

ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム及び、ベッドサイド抗原検出システムの開発

所属 国立感染症研究所 ウイルス第2部
研究者 武田 直和

分担研究者

国立感染症研究所ウイルス第2部 片山 和彦
株式会社BML研究開発1部 福士 秀悦、小嶋 慈之

要 旨

ノーウォークウイルスゲノム全長塩基配列を多数決定し、最も保存された領域を明らかにした。この領域を用いたリアルタイム核酸定量検出法、ゲノタイピング法を確立した。すべてのゲノタイプに共通するアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体を作成した。

1. 研究目的

ノーウォークウイルス（2002年に *Norovirus* ; ノロウイルスと呼称することが ICTV により決定された。以降 *Norovirus* と記載する）感染症の全貌を明らかにするためには、従来のように集団食中毒患者の排泄物、食品だけでなく、健常者排泄物や、下水、海水などの環境要素をも対象とした *Norovirus* の調査が必要である。しかし、現在も増え続けている *Norovirus* の血清型、遺伝子型が *Norovirus* 検出システムの構築を困難な物にしている。本研究は、増え続ける新たな *Norovirus* 株の全ゲノム塩基配列を決定し、データベースを構築すると共に全ての *Norovirus* 株を網羅し、特殊な機器を必要としないベッドサイド抗原検出システム、及び下水、海水など環境要素に含まれる微量な *Norovirus* を濃縮し、超高感度かつ定量的に *Norovirus* 核酸を測定するシステムを構築することを目指す。本研究期間を通じて行われる *Norovirus* ゲノム全長塩基配列のデータベース構築は、*Norovirus* の遺伝子構造及び特徴を明らかにし、分子レベルでのウイルス複製機構の解明、病原性発現機構の解析を推進する原動力となる。

本年度までの2年間は、データベース上に報告のない新たな *Norovirus* 株の全塩基配列を複数本決定し、それらを用いた解析により高感度核酸定量検出法を確立することを目的とした。

また、構造蛋白質を昆虫細胞に発現させて得られる *Norovirus* 中空粒子 (VLP) を用いた ELISA システムを構築し、*Norovirus* の血清型と genotype との関係を探るとともに、多種類の血清型に共通する *Norovirus* のアミノ酸配列を探し、それを利用して作成した抗体を評価することを目的とした。さらに河川水、海水などからウイルスを効果的に検出するために使用する効果的なウイルス濃縮技術の開発に取り組んだ。

2. 研究方法

(1) 全塩基配列の決定とデータベースの構築

患者糞便より核酸を抽出し、RNA 溶液を得た。各検体より抽出した RNA は、oligo dT をプライマーに用いた逆転写反応後に、Long-PCR を施行し、そこで得た増幅産物の塩基配列を primer walking 法によりダイレクトに決定した。ゲノムの5'末端および3'末端配列の決定は、RACE 法により行った。決定した塩基配列は DDBJ に登録し、データベース化した。

(2) 検体採取。高度保存領域の検索、プライマー及びプローブの作製

1997年から2000年にかけて、埼玉県内で発生した非細菌性胃腸炎患者糞便検体のうち EM 法により *Norovirus* 粒子が確認された79検体および、カキを食して胃腸炎になった患者 M.S. の糞便1検体、2001年に和歌山県内で発生

した集団胃腸炎患者の糞便検体を採取した。これらの検体の一部分を全塩基配列解析に使用した。

核酸データベース上に存在した既報の全長配列 Norwalk virus (NV68)、Southampton virus (SO)、BS5、Lordsdale virus (LD)、Camberwell virus (CW) Hawaii virus (Hawaii)、MD145-12 strain (MD145)に加え、分担研究者の決定した全長塩基配列 Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U201, U25, Chiba virus (Chiba) SzUG1, WUG1-11 を対象として用いた。Clustal W を用いて核酸のアライメントを施行し、木村らの 2 パラメーター法によって distance を算出し分子系統解析を行い、対象とした 18 本の全長塩基配列を genogroup I (GI) と genogroup (GII) の 2 グループに分別した (GI; 6 株, GII; 12 株)。これらを group ごとに clustal W で再度アライメントし、Plot Similarity analysis を用いて GI, GII 別に株間で塩基配列が高度に保存されている領域を検索した。

遺伝子が最も高度に保存されていた領域 (ORF1-ORF2 junction region) を内包する塩基配列を核酸データベース上から約 60 株収集し、新たに GENETYX-Mac version 11 でアライメントし、Norovirus GI 増幅用プライマー及び検出用プローブ、Norovirus GII 増幅用増幅用プライマー及び検出用プローブを設計した。検出用 probe には TaqMan PCR による蛍光検出に対応する蛍光色素 FAM を 5'末端に TAMRA を 3'末端にそれぞれラベルした。これらと、ORF1-ORF2 junction region 領域を pT7Blue plasmid vector にサブクローニングしたプラスミドクローンの 10 倍希釈系列を作成し、TaqMan PCR を検討した。さらに電子顕微鏡法により Norovirus 陽性であった糞便検体 7 9 例およびカキを食して胃腸炎になった患者糞便検体 1 例からなる実際の検体を用いて TaqMan 法による検出系の特異性と検出率の確認を行った。カキなどの食品類から Norovirus 検出を検討するために、カキの中腸腺抽出液を用いた NV 陽性糞便検体の添加回収試験を行った。

(3) 組換え中空粒子の作出と高力価血清の作製

ウイルス性胃腸炎患者の糞便から、RNA を抽出し、ORF2 に設計した SKG1F&SKG1R 又は SKG2F&SKG2R 設計したプライマーを用いて構造蛋白 (キャプシド領域) のアミノ末端約 300 塩基を増幅した。得られた増幅産物はダイターミネータ法によるサイクルシーケンシングで塩基配列を決定し、分子系統解析によって GI と GII さらに genotype に分類した。新たな genotype に分類された株、もしくは今までに VLP を作出したことがない株について、抽出した RNA を鋳型に RT-PCR で構造蛋白の全領域を増幅し、組換えバキュロウイルス発現系による VLP 作出を試みた。組換えバキュロウイルスの作製にはバキュロウイルストランスファーベクター-pVL1392 あるいは pVL1393 を用い、増幅した構造蛋白の全領域をクローニングして組み込んだ。リポフェクション法で野生株バキュロウイルスと共に Sf9 細胞にトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。組換えバキュロウイルスを MOI 5-10 で Sf9 細胞に感染後、26.5°C で 5-7 日間培養した。発現蛋白は患者回復期血清を用いたウエスタンブロット法で確認した。培養上清に産生された大量の VLP を CsCl ならびに蔗糖密度勾配遠心で精製した。

抗体 ELISA は、組換えバキュロウイルスで発現された VLP を抗原とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG あるいは IgM 抗体を用いて施行した。抗原 ELISA は、組換えバキュロウイルスで発現された VLP に対するウサギ免疫血清を捕獲抗体とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗 Norovirus 抗体を検出抗体とするサンドイッチ型 ELISA として構築し、施行した。

(4) 免疫血清の作製。単クローン抗体の作製

本研究によって決定された Norovirus の塩基配列を用いてすべての genotype に共通して保存されているアミノ酸配列を検索した。高度保存領域のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを (genogroup I (GI) 特異的オリゴペプチドとして QGEFTISPNNNT, genogroup II (GII) 特異的オリゴペプチドとして GEFTVSPRN) ペプチド合成機で合成した。合成ペプチドを精製し、KLH でコンジュゲート後、ウサギ (NZW) およびマウス (BALB/c) に免疫し、抗血清および単クローン抗体を得た。様々な血清型のキャプシド蛋白質領域を持つ組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞 Tn5 に感染させ、4 日後に感染細胞を回収し、塩化セシウムを用いた超遠心により VLP を精製した。GI は 4 株の VLP、GII は 8 株の VLP、さらに免疫に用いたオリゴペプチドとは異なるアミノ酸配列を有する変異 VLP を数種類作製し抗血清および単クローン抗体の評価に用いた。ウサギの抗血清と単クローン抗体の評価は western blotting で行った。

(5) 効果的な Norovirus 濃縮技術の開発

バキュロウイルス発現系にて得られた VLP 5ug あるいは患者糞便より精製した Norovirus 粒子 1×10^6 を試料水に加えた。陰電荷膜法では HA 膜にウイルスを吸着させ 0.5mM H_2SO_4 で洗浄後、1mM NaOH で誘出した。陽電荷

膜法では、Zetapor 膜にウイルスを吸着させ 0.5mM H₂SO₄ で誘出した。誘出した VLP およびウイルス粒子は限外ろ過膜で二次濃縮を行った後、それぞれウサギ抗 VLP ポリクローナル抗体を用いた ELISA および TaqMan 法によるリアルタイム PCR で測定した。また、精製したウイルス粒子を吸着させた HA 膜からダイレクトにウイルス RNA を抽出する方法について検討した。

3. 研究成果

(1) 全塩基配列の決定、データベースの構築

既報の *Norovirus* と異なる新たな遺伝子型である 10 株 (GI; SzUG1, WUG1, GII; Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U205, U25) の全塩基配列を決定した。既報の株 (GI; Norwalk virus, Southampton virus, BS5 virus, Chiba virus および GII; Lordsdale virus, Camberwell virus, Hawaii virus, MD145-12 strain) に今回われわれが新たに決定した株を含め、*Norovirus* 全塩基配列のデータベースを構築した。これらを group ごとに (GI; 6 株, GII; 12 株) アライメントした結果、塩基配列が保存されている部分と多様性に富んでいる領域がいくつか認められた。これまで *Norovirus* の塩基配列は多様性に富むと考えられていたが、全塩基配列の平均ホモロジーは 70% 以上であった。最も高度に保存された領域は ORF1 と ORF2 のジャンクション領域から ORF2 の N 末端 300 塩基ほどの領域であった。全塩基配列を複数本決定することにより、初めて *Norovirus* の全体像をとらえることに成功した。

(2) 検体採取、高度保存領域の検索、プライマー及びプローブの作製

新たに設計したプライマー及びプローブの TaqMan PCR における感度と特異性を評価するために、*Norovirus* の GI, GII それぞれのプラスミドコントロールの希釈系列に対する検出感度を調べたところ GI, GII それぞれ 10⁷~10¹ コピーの間で Ct と相関性があり (検出限界はどちらも 10¹ コピー/1 反応)、この範囲内で定量測定が可能であることが示された。なお、GI, GII 間での交差反応は認められなかった。

本研究で用いたプライマー及び蛍光プローブは、TaqMan PCR において非特異的な増幅産物には反応せず、標的 PCR 増幅産物にしか反応しなかった。TaqMan PCR は、PCR 増幅産物を反応チューブから取り出すことなく、蛍光強度の変化に基づいた *Norovirus* 特異的 PCR 増幅産物のみをリアルタイムに定量する事が可能であった。また、電子顕微鏡観察で *Norovirus* 陰性と判断された検体を本方法で調べたところ、一例を除いたすべての検体が陽性を示した (検出率: 98.8%)。内訳をみると、9 例 (11.3%) が GI, 61 例 (76.3%) が GII, GI と GII の混合感染が 9 例 (11.3%) であった。また、*Norovirus* 非陽性検体 20 例 (内訳はロタウイルス感染、アデノウイルス感染、腸炎ピブリオ感染、健常者など) はすべて陰性を示した。

(3) 組換え中空粒子の作出と高力価血清の作製

本研究の成果から genotyping に最適な領域を明らかにし、構造蛋白質領域の塩基配列を用いた genotyping によって合計 19 種類の血清型の存在を予想した。これらの内、すでに VLP 作成を終えていた GI の 6 種類と GII の 8 種類、合計 14 種類を除き、GI の r645 (Desert Shield-like virus)、II の r809 (Mexico/Toronto-like virus)、r754 (Snow Mountain-like virus) および r10-35 の合計 4 種類の genotype の VLP を発現させた。これで合計 11 種類の VLP の産生に成功した。

抗体 ELISA については、発現した 11 種類の VLP を抗原にして IgG 抗体検出系を確立した。過去 20 年間に免疫電子顕微鏡法、ELISA 法あるいはウェスタンブロット法による解析から血清学的に異なる *Norovirus* が多数存在することが確認されているが、11 種類の VLP と抗血清を用い、抗原の交差性を ELISA 法で調べた。GI, GII 間での交差性はほとんどみられなかった。血清学的に異なることが既に明らかになっている株同士の反応パターンを対照にして相互に比較した結果、これらは 11 種類の VLP は全て互いに異なる genotype に属するだけでなく、抗原的にも異なると考えられた。すなわち、構造蛋白質領域の塩基配列を用いた genotyping は、*Norovirus* の抗原性を予測し得ることが明らかになった。

抗原 ELISA については、7 種類の *Norovirus* 抗原を型別できる抗原 ELISA 法を確立した。同種の VLP を抗原に用いた場合の感度は個々の VLP によって多少の変動はあるものの、おおむね 10⁶ 粒子/well であった。血清型特異性は極めて高く、異種の VLP との交差性は全くみられなかった。First PCR で増幅バンドが確認され、塩基配列も解析できている糞便材料を用いてその 10% 乳剤を調製し、10 倍階段希釈してその吸光度を調べたところ、20,000 倍の希釈でも陽性となる検体が見られた。したがって患者便中には予想以上に大量の *Norovirus* が排泄されていることが明

らかになった。この ELISA を用いて小児の散発性下痢症患者の糞便検体について抗原検出を行なった。一つの県から集められた 433 検体で調べたところ、2 検体 (0.5%) が GI グループの抗原が陽性となり、39 検体 (9.0%) が GII グループの抗原が陽性となった。中でも GII グループの Camberwell/Lorsdale / Bristol 型 *Norovirus* が ELISA 陽性 *Norovirus* の約 85% を占めていた。

(4) 免疫血清の作製。単クローン抗体の作製

我々が新たに全塩基配列を決定した *Norovirus* 9 株と、既報の配列を対象に、ゲノム全長にわたってアミノ酸配列を詳細に解析した結果、最も高度に保存された領域は GI, GII ともに ORF2 の NS domain 近傍に存在していることが明らかになった。この領域近傍のアミノ酸配列を 71 株決定し、高度に保存されているアミノ酸配列を調べた。GI, GII それぞれの最も保存されている配列をもとに、GI 特異的アミノ酸配列を持つオリゴペプチドとして (1) QGFEITISPNT および (2) SRPYQLKPVGTA、GI, GII の両方に対して共通するアミノ酸を持つオリゴペプチドとして (3) GEPTVSPRN および (4) VPTVSCRVLTR を合成した。これらのオリゴペプチドをウサギ (NZW) およびマウス (BALB/c) に免疫して得られた抗血清を用い、バキュロウイルスを用いて作製した様々な血清型の VLP に対する反応性をウエスタンブロットで検討した。その結果、GI 特異的オリゴペプチドに対する抗血清は GI の VLP に特異的に反応し、GI, GII 両方に共通するオリゴペプチドに対する抗血清は GI, GII 両方に反応した。*Norovirus* 非感染の下痢症患者の糞便 (ロタウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスに感染、ワクチン予防接種による下痢を含む) の懸濁液には反応しなかった。これらの結果から、今回作製した *Norovirus* オリゴペプチドに対する抗血清は *Norovirus* に対し特異的に反応することが明らかとなった。

マウス抗 GI ペプチド単クローン抗体 2 種類、抗 GII ペプチド単クローン抗体 4 種類を得た。GI VLP および GII VLP を用いて western blotting で反応性を調べたところ、抗 GI ペプチド単クローン抗体はどちらもすべての GI VLP を認識した。一方、抗 GII ペプチド単クローン抗体も GII VLP を特異的に認識した。現在、データベースに登録されている *Norovirus* の 93% は単クローン抗体作成に用いたペプチド配列を有するが、アミノ酸が一つ異なる株が 9 株存在することが確認された。1 アミノ酸変異をもつ *Norovirus* が今回作製した単クローン抗体で検出可能かどうか検討するために U201 株 (GII) をベースに共通ペプチド領域に 1 アミノ酸置換を導入した変異 VLP を 6 種類作製し、western blotting による検出を行った。GII specific 単クローン抗体のうち、抗体 2-3 は共通ペプチド領域の前半に変異がある株を認識不能であったが、後半に変異がある株は認識可能であった。また抗体 2-4 はその逆の反応性を示した。一方 rabbit ポリクローナル抗体はすべての変異株を認識した。

(5) *Norovirus* 濃縮法

陰電化膜、陽電化膜を用いた濃縮法の検討をするため、試料水中に VLP を添加し、回収率を VLP の ELISA で測定したところ陰電荷膜法、陽電荷膜法ともに 20% 以下の回収率であった。患者糞便から精製した NV 粒子を添加し TaqMan 法で測定した場合も数% と低い回収率であった。以上の結果から、回収できなかった VLP またはウイルス粒子は膜に吸着したまま誘出されてない可能性が示唆された。次に精製した NV 粒子を試料水に添加し陰電荷膜に吸着させた後、膜に RNA 抽出試薬を添加し、直接膜から RNA 抽出を試みたところ、ウイルス回収率は 50-70% にまで上昇した。

4. 考 察

Norovirus 遺伝子を効率良く増幅し検出する方法を確立するためには、さまざまな遺伝子型の *Norovirus* ゲノム全長の塩基配列データの集積が必須である。本研究では、新たに *Norovirus* 9 株の全塩基配列を決定し、これまでに報告されている株を含めて *Norovirus* ゲノム全長データベースの構築を行った。このデータベースを利用した塩基配列解析により、*Norovirus* ゲノムで最も塩基配列が保存されている領域や、逆に多様性に富んだ領域が明らかになった。我々が明らかにした ORF1 と ORF2 のジャンクション近傍の高度保存領域は、ORF1 と ORF2 が重なっている領域を含んでいる。さらに、*Norovirus* の ORF2 はサブゲノミック mRNA により翻訳されると考えられ、ORF2 の直前の塩基配列は ORF2 の転写などに重要な役割をもった塩基配列を含んでいる可能性がある。本領域は核酸の変異に対して前述のような二重の制約がかかり高度に保存された領域になっていると思われる。

この領域内に設計したプライマーおよび蛍光プローブは、TaqMan PCR において高感度かつ高い特異性を示した。また、TaqMan PCR は、PCR 増幅産物を反応チューブから取り出すことなく、蛍光強度の変化に基づいたリアルタ

イム定量が可能である。TaqMan PCRは従来のRT-PCR法のように電気泳動あるいはサザンハイブリダイゼーションなどによる増幅産物の定性が不要なことから、RT-PCR法では問題となる増幅産物による実験設備や試薬類の汚染（コンタミネーション）の可能性が少ないと考えられた。また、NV陽性糞便検体をカキの中腸腺抽出液で希釈したものを用いた検討を行った結果、これらのサンプルは蒸留水で希釈したコントロールと同じ希釈系列と全く同じ蛍光シグナル強度を示した。このことから、本法はカキの中腸腺懸濁液などの混入物の多い検体から、高感度かつ定量的に *Norovirus* の RNA を検出可能であることが明らかになった。今後、本法を利用し、カキ以外の食材や調理器具スミアサンプルなどからの高感度かつ定量的な *Norovirus* RNA 検出が可能になると思われた。

Norovirus は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域や Capsid 領域の部分的な塩基配列を用いた解析により GI と GII それぞれの genogroup に多種類の subgroup や血清型が存在することが報告されている。本来、ウイルスの genotyping, subtyping を行うためには、genotype, subtype が互いに異なると予想される完全長のゲノムシーケンスを複数用いて、全長にわたる分子遺伝学的解析を行い、ゲノムリコンビネーションを考慮に入れたうえで typing に適した領域を選択する必要がある。本研究により構築された *Norovirus* ゲノム全長の塩基配列データベースはさまざまな遺伝子型、血清型を含み、分子遺伝学的解析にもとづいて構築された構造蛋白質領域の genotyping 法は、今後の *Norovirus* 感染症の分子疫学に大きく貢献すると思われた。

集団発生であれ散发例であれウイルス性下痢症が出た場合、はじめにすることは患者便材料からのウイルス検出である。この点については、全塩基配列の解析結果より得られた ORF1, 2 ジャンクション領域に設計したプライマープロベセットを用いた TaqMan PCR を実用化すれば、あくまでも EM 法が標準法ではあるものの、解決されると思われる。今回開発に成功した抗原 ELISA は迅速性、容易さ、費用の点から多量の検体を短時間で検査する目的には最適である。問題点は検出感度は 10^6 粒子程度と PCR に比べてであることと、VLP を供給し得ないタイプを検出できないことである。我々が構築した genotyping 法に基づいたデータベースの作製と提供を進め、あらたな genotype に対する VLP を作成し抗原抗体 ELISA システムをより充実させてゆくとともに、TaqMan PCR と併用しながら後述する共通抗原部位を用いて作成したモノクローナル抗体による簡便な検出系の開発を急がなければならない。

本研究では、*Norovirus* 株の全塩基配列解析をもとにゲノム上、保存されている領域を解析し、ORF2 の NS domain の一部が高度に保存されていることを発見した。この部分に相当する合成オリゴペプチドを免疫することによって得られた抗血清は GI および GI, GII の両方に特異的に反応した。これらのオリゴペプチドを用いて作成したマウス単クローン抗体は、genogroup 特異的に様々な VLP を認識することが明らかになった。これらの抗体は多様な抗原性を示す *Norovirus* を幅広くかつ簡便に検出する抗体抗原反応系を確立するのに有用であると考えられた。

Norovirus 感染症は、主にカキなどの食材に含まれるウイルス粒子を摂食することによって発症する。カキは海水中に含まれる食物を濃縮する際、ウイルスも濃縮していると考えられている。つまり、海水、河川水に含まれる *Norovirus* を検出し、その濃度をモニターできれば *Norovirus* の疫学調査、感染予防に有用である。しかし、これらに含まれる *Norovirus* は微量であり、効果的な濃縮技術無くして測定することはできない。陰電荷膜法あるいは陽電荷膜法はいずれの手法も従来報告されている濃縮操作では VLP 又は *Norovirus* の回収率が低かった。しかし、本研究で開発した陰電荷膜から直接 RNA を抽出する方法は、ウイルス回収率を最大で 70% にまで向上させるとともに、膜から誘出後に、限外ろ過膜を使った行程を必要しないため簡便である。本濃縮法の開発および TaqMan PCR によるリアルタイム定量検出系の開発は、今まで不可能であった海水及び河川水からの *Norovirus* の検出ばかりでなく、環境中の *Norovirus* 濃度の測定や、食品からの *Norovirus* にも有用であると思われた。

5. まとめ

新たに *Norovirus* 10 株の全塩基配列を決定し、既知の配列も含めて全塩基配列のデータベースの構築を行った。*Norovirus* の全塩基配列を解析した結果、*Norovirus* 遺伝子の高度保存領域を同定し、RT-PCR による高感度検出系のためのプライマー、プローブの設計を行った。これらを用いた TaqMan PCR は、*Norovirus* cDNA プラスミドを用いた検討において優れた検出感度、特異性、定量性を示した。今後、実用化に向けた実検体を用いた検討でも良好な成績を示した。さらに、本研究で開発に成功した陰電荷膜濃縮法と組み合わせることにより、河川水、海水などからも *Norovirus* の遺伝子を検出可能であることが示され、河川及び海洋のウイルス汚染調査、カキなどの食材や調理器具スミアサンプルなどからの高感度な NV 検出への道が開かれた。

構造蛋白質をクローニングし、昆虫細胞に発現させて得た VLP により、抗原検出 ELISA, 抗体検出 ELISA を構築した。Genotyping 法との比較から、genotype は抗原性の違いを良く反映していることが明らかになった。VLP ELISA の検出感度を向上させるためには新たな genotype に対応した VLP 作出を続ける必要がある。Norovirus のすべての genotype を抗原抗体反応で検出するためには、genotype に共通して存在するアミノ酸配列の探索が必要不可欠である。本研究では、Norovirus の全アミノ酸配列の解析を行い、キャプシド蛋白質の一部が最も保存されていることを明らかにした。この部分の合成オリゴペプチドを免疫して得られた抗血清は様々な genotype の VLP に反応したことから、Norovirus に対する共通抗体として、抗原抗体反応を用いた Norovirus 検出系に応用可能であると考えられた。さらに単クローン抗体の作製を行い、様々な VLP に対して良好な反応性を示す単クローン抗体の作出に成功した。今後、簡便な Norovirus 検出系の構築を進めていく必要があるが、これらの抗血清および単クローン抗体は Norovirus の抗原性に左右されることなく幅広く検出する系を構築するための有望なツールになると考えられる。

6. 研究発表

学会発表

1. 片山和彦：下痢症ウイルス (Norwalk-like viruses を中心として) . 国立保健医療科学院 平成13年度特別課程ウイルスコース講義 平成14年11月7日
2. 福土秀悦, 影山 努, 小嶋慈之, 片山和彦：HCV IRES と 40S ribosomal protein S5 との結合. 第49回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 平成13年11月20日
影山 努, 小嶋慈之, 福土秀悦, 星野文則, 片山和彦, 武田直和：Norwalk virus ゲノムリコンビネーションの解析. 第49回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 平成13年11月18日.
3. 片山和彦：NLVs 系統樹解析の統一化に向けて. 衛生微生物技術協議会 第22回研究会, 徳島, 平成13年7月12日.
4. 影山 努, 小嶋慈之, 高井玲子, 星野文則, 福土秀悦, 白土東子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和：Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製. 第50回日本ウイルス学会学術総会, 札幌, 平成14年10月16日
5. 白土東子, 片山和彦, 田村 克, 名取克郎, 岡智一郎, 武田直和, 宮村達男：ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討. 第50回日本ウイルス学会学術総会, 札幌, 平成14年10月16日
6. 片山和彦, 白土東子, 岡智一郎, 小嶋慈之, 影山 努, 福土秀悦, 武田直和, 宮村達男：Norwalk-like virus の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 第50回日本ウイルス学会学術総会, 札幌, 平成14年10月16日
7. 松原尚子, 片山和彦, 白土東子, 岡智一郎, 小川智子, 武田直和, 浜野国勝, 福土秀悦, 小嶋慈之, 影山 努, 高井玲子, 星野文則, 宮村達男：バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成14年12月11日
8. K. Katayama, H. Horikoshi-Shirato, T. Oka, K. Natori, N. Takeda, and T. Miyamura : GENOTYPING OF "NORWALK-LIKE VIRUSES" BASED ON PHYLOGENETIC ANALYSES OF 18 FULL GENOME SEQUENCES. INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGY, Paris, France, Aug 1, 2002.
9. 片山和彦：ウイルスの遺伝子解析の現状と今後の展望. 衛生検査専門技術研修学術講演会 学術講演, 横浜, 平成14年12月12日

論文発表

1. 片山和彦, 白土 (堀越) 東子, 武田直和: ノーウォークウイルスの分子系統解析とタイピング. 日本臨牀 60:6, 1165~1174, 2002
2. 片山和彦: ノーウォークウイルス診断法の進歩. ワールドフォーカス (in press)
3. 片山和彦: 新世紀の感染症学: カリシウイルス. 日本臨牀 (in press)
4. 白土東子, 片山和彦: 新世紀の感染症学: ノロウイルス. 日本臨牀 (in press)
5. Shigeyuki Kojima, Tsutomu Kageyama, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama., Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., *Journal of Virological Methods* vol 100 p107-114, 2002.
6. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, and Takeda N. Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* vol 299, p225 - 239, 2002.
7. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, and Katayama K. A broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative RT-PCR. *J of Clin Micro* (in press)