

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

平成 15 年度～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書

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 武田 直和 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧 17

III. 研究成果の刊行物・別冊 23

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

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

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

研究要旨 本研究によって、ノロウイルス（NoV）ジェノグループ I（GI）で 6 株、GII で 20 株、合計 26 株の抗原および抗血清が作製できた。血清学的には GI で 6 種、GII で 12 種、計 18 種である。中空粒子（VLPs）と抗血清の成績を基に、迅速かつ簡便な NoV 抗原検出 ELISA を確立し、診断キットとして承認を得ることができた。また、NoV イムノクロマト診断キットを構築するとともに、より広範に感度よく NoV 抗原を検出する ELISA を構築するために、VLPs と単クローン抗体研究を推進した。分子疫学研究から、GII が流行の主役であること、わが国でも GII/4 に遺伝子の変化が起こっていることが示された。NoV を多数解析するうえでの SSCP の有効性を明らかにし、井戸水に起因する NoV 感染症・食中毒を解析した。NoV の結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とする NoV もあることを明らかにした。カリシウイルスデータベースの構築によって、NoV を同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。NoV の複製機構の解析とサポウイルス（SaV）ORF1 の切断地図作成が進展し、予防・治療を目的とした創薬研究の足がかりができた。SaV においても GI、GII、GIV、GV で VLPs の発現に成功し高度免疫血清を作製した。動物細胞を用いて SaV VLPs を効率よく作製する方法を確立した。SaV の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 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。ファージ抗体ライブラリーからファージディスプレイ法によりロタウイルスに感染防御能を有するとおもわれる 3 種のヒト型単クローン抗体を分離した。ELISA によるロタウイルス抗原検出法を確立した。ロタウイルスで配列非依存的な遺伝子増幅法を確立した。A 型肝炎ウイルスの濃縮と定量的検出が確立できた。免疫磁気ビーズで下水からアイチウイルスを濃縮し、新たな遺伝子型を検出した。ウイルス性下痢症検査マニュアル第 3 版を作成した。

分担研究者		三好 龍也	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	池田 芳春	同上
谷口 孝喜	藤田保健衛生大学	吉田 永祥	同上
柴 賢司	愛知県衛生研究所	北元 憲利	姫路工業大学
大瀬戸光明	愛媛県立衛生環境研究所	守口 匡子	藤田保健衛生大学
篠崎 邦子	千葉県衛生研究所	黒澤 良和	同上
斎藤 博之	秋田県衛生科学研究所	和久田光毅	同上
松岡由美子	熊本市環境総合研究所	長嶋 茂雄	同上
勢戸 祥介	大阪府立大学	佐々木 潤	同上
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所	浅野 喜造	同上
西尾 治	国立感染症研究所	吉川 哲史	同上
名取 克郎	同上	實方 剛	鳥取大学農学部
片山 和彦	同上	小林 慎一	愛知県衛生研究所
岡 智一郎	同上	山下 照夫	同上
白土 東子	同上	伊藤 雅	同上
		椋島 由佳	同上
協力研究者		藤浦 明	同上
岩上 泰雄	堺市衛生研究所	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
内野 清子	同上	近藤 玲子	同上

豊嶋 千俊	同上
岡田 峰幸	千葉県衛生研究所
東方 美保	福井県衛生環境研究センター
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
山本 保男	徳島県保健環境センター
新屋 拓郎	熊本市環境総合研究所
森田 美加	同上
平野 敬之	佐賀県衛生薬業センター
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
改田 厚	大阪市立環境科学研究所
阿部仁一郎	同上
久保 英幸	同上
入谷 展弘	同上
勢戸 祥介	大阪市立大学
徳竹 由美	長野県環境保全研究所
中村 友香	同上
粕尾しず子	同上
小林 正人	同上
和田 啓子	同上
杉枝 正明	静岡県環境衛生科学研究所
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
西田 知子	山口県環境保健研究センター
田中 俊光	千葉市環境保健研究所
中込 治	長崎大学医学部
山口 卓	国立感染症研究所
秋山 美穂	同上
愛木 智香子	同上
岡部 信彦	同上
名取 克郎	同上
グラント・ハンスマン	東京大学
三瀬 敬治	札幌医科大学

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとり益々脅威となってきた。ノロウイルス (NoV) による集団食中毒や A 型肝炎ウイルス (HAV) による集団急性肝炎など、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになってきたことが背景にある。発生状況を正確に把握し、その結果を国民、行政機関、および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、本感染症を制圧する上で重要な施策のひとつである。本感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝と NoV、二枚貝と HAV の組合せ以外は原因食品や原因物質を特

定できるに至っていない。さらに、関与するウイルスが極めて多彩であるため、ターゲットが絞りにくい点も理由にあげられる。食品由来ウイルス感染症からは、上記の二つのウイルスのほか、サポウイルス (SaV)、ロタウイルス (RV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV) が検出される。いずれも RNA を遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要がある。また、本感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要がある。

本研究では、(1) 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る、(2) 原因食品からの抗原検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いた濃縮法を導入し、検出効率の向上を目指す、(3) 環境からの抗原検出には生化学、電気化学的手法で濃縮を行うと共に、各種膜分離技術を応用して効率の向上を計る、(4) 個々のウイルスについてその検査材料別に検査法を把握しその検出限界を明らかにすることを目的とする。ウイルス性食中毒のリスク評価には感染価を測定することが必須であり、そのための培養細胞を用いた培養系の確立が急務である。これに向けた基礎実験を並行して行う。これらの成果を基に、本感染症に関与するウイルスが食品を汚染するまでの経路を明らかにすることにより、検査法とその検出限界が明確になる。また、検出法をマニュアルとして広く普及することによって、国内における検査法の標準化が可能になる。しかしながら、最近、特別養護老人ホームや老人ホームで、これまで食品由来ウイルス感染症と考えられてきた NoV 感染症で多数の死者が出るという事態が発生した。NoV の診断は標準法となっている電子顕微鏡や RT-PCR、また、我々が本研究班で確立した抗原検出 ELISA があるがいずれもベッドサイドでの検査法とはいえない。15 分で診断が可能であるイムノクロマトによる抗原検出系を確立し、NoV ベッドサイド迅速診断法を確立することも目的とした。

B. 研究方法

(1) 組換えバキュロウイルスを用いた NoV 中空粒子 (VLPs) の作製

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 1650bp、あるいは ORF2 から 3' 末端のポリ A までの約 2300bp 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。Tn5 細胞に感染後、電気泳動による 58K 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。

(2) 単クローン抗体およびポリクローン抗体を用いた NoV 抗原検出 ELISA

GI NoV を特異的に認識する単クローン抗体 #3912 と GII NoV を特異的且つ広範囲に認識する単クローン抗体 #NS14 を抗原捕獲抗体として混合し、マイクロプレート上の 1 穴に固相した。検出抗体として NV23 を用いた。VLPs を免疫源としてウサギに接種し、免疫血清を作製した。得られたウサギ抗 NoV 抗体を捕捉抗体およびビオチン化 NoV 抗体を検出用抗体とした NoV 抗原検出 ELISA を構築した。

(3) NoV 抗体検出 ELISA

精製した VLPs を抗原として 96 穴マイクロプレートをコーティングした。患者あるいは健常人血清をこのマイクロプレート上で 2 倍階段希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗ヒト IgM、および抗ヒト IgG を反応させた。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。

(4) イムノクロマト (IC) の構築

GI, GII を特異的に認識する単クローン抗体、#3912 および #NS14 を用い捕獲抗体および金標識検出抗体として IC キットを構築した。

(5) NoV の一本鎖高次構造多型解析 (Single Strand Conformation Polymorphism: SSCP 解析)

ビオチン化プライマーを用い平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「NoV の検出法について」に準拠して RT-PCR を行なった。増幅産物を SSCP バッファで希釈して熱変性後、SSCP ゲルにアプライし、ゲル温度を 24℃ に保ちながら泳動した。電気泳動終了後、ゲル中の PCR 産物をナイロン膜へ転写し、ビオチン化学発光検出キットを用いて SSCP パターンを検出した。

(6) ヒト型抗体の作製

ヒトロタウイルス (HRV) KU 株の精製ビリオンを抗原として、ヒトの扁桃腺、骨髄、臍帯血および末梢血から作製したファージ抗体ライブラリーからファージディスプレイ法により抗 HRV 抗体 (Fab) を単離した。感染防御実験は、生後 5 ~ 7 日齢の

BALB/c マウスを用いて、精製各抗体を感染 1 時間前に経口投与し、下痢の程度をスコア化して、判定した。

(7) ロタウイルス抗原の検出

粒子中のもっとも多量に存在する内層タンパク質 VP6 の共通抗原に反応するモノクローン抗体を固相した 96 穴プレートを用いた ELISA にて被検血清中の VP6 抗原量を測定した。また、同様に VP7 ないし VP4 に特異的な中和モノクローン抗体を用いた ELISA により、VP7 抗原、VP4 抗原の検出も試みた。

(8) NoV およびその他の下痢症ウイルスの遺伝子増幅と遺伝子解析

NoV と SaV は糞便の電子顕微鏡法 (EM) 及び RT-PCR で行った。ウイルス性下痢症検査マニュアル (第 3 版) の術式にある GI と GII に特異的なプライマーに加え、Alphatron 株、Amsterdam 株の検出用にプライマーを別途設定した。これらのウイルスの遺伝子解析は、PCR 産物のダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し NJ 法で系統樹解析を行った。また一部クローン化後塩基配列を決定した。環境中の NoV 遺伝子検索では、濾過水 1000ml を HA フィルターで吸着させ、2ml に溶出し濃縮 RNA 抽出用サンプルとした。RV とアデノのウイルスの検出は市販の EIA キットを用いた。AstV 検出も RT-PCR 法で行った。HRV では RNA の 5' 末端をリン酸化し 3' 末端をアミノ化した任意の配列をもつプライマー A とウイルスゲノムを T4 RNA リガーゼにて反応し、未反応リンカーを除去後、プライマー A と相補的なプライマー B を用いて逆転写酵素反応を行った。この cDNA を鋳型としてプライマー B による PCR を行った。井戸水からのウイルス濃縮は、①超遠心法のみ濃縮と、②「ウォーターコンセル・ビルコン」キットで濃縮後、超遠心法で濃縮する方法で行った。AiV の検出では流入下水の遠心上清、および処理下水の限外濾過濃縮の遠心上清を材料とした。AiV 抗血清を吸着させた磁気ビーズを下水と反応後回収し、ウイルス RNA を抽出した。RT-PCR を用いて AiV 遺伝子を増幅し、クローン化してその塩基配列を調べた。HAV のリアルタイム PCR 法によるコピー数の測定は、1 件につき 3 回行った。また、RT-PCR で遺伝子を増幅後、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。

(9) NoV 高感度 RT-PCR

RT-PCR 法と抗原検出 ELISA を用いて原因 NoV の遺伝子型を同定し、これと同じ遺伝子型の NoV 抗体結合磁気ビーズを調製した。食品の表面を精製水で洗い流した後、遠心して上清を回収した。抗体結合磁

気ビーズを加えて反応させた後、磁気ビーズから RNA を抽出した。糞便検査と同様の方法で RT-PCR を実施した。

(10) SaV がコードするポリペプチドの発現と抗体の作製

SaV の ORF1 および ORF2 ポリペプチドに対応する 16 種類の遺伝子領域を PCR 法によって増幅し、それぞれヒスチジンタグ融合タンパク質およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現した。上記発現タンパク質のうち、ORF1 の異なる領域に対応する 8 種類および ORF2 に対応する 1 種類、合計 9 種類のヒスチジンタグ融合タンパク質を 8M 尿素変性条件下で TALON affinity resin (Clontech 社) を用いて精製した後、4M 尿素/PBS に透析した。精製したリコンビナントタンパク質を、ウサギに免疫し、抗血清を得た。各抗血清の特異性は、免疫に用いた 9 種類のリコンビナントタンパク質を SDS-PAGE し、ウェスタンブロット法によって検討した。

(11) サポウイルス ORF1 の切断地図の決定

SaV Mc10 の full-length cDNA clone を作製した。この plasmid を鋳型として、サポウイルス ORF1 の全長もしくは一部に対応する遺伝子領域を T7 promoter 配列を有するセンスプライマーと、終止コドンおよびポリ A テイルを有するアンチセンスプライマーを用いて PCR 法によって増幅した。この PCR 産物を鋳型として Rabbit reticulocyte *in vitro* coupling transcription/ translation system (プロメガ) を用いて ³⁵S メチオニン標識タンパク質を発現させた。翻訳産物を直接、あるいは昨年度の本研究事業で作製したサポウイルス ORF1 に対する 8 種類の部位特異抗体を用いた免疫沈降法を行った後にウェスタンブロット法で検出し、各切断産物の検出、同定を行った。プロテアーゼの活性部位と推測される GDCG モチーフに変異を導入した full-length cDNA clone を作製し、これを鋳型として上記と同様に遺伝子増幅と発現産物の解析を行った。

(12) 動物細胞による SaV VLPs の作製

COS7 細胞、293T 細胞で SaV GII Mc10 株の構造遺伝子を定法に従って発現した。

(13) 唾液中の型物質の定量

採取後、直ちに 100°C、10 分間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B、Le^a、Le^b 各型物質を分泌型試験の半定量系により測定した。唾液と抗 H レクチン、抗 A 抗体、抗 B 抗体、抗 Le^a 抗体、抗 Le^b 抗体それぞれを 26°C で 10 または 20 分間反応させ

た後に、O 型赤血球、A1 型赤血球、B 型赤血球、Ficin 処理 Le^a 陽性赤血球、Ficin 処理 Le^b 陽性赤血球を加え 26°C で 5 分間反応後、肉眼的検査により凝集阻止の有無を調べた。

(14) 唾液中の型物質と NV VLPs との結合

唾液を採取後、直ちに 100°C、10 分間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B 各型物質の有無を赤血球凝集阻止反応により調べ、それぞれのサンプルの血液型を判定した。唾液と VLPs との結合は Saliva-VLP binding assay (ELISA-based) にて検出した。4 種類の合成糖鎖、A、B、Le^a、Le^b 型抗原と VLPs との結合は ELISA-based Carbohydrate-VLP binding assay にて検出した。

(15) カリシネットの構築

カリシウイルスに特化したデータベースを作成し、DDBJ と協力しながらカリシウイルス研究者の遺伝子配列情報の解析をサポートすることを目的としたサブデータベース及び情報交換の場の構築を試みた。

(倫理面への配慮)

唾液の使用は、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会での承認、提供者からのインフォームド・コンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究

(1) NoV 中空粒子の発現と高力価免疫血清の作製
本年度に発現できた株を加え、GI で 6 株、GII で 20 株、合計 26 株の抗原および抗血清が作製できた。血清学的には GI で 6 種、GII で 12 種、計 18 種である。抗体 ELISA、抗原 ELISA で抗原性を詳細に解析し、J. Gen. Virol. (in press) に発表した。

(2) NoV 抗原検出 ELISA

糞便検体に正常マウス血清、正常ウサギ血清を添加することにより、非特異反応を抑え、測定感度、特異度を著しく向上させることができた。抗原検出 ELISA が実用の域に達し、診断薬として承認された。

(3) IC キットの評価

RT-PCR 法との一致率は 67%、感度 71%、特異性 61%であった。本法の感度は ELISA 法とほぼ同程度であったが、RT-PCR 法との一致率および特異性は ELISA 法と比べると低かった。

(4) ヒトロタウイルス感染における抗原血症の解析と血清を利用した検査法の検討

ヒト RV 感染において抗原血症がほぼ普遍的に起きていること、微量の血清（血液）中のロタウイルス抗原 VP6 を検出することにより、ヒトロタウイルス感染の診断に使用可能であることが示された。

[2] 遺伝子増幅による食品からの定量的ウイルス検出法の確立、および濃縮法に関する研究

(1) ウチムラサキ貝からの HAV 検出における前処理方法の検討

HAV 陽性のウチムラサキガイを用い、リアルタイム PCR 法で定量的検討を行った。超遠心法、ポリエチレングリコールによる濃縮法（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 種類の前処理を行なった結果、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%、内容液方法では 3~11%のコピー数が得られた。

(2) 二枚貝からの NoV および SaV の検出

地力キ、うば貝から NoV および SaV の検出をおこなった。その結果、地力キ 17 検体中 3 検体から、うば貝 12 検体中 4 検体から NoV が検出された。SaV は検出されなかった。下痢症患者から分離された NoV の遺伝子解析をおこない比較したところ、地力キ、ウバ貝から検出された NoV 遺伝子型と下痢症患者から検出された遺伝子型は一部では一致したが、二枚貝からは遺伝子型の異なる NoV が検出された。

(3) 環境水からのノロウイルスの濃縮

井戸水の中のウイルス濃縮は、超遠心法のみでの濃縮と、「ウォーターコンセル・ビルコン」キットで濃縮後、超遠心法で濃縮した二法で行った。リアルタイム PCR 法で検出されたコピー数は超遠心法が、ビルコン濃縮後超遠心法に比べ約 200 倍高いコピー数を示した。これは、ビルコン濃縮を行うことでウイルスのロスが出るため、ビルコン濃縮後超遠心法の方が低いコピー数を示したと考えられた。しかし、実測値ではビルコン濃縮後超遠心法の方が高いコピー数を示したため、検査水中に含まれるウイルス量が少ない場合には有効であると考えられた。

(4) 磁気ビーズを用いた AiV の検出

流入下水 98 件中 82 件（83.7%）から AiV 遺伝子が検出された。処理下水 98 件は全例陰性であった。PCR 産物の塩基配列を調べたところ、82 件中 81 件からは A 型、1 件からは B 型の遺伝子が検出された。さらに、5 件からはいずれの型にも属さない新型の遺伝子が検出された

[3] 検出系の確立に向けた基礎研究

(1) RV 塩基配列非依存性 PCR の確立

Lambden らの方法を改変し、塩基配列非依存の単一プライマーを用いた PCR とその後のクローニングを行い、配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法を確立した。A 群ロタウイルスの SA11 株、T-152 株（G 血清型：G12）および B 群ロタウイルスの SKA-1 株由来 dsRNA を用い、11 本すべての RNA に対する PCR 産物を得た。本法を用い、T-152 株の NSP1 遺伝子のクローニングを行い全塩基配列を決定したところ、これまで報告されている NSP1 遺伝子との相同性はきわめて低いことが判明した。本法は、末端配列決定に 5' Race 法や 3' Race 法を別々に行う必要がなく、また、分節 RNA ごとに増幅を行う必要もない。A 群~C 群ロタウイルス、さらに、dsRNA をゲノムとして有するピコビルナウイルスのゲノム解析にも応用でき、きわめて有用と思われる。

(2) SSCP 解析を活用した NoV の同定

NoV の流行、あるいは集団感染などの危機管理において行政対応に直接役立つ情報を素早く把握する手法として種々の事例について SSCP 解析を検討した。最大 50 検体の PCR 産物の遺伝子配列の異同を 1 日半で比較することができるため、集団感染等の危機管理局面での行政判断に必要な情報の早期把握に役立つものと考えられた。複数の機関で行った SSCP 解析データをネットワーク上で照合するシミュレーションを行うとともに、実際の流行局面での実用試験を行った。後者については、食中毒や施設等での集団発生に加えて、簡易水道にウイルスが混入した場合の迅速な対応が可能であった。

(3) ノロウイルス（NoV）全長 cDNA クローンを用いた複製機構の解析

ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、作成したプラスミドクローンと T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子組換えワクチニアウイルス（vTF7）を用いて、哺乳類細胞内における NoV ゲノムの転写翻訳機構を調べた。哺乳類細胞にキャップ構造の付加された完全長の NoV ゲノム RNA を導入した場合、NoV ゲノム RNA の ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が翻訳され、プロテアーゼ、ポリメラーゼなどがその機能を発揮し、約 2.3kb のサブゲノム RNA が転写された。しかし、サブゲノム RNA から ORF2 及び ORF3 は翻訳されず粒子形成は認められなかった。これを補うため、完全長の NoV ゲノム RNA と ORF2 及び ORF3 をコードする約 2.3 Kb のサブゲノム RNA を細胞内に同時に供給すると、VLP と核酸を内包し

た不定形粒子の形成が認められた。

(4) サポウイルス ORF1 の切断地図の作製
in vitro transcription/translation system および部位特異抗体を用いてサポウイルス ORF1 の切断産物を同定し、7つの最終産物からなる切断地図 (NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH) を決定することに初めて成功した。またカリシウイルスのプロテアーゼで高度に保存されているアミノ酸モチーフに変異を導入することで、この切断がサポウイルスの ORF1 にコードされる自己のプロテアーゼに依存することを明らかにした。

(5) 完全長ゲノムを用いた SaV の遺伝子解析
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。

(6) SaV 蛋白の発現ならびに部位特異抗体の作製
大腸菌を用いて SaV の ORF1 および ORF2 に対応する 16 種類の領域についてポリペプチドの網羅的な発現を試み、15 種類について発現を確認した。そのうち SaV の ORF1 のそれぞれ異なる領域に対応する 8 種類、および ORF2 に対応する 1 種類、合計 9 種類の組換えタンパクを用いて、SaV ゲノムのほぼ全域 (ORF1 の 83%、ORF2 の 100%) にわたり部位特異抗体を作製した。また、アミノ酸モチーフ (YGDD) から SaV の RNA ポリメラーゼ (RdRp) に対応する領域については、可溶性の GST 融合タンパク質が得られたため、この融合タンパク質を用いて酵素活性の検討を行い、RdRp 活性を検出することに成功した。

(7) SaV VLPs の作製
SaVORF1 を動物細胞で発現することによって、昆虫細胞では作製が困難であった GII SaV の VLPs 作製に初めて成功した。SaV 高感度抗原抗体検出系の確立のために極めて有用な材料を手に入れることができた。

[4] 培養系の確立に向けた基礎研究

(1) NoV および SaV と血液型物質との結合に関する研究

NoV GI に属する 4 株、4 クラスター、NoV GII に属する 10 株、7 クラスター、計 11 クラスター 14 株の NoV VLPs、さらに SaV GI に属する 1 株の SaV VLPs を用い、型物質との結合を検討した。その結果、NoV GI に属する VLPs はすべて唾液と結合した。これに対し、NoV GII の VLPs は 7 株が唾液に結合し、3 株は結合しなかった。同じクラスターに属するウイルス株は同じ結合パターンを示した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、GI の 4 株では共通して H、A 型物質を含む唾液への結合が高かった。一方、GII の 7 株では共通して B、A 型物質を含む唾液への結合が高く、同じジェノグループに属する株には結合パターンに共通項があること、糖鎖のわずかな構造の違いがウイルスの結合量を左右していることが明らかになった。SaV は全く唾液に結合しなかった。

[5] ノロウイルスの分子疫学および遺伝子解析に関する研究

(1) NoV 検出法の検討と評価

大阪市で検出された NoV について、プローブ型別および Capsid N/S 領域の遺伝子型別を行った。平成 14 年度に大阪市で検出された NoV は、P2B 型が主流であった。しかし、P2B 型には少なくとも 8 種類の遺伝子型が存在しており、特に 1 種類の遺伝子型が優勢になるような流行ではなく、様々な種類の遺伝子型が混在した流行であった。Capsid N/S 領域における遺伝子型別では、少なくとも 21 種類 (GI/7 種類、GII/14 種類) の遺伝子型に分類された。遺伝的多様性を示す NoV 流行を詳細に解析していくためには遺伝子型別が有用であると考えられた。

(2) 施設内の集団発生の解析

2003 年 4 月から 2004 年 1 月までに千葉県内で NoV 集団発生事例が 19 事例あった。発生場所は、社会福祉施設、保育所、学校、病院など集団生活の場での発生が 13 事例 (62%) と多かった。社会福祉施設、保育所での集団発生事例 8 事例についてその感染経路を検討した。1 事例は食中毒を疑った事例であったが、7 事例は、患者発生のピークがなだらかで、ピークの数日前から患者がみられ、さらに職員にも発症者がみられるという特徴から、人一人感染による集団発生であることが推定された。また、1 事例は入所者 10 名と職員 1 名から検出した NoV の塩基配列が一致した。

(3) 散発性の急性胃腸炎原因ウイルスの流行状況

調査

2003年1月から2003年12月の間に452例の散発性急性胃腸炎の原因検索を行い、カリシウイルスが109例検出され、その内訳はNV78例、SaV31例であった。その他のウイルスではRVが56例（そのうちC群RV13例）、AstV16例、アデノウイルス15例が検出された。2003年はSaVの増加傾向が注目された。また、2003年12月には、幼稚園においてSaVによる胃腸炎の集団発生があった。園児118名中55名が発症し、職員は11名中2名が発症した。患者発生状況は突発的でクラス別集積性もみられず、食中毒が疑われたが、給食等の疫学調査の結果から食中毒と断定するには至らなかった。集団発生事例から検出されたSaV株と同時期地域で流行していた株の遺伝子配列は極めて類似していた。

(1) 堺市内の河川からのノロウイルス検出

河川水中のGIIノロウイルスのコピー数は1月、2月をピークとし漸次減少し夏季には低値となっている事、散発、集団感染症の発生時期とその程度、および河川水から検出されるコピー数との間には、時間差を持った有意な関連性は認められないことが判明した。しかし、流行時期、採水時期の時間差から推測して、感染事例から何らかの形でウイルスが河川水に汚染したものと考えられた例も存在した。

(2) 千葉県におけるノロウイルス遺伝子型の推移

1999年9月から2005年1月初旬までの期間に、集団発生227事例、1345検体、散発750検体のうち集団発生138事例、514検体(66.4%、41.7%)、散発178検体(30.5%)からNoVを検出した。検出したNoVの80%以上がGIIであった。GIは13遺伝子型、GIIは16遺伝子型に分類された。集団では、GII-3、4、5が全シーズンで検出され、03/04シーズンはGII/4が主流行になっていた。散発では、GII/4が全シーズンで高頻度に検出された。集団事例は、02/03シーズン以降保育園、学校、老人施設における人-人感染事例の増加が認められた。

(3) 九州3地研で検出されたノロウイルス(NV)の遺伝子型

2003年2月から2005年1月までに九州の3地研で検出されたNVについてCapsid領域の遺伝子型別をおこなった。3地研で検出された遺伝子型はGIが6種類、GIIが7種類検出された。前年度に流行した遺伝子型が次の年に流行するわけではないこと、GII/4型については2003年11月から検出が増加した。

(4) 大阪市で流行したGII/2型ノロウイルスの分子疫学的解析

2004年3月中旬～5月にGII/2の流行が園児、小学生、中学生を中心に大阪市内で初めて認められた。検出されたGII/2は遺伝的に同一あるいは近縁であった。2004年6月以降は、GII/2は検出されておらず、今回の流行は終息したものと考えられた。

(5) ノロウイルスに汚染された井戸水による食中毒事例

平成16年5月下旬、長野県内の旅館でノロウイルスによる食中毒事例が発生した。この施設を利用した26グループ160名中18グループ65名が発症し、施設で利用していた自家水(井戸水)、患者および従事者からノロウイルスが検出された。検出されたノロウイルスの塩基配列は、井戸水、患者便、従事者便共に一致しGII/4類似株であった。本食中毒事件は当該施設の井戸がノロウイルスに汚染されていたことから、自家水(井戸水)によるものと判断された。

(6) 愛媛県における散発性及び集団発生から検出されたNoVの遺伝学的多様性

散発例からGII/4Lordsdale、GII/3Mexico、GII/2Melksham、GII/4Miami型株等が多く検出された。一方、カキの摂食が関与しないノロウイルス食中毒及び集団発生12事例中5事例からGII/4Lordsdale、3事例からGII/2Melkshamが検出され、GII/3Mexico、GII/4Miami、GII/8Amsterdam型が各々1事例から検出された。

(7) NoVの血清疫学

GIIの6株中4株で保有率の上昇が認められ、最近のGII型NoVの流行を反映する結果が得られた。

[6] 予防・治療法に関する研究

ヒト由来のファージ抗体ライブラリーから、ヒトロタウイルスを中和する3種のヒト型モノクローナル抗体を分離した。感染防御能を、生後5～6日齢のBALB/cマウスを用いて調べた結果、150 μ gの抗体の経口投与により、 1.7×10^6 FFUのKU株による下痢発症の程度を有意に阻止した。

[7] ウイルス性下痢症検査マニュアルの整備

(1) 第3版の作成と配布

2版の内容に加えて3版では新たにSaVの遺伝子検出法とNoVの定量法の二つを追加した。平成15年7月の第24回衛生微生物技術協議会、および11月の第15回ウイルス性下痢症研究会で配布した。

[8] カリシウイルスデータベースの構築

ホームページ上では、ノロウイルスの分子系統解析法を簡単に習得し、実行できるようにガイドした

“分子系統樹の作り方”（パワーポイントファイル）を公開した。また、ノロウイルスの各ゲノタイプの標準配列を公開し、ホームページにアクセスした研究者が、自由にダウンロードして分子系統解析に使用できるようにした。さらに、研究者間のコミュニケーションが図れるように掲示板形式のフォーラムサイトをもうけ、ホームページ上で意見交換ができるようにした。

D. 考察

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究
今年始に報告された、本邦での様々な地域の様々な病院内、特別養護老人ホームにおけるノロウイルス集団感染事例で求められているのは、ノロウイルスの簡便かつ迅速な診断方法である。診断の確立は感染拡大の予防や重症化予防に大きな貢献ができる。ノロウイルス感染診断には、いくつかの方法が開発されているが、いずれも一長一短がある。中でも、今回の研究主眼である IC キットはその簡便性では他法に比べ大きな長所となっているが、感度、特異性は低く精度の向上が今後の研究課題である。抗原検出 ELISA 法は迅速かつ簡便で、検査に高額な機器を必要とせず、また検体間でのコンタミネーションの危険性が低いなどの利点があり、食中毒検査のように多数の検体を検査する場合には非常に有用な方法である。その反面、特異性が高いために検査検体の抗原性が一致していないと検出感度が低下するという欠点がある。NoV は遺伝学的にも血清学的にも多様性の大きいウイルスでことから、NoV の流行株を的確に検出できるように、キットに使用する抗体の組み合わせや抗体の追加が重要な課題である。改良 ELISA は、感度、特異性それに RT-PCR 法との一致率は、一昨年度、昨年度の方法に比べ、著しく向上した。感染性胃腸炎の散发事例においても、食中毒の流行事例においても、十分対応できる診断方法と考える。これまでも強調してきているが、ウイルス性食中毒と細菌性食中毒の鑑別は、極めて重要で、予後対応は大きく異なってくる。さらに、その鑑別に要する費用は大きい。今回の ELISA 法は、初期に搬入される検査検体が多ければ多いほど鑑別診断は容易で且つ経済性を示し、diffuse outbreak の感染事例に十分対応できる測定キットと考える。感度をより向上させるため、また、広範囲な感染原のウイルス株を検出するためにも、現有の単クローン抗体に加えて、他の抗原決定基を認識する抗体の作製が必要あると考えている。NoV を免疫学的手法で検出する上でその基礎は高力価血清

の作製であるが、そのためには中空粒子の作製が不可欠である。NoV の遺伝子系統解析によれば現在までに GI は 14、GII は 17 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、GI で 9 株、GII で 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 GI で 7 種、GII で 14 種、計 21 種である。これらの抗原、抗血清の保持によって NoV 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 NoV 抗原として下痢症、胃腸炎患者の血清学的診断にも有用である。NoV 同様、AiV でも高力価血清を用いた磁気ビーズ法が環境中からのウイルス濃縮に有効であることが証明された。今回の AiV 遺伝子の検出成績から、本ウイルスの流行は冬期にあると思われた。冬季に流行しカキ等の食品を介して感染を繰り返し人の抗体保有率も上昇して行くものと考えられる。AiV は同一の血清型ウイルスでも塩基配列の差(3CD 領域で 10%)により A 型と B 型に分けられる。我が国の分離株はほとんどが A 型に属する。一方 B 型は東南アジアでの感染例から分離されたものが属する。今回検出された遺伝子は殆どが A 型であり、我が国の流行ウイルスが A 型であることが確認された。海外感染例から検出される B 型は、98 件中 1 件のみであり、わが国ではほとんど流行していないと思われた。ヒト RV 感染の急性期において、かなり普遍的に抗原血症が起きていることが明らかとなった。RV と胃腸炎以外の疾患との関連の可能性は、より濃厚となってきた。また、RV 感染においては、きわめて微量（約 4 μ l）の血清で RV 抗原が検出可能であることが、判明し、血清を用いた迅速診断も可能であることを示唆した。

[2] 遺伝子増幅による食品からの定量的ウイルス検出法の確立、および濃縮法に関する研究
ウチムラサキ貝を用い超遠心法、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た。各方法の優劣について検討した結果、超遠心法は他の 2 つの方法に比べて良好な成績が得られた。内容液を用いた方法は、簡便ではあるがウイルスの回収率は低いことから、他の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。熊本市域に流通している地カキ、うば貝から SaV は検出されなかった。これは、市中で NoV に比べて SaV 感染者が少ないことを反映してい

るのではないかと考えられた。一方、二枚貝からは遺伝学的に異なる NoV が検出された。食品検体と患者検体での検出 NoV 遺伝子型が完全に一致しないのは、患者検体数が少ないことによる問題なのか人のウイルスに関する感受性の問題かは不明であった。しかし今後調査を続けていくことで、遺伝子型の検出パターンの違いは解明されると考えられた。

[3] 検出系の確立に向けた基礎研究

RV 配列非依存の単一プライマーを用いた PCR は配列が未知であっても、末端配列を含め全塩基配列を決定できる方法である。末端配列の決定に 5' Race 法や 3' Race 法を別々に行う必要がなく、また、分節 RNA ごとに増幅を行う必要もない。A 群のみならず、B 群や C 群ロタウイルスのゲノム解析にも応用でき、今後の RV 遺伝子解析に有用である。

NoV の解析はシーケンスを決定して比較する方法が一般的であるが、数週間～数ヶ月を要するため行政側との時間軸のずれが大きく、個々の局面で有効な情報を提供するという目的には向いていない。遺伝子解析が必要となるような事例は検体数も多いのが普通であるから、行政対応に役立てるためには多くの NoV の遺伝子の異同をシーケンスせず短期間に比較する手法の導入が必要になる。行政判断で重要なのは複数の NV 遺伝子が「同じかどうか」であり、その情報を迅速に把握する手法として SSCP 解析を用いることは意義があるものと考えられた。また、あらかじめ対照試料を配布しておくことで異なる機関で行った SSCP 解析のデータをネットワーク上で照合できるようになるため、広域にわたる事例であっても対応可能になる可能性が開けた。

SaV のゲノム全長のうち最も塩基配列が保存された領域は、構造蛋白質領域の直前であり、NoV の ORF1-ORF2 ジャンクション領域（リアルタイム PCR の標的領域）に相当していた。この領域には、本研究で解析した SaV 株全てで 100% 近く保存された 100 塩基ほどの領域が存在し、NoV 同様、高感度 SaV 核酸検出法の絶好の標的領域となると思われた。また、本研究で SaV ゲノムのほぼ全域をカバーする SaV 部位特異抗体が作製できた。今後、SaV 抗原検出に最適な手法を確立する上で有用な材料が作製できた。昆虫細胞でまったく VLPs の形成ができなかった SaV GII Mc10 株について検討を行い、VLPs 発現に成功した。今後、昆虫細胞で発現したものの、発現量が著しく低かった GII C12 株や、その他の genogroup に属する株についても本発現系が有用か検討を行い、昆虫細胞発現系で作製した VLPs とともに、SaV の genogroup 間、genotype 間の抗原性の

違いを検討していくことが可能になった。

愛知県民の抗体保有状況を比較検討した結果、11 年度と比べて 16 年度では、GI の 2 株に対する保有率は低下していたが、GII の 6 株中 4 株で保有率の上昇が認められ、最近の GII 型 NoV の流行を反映する結果と考えられた。抗体保有率と流行株との関連性を継続調査することにより、今後の流行株の予測、また感染症や食中毒の防疫対策のための基礎資料となることが期待される。

[4] 培養系の確立に向けた基礎研究

NoV GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の VLPs を用い、血液型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討した。その結果、GI の 4 株、また GII の 7 株の結合には血液型物質が関与していること、GI 株の結合には、H 型物質が重要であること、GII 株の結合には GI とは異なり、H 型物質以外の型物質が重要であること、結合に血液型物質以外の因子を必要とするウイルス株が存在することが明らかになった。血液型物質の NoV 感染における役割を明らかにするとともに、第 2 のレセプターの存在についても検討したい。カリシウイルス科 *Lagovirus* 属のウサギ出血病ウイルスは H 型物質に結合することが知られている。しかし、今回の研究で、NoV の型物質認識パターンは様々であり、型物質を認識しない株も存在することが明らかになった。また、SaV は型物質に結合しない可能性があり、カリシウイルス科に共通の特徴ではないことが示唆された。今後さらに詳細な解析を行うことにより、型物質がカリシウイルスの単なる結合因子として働いているのか、細胞への侵入にも関与するレセプターであるのかを検討したい。NoV は遺伝学的、血清学的に多様であるため、ワクチンによる予防は困難であるが、レセプターへの結合を阻害する薬剤による予防は効果が期待できる。今回、GI 4 株、GII 10 株の NoV VLPs を用いた Carbohydrate-VLPs binding assay により、1) 同じジェノグループに属する株には血液型抗原認識パターンに共通項があること、2) 血液型抗原のわずかな構造の違いがウイルスの結合量を左右していることが明らかになった。今後、さらに詳細な解析を行い、血液型抗原上の NoV 結合部位を明らかにすることにより、血液型抗原への結合を阻害する薬剤の開発を目指したい。

[5] 下痢症ウイルスの分子疫学および遺伝子解析に関する研究

食中毒や感染性胃腸炎が多発する秋から冬にかけ

て、堺市内の河川水でもノロウイルスのコピー数が増加している。河川水中のノロウイルスノ遺伝子型からそのシーズンにおける流行ウイルスを予測する事は困難であるが、継続調査によって次期の流行の遺伝子型を予測する事は不可能でないかもしれない。遺伝的多様性を示す NoV 流行を詳細に解析していくためには、Capsid N/S 領域の遺伝子型別による解析が必要であること、老人保健施設や保育所など介護を伴う施設では、なんらかの原因で NV 患者が発生すると人-人感染により感染が拡大する可能性が高く、ウイルス感染を制御する事が難しく長期化しやすいことが示されている。人-人感染は糞口感染と空気感染（吐物が空気中に飛散しエアロゾルになる）によって起こると考えられ、保育所では屋内の遊戯室で園児が嘔吐した後患者発生し、糞口感染だけでなく乾燥した吐物が飛散し次ぎの感染を生じる可能性も推測された。施設内で NoV を拡大させないための対策は、汚物によって汚染された環境の消毒、患者に接触したときの手洗いを徹底するなどの衛生管理が重要であると考えられた。今後、集団生活の場で患者が発生した場合の処置方法をマニュアル化する必要がある。EU グループ (European Food-borne Viruses Network) は、2002 年を境にして、GII/4 の polymerase 領域に変化が認められることを報告している。今回千葉で検出した GII/4 の一部の株について ORF2 の解析をおこなったところ、同時期を境にして ORF2 領域に変化が認められた。GII/4 の遺伝子の変化と、老人施設、障害者施設、病院での集団発生の増加との関連性の可能性が推測されたが、さらに詳細な解析が必要と思われた。九州でも GII/4 型については 2003 年 11 月から検出が増加したが、当該株についてはヨーロッパで急増している株類似株か今後調査していく必要があると考えられた。GII/2 大阪で流行した原因の一つとして、大阪市では集団事例においても、小児散発例においても過去に GII/2 型の流行がなかったことが考えられた。GII/4 変異株のように遺伝子の変異による流行の変化についても検討必要がある。今回、比較した領域において過去の GII/2 と明確な相違は認められなかったが、他の遺伝子領域についても解析する必要があると考えられる。流行株の検出時期と集団発生時期がほぼ一致していたことから、地域社会でのノロウイルスの流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関連を持っていることが示唆された。ウイルス性食中毒や胃腸炎集団発生の制御には、カキ等の食品のノロウイルス汚染を減少させる対策とともに、地域社会におけるウイルスの流行実態を把握し、対策を強化させることが重

要である。愛媛県における集団発生及び散発性胃腸炎の調査から、散発例での SaV の関連する割合が比較的高いこと、逆に、食中毒や施設内集団発生事例では、原因はほとんど NoV であり、SaV の関与は少ないことが明らかとなった。地域社会での NoV の流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関連を持っていることが示唆された。また、現在 NoV の検出に国内で最も汎用されているプライマーは、少なくとも国内で流行している NoV を広く検出していることが推測された。今回、成人の知的障害者厚生施設において SaV の集団発生がみられた。感染経路は明らかでないが、施設の特異性から汚物により環境が汚染され施設内に広まったと推測され、成人においてもヒト-ヒト感染を起こすことが示唆された。今後 SV の動向を監視することが必要である。2005 年 3 月 GI/3 が佐賀県、熊本市で初めて検出された遺伝子型であるため、よくシーズンに流行株と予測したが、現在まで大きな流行は発生していない。これらの事から流行型の予測はいまだ困難であると考えられた。大阪市では毎年、11~16 種類の遺伝子型の多様な NoV が検出されるが、ヒトからヒトへ感染が広がった事例については、カキ関連事例と比べて、検出された遺伝子型の種類が少なく、1 種類の遺伝子型 (GII/4) が特に優勢で、患者の年齢層（主に子供と老人）や感染経路（ヒトからヒト）などが食中毒事例と比べて特徴的であった。ヒトからヒトへの感染事例は、保育園、小学校、老人施設などの施設内において平成 16 年度から急激に増加しているため、今後の動向に注意し、監視を続ける必要がある。最近の小児の散発性胃腸炎患者、食中毒事件、集団発生（感染症）由来のキャプシド領域が MX 株のポリメラーゼ領域について分子遺伝学的検討を行ったところ、国内においても MX 株類似リコンビナント株が高率に認められた。MX 株類似リコンビナント株は、ポリメラーゼ領域で GGIIb 型と Lordsdale 型の 2 種類が検出され、共に小児で高率に、GGIIb 型は患者数が多い傾向が見られ、本邦でも MX 株類似リコンビナント株が小児散発例や大規模集団発生の起因ウイルスとなり得ることが予測された。

[6] 予防・治療法に関する研究

本研究で得られたヒト型抗ロタウイルス抗体は、cross-reactive に複数の血清型のヒトロタウイルス株を中和することから、その有用性が高いと思われる。乳のみマウスを利用した *in vivo* での感染防御効果から、ヒトへの応用の可能性が示唆された。NoV の予防を目的とした創薬の研究を推進するた

めには、ウイルスの複製機構など NoV の基礎的研究が必須である。しかし、NoV は実験動物系、in vitro における培養細胞系も見いだされておらず、NoV の感染及び増殖機序の解析が遅れている。本研究ではワクチニアウイルスのキャッピング酵素によって修飾を受けないサブゲノムの翻訳が機能していないため複製サイクルが停止していると考えられたが、プロテアーゼによる非構造蛋白の切断は効率よく起こっていた。また、ゲノム RNA の複製も起こっていた。したがって、プロテアーゼや RNA ポリメラーゼの活性をスクリーニングする上で有用なアッセイ系であると考えられる。本研究によって SaV ORF1 のプロセッシングが自己のプロテアーゼによって行なわれることが明らかになった。また、SaV ORF1 内部の 1 カ所の切断点を同定に成功し、サポウイルスのプロテアーゼの基質特異性が他のカリシウイルスと同様であることを示すことが出来た。上記の NoV 同様、プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングに有用なアッセイ系が確立できた。

[7] ウイルス性下痢症検査マニュアルの整備

改定したマニュアルによって、ウイルス性下痢症検査の標準プロトコールが完成した。ウイルス性食中毒の検査に、常に実験台の脇において活用されることが期待される。今後は Web 上で公開し、改正、修正等、迅速な対応ができるよう整備したい。

[8] カリシウイルスデータベースの構築

NoV を同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。今後、カリシウイルスデータベースに希望者が容易にアクセスし、十分に活用できるようにページデザインの見直し、登録データの充実などを図っていく予定である。

E. 結論

NoV 抗原 ELISA が実用の域に達した。より広範に検出するために VLPs と単クローン抗体研究を推進する必要がある。患者および貝からの RT-PCR による遺伝子検出は一般的な手法として確立している。迅速かつ簡便なノロウイルス診断 IC キットの構築を行ったが、感度、特異性の向上を図る必要がある。より広範に感度よく NoV 抗原を検出する ELISA を構築するために、更なる VLPs と単クローン抗体研究を推進する必要がある。分子疫学研究から、GII/4 の遺伝子の変化と、老人施設、障害者施設、病院での集団発生の増加との関連性の可能性が推測された。また、地域で散発的に流行する NoV が集団発生の原因と関連していることも示唆された。さらに詳細な解

析が必要である。環境からの NoV による感染症・食中毒が急増している。井戸水などの原水が汚染される可能性があることを啓発していく必要がある。NoV の結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とする NoV もある。NoV を多数解析するうえでの SSCP の有効性を明らかにした。カリシウイルスデータベースを構築することによって、NoV を同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。NoV の複製機構の解析と SaV ORF1 の切断地図作成が進展し、プロテアーゼやポリメラーゼ阻害剤のアッセイ系として有望である。今後、予防・治療を目的とした創薬研究の足がかりができた。HAV の濃縮と定量的検出が確立できた。磁気ビーズは AiV の濃縮にも効果的であった。SaV の遺伝子解析と抗体調製が大きく進展した。感染防御能を有するとおもわれる 3 種のヒト型 RV モノクロナール抗体を分離した。RV で配列非依存的な遺伝子増幅法を確立した。ウイルス性下痢症検査マニュアル第 3 版を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* 2004;78:3817-3826.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41: 1548-1557.

Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 2004;48:201-204.

Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and Identification of a Novel Human Parechovirus. *J. Gen. Virol.* 2004;85:391-398.

Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of virions

- of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch. Virol.* 2003; 148: 1659-1670.
- Sasaki J, Taniguchi K. The 5' -end sequence of the genome of Aichi virus, a Picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J. Virol.* 2003;77:3542-3548.
- 1.
- Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi K. Functional analysis of the stem-loop structures at the 5' end of the Aichi virus genome. *Virology* 2003;39:3969-3975.
- Sasaki J, Nagashima S, Taniguchi K. The Aichi virus leader protein is involved in viral RNA replication and encapsidation. *J. Virol.* 2003;77:10799-10807.
- Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K. Close relationship between G8 bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:3945-3950.
- Wakuda M, Nagashima S, Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Kobayashi N, Taniguchi K. Serological and genomic characterization of a G12 human rotavirus in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:5764-5769.
- Sanekata T, Ahmed MU, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:2187-2190.
- Kohmoto S, Tsuji S, Ibrahim MS, Li Y, Warachit J, Taniguchi K, Ikuta K. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 plays a protective role against virus-induced apoptosis in primary CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 2003;77:10304-10413.
- Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing human rotaviruses. *J. Virol.* 2004;78: 3325-3332.
- T. Yamashita, M. Ito, Y. Kabashima, H. Tsuzuki, A. Fujiura and K. Sakae. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J. Gen. Virol.* 2003;84:3069-3077,
- Tomoko Nishida, Hirokazu Kimura, Mika Saitoh, Michiyo Shinohara, Masahiko ,Kato, Shinji Fukuda, Tetsuya Munemura, Toshiyuki Mikami, Ayumi Kawamoto, Miho Akiyama, Yumiko Kato, Kanako Nishi, KunihisaKozawa, 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, Yagy 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.
- Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of Norwalk-like virus Infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan, *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:1756-1759.
- Ahmed UA, Kobayashi N, Wakuda M, Sanekata T, Taniguchi K, Kader A, Naik TN, Ishino M, Alam MM, Kojima K, Mise K, Sumi A: Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
- Shiomi H, Urasawa T, Urasawa S, Kobayashi N, Taniguchi K: Isolation and characterization of poliovirus mutants resistant to heating at 50°C for 30 min. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
- Shinozaki K, Okada M, Kaiho I, Nagashima S, Taniguchi K: Characterization of Human Rotavirus Strains with G12 and P[9] detected in Japan. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
- Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H: Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:4032-4039.
- T. Fujimoto, T. Okafuji, M. Ito, S. Nukuzuma, M. Chikahira, and O. Nishio: Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of Adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5489-5492.

- Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K. Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus. *J. Virol.* 2004;78:3889-3896.
- Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:1305-1307.
- Hansman GS, Doan LT, Kguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch. Virol.* 2004;149:1673-1688.
- Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:2988-2995.
- Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10:1874-1876.
- Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, and Katayama K. Norovirus and Sapovirus Infection in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004;57:276-278.
- Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch. Virol.* 2005;150: 21-36.
- Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11:180-182.
- Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virol. J.* 2005;2:13.
- Nagashima, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: The 5' terminal region of the Aichi virus genome encodes cis-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 2005;79:6918-6931.
- Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K.: Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods* 2005;126:165-169.
- Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B. J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at vpu gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with that of other subtypes. *Microbes Infect.* 2005;7:139-147.
- Kamata, K., Shinozaki, K., Okada, M., Seto, Y., Kobayashi, S., Sakae, K., Oseto, M., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Katayama, K., Tanaka, T., Takeda, N., Taniguchi, K.: Expression and antigenicity of virus-like particles of Norovirus and their application for detection of Noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.* 2005;76:129-136.
- Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S. G., Taniguchi, K., Sack, D. A., Ranst, M. V., Azim, T.: Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:4460-4465.
- Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR.: High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol.* 2006;80:1513-1523.
- Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
- Okada M et al.: Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:4391-4401
- Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O, Ayata M, and Ogura T: Genotyping of norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol. Immunol.* 2005;49:275-283.
- Hirakata Y, Arisawa K, Nishio O, Nakagomi O. Multifactorial spread of gastroenteritis

- outbreaks attributable to a single genogroup II norovirus strain from a tourist restaurant in Nagasaki, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:1093-1098.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic of Sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 2005;150:371-377.
- Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Ushijima H., Miyamura T., and Takeda N.. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *J. Virol.* 2005; 79:7283-90.
- Hansman GS., Matsubara N., Oka T., Ogawa S., Natori K., Takeda N., and Katayama K. Deletion analysis of the Sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Archives of Virology.* 2005;150:2529-2538.
- Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Miyamura T., and Naokazu Takeda. Cleavage activity of the Sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Arch. Virol.* 2005;150:2539-2548.
- Hansman GS., Takeda N., Oka T., Oseto M., Hedlund KO., and Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11:1916-1920.
- Oka T., Hansman GS., Katayama K., Ogawa S., Nagata N., Miyamura T., Takeda N. Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch. Virol.* 2006;151:399-404.
- Wu FT., Oka T., Katayama K., Wu HS., Donald Jiang DS., Miyamura T., Takeda N., and Hansman GS. Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch. Virol.* In press
- Hansman GS., Natori K., Shirato-Horikoshi H., Ogawa S., Oka T., Katayama K., Tanaka T., Miyoshi T., Sakae K., Kobayashi S., Shinohara M., Uchida K., Sakurai N., Shinozaki K., Okada M., Seto Y., Kamata K., Miyamura T. and Takeda N. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J. Gen. Virol.* In press
- Katayama K., Hansman GS., Oka T., Ogawa S., Takeda N. Investigation of Norovirus replication in a human cell line. *Arch. Virol.* In press
- 田中智之 「微生物の基礎知識」 ノロウイルス 感染と消毒 2004;11;28-31
- 齋藤博之、ノロウイルスによる胃腸炎の流行形態と対策、*クリーンネス* 231:2-7、2005
- 杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、徳竹由美、山口卓、秋山美穂、西尾治: *Norovirus* 感染により排泄されるウイルス量について、*臨床とウイルス* 32:189-194、2004
- 新川奈緒美、川元孝久、秋山美穂、加藤由美子、西尾治: 吐物が感染源と推察されたノロウイルス集団胃腸炎事例について、*臨床とウイルス* 32:195-201、2004
- 西尾治、秋山美穂、愛木智香子: ノロウイルスによる食中毒、*月刊 HACCP*、109: 48-50、2004
- 白土(堀越)東子、武田直和: 冬でも怖い食中毒(冬の食生活予防は万全ですか?)。 *食生活*: 98 2004.
- 武田直和、米山徹夫、清水博之、白土(堀越)東子: 食品由来の感染症. *ネオエカス 感染症・アレルギーと生体防御* 11-20, 2005.
- 白土(堀越)東子: ノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生. *生活と環境* 2005;50:8-13.
- 椛島由佳, 伊藤 雅, 山下照夫, 藤浦 明, 榮 賢司: *臨床とウイルス*. 33:228-233, 2005
- 山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、愛木智香子、秋山美穂、西尾 治. 散发性胃腸炎と胃腸炎集団発生からのノロウイルス検出状況-愛媛県、病原微生物検出情報, 26:327-329, 2005
- 山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、杉枝正明、古屋由美子、愛木智香子、秋山美穂、西尾 治. 輸入生鮮魚介類からのノロウイルス検出状況とその遺伝子型、病原微生物検出情報 26: 337-338, 2005
- 齋藤博之 他、簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行、病原微生物検出情報 26:14-15 (2005)
- 齋藤博之 他、エンテロウイルスの血清型別同定における一本鎖高次構造多型 (SSCP) 解析の応用、*臨床とウイルス* 33:220-227 (2005)
- 齋藤博之、ノロウイルス胃腸炎の疫学調査における一本鎖高次構造多型 (SSCP) 解析の利用、食中毒検査と診療の落とし穴、第 2 章、中山書店 (2006)
- 齋藤博之、ノロウイルス胃腸炎の流行拡大防止、食中毒検査と診療の落とし穴、第 5 章、中山書店 (2006)
- 久保英幸、改田 厚、入谷展弘、村上 司: 2000-2002 年に世界的流行の認められたエコーウイルス 13 型の大阪市での分離株を含む遺伝子系

統樹解析. 生活衛生 49:144-151 (2005)

入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾 治, 久保英幸, 改田 厚, 村上 司, 綾田 稔, 小倉 壽: 市販生カキからのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの検出. 生活衛生 49:279-287 (2005)

西尾治, 古屋由美子, 大瀬戸光明. ウイルス性食中毒の予防—ノロウイルス, A型肝炎ウイルス—. 食品衛生研究 55:19-24, 2005.

西尾治. ノロウイルスの感染と遺伝子迅速検査の現状と期待. The Medical Journal. 915:11, 2005.

西尾治. ノロウイルスによる感染症と食中毒. 日本医事新報 4221:105, 2005.

西田知子, 岡本玲子, 中尾利器, 松村健道, 大瀬戸光明, 西尾治. 山口県内におけるノロウイルス胃腸炎集団発生事例および市販生食カキの汚染状況. 獣医公衆衛生研究 7:24-25, 2005.

西尾治. 広範囲 血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか—ノロウイルス. 日本臨床 63 巻増刊号 7:332-333, 2005.

西尾治, 山下育孝, 宇宿秀三. ノロウイルスによる食中毒, 感染症. 食品衛生研究 55:7-16, 2005.

西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一. ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌 46:235-245, 2005.

白土(堀越)東子, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和: ノロウイルス研究の最近の動向. 感染・炎症・免疫 35: 106-117, 2005.

白土(堀越)東子: 誰もが感染の危機!! ノロウイルス. 食と健康 49(11): 53-57, 2005.

米山徹夫, 李天成, 白土(堀越)東子, 武田直和: 食品産業従事者のためのウイルス基礎知識. ジャパンフードサイエンス 印刷中

II. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* 2004;78:3817-3826.
2. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:1548-1557.
3. Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 2004;48:201-204.
4. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and Identification of a Novel Human Parechovirus. *J. Gen. Virol.* 2004;85:391-398.
5. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch. Virol.* 2003;148:1659-1670.
6. Sasaki J, Taniguchi K. The 5' -end sequence of the genome of Aichi virus, a Picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J. Virol.* 2003;77:3542-3548.
7. Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi K. Functional analysis of the stem-loop structures at the 5' end of the Aichi virus genome. *Virology* 2003;39:3969-3975.
8. Sasaki J, Nagashima S, Taniguchi K. he Aichi virus leader protein is involved in viral RNA replication and encapsidation. *J. Virol.* 2003;77:10799-10807.
9. Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K. Close relationship between G8 bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:3945-3950.
10. Wakuda M, Nagashima S, Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Kobayashi N, Taniguchi K. Serological and genomic characterization of a G12 human rotavirus in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:5764-5769.
11. Sanekata T, Ahmed MU, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:2187-2190.
12. Kohmoto S, Tsuji S, Ibrahim MS, Li Y, Warachit J, Taniguchi K, Ikuta K. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 plays a protective role against virus-induced apoptosis in primary CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 2003;77:10304-10413.
13. Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing human rotaviruses. *J. Virol.* 2004;78:3325-3332.
14. T. Yamashita, M. Ito, Y. Kabashima, H. Tsuzuki, A. Fujiura and K. Sakae. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J. Gen. Virol.*

- 2003;84:3069-3077.
15. Tomoko Nishida, Hirokazu Kimura, Mika Saitoh, Michiyo Shinohara, Masahiko Kato, Shinji Fukuda, Tetsuya Munemura, Toshiyuki Mikami, Ayumi Kawamoto, Miho Akiyama, Yumiko Kato, Kanako Nishi, KunihiisaKozawa, Osamu Nishio: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69: 5782-5786.
 16. 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
 17. 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.
 18. Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of Norwalk-like virus Infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan, *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:1756-1759.
 19. Ahmed UA, Kobayashi N, Wakuda M, Sanekata T, Taniguchi K, Kader A, Naik TN, Ishino M, Alam MM, Kojima K, Mise K, Sumi A: Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
 20. Shiomi H, Urasawa T, Urasawa S, Kobayashi N, Taniguchi K: Isolation and characterization of poliovirus mutants resistant to heating at 50°C for 30 min. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
 21. Shinozaki K, Okada M, Kaiho I, Nagashima S, Taniguchi K: Characterization of Human Rotavirus Strains with G12 and P[9] detected in Japan. *J. Med. Virol.* 2004;72:149-155.
 22. Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitsu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H: Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:4032-4039.
 23. T. Fujimoto, T. Okafuji, M. Ito, S. Nukuzuma, M. Chikahira, and O. Nishio: Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of Adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5489-5492.
 24. Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K. Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus. *J. Virol.* 2004;78:3889-3896.
 25. Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:1305-1307.

26. Hansman GS, Doan LT, Kguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch. Virol.* 2004;149:1673-1688.
27. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:2988-2995.
28. Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10:1874-1876.
29. Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, and Katayama K. Norovirus and Sapovirus Infection in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004;57:276-278.
30. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch. Virol.* 2005;150:21-36.
31. Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11:180-182.
32. Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virol. J.* 2005;2:13.
33. Nagashima, S., Sasaki, J., Taniguchi, K. : The 5' Ω terminal region of the Aichi virus genome encodes *cis*-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 2005;79:6918-6931.
34. Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K. : Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods* 2005;126:165-169.
35. Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B. J, Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., Ikuta, K. : Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with that of other subtypes. *Microbes Infect.* 2005;7:139-147.
36. Kamata, K., Shinozaki, K., Okada, M., Seto, Y., Kobayashi, S., Sakae, K., Oseto, M., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Katayama, K., Tanaka, T., Takeda, N., Taniguchi, K. : Expression and antigenicity of virus-like particles of Norovirus and their application for detection of Noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.* 2005;76:129-136.
37. Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S. G., Taniguchi, K., Sack, D. A., Ranst, M. V., Azim, T. : Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:4460-4465.
38. Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR. :High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic