

機関番号：83907

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590134

研究課題名 (和文) ノロウイルスの抗原性解析と血清診断への応用

研究課題名 (英文) Antigenic analysis of Norovirus and its application for serological diagnosis

研究代表者

小林 慎一 (KOBAYASHI SHINICHI)

愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・室長補佐

研究者番号：30139737

研究成果の概要 (和文)：カリシウイルス科のノロウイルス (NoV) は、非細菌性胃腸炎の主要な原因ウイルスの 1 つである。NoV は、未だ培養増殖できないウイルスであるので、血清中の NoV 感染防御抗体を測定できない。そこで、NoV の構造タンパク遺伝子を組み込んだバキュロウイルスで遺伝子型の異なる NoV のウイルス様粒子 (VLPs) を発現し、発現 VLPs を利用した NoV 抗体測定法を確立した。次いで、NoV 抗体測定法を NoV の血清疫学調査や血清学的診断に応用した。

研究成果の概要 (英文)：Norovirus (NoV), a member of the family *Caliciviridae*, is one of the major cause of acute non-bacterial gastroenteritis. Due to the lack of a culture system for NoV, measurement of neutralization antibody to NoV is now impossible. Capsid proteins of different antigenic types of NoV strains were expressed as virus-like particles (VLPs) in baculovirus-infected insect cells, and VLPs were used for detection of antibody to NoV by ELISA. The developed antibody-detection ELISA was applied for seroepidemiological study and serological diagnosis of NoV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ノロウイルス、中空粒子、抗原解析

1. 研究開始当初の背景

カリシウイルス科のノロウイルス (NoV) は、カキなどの二枚貝の生食や調理従事者を介して汚染された食品の喫食によるウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスである。また、NoV は 11 月から 3 月にかけての冬季を中心に、乳幼児や高齢者の間で多発する感染性胃腸炎の主要な病原体でもある。特に近年は、老人介護施設や病院等でヒト-ヒト感染による

集団感染が多発し、感染症の原因ウイルスとしての側面が社会問題となっている。NoV の集団感染が公衆衛生上、大きな社会問題となってきたことから、NoV 検査の迅速化が行政側から求められてきた。NoV は未だ組織培養法や実験動物で増殖できないことから、NoV の検出検査の標準法として電子顕微鏡法 (電顕法) によるウイルス検索が実施されてきた。しかし、電顕法は検体の精製から観察までに

多大な時間を要する方法であることから、迅速診断には不適な方法であった。1990年のJiangらによるNorwalk virusの遺伝子クローニングの成功を契機として、NoV株の遺伝子解析が進展した。NoVの遺伝子情報の蓄積に伴い、電顕法に代わるNoVの迅速診断法としてRT-PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法やTRC法等の遺伝子検出法が開発されている。それに対して、NoVは培養増殖できないウイルスであるためにNoVの血清学的診断法の開発は遅れをとってきた。1992年にJiangらは、構造タンパク遺伝子を組込んだバキュロウイルスを用いて形態学的にも抗原的にもnativeなウイルスと変わらないウイルス様中空粒子(virus-like particles : VLPs)の発現に成功し、発現VLPsをNoV抗原として大量に確保することが容易となった。発現VLPs抗原に対する抗体価を測定することで、NoV感染の血清学的診断も可能と考えられた。しかし、抗体測定に必要なNoV抗原を安定的に供給できるようなシステムはないのが現状である。

2. 研究の目的

NoVの組織培養系が未だ確立していないことから、現段階ではNoVの中和抗体測定は不可能である。従って、免疫電顕法がNoVの抗体測定の標準法として用いられてきた。本法は、臨床検体に由来するNoVとペア血清との反応後の凝集像を電子顕微鏡で観察することで抗体価の上昇を判定する方法であるが、臨床検体由来の抗原量に限りがあること、また、ウイルス抗原の精製や凝集像の有無の判定に労力を要する等の欠点があった。組換えバキュロウイルスによるタンパク発現系でNoVの構造タンパクがウイルス様粒子(VLPs)としての発現に成功したことから、VLPs抗原を利用したELISA法によるNoVの血清診断への応用が可能となった。しかし、わが国ではVLPsを安定的に供給するようなシステムはなく、VLPsを保有する機関でのみ血清診断の有用性評価が可能であり、汎用的な方法でないのが現状である。そこで、本研究では、汎用的なNoVの抗体検出ELISAを確立することを目的として、NoVの遺伝子型間での抗原性の差異を検討するとともに、NoV抗体検出ELISAを血清疫学調査や血清学的診断への応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) ウイルス様中空粒子(VLPs)の発現

RT-PCRで増幅したNoVの構造タンパク領域

の遺伝子をLIC法でマルチシステム発現ベクターに組込んだ後、BacMagicキット(メルク社製)で組換えバキュロウイルスを作製した。次に、組換えバキュロウイルスを昆虫細胞Sf-9に接種し、VLPsを発現させた。VLPsの発現はSDS電気泳動または電子顕微鏡観察により確認した。

(2) 酵素抗体法(ELISA)による抗体測定

サンドイッチ型ELISAでNoV抗体を測定した。精製したVLPsを50mM炭酸緩衝液(pH9.0)で100 μ g/mlに調製し、ELISA用プレートの各ウェルに100 μ lを添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした。抗原溶液を除去後、ブロッキングバッファー(0.5%BSAを含むPBS)を加え4 $^{\circ}$ Cで一晩、静置した。0.1%BSAを含むPBSで階段希釈した被検血清を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。0.05%Tween PBS(T-PBS)で洗浄後、希釈ペルオキシダーゼ標識二次抗体と37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、T-PBSで洗浄した。TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)基質を加え、室温で30分反応後、1N硫酸で反応を停止した。プレートリーダーで450nmの吸光度を測定し、吸光度0.15以上を陽性と判定した。

4. 研究成果

(1) NoVの抗原性解析

遺伝子グループI(GI)の2株(遺伝子型G1とG4)と遺伝子グループ(GII)の5株(G3、G4、G10、G12、G15)由来のVLPs抗原とそれらのポリクローナル抗体を用いてこれらの株間の交叉反応性をELISA法で検討した。その結果、GIとGIIでは数%以下であり、血清学的にも区別できることを確認した。同一グループ間では、6~12.5%の交叉反応性を認めたが、遺伝学的分類と血清学的分類とはよく一致する結果を得た。

2006年冬季のNoVの大流行以降、GII.4型NoVが主要な流行株であったので、2007年と08年のGII.4型流行株(07年3株と08年2株)計5株についてVLPs発現を行い、プロトタイプGII.4のポリクローナル抗体に対する反応性をELISA法で検討したが、抗原性の変異は認められなかった。今後も継続して同一遺伝子型のVLPs抗原を蓄積することによって、抗原変異の方向性に関する有用な情報を収集できることが期待される。

(2) 血清疫学調査及び血清診断への応用

7種類のVLPs抗原を用いて、愛知県民の年齢階層別のNoVに対する抗体保有率を調査した。GIの2株に対する県民全体の抗体保有率は、Seto株(G1):24.0%、Chiba株(G4):32.0%、GIIの5株に対しては、Sinsiro株(G3):37.5%、

Narita104株(G4):69.5%、Hokushin株(G10):32.0%、Chitta株(G12):42.0%、Kamo株(G15):47.0%であった。各年齢階層でGII.4に対する保有率が最も高い傾向が認められ、近年のGII.4株の流行を反映する結果が得られた。

カキ関連の食中毒事例の有症患者3名から採取されたペア血清について、GIの2株[Seto株(G1)とChiba株(G4)]及びGIIの4株[NG1株(G2)、Sinsiro株(G3)、Narita104株(G4)GIIとChitta株(G12)]、計6株のVLPs抗原に対する抗体価を測定した。その結果、3名中2名は、GI抗原に対して16~32倍の抗体上昇を認めたが、GII抗原に対しては2~8倍の抗体上昇であった。残り1名は、GI抗原に対して1~2倍の抗体上昇であったのに対して、GII抗原に対して64~128倍の抗体上昇を認めた。カキ関連の食中毒疑い事例では、摂食者は多様な免疫応答示すことが想定されるが、NoV感染疑い患者のペア血清について複数のVLPs抗原に対する抗体価を測定することによりNoV感染グループの特定は可能と考えられた。

NoVは抗原的にも多様なウイルスであるので、今後とも、流行株の遺伝子型や抗原性の経年的変化の追跡は必要であるが、VLPs抗原をグループ化することにより、簡便かつ汎用的な抗体測定系の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

- ①Motomura K., Yokoyama M., Ode H., Nakamura H., Mori H., Kanda T., Oka T., Katayama K., Mamoru Noda M., Tanaka T., Takeda N., Sato H., Yoshizumi S., Mikami T., Saito H., Ueki Y., Takahashi A., Hebiguchi T., Shinozaki K., Yoshida T., Tamura T., Takizawa T., Toho M., Kobayashi S., Uchino K., Iritani N., Iizuka S., Fumiaki Itoh F., Fukuda S., Kondo R., Yamashita Y., Funatsumaru S., Matsuoka Y., Iwakiri A. Divergent evolution of Norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *Journal of Virology* 84: 8085-8097 (2010) 査読有
- ②Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H., Kabashima Y., Hasegawa A., Nagaya S., Kawaguchi M., Kobayashi S., Fujiura A., Sakae K., Minagawa H. Detection of Human Parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *Journal of*

Clinical Microbiology 48: 2683-2688

(2010) 査読有

- ③Yamashita T., Ito M., Tsuzuki H., Sakae K., Minagawa H. Molecular identification of enteroviruses including two new types (EV-98 and EV-107) isolated from Japanese travelers from Asian countries. *Journal of General Virology* 91:1063-1066 (2010) 査読有

- ④小林慎一、藤原範子、水谷恵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、山下照夫、平松礼司、下岸 協、皆川洋子 他5名 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例—愛知県 病原微生物検出情報 31: 322-323 (2010)

- ⑤岡 智一郎、片山和彦、小林慎一、飯高順子、野田 衛 愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較 病原微生物検出情報 31: 324-325 (2010)

- ⑥野田 衛、山本茂貴、片山和彦、岡 智一郎、山下和予、岡部信彦、小林慎一 他24名 ノロウイルス食中毒の調査・検査体制に関する研究の動向 病原微生物検出情報 31: 315-316 (2010)

- ⑦Kobayashi S., Fujiwara N., Takeda N., Minagawa H. Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan. *Microbiology Immunology* 53:356-359 (2009) 査読有

- ⑧伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子 ヒトパレコウイルス 臨床と微生物 36:187-192 (2009)

- ⑨山下照夫、伊藤 雅、水谷絵美、藤原範子、皆川洋子:無菌性髄膜炎からのエンテロウイルス検出状況、2004~08年—愛知県 病原微生物検出情報 30:6-8 (2009)

- ⑩伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子:ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus:HPeV) 感染症 臨床検査 53:105-110 (2009)

- ⑪Motomura K., Oka T., Yokoyama M., Nakamura H., Mori H., Ode H., Hansman G. S., Katayama K., Kanda T., Tanaka T., Takeda N., Sato H., Yoshizumi S., Mikami T., Saito H., Ueki Y., Takizawa T., Uchino K., Noda M., Kondo R., Matsuoka Y., Funatsumaru S., Kobayashi S. Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in the 2006-2007 Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genomewide Tracing of Evolutionary History *Journal of Virology* 82(22): 11247-11262, (2008) 査読有

- ⑫山下照夫、伊藤 雅、川口まり子、田中正大、秦 眞美、小林慎一、皆川洋子:感染性

胃腸炎および流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス検出状況－愛知県 病原微生物検出情報 29:96-98 (2008)

〔学会発表〕(計 14 件)

①小林慎一、藤原範子、安井善宏、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：食中毒事例から検出されたサポウイルスの遺伝子解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月、徳島市

②藤原範子、安達啓一、水谷絵美、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：愛知県におけるノロウイルスの検出状況：2009/10 シーズン、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月、徳島市

③水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：流入下水から分離されるエンテロウイルスについて、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月、徳島市

④Kobayashi S: Surveillance for Gastroenteritic Viruses and Trend of Norovirus Epidemic in Japan. Asia Pacific Symposium on Food Safety. Seoul, Korea November 12 (2009)

⑤小林慎一、伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：平成 20 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京都

⑥山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子：新型アイチウイルス遺伝子の検出、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京都

⑦伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：臨床検体から検出されたカルディオウイルス属 Saffold virus について、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京都

⑧端 昭彦、北島正章、山下照夫、皆川洋子、片山浩之、大垣眞一郎：Real-time RT-PCR によるアイチウイルスの核酸検出および遺伝子型識別法の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 年 10 月、東京都

⑨伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、長谷川晶子、秦 眞美、小林慎一、榮 賢司、皆川洋子：ヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) 感染症について、衛生微生物技術協議会第 30 回研究会、平成 21 年 7 月、堺市

⑩小林慎一、伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：平成 19 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山市

⑪山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子：下水から

検出された新型アイチウイルスと推定される遺伝子断片の解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山市

⑫Yamashita T., Ito M., Tsuzuki H., Sakae K., Minagawa H.: Molecular Identification of Enteroviruses Including Two New Types (‘CV-A9r’ and EV-98) Isolated from Japanese Travelers Returning from Southeast Asia. XIV International Congress of Virology, Istanbul, Turkey, August 12 (2008)

⑬伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：愛知県におけるヒトパレコウイルス (HPeV) の検出状況、第 49 回日本臨床ウイルス学会、平成 20 年 6 月、犬山市

⑭山下照夫、伊藤 雅、川口まり子、小林慎二、皆川洋子：ノロウイルス等胃腸炎ウイルスの発生動向とパレコウイルスおよびコブウイルス、第 49 回日本臨床ウイルス学会、平成 20 年 6 月、犬山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 慎一 (KOBAYASHI SHINICHI)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・室長補佐
研究者番号：30139737

(2) 研究分担者

山下 照夫 (YAMASHITA TERUO)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・室長
研究者番号：40402177
安井 善宏 (YASUI YOSHIHIRO)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・主任研究員
研究者番号：40393128
藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・技師
研究者番号：10518757