

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

## カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討

研究協力者	山本美和子	広島市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 寛子	広島市衛生研究所
研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究協力者	京塚 明美	広島市衛生研究所
研究協力者	石村 勝之	広島市衛生研究所
研究協力者	阿部 勝之	広島市動物管理センター

### 研究要旨

感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としての F 特異 RNA 大腸菌ファージ(F-ファージ)の有用性を検証することを目的とした。プラーク法およびリアルタイム PCR 法によるカキ中の F-ファージの検出を試み、リアルタイム PCR 法による NoV、SaV 遺伝子検出との相関について調査し、ウイルスの存在指標として使用できるか検討した。その結果、カキ中からの F-ファージは、プラーク法では 77 検体中 11 検体からプラーク形成され、リアルタイム PCR 法では、カキ 114 検体中、Ⅱ群ファージ 44 検体、Ⅲ群ファージ 49 検体が陽性であった。Ⅱ群ファージと NoVG2 の一致率は 75.0%、Ⅱ群ファージと SaV は 78.4%と高い結果が得られた。さらにⅡ群ファージと NoVG2 のコピー数の相関係数は 0.76 と正の相関がみられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) など食中毒の原因となるウイルスは培養が不可能なため、その検出は PCR 法等の遺伝子検査に依存している。遺伝子検査は、感染性のあるウイルスだけを検出しているわけではなく、特にカキ等の二枚貝や下水放流水、海水等の環境中には紫外線や下水処理場の塩素等で不活化されたウイルスが含まれる可能性があ

る。そのため、二枚貝の腸管系ウイルス汚染リスクや安全性の指標を遺伝子検査によって正確に把握することはできない。

また、カキ等の二枚貝が関連する食中毒は主に NoV によるが、二枚貝には NoV 以外のさまざまな腸管系ウイルスなどの汚染リスクが高い。したがって、二枚貝の安全性を確保するためには、NoV だけでなく、ヒトの糞便由来ウイルス全般の汚染の有無をモニタリングする必要がある。

現在、水環境中の腸管系ウイルスの存在指標として、腸管系ウイルスと同じような挙動をとる F-ファージが有望視されている。そのなかで、Ⅱ群およびⅢ群ファージは主にヒト由来であることが知られている。本研究は、感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標として F-ファージの有用性を検証することを目的として、カキ中の F-ファージをプラーク法で検出するとともに、リアルタイム PCR 法による NoV、SaV 遺伝子検出率と F-ファージの相関を検討した。

## B. 研究方法

### 1. プラーク法

#### (1) 試薬等の調製方法

(a) 液体培地 : Bacto Tryptone 10g、D(+) グルコース 1g、NaCl 8g、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.3g および MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.15g を蒸留水 1L に溶解後、滅菌した。

(b) 培養液 : 液体培地 20mL にナルジキシン酸溶液 20 μl およびカナマイシン溶液 20 μl を加えたものを宿主菌の培養に供した。

(c) F-ファージ感受性菌株の培養 : 宿主菌は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (WG49) を用いた。WG49 は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG45 に大腸菌の F 繊毛を組み込んだ宿主菌を用いた。これは F 特異大腸菌ファージ感受性、体表面吸着大腸菌ファージ非感受性、*Salmonella* ファージ感受性という特徴を有している。一般的に環境水中に *Salmonella* ファージはほとんど存在しないとされているので、WG49 は環境水中から主に F-ファージを検

出することができる。

凍結 WG49 菌液を融解後、培養液 20ml に約 1 ml 加えて攪拌し、37°C で 3~4 時間振とう培養を行った。

(d) 寒天培地 : 液体培地 1L に Bacto agar 9g を加えて滅菌後、50°C に保温し、使用直前に、ナルジキシン酸溶液 1ml、カナマイシン溶液 1ml を加え、培養した WG49 を適量加えて使用した。

(e) WG49 の宿主菌としての有効性の確認 : 宿主菌としての有効性を確認するため、培養した WG49 を MacConkey Agar で培養し、大腸菌の F 繊毛を有していることを意味するラクトース分解性である赤色コロニーが全体の 9 割以上であり、その濃度が 10<sup>8</sup>CFU/ml 以上であることを確認した。

#### (2) 50% カキ中腸線乳剤

カキ中腸線 5 個に等量の PBS と α アミラーゼ 50mg を添加後、ストマッカーで 3 分間処理して乳剤とし、36°C 1~2 時間インキュベートし、2ml のマイクロチューブに採取後、12,000rpm、5 分間遠心した上清をその後の検査に用いた。

#### (3) ファージ測定手順 (単層寒天培地法)

50% カキ中腸線乳剤遠心上清 1ml をシャーレに加え、(d) の寒天培地 10ml 程度を添加して十分に混和後、静置凝固させ、37°C 18~24 時間培養し、形成したプラークを計数した。単位は、PFU/ml (Plaque Forming Unit/ml)。

### 2. リアルタイム PCR 法

50% カキ中腸線乳剤遠心上清 280 μl から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行い、AVL バッファー 60 μl に溶出した。溶出液 50 μl を RT 反応に用い、

100  $\mu$ l の cDNA を得た。cDNA 液 5  $\mu$ l をリアルタイム PCR 法に用い、F-ファージ I 群~IV 群、NoVG1、G2 および SaV 遺伝子検出を実施した。

### 3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における Ct 値との関連性

陽性コントロールとして用いている MS2 ファージ (I 群) を WG49 に感染させ 18 ~24 時間培養後に、フィルター濾過し、10 倍段階希釈して上述のプラーク法およびリアルタイム PCR 法を実施し、プラーク数と Ct 値との関連性を調べた。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. プラーク法による F-ファージの検出 (表 1)

カキ 77 検体についてプラーク法による F-ファージの検出を試みた。その結果プラークを形成したのは 22 検体であり、プラーク数は遠心上清 1ml あたり 1 個~46 個であった。

### 2. リアルタイム PCR 法による群特異的 F-ファージ、NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子の検出 (表 2)

ファージ群別プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により I 群~IV 群別の F-ファージ、NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子の検出を試みた。I 群ファージはカキ 109 検体中 2 検体、II 群ファージは 44 検体、III 群ファージは 49 検体、NoVG1 はカキ 114 検体中 18 検体、NoVG2 は 45 検体検

出され、SaV はカキ 51 検体中 16 検体から遺伝子が検出された。IV 群ファージは検出されなかった。II 群ファージおよび III 群ファージと NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子の一致率は、II 群ファージと NoVG1 が 67.6%、II 群ファージと NoVG2 が 75.0%、II 群ファージと SaV が 78.4%、III 群ファージと NoVG1 が 50.9%、III 群ファージと NoVG2 が 58.3%、III 群ファージと SaV が 41.2% であった。

### 3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における Ct 値との関連性

MS2 ファージの培養液を 10 倍段階希釈したものについてプラーク数およびリアルタイム PCR 法を 2 系列で実施した結果、 $10^{-7}$  希釈では①プラーク数 137 個、リアルタイム Ct 値 40.95、②プラーク数 230 個、リアルタイム Ct 値 39.08 となった。リアルタイム PCR の Ct 値は各段階希釈液 7  $\mu$ l に相当するので、プラーク数も 7  $\mu$ l 当たりの量に換算し、さらに 2 系列の平均をとると、リアルタイム Ct 値 40.95 のときプラーク数 0.96 となる。プラーク数 1 個を 1 コピーと想定し、段階希釈ごとのリアルタイム Ct 値に当てはめ検量線を引くと直線が得られ、II 群および III 群ファージが I 群ファージと同じようにプラーク形成すると仮定し、作成した検量線に実際のカキ検体のリアルタイム PCR の Ct 値を当てはめコピー数を算出した。II 群ファージコピー数と NoVG2 のコピー数で散布図を作成し、相関係数を算出した。外れ値を除くと、図 1 になり、相関係数を算出したところ 0.76 となり、強い正の相関がみとめられた。

#### D. 考察

カキ中の F-ファージをプラーク法およびリアルタイム PCR 法により検討した。プラーク法ではカキ 77 検体中 11 検体から検出され、プラーク数は 1~46 個であった。リアルタイム PCR 法では、II 群ファージはカキ 109 検体中 44 検体、III 群ファージは 49 検体陽性であった。MS2 ファージを用いた実験では、不活化されていない F-ファージは、リアルタイム PCR の Ct 値から算出されたコピー数とプラーク数がほぼ同じ値であることが確認できた。カキ中の F-ファージがリアルタイム PCR 法では陽性であったにも関わらず、プラーク法では検出されない要因として、カキ中にプラーク形成を阻害する要因が存在し、見かけ上低く定量されている可能性があること、カキ中に不活化された F-ファージが存在し、プラーク法では検出されないことなどが考えられた。

しかし、リアルタイム PCR 法によるカキからの II 群ファージおよび NoVG2 の一致率は 75.0%、II 群ファージと SaV は 78.4% と高い一致率を示すこと、さらに II 群ファージと NoVG2 とのコピー数の相関係数が 0.76 と強い正の相関がみられたことなどから、II 群ファージと腸管系ウ

イルスは相関があることが示唆された。今後、感染性のある F-ファージを検出するためには、プラーク法での検出が必須であり、検査法についてさらなる検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

カキ中の F-ファージプラーク数は、リアルタイム PCR 法から推測される数値より低い結果となった。

リアルタイム PCR 法による II 群ファージと NoVG2 の一致率は 75.0%、II 群ファージと SaV は 78.4% と高く、II 群ファージと腸管系ウイルスの相関が高いことが示唆された。

II 群ファージと NoVG2 のコピー数の相関係数は 0.76 と強い正の相関がみられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 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

表 1 プラーク法およびリアルタイム PCR 法検出数

プラーク法	リアルタイム PCR 法							
	F-ファージ				NoVG1	NoVG2	SaV	
	I 群	II 群	III 群	IV 群				
検出数	11/77 (14.3%)	2/109 (1.83%)	44/109 (36.7%)	49/109 (45.0%)	0/109 (0%)	18/114 (15.8%)	45/114 (39.5%)	16/51 (31.4%)

表2 リアルタイム PCR 法による F-ファージと NoV、SaV 一致率

	NoVG1	NoVG2	SaV
II 群ファージ	54.9%	80.4%	78.4%
III 群ファージ	25.5%	47.1%	41.2%

表3 プラーク数とリアルタイム Ct 値

段階希釈	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
プラーク数 (PFU/ml)	1.8E8	1.8E7	1.8E6	1.8E5	1.8E4	1835	183.5 (実測値)
リアルタイム Ct 値 (7 μl)	16.695	20.095	23.945	28.66	32.44	36.275	40.015
リアルタイム コピー数(copy/7 μl)	1.1E6	1.5E5	1.6E4	1000	110	12	1.4
リアルタイム コピー数(copy/ml)	1.5E8	2.1E7	2.3E6	1.4E5	1.6E4	1700	200

$$Y(Ct) = -3.958X + 40.552$$

$$\text{コピー数} = 10^X$$

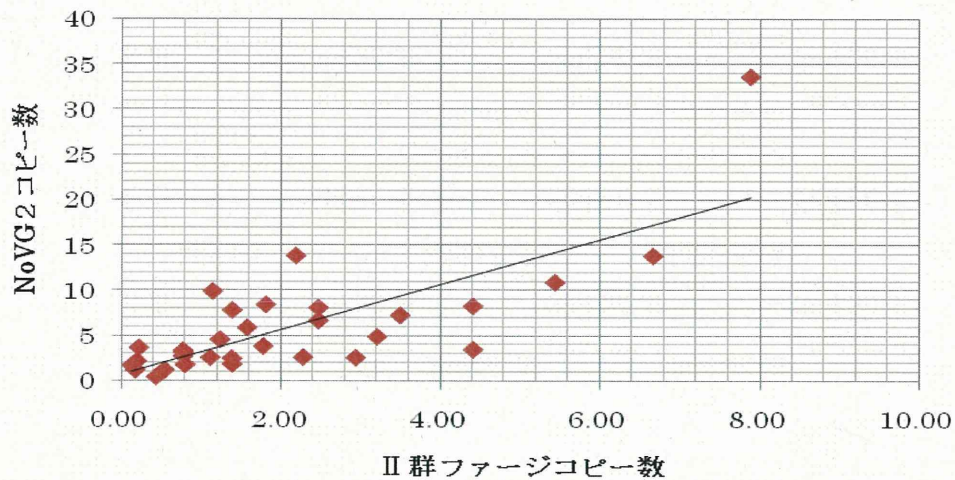


図1 II 群ファージコピー数と NoVG2 コピー数

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

## 熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査 (平成 22～24 年度)

研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	西村浩一	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大迫英夫	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	吉岡健太	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	石井孝司	国立感染症研究所
研究協力者	李 天成	国立感染症研究所

### 研究要旨

Nested RT-PCR 法を用いて、熊本県内のイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染実態調査を行ったところ、イノシシ 173 頭中 13 頭 (7.5%) 及びブタ 1,634 頭中 15 頭 (0.9%) から HEV 遺伝子が検出されたが、シカ 63 頭から HEV 遺伝子は検出されなかった。イノシシから検出された HEV の遺伝子型は、地域特異的に 3 型 (G3) と 4 型 (G4) に分かれた。ブタの HEV は G3 のみで、各養豚場に特異的であった。特にブタでは、と畜検査で合格となった肝臓からも 80 検体中 2 検体 (2.5%) から HEV 遺伝子が検出された。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、ブタ肝臓を生食用に提供しているとの報道もあるが、ブタ肝臓から HEV に感染する可能性も高く、生食の危険性を消費者に繰り返し周知徹底する必要がある。

また、ELISA 法により、ブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体を調査したところ、966 頭中 695 頭 (71.9%) が陽性であった。Specific Pathogen Free (SPF) ブタと一般ブタを比較すると、SPF ブタは 101 頭中 12 頭 (11.9%)、一般ブタは 865 頭中 683 頭 (79%) が抗 HEV-IgG 抗体陽性で、抗体保有率に大きな差があった。

### A. 研究目的

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス (HEV) に汚染された食品や水の飲食等に起因する経口感染症で、従来、輸入感染症として位置づけられてきた。しかし、近年、

イノシシ、シカ及びブタ等の動物からヒト由来 HEV と極めて類似するウイルスが分離され、HEV は既に日本に土着していることが明らかになった。また、これらの動物の肉や肝臓等の生食あるいは加熱不

十分な状態での喫食による国内感染事例が複数報告されていることから、E型肝炎は動物由来感染症としても重要視されている。

そこで本研究では、熊本県内で捕獲されたイノシシ、シカ及びと畜されたブタのHEV汚染実態を調査し、情報を提供することにより、これらの食肉等の喫食による健康被害の発生防止に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

平成18年度～平成24年度に熊本県で捕獲されたイノシシ173頭（筋肉130検体、肝臓153検体、血液65検体）、シカ63頭（筋肉43検体、肝臓55検体、血液26検体）、及びブタ1,634頭（廃棄肝臓183検体、合格肝臓80検体及び血液1,371検体）を検査材料とした。

### 2. Nested RT-PCR法によるHEV遺伝子検出及び塩基配列解析

イノシシ、シカ及びブタの肉や肝臓、各々約2gをペースト状にした後、PBS(-)で50%乳剤とし3,000rpmで10分間遠心した。その上清をさらに10,000rpmで10分間遠心し、得られた上清を検体とした。また、血液は30分以上室温に放置して血清を分離後、3,000rpmで10分間遠心した上清を検体とした。

次に、各々の検体100 $\mu$ lからAGPC法でRNAを抽出（最終的に50 $\mu$ lのDEPC処理水に溶解）し、Random Primerを用いてcDNAを合成した。

その後、E型肝炎検査マニュアル（<http://www0.nih.go.jp/niid/referen>

ce/HE-manual.pdf）に記載されているORF2領域のプライマーセットを用いたPCR及び2%アガロースゲル電気泳動を行い、HEVの増幅バンドを確認した。増幅バンドが確認された検体についてはnestnd PCR産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、遺伝子解析ソフトMEGA5.0を用いて、近隣結合法（NJ法）による分子系統樹解析を行った。

### 3. ELISA法によるIgG抗体測定

平成22年7月～平成23年9月に966頭のブタから採取した血清中の抗HEV-IgG抗体を、HEVウイルス様中空粒子（G1-sHEV-LPs）を抗原としたELISA法で測定した。なお、Cutoff値は、HEVに感染していないと推定された養豚場1施設のブタ集団の測定値（n=38、平均：0.133、SD：0.050）から（平均+3 $\times$ SD）計算し、OD値0.283以上を抗体陽性とした。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. Nested RT-PCR法によるHEV遺伝子検出及び塩基配列解析

イノシシは173頭中13頭（7.5%）からHEV遺伝子が検出されたが、シカ63頭からは全く検出されなかった（表1）。イノシシの検体別の内訳は、筋肉130検体中2検体（1.5%）、肝臓153検体中12検体（7.8%）、及び血液65検体中4検体（6.2%）であった（表1）。また、イノシシから検出されたHEVの遺伝子型は3型（G3）及び4型（G4）で、捕獲地域による特異性

が見られた (表 2, 図 1)。

一方、ブタは 1,634 頭中 15 頭 (0.9%) から G3 の HEV 遺伝子が検出された。検体別の内訳は、と畜検査による合格肝臓 80 検体中 2 検体 (2.5%), 廃棄肝臓 183 検体中 11 検体 (6.0%), 及び血液 1,371 検体中 2 検体 (0.1%) で、調査した 60 ヶ所以上の養豚場中 5 養豚場から HEV 遺伝子が検出された。なお、HEV 遺伝子が最も多く検出された廃棄肝臓 11 検体中 8 検体は同一養豚場に由来していた (表 3, 4)。

HEV 遺伝子 (ORF2 領域 338bp) の塩基配列を比較したところ、イノシシから検出された G3 では、人吉・球磨地域の塩基配列の相同性は 100%, G4 では天草地域の相同性は 99%以上で、人吉・球磨地域と天草地域間の相同性は 97.6%, その他の地域間の相同性は 86%以下で、ブタから検出された G3 の相同性は、同一養豚場内では 99.1%~100%, 各養豚場間の相同性は 92%以下であった (図 1)。

## 2. ELISA 法による IgG 抗体測定

ブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体保有率は平均 71.9%であったが、養豚場間で 0~100%と大きな開きが見られた (表 5)。

Specific Pathogen Free (SPF) ブタを飼育している養豚場 5 施設の抗体保有率は、1 施設を除き 15%未満と低かった。一方、SPF ブタ以外の一般養豚場のうち、養豚場名の明らかな 20 施設の抗体保有率は、80%以上が 12 施設 (60%), 60%~80%が 4 施設 (20%), 及び 60%未満が 4 施設 (20%) であり、SPF ブタの養豚場より抗体保有率が有意に高かった (表 5)。

## D. 考察

本研究により、熊本県内のイノシシ及びブタからこれまでに検出された HEV 遺伝子の塩基配列を解析した結果、異なる地域で捕獲されたイノシシ間での相同性は 91%以下であったのに対し、同一地域で捕獲されたものは 99%以上であり非常に相同性が高かった。ブタでもイノシシと同様な傾向が見られ、同一養豚場内のブタでは相同性が 99%以上であったのに対し、異なる養豚場間では 91%以下であった。これらのことから、イノシシでは捕獲地域毎に、ブタでは養豚場毎に非常に類似した遺伝子を有する HEV が浸淫しているか、または地域や養豚場毎に HEV 遺伝子が増変した可能性が考えられた。

またブタでは、と畜検査で合格となった肝臓の 2.5%から HEV 遺伝子が検出された。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、牛肝臓の代わりにブタ肝臓を生食用として提供している飲食店があるとの報道もあり、平成 24 年 10 月 4 日付け食安監発 1004 第 1 号で、ブタ肝臓の提供に関する注意喚起も行われている。しかし、この通知を受けて行われた平成 24 年度食品、添加物等の年末一斉取締りにおける立ち入り調査では、生食用としてのブタ肝臓等の提供に対する指導が全国で 80 件も行われていた。注意喚起がまだまだ不十分であり、HEV のみならず細菌感染も含めてブタ肝臓の生食の危険性を繰り返し関係事業者及び消費者に周知徹底することが必要である。

特に、肝臓から HEV 遺伝子が検出されたブタのほとんどが少数の同一施設で飼育されていたこと、及びブタ血清中の抗 HEV-IgG 抗体の保有率が養豚場間で大き



な開きがあったことから、養豚場間の HEV 汚染の差は、飼育形態や飼育環境など複数の要因が重なり、ブタの HEV 感染の頻度や感染時期に差が生じるためであろうと推察された。

これらの科学的根拠から今後、畜産部局等とも連携を密にし、養豚場の HEV 清浄化対策を進めていかなければならないと考える。

#### E. 結論

熊本県内のイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染実態調査を行ったところ、シカからは HEV 遺伝子は全く検出されなかったが、イノシシの 7.5% から HEV 遺伝子が検出された。

また、と畜検査合格の肝臓からも 2.5% から HEV の遺伝子が検出された。厚生労働省の平成 24 年度の食品、添加物等の年末一斉取締りにおける立ち入り調査では、生食用ブタ肝臓等の提供に対する指導が全国で 80 件も行われていた。ブタ肝臓から HEV に感染する可能性が高く、生食の危険性を消費者に繰り返し周知徹底する必要がある。

さらに、イノシシやブタの肉や肝臓を喫食する際には十分な加熱調理を行うとともに、調理時の二次汚染を防ぐため、他の食品との調理器具の共用を避けることも重要である。

なお、熊本県内で捕獲されたシカからは HEV 遺伝子は検出されなかったが、国内では検出事例もあることから、喫食する際には、イノシシやブタと同様、感染防止に留意して調理する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 西村浩一, 原田誠也, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛: 熊本県におけるイノシシ, ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, 2013 年 10 月, 東京都

2) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama. Rapid Detection kit for norovirus and sapovirus with viruses specific monoclonal antibodies. The 5th China Medicinal Biotech Forum November 7-9, Beijing, China

3) 原田誠也, 西村浩一, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛: 熊本県におけるイノシシ, シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 24 年 11 月, 大阪市

#### G. 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

表1 イノシシ及びシカの HEV 遺伝子検査結果 (検体別)

	イノシシ				シカ			
	筋肉	肝臓	血液	頭数	筋肉	肝臓	血液	頭数
検査数	130	153	65	173	43	55	26	63
陽性数	2	12	4	13	0	0	0	0
陽性率 (%)	1.5	7.8	6.2	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0

表2 イノシシにおける HEV 遺伝子陽性検体の詳細

検体番号	個体番号	捕獲地域	部位	遺伝子型
1	1	宇城・八代地域	肝臓	G3
2	2	天草地域	肝臓	G4
3	3	天草地域	肝臓	G4
4	4	天草地域	肝臓	G4
5	5	天草地域	肝臓	G4
6	6	天草地域	肝臓	G4
7	7	人吉・球磨地域	肝臓	G4
	8		血液	G4
8	9	人吉・球磨地域	筋肉	G3
	10		肝臓	G3
	11		血液	G3
9	12	人吉・球磨地域	筋肉	G3
	13		肝臓	G3
10	14	人吉・球磨地域	血液	G3
	15		肝臓	G3
11	16	人吉・球磨地域	肝臓	G3
12	17	人吉・球磨地域	血液	G3
13	18	宇城・八代地域	肝臓	G4

表3 ブタの HEV 遺伝子検査結果 (検体別)

	ブタ			頭数
	合格肝臓	廃棄肝臓	血液	
検査数	80	183	1371	1634
陽性数	2	11	2	15
陽性率 (%)	2.5	6.0	0.1	0.9

表4 ブタの HEV 遺伝子検査結果 (養豚場別)

養豚場	合格肝臓	廃棄肝臓	血液
A	26	11	
B	14 (1)	15 (8)	
C	12		
D	11	2	
E	9	1 (1)	
F	4	2 (1)	55
G	4 (1)		116 (1)
H		5	0
I			30
J			10
K			35
L			188
M			65
N			45
O			5
P			55
R			30
S			10
T		2 (1)	173 (1)
U			199
V			54
W			126
その他		145	175
合計	80 (2)	183 (11)	1371 (2)

括弧内は HEV 遺伝子陽性数を示す。



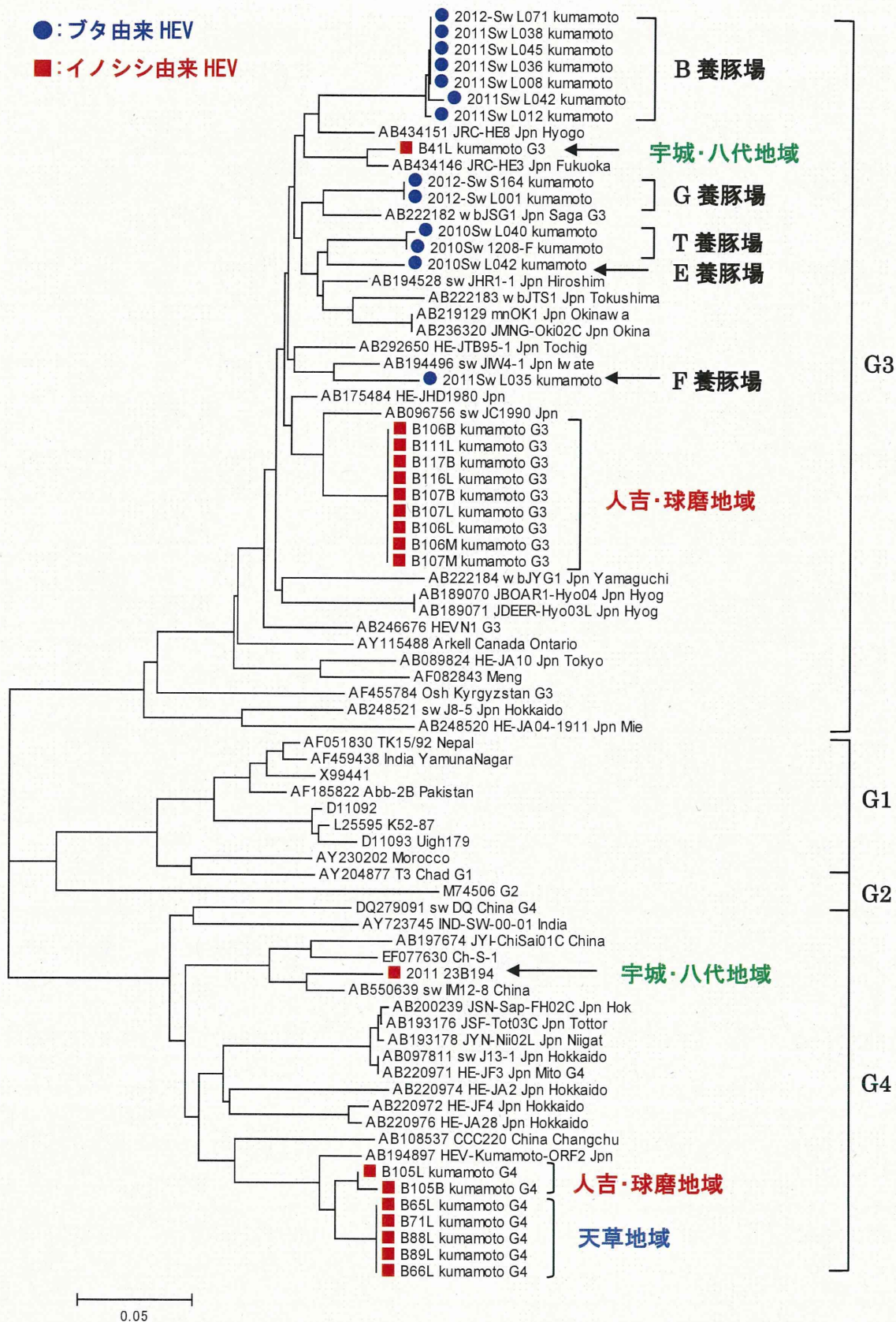


図1 イノシシ及びブタから検出された HEV の分子系統樹 (NJ 法)

表5 ブタのHEVに対する特異的IgG抗体保有率

養豚場	2010			2011			計	
	陰性	陽性	保有率	陰性	陽性	保有率	検査数	保有率
a (SPF)	10		0.0%	28	2	6.7%	40	5.0%
b (SPF)				26	4	13.3%	30	13.3%
c (SPF)				14	1	6.7%	15	6.7%
d (SPF)	11		0.0%				11	0.0%
e (SPF)					5	100.0%	5	100.0%
f	22	93	80.9%	9	50	84.7%	174	82.2%
g	13	66	83.5%		74	100.0%	153	91.5%
h	9	81	90.0%	1	42	97.7%	133	92.5%
i	5	67	93.1%	1	18	94.7%	91	93.4%
j	16	30	65.2%	3	32	91.4%	81	76.5%
k	29	11	27.5%				40	27.5%
l	1	4	80.0%	4	26	86.7%	35	85.7%
m	29		0.0%	4	1	20.0%	34	2.9%
n				2	28	93.3%	30	93.3%
o	2	3	60.0%	1	14	93.3%	20	85.0%
p	1	4	80.0%	2	3	60.0%	10	70.0%
q	3	7	70.0%				10	70.0%
r	5		0.0%				5	0.0%
s	1	4	80.0%				5	80.0%
t	1	4	80.0%				5	80.0%
u					5	100.0%	5	100.0%
v	2	3	60.0%				5	60.0%
w					5	100.0%	5	100.0%
x				5		0.0%	5	0.0%
y		4	100.0%				4	100.0%
不明	1	4	80.0%	10		0.0%	15	26.7%
合計	161	385	70.5%	110	310	73.8%	966	71.9%

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

## サポウイルス VLPs に対する新規単クローン抗体の樹立とその解析

研究協力者	北元憲利	兵庫県立大学
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
	岡智一郎	国立感染症研究所
	李 天成	同
	村上耕介	同
	片山和彦	同

### 研究要旨

ヒトに急性胃腸炎を起こすサポウイルス (Sapovirus, SaV) は、遺伝子学的に多様性であり、現在4つの Genogroup (GI, GII, GIV および GV) に分類されている。SaV の検出法は PCR 法に依存しており、簡便迅速な免疫学的診断法は確立されていない。本研究では、SaV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SaV のレコンビナントウイルス様中空粒子 (VLP) に対する単クローン抗体 (MAb) の作製を試みた。これまでに、いくつかの MAbs を得て、その解析と有用性について検討した。各 Genogroup (GI, GII, GIV および GV) の VLPs を抗原とした ELISA 法およびウエスタンブロット法により各抗体の反応性を調べたところ、すべての Genogroup に交叉する抗体があることがわかった。また、Genogroup 特異的あるいは Genotype 特異的な抗体も得られた。すべての Genogroup に反応する抗体について、競争 ELISA 法により検討したところ、認識部位の異なる抗体があることが分かった。今回、これらの抗体を用いて、抗体パネルを構築することができた。今後、ブロードに反応する抗体あるいは Genogroup 特異的抗体のカクテルを用いたイムノクロマト法などの検出系の実用化が期待される。

### 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 に亜分類されている。NoV 感染の診断法として、現在、免疫学的および遺伝子学的診断法が利用されている。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が、操作が煩雑で手間と技術が必要とされ、試薬も高価である。一方、免疫学的方法は、特異性や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可能なスクリーニング

などに適している。この免疫学的手法に単クローン抗体 (MAbs) を利用すれば、より特異性が高くなることが期待される。

これまで、ノロウイルス様中空粒子 (NoV-VLPs) に対する MAbs をいくつか作製し、ウイルスの抗原学的解析に応用するとともに、MAbs の特性を生かした NoV-ELISA 法やイムノクロマト法の開発を手がけてきた。

一方、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おり、ここ数年発症事例の報告が増えている。SaV の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。本研究では、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、各 Genogroup の SaV-VLPs を免疫源として MAbs の作製を行い、その解析と有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1 材料

昆虫細胞発現系を用いて作製された SaV-VLPs を免疫源とした。すなわち、GI.1 (Mc114 株)-、GI.5 (Yokote1 株)-、GI.6 (Nichinan 株)-、GII.3 (Syd53 株)-、GIV.1 (Syd3 株)-、GIV.1 (Yakumo8 株)-、および GV.1 (NK24 株)-VLPs を用いた。抗原的解析には、ほ乳動物のベクターを用いて作製された GII.2 (Mc10)- および GII.3 (C12)-VLPs を、また、昆虫細胞発現系を用いて作製された GII.3 (20082029 株)-、GII.3 (D1711 株)-、GII.3 (Kushiro5 株)-、GII.3 (Nayoro4 株)-、GII.3 (Kumamoto6 株)-、および GII.3 (20072248 株)-VLPs を使用した (図1)。VLPs はいずれも岡ら

(国立感染研) において作製された。

### 2. 単クローン抗体の作製

免疫法として、VLPs 抗原の腹腔内投与を行った。細胞融合法は常法に従って行った。抗体陽性細胞のスクリーニングは、免疫源を固相化した ELISA 法にて行った。選択された抗体産生細胞をマウスの腹腔内に接種し、得られた腹水を抗体として用いた。

### 3. 抗体の解析

得られた抗体の各 VLPs に対する交叉性は、ELISA 法およびウエスタンブロット法にて検討した。

### 4. 競争 ELISA

抗体の特異性は、競争 ELISA 法により確認した。各 Genogroup の VLP を coating したプレートに、あらかじめ抗体と各 VLP を混合した反応液を添加し、VLP の競合の程度を比較した。競争の評価は、 $[B/Bo = (\text{抗体} + \text{段階希釈抗原}) \text{の OD} - \text{対照の OD} / \text{抗体のみの OD} - \text{対照の OD}]$  で表した。

### 5. 倫理面への配慮

動物実験に際しては、兵庫県立大学および環境人間学部研究倫理委員会規定に基づき、同審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

これまでに得られた抗体は計 70 抗体となった。このうち、26 抗体を腹水化し、いくつかの VLPs に対する反応性を検討した (表1)。各 Genogroup の VLPs を固相化した ELISA 法により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。

### 1. 得られた抗体の反応性

#### 1) 各 Genogroup-VLPs と反応する MAbs

GI.6 (Nichinan) に対する抗体が 7 つ得ら

れたが、このうち4抗体(5C9、1A1、5C1および6C4)はいずれのVLPsに対して同等の強さの陽性反応を示した(表1)。また、GIV.1(Yakumo8)に対する抗体が5つ得られたが、このうち1抗体(Y2A4)は、調べた限り同様にいずれのVLPsに対しても同等の強さの陽性反応を示した。一方、GI.5(Yokote1)に対して作製された抗体8127、およびGI.6(Nichinan)に対する3抗体(6D3、3D2および4G7)はすべての株に交叉反応性を示すものの、genogroupにより反応の強さが異なり、GIおよびGVのVLPsに対しては強陽性を示したが、GIIおよびGIVのVLPsに対しては弱陽性であった。

#### 2) Genogroup 特異的な MAbs

調べた限り同じGenogroupのVLPsと反応する抗体があり、Genogroup 特異的と考えられた。GI.5(Yokote1)に対する616抗体は、GI.1、GI.5およびGI.6のVLPsと反応した。また、GII.3(Syd53)に対する抗体8083および1803は、解析した3種のGII-VLPsと反応した。また、GIV.1(Syd3)に対する抗体(819および806)、およびGIV.1(Yakumo8)に対する抗体Y1A8は、調べた限り2株ではあるが、GIVのVLPsと反応した。

#### 3) Genotype あるいは株特異的な MAbs

抗体1015は、GII.3のすべての株に対して反応するが、他のGII(GII.2、GII.4およびGII.7)-VLPsには反応しない抗体であった。また、各VLPs株(免疫源)とのみに反応する抗体もあった。

#### 2. ウェスタンブロット法による解析

これらの抗体について、ウェスタンブロット法による解析を行った。各GenogroupのVLPsとの交差性をみたところELISA法と同様の反応性を示した(図2)。いずれも

分子量58~60kDのタンパク質と特異的に反応した。

#### 3. 競争ELISA法による特異性の確認

各GenogroupのVLPをcoatingし、競争ELISA法により特異性を確認した。抗体5C9は、各GenogroupのVLPにより同等に競合された(図3AおよびB)。また、抗体1A1は、5C9と同様の結果を示した(図3CおよびD)。一方、8127は、GIおよびGVとの株とは競合したが、GIIおよびGIVの株とは弱い競合しか示さなかった(図3EおよびF)

#### 4. 抗体パネルの構築

それぞれGI特異的な抗体616、GII特異的な1803、GIV特異的なY1A8およびGV特異的な1496を用いて抗体パネルを構築することができた(図4)。これらの抗体をカクテルにして反応性をみたところ、マウス抗血清(免疫血清)と同様に、すべてのgenogroupのVLPsと反応した。

#### 4. サンドイッチELISA法の検討

サンドイッチ法を原理とするイムノクロマト法を行うにあたり、基礎的検討として、サンドイッチELISA法を試みた。固相抗体としては、マウスの抗血清(免疫血清)、あるいは抗体616、1803、Y1A8および1496をカクテルにした抗体を用いた。抗原を捕捉する抗体としてY2A4抗体をビオチン化したものを用いた。その結果、抗血清およびカクテル抗体は調べた限りすべてのVLPsと反応性を示した(図5)。

#### D. 考察

元来、SaV-VLPsはNoV-VLPsなどに比較してその産生量が悪いといわれ、それが研



究の隘路となっていた。研究分担者の岡ら（国立感染研）は、Mc10（GII.2）および C12（GII.3）のように、SaV-VLP 発現系として、ほ乳動物のベクターを用いて VLPs を発現することを可能にし、さらにカイコを用いた新たな SaV-VLP の作製に成功した。このことにより、種々の VLPs に対する単クローン抗体を作製することも可能になった。今回 VLP を免疫源として、広く交差性を示す単クローン抗体を樹立することができた。

抗体 5C9、5C1、1A1、6C4 および Y2A4 は、ELISA 法により、各 Genogroup の VLPs に対して、同等の強さで反応した。これに対し、8127、6D3、3D2 および 4G7 は、SaV の Genogroup 間すべてに交叉反応を示したが、株の違いにより若干反応性の強弱があり、競争 ELISA の結果にも反映されていた。前者のグループの抗体は、同じ抗原部位を認識した抗体であることが示唆されたが、少なくとも後者とは異なる部位を認識したものと考えられる。

これらブロードに交差性を示す MAbs は SaV の共通領域を認識したとみられるため、野外材料を用いたイムノクロマト法によりその有用性を検討したが、その検出率は GII および GIV に対して低いことが分かり、イムノクロマト法に用いるには有用性が低いことが分かった（共同研究者 田中ら）。

一方、抗体 616 は、同 Genogroup の 3 株（GI.1、GI.5 および GI.6）と反応し、調べた限り 2 株（Mc114 および Yokote1）と競合を示した。このことにより、616 は、GI 株の共通した領域を認識したものと思われる。また、1803 は、すべての GII-VLPs と反応し、GII 特異性の抗体と考えられる。このように Genogroup に特異的な抗体を用いれ

ば、既存の NoV の診断キット（GI および GII を区別）のように Genogroup の鑑別診断に利用することも可能である。さらに、Genogroup の異なるいくつかのクローンにより、カクテルにして検出することも可能と考えられる。

データには示していないが、得られた多くの MAbs は、株（免疫源）特異的であった。しかし、GIV および GV に関しては抗原として、それぞれ 2 および 1 株の VLP しか用いていない。同グループのいくつかの株を用いて検討すれば、Genogroup あるいは Genotype 特異的な抗体が存在する可能性がある。株特異性の抗体は、検出・診断としての利用は難しいが、抗原的な解析などには役立つことが期待される。

今後、詳細な抗原的解析やエピトープマッピングを行うとともに、ブロードに交差性を示す抗体、あるいは genogroup 特異的抗体のカクテルにより、SaV の ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に寄与したい。

## E. 結論

SaV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SaV-VLPs に対する MAbs の作製を試み、得られた MAbs の解析とその有用性について検討した。

ELISA 法およびウエスタンブロット法により各抗体の反応性を調べたところ、株あるいは Genotype 特異的、Genogroup 特異的、また、すべての Genogroup に交叉する抗体があることがわかった。また、いくつかの抗体の特異性は競争 ELISA 法により確かめ

られた。ブロードに反応する抗体の有用性を野外材料を用いたイムノクロマト法により検討したが、その検出率は低かった。現在、新規抗体を用いて検討中である。また、Genogroup 特異性抗体を用い、カクテルにして利用する方法も考えられる。これらの抗体を用いることにより、ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に役立てたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Yoji Kato, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka: Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 56: 760-770 (2012)

### 2. 学会発表

1) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之：サポウイルスに対する単クローン抗体の解析 第 58 回日

本ウイルス学会. 2010 年 11 月. 徳島.

2) Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Yoji Kato, Tomoyuki Tanaka. Broadly reactive monoclonal antibody with several recombinant Sapovirus-like particles (SV-VLPs). *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress.* 2011 (September). Sapporo.

3) 北元憲利、三好龍也、田中智之：サポウイルス単クローン抗体による迅速診断法の可能性. 第 53 回日本臨床ウイルス学会. 2012 年 6 月. 大阪.

4) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、三好龍也、田中智之：サポウイルスの genogroup に特異的な単クローン抗体の作製とその解析. 第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月. 大阪.

## G. 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



表 1. ELISA 法による各 VLPs に対する単クローン抗体 (MAb) の反応性

Group	MAb	Immunogen	Antigen(VLPs)												GIV			GV
			GI			GII							GIV		GV			
			1	5	6	2	3	3	3	3	3	3	4	7	1	1	1	
Mc114	Yokote1	Nichinan	Mc10	C12	2029	D1711	Syd53	kushiro5	Nayoro4	kumamo	2248	Syd3	Yakumo8	NK24				
A	5C9	Nichinan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	5C1	Nichinan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	1A1	Nichinan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	6C4	Nichinan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	Y2A4	Yakumo8	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT	+++	NT	NT	+++	+++	+++	+++	+++	
	8127	Yokote	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	6D3	Nichinan	++	+++	+++	++	+	+	+	NT	++	++	++	++	++	++	++	
3D2	Nichinan	+	++	+++	++	+	+	++	NT	+	++	+	+	+	+	++		
4G7	Nichinan	+	NT	+++	+	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+		
B	616	Yokote1	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1325	Mc114	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5001	Mc114	++	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	
	4357	Mc114	++	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	
	627	Yokote1	-	++	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	
	7F8	Nichinan	-	-	++	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	
	1F2	Nichinan	-	-	++	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	
C	8083	Syd53	-	-	NT	++	++	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT	-	-	-	
	1803	Syd53	-	-	NT	++	++	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT	-	-	-	
	1015	Syd53	-	-	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-		
D	819	Syd3	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	++	++	-	
	806	Syd3	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	++	++	-	
	Y1A8	Yakumo8	-	-	-	-	NT	NT	NT	-	NT	NT	-	-	+++	+++	-	
E	155	NK24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
	1496	NK24	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	+++	
	4971	NK24	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	+++	
	1052	NK24	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	+++	
	anti-SV serum		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

+++ : 強陽性 (OD ratio of sample/PBS>10)、++ : 中陽性 (5-9)、+ : 弱陽性 (1-4)、- : 陰性、NT : 未試練

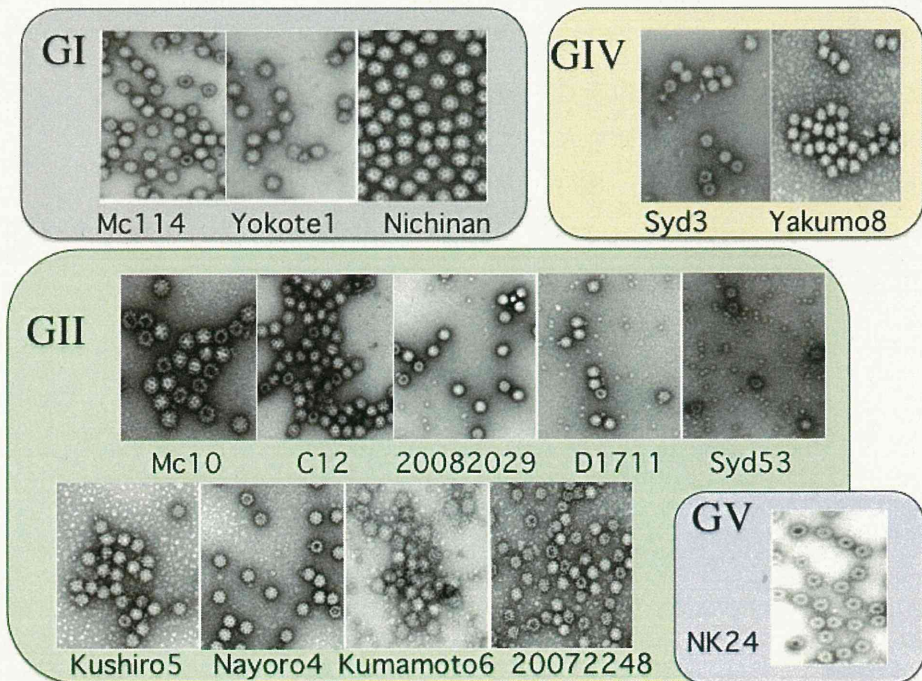


図 1. 用いた VLPs

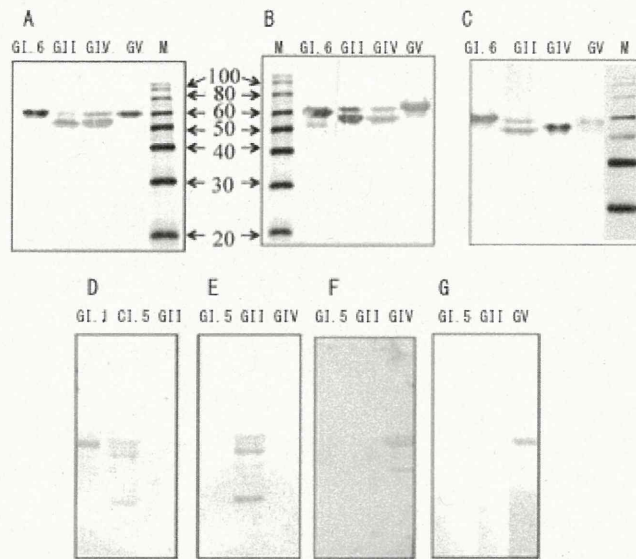


図2. ウェスタンブロット法による各 VLPs に対する単クローン抗体の反応性  
 抗体 : (A)5C9, (B)1A1, (C)Y2A4, (D)616, (E)1803, (F)Y1A8, (G)1496.  
 VLPs : GI.1(Mc114), GI.5(Yokotel1), GI.6(Nichinan), GII (GII.7:20072248[A-C],  
 GII.3:Syd53[D-G])、GIV (Yakumo8[A-C], Syd3[D-G]), GV (NK24). Lane M : molecular mass  
 markers.

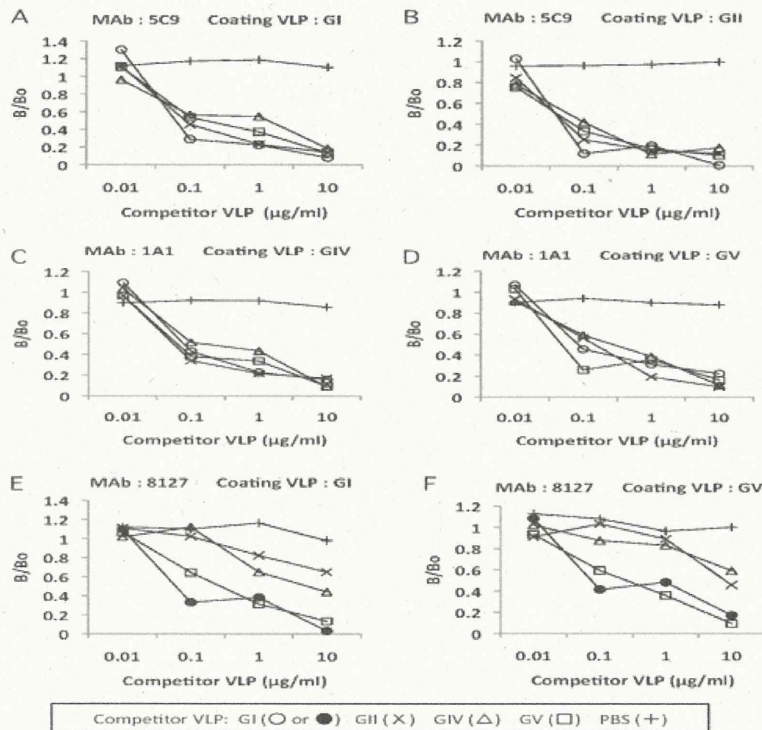


図3. 抗体の競争 ELISA  
 Coated VLPs : GI.6 Nichinan (A)、GII.7 20072248 (B)、GIV Yakumo8 (C)、GI.5 Yokotel (E)、GV  
 NK24 (D and F). Competitor VLPs : GI.6 Nichinan (○)、GI.5 Yokotel (●)、GII.7 20072248 (X)、  
 GIV Yakumo8 (△)、GV NK24 (□). 抗体 : 5C9 (A and B)、1A1 (C and D)、8127 (E and F)