, Someya Y, Li T, Wakita T, Takeda N,

Miyamura K, 2008.10. Development of Inactivated Polio Vaccine in Japan. Milieu Foundation Vaccine Workshop. Tokyo, Japan.

Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, Takeda N, 2008.10. Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases. Hanoi, Vietnam.

Oka T, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on apovirus ORF1 polyprotein processing. IUMS2008. Istanbul, Turkey.

Oka T, Iwakiri A, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Sequential analysis of fecal sapovirus shedding. IUMS2008. Istanbul, Turkey.

Katayama K, Hansman GS, Oka T, Suzuki Y, Wakita T, Takeda N, 2008.8. Newly identified human norovirus Sa299 strain may be recombinant between one genogroup and the other. IUMS2008. Istanbul, Turkey.

Hung P, Kao C, Chang S, Huang L, Takeda N, Lee C, 2008.8. The Seroepidemiology of Norovirus in Taiwan Established by ELISA Using E.coli-Expressed Capsid Antigen IUMS2008. Istanbul, Turkey.

本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Grant H, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 星野和彦, 蒔本恭, 秋山美穂, 木村博一, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2008.10. ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.

北島正章, 岡智一郎, 片山和彦, 原本英司, 片山浩之, 武田直和, 大垣眞一郎, 2008.10. 河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.



- 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字, 武田直和, 2008. 10. リバースジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 武田直和, 2008. 10. 食品媒介性ウイルス感染症の現状と対策. 第 30 回日本食品微生物学会学術セミナー. 静岡.
- 飯塚節子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 2008. 10. サボウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 隆 佐, 亀山昭彦, 久 成, 脇田隆字, 石井孝司, 武田直和, 2008. 10. ノロウイルスによる血液型抗原の識別. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 東方美保, 斎藤博之, 田中智之, 武田直和, 2008. 10. 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 田村務, 西川眞, 野田衛, 田中智之, 武田直和, 鈴木宏, 2008. 10. 急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2008. 10. ノロウイルス 3C 様プロテアーゼ Glu54 残基変異の基質認識への影響. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 森嘉生, 山下哲夫, 嶋亮一, 森石恆司, 李天成, 武田直和, 松浦善治, 2008. 10. 型肝炎ウイルス様粒子形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 植木洋, 庄司美加, 山本美和子, 阿部勝彦, 伊藤文明, 池田義文, 西尾治, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 2008. 10. カキを用いたサボウイルスの環境調査. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 小澤一弘, 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 中村浩美, 守宏美, 佐藤裕徳, 武田直和, 2008. 10. 調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 山下哲夫, 宮崎直幸, 森嘉生, 森石恆司, 李天成, 宮村達男, 武田直和, 吉村政人, 月原富武, 善治 松, 2008. 10. 分解能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 三好龍也, 武田直和, 田中智之, 2008. 10. GII/4 型ノロウイルス P particle の発現と血液型抗原との結合. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 斎藤博之, 東方美保, 田中智之, 武田直和, 2008. 10. 食品からのノロウイルス回収を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 高木弘隆, 遠矢幸伸, 片山和彦, 岡智一郎, 武田直和, 杉山和良, 2008. 10. 国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, 八尋俊輔, 西村浩一, 松尾繁, 中島龍一, 篠崎邦子, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. サボウイルスによる散发性下痢症の地域流行-熊本-. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石崇, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. 長野県内で発生したサボウイルスによる集団感染性胃腸炎の 2 事例. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 岩切章, 山本正悟, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 2008. 10. リアルタイム RT-PCR 法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサボウイルス排泄期間の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山.
- 加藤大介, 三好龍也, 内野清子, 鎌田公仁夫, 高橋幸三, 武田直和, 田中智之, 2008. 10. 改良 Immunochromatography 法によるノロウイルス抗

原検出。第56回日本ウイルス学会学術集会。岡山。

岡智一郎，横山勝，片山和彦，恒光裕，山本真民，  
宮下佳奈，本村和嗣，守宏美，中村浩美，脇田  
隆字，佐藤裕徳，武田直和，2008.10. カリシウ  
イルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断  
部位上流アミノ酸残基の解析。第56回日本ウイ  
ルス学会学術集会。岡山。

横山勝，岡智一郎，片山和彦，山本真民，宮下佳  
奈，神田忠仁，武田直和，佐藤裕徳，2008.10.  
サボウイルスプロテアーゼの基質認識に関わる

アミノ酸残基の解析。第56回日本ウイルス学会  
学術集会。岡山。

#### F. 健康危機情報

なし

#### E. 知的財産の出願、登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業  
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」  
分担研究報告書

ノロウイルス P particle の発現と血液型抗原との結合

研究分担者 田中 智之 ( 堺市衛生研究所 )  
研究協力者 三好 龍也 ( 堺市衛生研究所 )  
武田 直和 ( 国立感染症研究所ウイルス第二部 )

研究要旨:

大腸菌発現系を用いて GII/4 変異型ノロウイルス (2006b 型) のカプシド蛋白の一部である P ドメインを発現させた。発現された P 蛋白は、FPLC の結果より粒子状 (P particle) であることが示された。この P particle を用いて唾液中の血液型抗原との結合を調べたが、今回の検体では結合はみられなかった。

大腸菌発現系は、昆虫細胞発現系よりも簡便で、コストも低い。抗原性の異なったノロウイルスが出現した場合、この発現系を用いることにより比較的簡易にウイルス抗原の解析が可能である。また、受容体抗原決定基に対する抗体の作製は、新たなウイルス抗原検出法の構築が可能であり、既存検出系の評価にも利用可能で、有用なツールであると考えられる。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) には、効率よく増殖する細胞培養系が確立されていない。そのため、組換えバキュロウイルスを用いてウイルス様粒子 (VLPs) が作製され、抗原性の解析や抗血清作製時のウイルス抗原として利用されている。これらから得られた抗体を用いて、NV 抗原検出の ELISA 法やイムノクロマト法が構築され、大いに活用されている。VLPs を用いた NV 受容体の解析結果より NV が血液型抗原と結合することが判明し、血液型物質がウイルスレセプターであることが示唆された。

NV のカプシド蛋白には、粒子内部を形成する Shell (S) ドメインと粒子の外部表面側の Protruding (P) ドメインの 2 つのドメインが存在している。P ドメインのみを大腸菌を用いて発現させると、大量の P particle (P 粒子) が発現され、血液型抗原との結合性の解析に利用されている。

一方、2006/2007 年 NV 流行シーズンでは、日本国内で NV による食中毒や施設内集団感染事例が数多く発生した。また、ヨーロッパやアメリカ合衆国などの多く国々でも同様に感染事例の増加が報告され、特に、GII/4 型 NV の関与が重要視された。このシーズンの大流行は、以前ま

で流行していた GII/4 型が変異した GII/4 変異型 NV が原因であったことが判明した。今回、この GII/4 変異型 NV の P particle の作製を試み、レセプター候補である血液型抗原との結合性を解析し、この NV 大流行の原因について検討した。

## B. 研究材料と方法

### 1. 材料

NV P particle 作製には、2006 年 10 月に堺市内で発生した集団感染事例の患者糞便から検出された GII/4 変異型 NV (2006b 型) を用いた。NV と唾液中の血液型抗原との結合を調べるため、血液型 A、B、O 型のヒト唾液各 1 検体、非分泌型のヒト唾液 1 検体の合計 4 検体を用いた。

### 2. 方法

#### (1) NV P 粒子の作製

10%糞便懸濁液から RNA を抽出し、RT-PCR により P ドメイン領域を増幅させた。増幅断片を pGEX-4T-1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) に組み込み、大腸菌 (BL-21) に導入し、GST 融合蛋白として発現させた。発現したタンパク質は、グルタチオン担体を用いて精製後、Thrombin によるプロテアーゼ消化、FPLC による分離を行い、P particle の発現を行った。

#### (2) 唾液中の血液型抗原との結合測定

唾液サンプルを固相したプレートを使った Saliva binding ELISA 法で評価した。すなわち、熱処理を行った唾液サンプルをマイクロプレート上に 4°C、オーバーナイトで固相化し、P particle と 37°C、60 分反応させた。洗浄後、1 次抗体として抗 NV モルモット抗血清を用い、2 次抗体と

して抗モルモット HRP 標識ヤギ血清を用いた。TMB 基質と反応後、OD 値を測定し、血液型抗原との結合を評価した。

## C. 結果

大腸菌発現蛋白から大量の P ドメイン蛋白を作製することができた。FPLC 及び SDS-PAGE の解析結果より P particle と P dimer と考えられるピークがみられ、多量の P particle の形成が示唆された (図 1)。

この得られた P particle を用いた Saliva binding ELISA では、今回の NV/GII/4 変異型は A、B、O 型、非分泌型、すべての型との結合はみられなかった (図 2)。

## D. 考察

NV と血液型抗原との結合については、ウイルス株によっていくつかの結合パターンが存在することが報告されており、GII/4 型 NV は A、B、O 型と結合すると報告されている。しかし、今回発現した P particle では血液型抗原と結合しなかった。2006/2007 年シーズンの GII/4 変異型 NV による大流行は、宿主側の要因や変異ウイルス自体の要因などが推測されているが、血液型抗原との結合パターンの変化がレセプターの変異を誘導し、それが感染拡大の要因になったかどうかは不明である。

今後、対象のウイルス株を増やし、さらに解析を行い、ウイルスの変異と流行について検討の検討が課題として残った。

現在、NV のウイルス抗原を得るために組換えバキュロウイルスを用いてウイルス様粒子 (VLPs) が作製され、抗原性の解析や抗血清作製時のウイルス抗原とし

て利用されている。この方法は、ネイティブなウイルス粒子に近い VLPs を多量に得ることができる非常に有用な方法である。一方、大腸菌発現系は、昆虫細胞発現系よりも簡便で、コストも低く、非常に多くのタンパク質を得ることができる。P particle 蛋白は NV の結合性(受容体)抗原決定基をさらに絞り込めて認識する抗体、特にモノクローナル抗体の作製につながり、より感度や特異性の高い抗原決定基の測定系の開発に繋がると思われる。また、既存のウイルス抗原検出法の評価にも利用でき、有用なツールであると考えられる。

NV は 2 つの Genogroup (GI、GII) があり、さらに GI で 14、GII で 19 以上の遺伝子型が存在し、遺伝学的にも抗原的にも多様なウイルスである。今後、新しい遺伝子型や抗原性の異なったノロウイルスが出現する可能性は十分考えられる。その場合、この発現系を用いることにより比較的簡易にウイルス抗原の解析が可能であると考えられる。

今後は、バキュロウイルス発現系では発現困難な株について、この方法で発現を試み、ウイルス抗原解析や免疫源としての利用法について検討していきたい。

#### E. 結論

GII/4 変異型 NV について P particle の発現を行った。この P particle を用いて唾液中の血液型抗原との結合を調べたが、A、B、O 型、非分泌型、すべての型に結合はみられなかった。この発現系を用いた NV 抗原の発現は、簡便性、コスト面において他法より有用な方法であると考えられる。

また、発現されるウイルス蛋白はウイルス抗原の解析のみならず、作製される抗体を用いてより感度・特異性の高い NV 抗原検出系が構築されるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 誌上発表

- (1) Kazushi Motomura, Tomoichiro Oka, Masaru Yokoyama, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori Hiroataka Ode, Grant S.Hansman, Kazuhiro Katayama, Tadahito Kanda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sato and the Norovirus Surveillance Group of Janan include Shima Yoshizumi, Toshiyuki Mikami, Hiroyuki Saito, You Ueki, Takenori Takizawa, Kiyoko Uchino, Mamoru Noda, Reiko Kondo, Yumiko Matsuoka, Sadayuki Funatsumaru and Shinichi Kobayashi

Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 20006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolution history. *J.Virol.*200 8; 82(222), 11247-11262.

- (2) Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka

Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossedbred Inobuta into boar populations. *Mammal Study* 33: 43-49 (2008)

(3) Tajiri H, Kiyohara Y, Tanaka T, Etani Y, Mushiaki S

Abnormal computed tomography findings among children with viral gastroenteritis and symptoms mimicking acute appendicitis.

Pediatric Emergency Care. 24(9):601-4. (2008)

(4) 田中智之 ノロウイルス胃腸炎の診断と予防指針 総合臨床 2880; 57(7), 2002-2003

(5) 田中 智之 各種迅速診断法 消化管の感染症 2) ウイルス性胃腸炎 Medical Technology 36(13); 1393-1399, (2008)

## 2) 学会発表

(1) Tomoyuki TANAKA<sup>1)</sup>, Daisuke KATO<sup>2)</sup>, Kunio KAMATA<sup>2)</sup>, Tatsuya MIYOSHI<sup>1)</sup>, Kiyoko UCHINO<sup>1)</sup>, Hisaaki YOSHIDA<sup>1)</sup>, Hitoshi TAJIRI<sup>3)</sup>, Masumi OKUDA<sup>4)</sup>, Yoshiko NAKAYAMA<sup>5)</sup>, Yoshiro HIRAYAMA<sup>2)</sup>, Noritoshi KITAMOTO<sup>6)</sup>, Grant S. Hansman<sup>7)</sup> and Naokazu TAKEDA<sup>7)</sup>

A First Authorized Immunochromatography Kit for Rapid Norovirus Diagnosis

The 7<sup>th</sup> China Japan International Conference of Virology 2008, Tokyo

(2) 三好龍也、武田直和、田中智之

GII/4 型ノロウイルス Particle の発現と血液型抗原との結合

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(3) 田村 務、西川 眞、野田 衛、武田直和、田中智之、鈴木 宏

急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(4) 高橋幸三、三好龍也、内野清子、田中智之

自動核酸抽出機を用いたノロウイルス遺伝子検出の試み

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(5) 加藤大介、三好龍也、内野清子、鎌田公仁夫、高橋幸三、武田直和、田中智之

改良 Immunochromatography 法によるノロウイルス抗原検出

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(6) 東方美保、斉藤博之、田中智之、武田直和

食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性の検討

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(7) 斉藤博之、東方美保、田中智之、武田直和

食品からのノロウイルス回収を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(8) 本村和嗣、横山 勝、岡智一郎、中村浩美、守 宏美、GRANT Hansman、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本 恭、秋山美穂、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳

ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行

の分子機序

第 56 回日本ウイルス学会学術集会

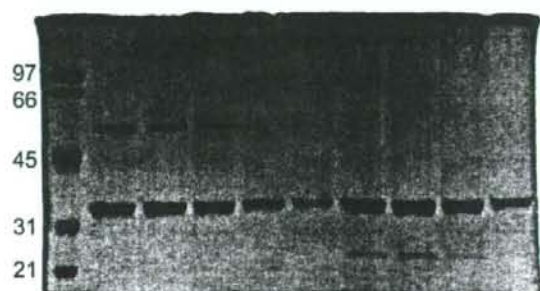
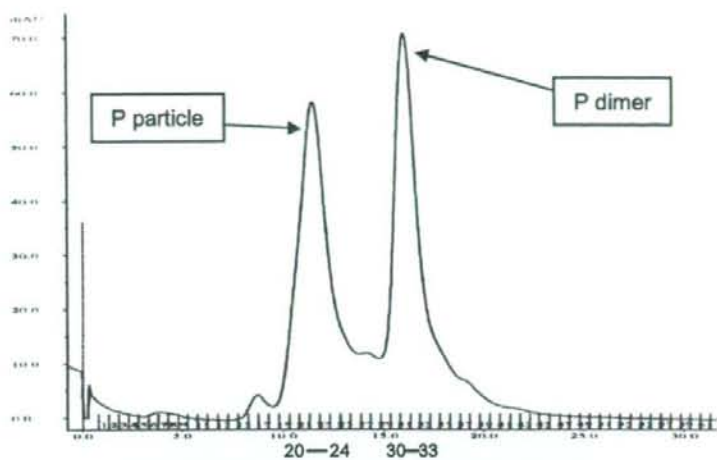
2008 年 10 月 岡山市

- (9) 田尻 仁、恵谷 ゆり、田中智之  
胃腸炎入院例を対象としたイムノクロ  
マト法によるノロウイルス検出キット  
に関する検討

第 40 回日本小児感染症学会総会・学術  
集会 2008 年 11 月 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願中

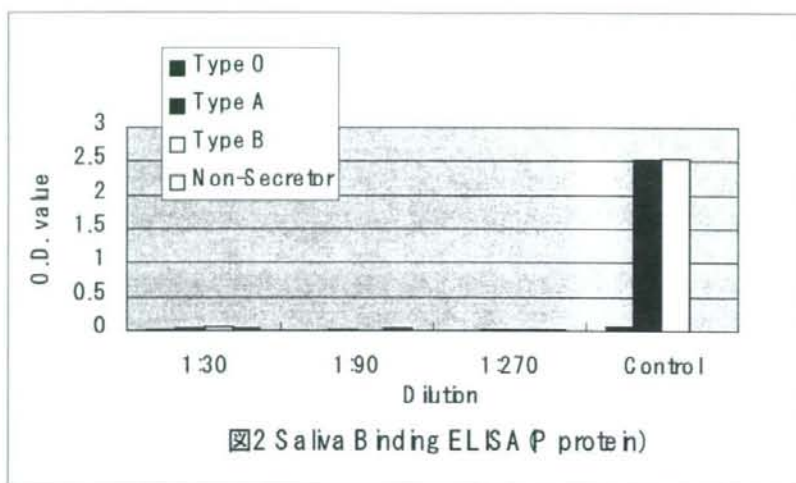


M 20 21 22 23 24 30 31 32 33

Fraction number

図1 FPLCの結果





## カリシウェブの整備

研究分担者 染谷雄一、片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**要旨** ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。しかし、遺伝子型の判定基準の策定は探索の段階にある事に加え、データベース上の NoV、SaV の塩基配列データは、日々新規登録、更新が行われ、刻々と変化している。本年度は遺伝子解析に用いるカリシウェブのフロントページおよび CaliciWeb 骨格デザインを構築した。

研究協力者 三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、約 7500 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。NoV のゲノムには 3 つの蛋白質コード領域 (open reading frame; ORF) が存在しており、ORF1; 非構造蛋白質、ORF2; 構造蛋白質 1 (VP1)、ORF3; 構造蛋白質 2 (VP2) をコードしている。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づきいくつかのグループ、遺伝子型に分類されている。これまでに、非構造蛋白質の RNA 依存性 RNA 合成酵素 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp もしくは polymerase) をコードする領域を用いた遺伝子型分類や、VP1 領域を用いた遺伝子型分類が報告されている。特に我々の構築した VP1 領域を用いた遺伝子型分類は、NoV 粒子の抗原性をよく反映するため、遺伝子型分類の主流となってきた。

最近、流行の主流を担っている NoV は、VP1 領域のタイピングによって GII/4 に分類されるウイルスである。オランダの研究グループは、この GII/4 を細分化するため RdRp 領域を用いたタイピングを行い、流行株を区別している。彼らは、RdRp の遺伝子配列の違いが NoV の複製効率に関与し流行株出現の一因となる可能性を示唆し、RdRp によるタイピング

を推進しようとしている。NoV は RdRp 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換え (リコンビネーション) を起こすことが知られている。この領域は ORF1, 2 junction と呼ばれており、リコンビネーションのホットスポットとして認知されている。NoV のゲノムリコンビネーションは、NoV の宿主への適合やウイルス病原性の変化等を理解する上で重要な現象だが、NoV の遺伝子型分類を混沌とした状態に陥れている。リコンビナント株は ORF1, 2 junction 上流の RdRp 領域を用いた遺伝子型分類と、下流の VP1 領域を用いた遺伝子型分類で異なる結果を与えるからである。ゲノムリコンビネーションの問題は、NoV ばかりでなく、サポウイルスにも認められており、カリシウイルス科の特徴である可能性がある。

本研究では、世界三大データベース (DDBJ, Genbank, EMBL) 上に点在しているカリシウイルスゲノムデータを集積し、サブデータベースをカリシウェブ上に作製すること、このサブデータベースをウェブ上で共有することにより、日本国内ばかりでなく、世界のカリシウイルス研究者が共通の情報を元に遺伝子解析ができるように解析ツールを備えたウェブページの作成を試みた。本年度はデータベース操作性改善、ゲノム解析ツールの登載に備え、カリシウェブのフロントページデザインの改良を試みた。

## B. 材料と方法

昨年度作製し、実装したオートパイロットプログラムにより、カリシウイルスのデータをサブデータベース化することに成功した。また、実装した検索ツールによりサブデータベース内から任意のデータをキーワードなどにより抽出し、スプレッドシートとして出力する事も可能となった。しかし、CaliciWebのフロントページデザイン、データベースのデザインは初期段階の素案から変化しておらず、使い勝手が良くない。そこで、ページデザインツールにより、将来の遺伝子解析ツール登載、データアップロード、他ページへのリンクを考慮に入れたフロントページデザインを行った。ページ記述言語はハイパーテキストフォーマットとし、特殊なウェブ構築ソフトウェアを使用せずに行った。ウェブブラウザに対応させるための確認ツールとして、アドビ社のクリエイティブスイートパッケージを用いた。

## C. 結果および考察

フロントページ素案(図)は、CaliciWebタイトル、コンテンツ一覧、コンテンツに移動するためのボタンからなり、初めて訪れても戸惑うことなく目的のページへ移動できるようにデザインした。各コンテンツ、ボタンにはロールオーバーを採用し、マウスクリックに対応した操作感が得られるようにした。フロントページは可能な限り情報量を減らし、直感的かつ軽快な操作感が得られるようスクリプトをHTMLベースで作製した。下記にスクリプトを示した。

```
—
<HTML lang="ja"> <!-- 作成日 2008/4/29
0:29:39 AM --> <HEAD> <META
http-equiv="Content-Type" content="text/html;
charset=Shift_JIS"> <META
NAME="GENERATOR" CONTENT="mi">
<style type="text/css"> <!-- a:link
{text-decoration:none;color:black;} a:visited
{text-decoration:none;color:black;} a:active
{text-decoration:none;color:blue;} a:hover
```

```
{text-decoration:none;color:blue;} --> </styl
e> <TITLE>Calici
Web</TITLE> </HEAD> <BODY> <div
align="center"> <TABLE width="700" BORDER="1"
cellspacing="0" cellpadding="0"
bgcolor="#cacaca"> <TR>
<TH></TH>
</TR> <TR>
<TH
bgcolor="lightsteelblue"><font
color="black">Contents : <a href=
"http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules
/news/">News</a> / <a href=
"http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/">
Database</a> / <a href=
"http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html">An
alyze</a> / <a href=
"http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/">Too
ls</a> / <a href=
"http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules
/newbb/">Folium</a> / Links</font></TH>
</TR>
<tr>
<th
bgcolor="aliceblue"><br><!-- ボタンはとりあえ
ず全部このページにリンクしたので押しても変化
しない。 -->
<p><a
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/Cal
iciWeb Home/index.html"></a>
<a
```

```
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/CaliciWeb
Home/index.html"></a>
```

<a

```
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/CaliciWeb
Home/index.html"></a></p>
```

<p><a

```
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/CaliciWeb
Home/index.html"></a>
```

<a

```
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/CaliciWeb
Home/index.html"></a>
```

<a

```
href="file:///SuperKOZA/Users/koza/Desktop/CaliciWeb
Home/index.html"></a></p>
```

<hr width="80%">

<p>このページ

は、カリシウイルスの遺伝子解析のために、厚生労働省科学研究費の補助を受け、国立感染症研究所（NIID）ウイルス第2部と札幌医科大学衛生学教室によって構築されました。<br>

<p><br>

</p>

</th>

</tr>

<tr>

<th bgcolor="lightsteelblue"><font color="#353535">Copyright &#169; — NIID & Sapporo Medical Univ. — All rights reserved.</font></th>

</tr>

</TABLE> </div> </BODY> </HTML>

—

コンテンツとして、News, Database, Analyze, Tools, Folum, Links をアップし、それぞれロールオーバーで CaliciWeb ニュースページ、データベース検索ツール、DDBJ、MEGA ソフトウェア日本語ホームページ、CaliciWeb ディスカッションボード、国立感染症 IASR ホームページへリンクさせた。

**2006/07** シーズンのノロウイルスによる食中毒及び感染症の発生の増加を受け、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会で取りまとめられた「ノロウイルス食中毒対策（提言）」が厚生労働省より平成19年10月12日付け食安発第1012001号「ノロウイルス食中毒対策について」として都道府県知事等宛に通知された。その中で、調理従事者からの食品汚染を原因とする食中毒と判断する場合には、