

竹中重幸、堀川和美、大岡唯祐、林哲也、楠本正博、寺嶋 淳、「腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動の比較」、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2008.3.7-8) にて発表。

- 2) 中村祥子、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、堀川和美、「福岡県で分離された稀な O 群血清型の腸管出血性大腸菌について」、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2008.3.7-8) にて発表
- 3) 江藤 良樹、中村 祥子、濱崎 光宏、村上

光一、竹中 重幸、堀川 和美、大岡 唯祐、林 哲也、楠本 正博、寺嶋 淳、「パルスフィールド・ゲル電気泳動と IS-printing の結果が一致しない腸管出血性大腸菌 O157 についての解析」、第 29 回日本食品微生物学会学術総会 (2008.11.12-13)。

- 4) 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上光一、竹中 重幸、堀川 和美、「福岡県内の食品取扱い従事者から分離された志賀毒素産生性大腸菌の性状」、第 29 回日本食品微生物学会学術総会 (2008.11.12-13)。

表1. PCR 反応条件検討

項目	条件	
テンプレート量	1st set および2nd set用のtemplate mix を 10^7 、 10^6 および 10^5 copies/ μ l	3濃度
DNAポリメラーゼ量	DNAポリメラーゼ (KOD Dash) をPCR 反応液50 μ lあたり0.5および1.0 μ l	2濃度
PCRサイクル数	1st set および2nd setそれぞれについ て、PCR反応を20および25	2条件

表2. 標準株を用いた DNA 濃度の検討

項目	条件	
菌株	Sakai, #7, #8	3菌種
テンプレート量	コロニー1mmおよび2mm	2濃度
DNAポリメラーゼ量	DNAポリメラーゼ (KOD Dash) をPCR 反応液50 μ lあたり0.5および1.0 μ l	2濃度

表3. 病原細菌の遺伝子解析法の改良及びマニュアル化

衛生研究所	協力者	解析法
熊本県保健環境科学研究所 鹿児島県環境保健センター 長崎県衛生公害研究所 福岡県保健環境研究所	八尋俊輔 上野伸広 山崎省吾 堀川和美	<i>Campylobacter jejuni</i> 分子疫学解析の 検討
宮崎県衛生環境研究所 福岡県保健環境研究所 北九州市環境科学研究所 佐賀県衛生薬業センター 長崎市保健環境試験所 大分県衛生環境研究センター 熊本県保健環境科学研究所 熊本市環境総合研究所 鹿児島県環境保健センター 沖縄県衛生環境研究所	河野喜美子、岡田美香 村上光一、野田多美枝 徳崎里美 眞子純孝 植木 信介、江原 裕子 緒方喜久代 八尋 俊輔 杉谷和加奈、松岡由美子 上野伸広、久保園祥子 久高 潤	レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、 及び九州各機関で検出された <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 の PFGE による比較解析

表4. 事例報告

平成19年度 6事例		
衛生研究所	発表者	事例名
沖縄県衛生環境研究所、 ¹ 沖縄県中部保健所、 ² 国立感染症研究所、 ³ Centers for Disease Control and Prevention	久高潤、安里龍二、糸数清正、中村正治、平良勝也、国吉秀樹 ¹ 、金城夕子 ¹ 、寺島淳 ² 、渡辺治雄 ² 、Swaminathan、B.、Braden ³ 、C. R.、Dunn、J. R. ³	米国及び極東米軍基地に流通する冷凍ピーフパティーンによる腸管出血性大腸菌 O157:H7 の感染事例と原因食品の加熱試験
鹿児島県環境保健センター	上野伸広、本田俊郎、養田祥子、石谷完二、松山茂樹、藏元強	PFGEにより湧水を原因と特定し得た <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> による家庭内感染事例
大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代、成松浩志、若松正人、長岡健朗、小河正雄、吉用省三、瀧祐一	3施設へ拡大した腸管出血性大腸菌 O111 による集団発生事例
宮崎県衛生環境研究所	河野喜美子	2007年9-10月に発生した <i>Salmonella</i> Enteritidis による2例の集団事例、および同時期に発生した散発事例について
長崎市保健環境試験所	海部春樹、飯田國洋、植木信介、島崎裕子、江原裕子	トリカガが感染源と考えられる小児サルモネラ感染事例
鹿児島県環境保健センター	養田祥子、上野伸広、松山茂樹、本田俊郎、石谷完二、藏元強	足湯浴槽の清掃が原因と考えられたレジオネラ症の事例報告
平成20年度 4事例		
衛生研究所	発表者	事例名
福岡市保健環境研究所	尾崎延芳、眞子俊博、宮尾義浩、財津修一、川崎 恵、江渕寿美、吉田眞一	輸入冷凍海産物を原因とした赤痢集団事例
長崎県環境保健研究センター	右田雄二、山崎省吾、吾郷昌信	運動会時の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析
宮崎県衛生環境研究所 ¹ 宮崎県都城保健所	河野喜美子、岩切章、三浦美穂、塩山陽子、山本正悟、川畑紀彦、吉野修司 ¹ 、小寺美津夫 ¹ 、藤本茂紘 ¹	保育園における腸管出血性大腸菌 O111 とノロウイルスの同時流行による集団発生事例
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	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

表5. 新規遺伝子解析法の解析

開催年月日	開催場所	講師	研修内容
平成18年9月29日	宮崎県衛生環境研究所	大岡唯祐 (宮崎大学・医学部・医学科)	O157 新規遺伝子解析法 IS-printing System に関する研修
平成19年12月10日、11日	福岡県保健環境研究所	前川純子 (国立感染症研究所・細菌第一部)	新規遺伝子解析法 Sequence - based Typing
平成20年12月1日、2日	福岡県保健環境研究所	伊藤健一郎 (感染症研究所・感染症情報センター)	大腸菌の病原性因子の検査とその解析法

図 1. アガロースゲルの作製と泳動について

[3%アガロースゲル]

- 0.5×TBE
- NuSieveGTG agarose
- SeaKemGTG agarose

100 ml の場合

1. 0.5×TBE を 100 ml, 300 ml コニカルピーカーに測り入れる。
2. NuSieveGTG agarose を 2 g 秤量後, 1 に入れる。
3. SeaKemGTG agarose を 1 g 秤量後, 1 に入れる。
4. ガラス棒で全体を攪拌し, Agarose の固まりがない状態にする。
5. 電子レンジを数回かけて, 溶解する。
6. ゲルメーカーにコームをセットする。
※コームがゲルメーカーに接着している場合は, コーム両端にテープをはるなどして高さを調節する。
※コームのセットは Agarose 溶液を流し込んだ後の方が, 高温の Agarose 溶液によるコームの損傷を防がれる。また, Agarose 溶液をゲルメーカー全体に展開しやすい。
7. ゲルメーカーの中心部に水準器を置き, 水平であることを確認する。
8. ゲルメーカーセットに Agarose 溶液を流し込む。
※通常 Agarose 溶液を 70℃程度に保温してゲルメーカーセットに流し込むが, ゲル濃度が高いので, ほどほどで流し込む。
※Mupid の場合, ゲルメーカー板大で, 約 25 ml
9. 直ちにスパーテルなどで板と台の間の空気や表面の気泡を取り除く。
10. 室温のまま放置し, 固化させる。充分固化させる。
※固化後, 氷上で冷却してもよい。
11. 0.5×TBE をコーム周囲に注ぎ, 静かにコームを引き抜く。
※使用時にコームを抜く, ゲルを保存する場合はゲルメーカー全体に 0.5×TBE を注ぎ, ラップをして冷蔵庫で保存する。

[泳動]

- 泳動槽中央部に水準器を置き, 水平確認をする。
- Loading Dye に粘性があるので, PCR産物を混和する際, ピペッティングを充分して, サンプル溝に注入する。

図 2 *Campylobacter* PFGE マニュアル

- 第 1 日目 (菌の培養)
- 1) 3ml の Brucella Broth (Preston, Bolton でも可) に菌を接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第 2 日目 (菌の培養)
- 2) Brucella Agar (TSA, BHIA, CCDA でも可) に 1) 菌液を濃厚に接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第 3 日目 (集菌, アガロースブロックの作製)
- 3) 予めアガロースブロック作成用ウエルにテープを貼り番号を付け, 氷上で冷す。
 - 4) 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を電子レンジで溶かし, 50-55°C で保温する。
- ↓
- 5) 試験管に 1-2ml の PBS をいれ, 平板上の菌を滅菌綿棒でかきとり, MacFarland 5 程度に懸濁する。調整した菌液の 500 μl を 1.5ml チューブに取る。
S. Braenderup H9812 は大腸菌のマニュアルを参照にし, 菌液を調整する。
 - 6) ゲルとの混和準備のために菌液を 40°C に温める。
 - 7) 6) のチューブに 4) の 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を 500 μl 入れ混和する。
寒天が熱いのでチップが膨化し, 2 度目以降は寒天量が多くなるのでチップは 1 回毎替える。
 - 7) を 3) のサンプルプラグキャスター (0.7mm) に約 100 μl 注入する。
 - 9) 氷上で固める。15-30 分間放置。
- ↓
- (ProteinaseK 処理)
- 10) ProteinaseK を 1 mg/ブロック 分秤量し, 1%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA で 1 mg/ml となるよう溶解し, チューブに 1ml ずつ分注 (1ブロック作製用)。
1%N-lauroylsarcosine が溶けにくいので 50°C の恒温槽に入れておく。
 - 11) 固化したアガロースブロックを 50°C に保温した 10) の溶菌液入りチューブの中に落とし入れる。
使用したモールド及びミニスパーテルは消毒用エタノールで浸漬あるいはスプレーし消毒する。
 - 12) 50°C で 2 時間 ~ over night 緩やかに振盪する (30rpm 程度)。(72 時間まで可)。
* 水槽の水位がチューブの中の溶液より上であることを確認する。
(ここで止めても良い, ブロックの保存はこの状態で冷蔵保存する)
恒温槽から取り出したら氷上で一旦冷やした後, 次の操作にはいと寒天が固まり作業しやすい。
- ↓
- (ProteinaseK の不活化・洗浄)
- 13) アガロースブロックを取り出し, メスやカバーガラスを使って泳動時用の大きさ (コーム幅 × 約 2-4mm) にカットする。
泳動時の大きさにすると取り扱いが大変なので取り敢えず半分にしても良い。
残りは新しい ProteinaseK 液 (0.5mg ProteinaseK in TE, 1%N-lauroylsarcosine は入れない) で保存する。
 - 14) 0.5ml ずつ分注した 1mg (4 mM) Pefabloc SC (AEBSF)/ml in TE にブロックを移し, 50°C で 20 分以上振盪し ProteinaseK 液を不活化する (1 回目)。
 - 15) チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後, Pefabloc 液を丁寧に取り, 新しい 4mM Pefabloc in TE を 0.5ml 加え 50°C 20 分間以上振盪する (2 回目)。
 - 16) TE (1ml/sample) にバッファーを変えて, 50°C で 20 分以上振盪し洗浄する。この操作を 2 回行う。
(ここで止めても, 1 週間以内であれば冷蔵保存できる。日をおいて再開する場合は TE で洗浄する。この時 50°C

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

食品由来ウイルスの検出法の開発

研究分担者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨

組換えバキュロウイルス発現系を用いて、ノロウイルス(NoV)およびサボウイルス(SaV)中空粒子(VLP)を発現した。これらのVLPは抗原性、免疫原性がネイティブなウイルスと区別できない。これらに対するポリクローナル抗体、および単クローン抗体を作製し、食品中のNoV、SaV検出法の確立に向けて、磁気ビーズを用いた濃縮精製法を検討した。

研究協力者

小林慎一（愛知県衛生研究所）
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）
グラント・ハンスマン（国立感染症研究所）

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)およびサボウイルス(SaV)は、ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスである。食中毒の感染源および感染経路の究明には推定原因食品からの病原体の検出が必須である。しかしながら、食品や食材ではウイルス含量が少ないこと、PCR阻害物質が共存することなど、ウイルスの精製と濃縮が課題である。

本研究では、バキュロウイルス発現系を用いてNoV、SaV中空粒子(VLP)を作製し、これらに対する高力価抗体、および、種々な性状の単クローン抗体を作製し、

食中毒原因食品からのウイルス検出法の確立に向けて、抗体を結合した磁気ビーズの特異性および濃縮効果について検討した。

B. 研究方法

1) 組換えバキュロウイルスの調製：構造蛋白をコードする遺伝子領域をクローニング後、定法に従って組換えバキュロウイルスを作出した。組換えバキュロウイルスをTn-5細胞に感染させ、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VLPの発現を調べた。VLPは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によって濃縮、精製した。

2) 高力価ポリクローナル抗体の作製：約10・gの精製VLPでウサギを2回免疫して抗血清を作製した。VLPは抗血清を用いたELISA法で交叉反応試験を行ない抗原性を検討した。

3) 抗体結合磁気ビーズの調製とRT-PCR

によるウイルス遺伝子検出：精製ポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズでウイルスを濃縮精製後、ウイルスRNAを抽出した。逆転写酵素でcDNAを作製後、構造タンパクをPCRで増幅した。電気泳動により標的バンドの有無を確認し、増幅産物の塩基配列を解読した。

C. 研究結果

1) VLPの作製：遺伝子の系統樹解析から発現候補株を選出し、これまでにGI NoVで9株の、GII NoVでは24株の組換えVLPを作製した。抗体ELISAで高力価ポリクローナル抗体と精製VLPの交差反応をしらべたところGIの9株は9の抗原型に、GIIの24株は14の抗原型に分類された。同様に、6株のSaV VLPと抗体を作製した。

2) 抗体磁気ビーズの評価：GI NoV VLPで作製した高力価抗体を用いて磁気ビーズを作製した。ノロウイルスが含まれることがわかっている患者便材料と磁気ビーズを混合し、結合したウイルスの遺伝子をしらべたところ磁気ビーズは同種の抗原型とのみ結合し、異種の抗原型とは全く反応しないことが明らかになった。磁気ビーズ特異性が確認できた。また、磁気ビーズの濃縮効果も確認し、カキ1個体からもNoVを検出することもできた。さらに、原因食品からのNoV検出にも有効であった。

D. 考察

本年度に発現できた株を加えると、GIで9株、GIIで24株、抗原型ではGIで9種、GIIで14種のNoV抗原および抗血清を持つことができた。食中毒の原因究明におい

て、感染経路や感染源の特定および予防対策のためには食中毒原因食品からのウイルス検出は重要である。しかし、食中毒の検査では多数かつ多量の検体を処理する必要があり、また抽出段階でのRNA損失を抑えることや検体間でのコンタミネーションを避けるためにも簡便な食品からのNoV遺伝子検出法を確立する必要がある。抗体を結合した磁気ビーズの濃縮効果および特異性を検討した結果、良好な結果が得られた。食品検査のためには何種類の磁気ビーズを準備する必要があるのかについては今後の検討課題である。また、GIとGII NoVに特異的な単クローン抗体も獲得しているのでこれらを結合した磁気ビーズの有用性についても検討したい。また、SaVについても今後検討する。

E. 結論

ノロウイルス、サボウイルス中空粒子に対する抗体を作製した。抗体磁気ビーズによって食品中のノロウイルスノ検出が可能になった。

F. 研究発表

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.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 152: 457-61.
- Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 3996-4005.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N,

2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.
- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-5.
- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N, 2007. An outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus. *J Clin Microbiol* 45:1247-1349
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N, 2007. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 13: 1519-1525.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, 2007. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 620-2.
- Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N, 2007. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis*: 786-788. 2007.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N, 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17: 133-41.
- Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
- Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 2006;151:1291-1308.
- 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, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
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.
- Shirato H, Takeda N, 2007. 10. Interaction between norovirus and histo-blood group antigens. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand.
- Oka T, Okamoto R, Arita T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki U, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, Hansman GS, 2007. 9. Detection of Human Sapovirus from clams in brackish water. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.
- Hansman GS, Sano D, Ueki U, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007. 9. Sapovirus in Water, Japan. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.
- Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2007. 5. Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- Oka T, Hansman G, Ishida S, Saito H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Shibata C, Ishizuka S, Takeda N, 2007. 5. Viral Loads of Sapovirus. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- Hansman G, Oka T, Takeda N, 2007. 5. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006. 11.
- Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. In 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006. 8.
- Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool

- Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.
- 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ピン・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3.5Å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，脇田隆宇，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。
- 本村和嗣，岡智一郎，Hansman GS，横山勝，神田忠仁，武田直和，佐藤裕徳，2007.10. 2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析。第55回日本ウイルス学会学術集会。札幌。
- 北元憲利，三好龍也，内野清子，Hansman GS，武田直和，田中智之，2007.10. サボウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性。第55回日本ウイルス学会学術集会。札幌。
- 染谷雄一，武田直和，脇田隆宇，2007.10. ノロウイルス3C様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割。第55回日本ウイルス学会学術集会。札幌。
- 石田勢津子，吉澄志磨，三好正浩，奥井登代，岡野素彦，Hansman GS，岡智一郎，武田直和，2007.10. サボウイルスによる胃腸炎集団発生事例-北海道-。第55回日本ウイルス学会学術集会。

- 札幌。
- 小澤一弘, 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 武田直和, 2007.10. 調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 山本真民, 岡智一郎, Hansman GS, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. サポウイルス粒子形成機構の解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 斎藤博之, Hansman GS, 岡智一郎, 武田直和, 2007.10. 保育園で流行したサポウイルスの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, Hansman GS, 武田直和, 2007.10. サポウイルスによる乳幼児散発性胃腸炎の分子疫学解析- 熊本県-. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman GS, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス組換え粒子の発現. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和, 2007.10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007.10. サポウイルスプロテアーゼ・基質複合体の構造解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- Hansman GS, Oka T, Takeda N, 2007.10. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 武田直和, 2007.9. 食品媒介ウイルス感染症. 第28回日本食品微生物学会学術総会 教育講演. 東京.
- 武田直和, 2007.6. ノロウイルスの大流行: 特徴と原因. 第48回 日本臨床ウイルス学会 シンポジウム. 富山.
- 武田直和, 白土東子, 宮村達男: ノロウイルス感染症. 第80回日本感染症学会学術講演会. 東京, 2006.4
- 白土東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006.11

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: 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」
平成 18-20 年度 総合分担研究報告書

ノロウイルス迅速診断法 —イムノクロマト法— の開発

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、内野 清子、吉田 永祥 (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:

組換えバキュロウイルスで発現したノロウイルス中空粒子(VLPs)に対するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いたノロウイルス抗原測定イムノクロマトキットを開発した。当初は非特異反応を抑えることが課題であったが、改良の結果、ラテックス標識抗体を用いたキットでは RT-PCR 法との一致率は、89.2%、感度 81.0%、特異性 100%に向上した。平成 19 年 10 月に厚生労働省より「ノロウイルス抗原検出体外診断試薬」として認可された。

検出感度、特異性を高めるために、より特異的に、より広範囲に認識するモノクローナル抗体の作製に向けて、NoV capsid 蛋白の一部である P ドメイン蛋白の大腸菌を用いた発現を試みた。この P 蛋白に対するモノクローナル抗体の作製は現在進行中であるが、それを用いた NoV 検出キットの開発が一層 NoV 診断には有用であると考えられる。

A. 研究目的

ノロウイルスの検査方法には、電子顕微鏡法、RT-PCR 法、real Time PCR 法、LAMP 法など、さらにこれらの長所をコンビネーションしたいくつかの方法が開発されている。しかし、いずれの方法にも特異性・感度は言うに及ばず簡便性、経済性、さらに多検体処理能力などに一長一短がある。これらの点を改良するためにノロウイルス抗原検出 ELISA 法を開発し、平成 17 年 11 月 21 日、厚生労働省よりノロウイルス体外診断キットとして承認され

た。RT-PCR 法と比較した場合、ELISA 法の一致率は 81%、感度 62%、特異性 99%である。

ノロウイルス感染は、学校、病院、特別養護老人ホームなどの集団感染事例として発生する頻度が高く、さらに感染拡大が高い事実から、早期の感染防止対策が求められる。これには迅速且つ簡便、正確な診断が必須であり、上述の ELISA 法のみならずイムノクロマト(IC)キットはこれらの目的を達成し得る最良の方法の一つである。

初年度は、パキウウイルス発現系によるNoVウイルス様中空粒子(Virus-like particles: VLPs)を免疫源として得られた単クローン抗体は、種々の遺伝子型のノロウイルスと幅広く交差反応する抗体であることが確認された。これを用いたイムノクロマト法の開発を試みたが感度・特異性は不十分であった。

改良の結果、次年度ではRT-PCR法との一致率が、89.2%、感度 81.0%、特異性 100%のNoV抗原検出キットの構築が出来、平成19年10月に厚生労働省より「ノロウイルス抗原体外診断薬」として認可された。感度・特異性の向上をさらに高めるために、最終年度では、NoV capsid 蛋白の一部であるPドメイン蛋白の発現、特に各年の流行シーズンの主たる遺伝子型であるGII/4 NoVのP蛋白発現を試みた。それらを用いてモノクローナル抗体の作製を試み、新たなNoV検出キットの開発に取り組んだ。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) モノクローナル抗体

基本的には、これまでに作製されたGI、GIIそれぞれを特異的かつ広範囲に認識するモノクローナル抗体を固相抗体および検出抗体として、GIには4種、GIIには10種を用いた。

2) イムノクロマトキットの構築

テストストリップには前述のモノクローナル抗体と抗マウス抗体が固相されている。10%糞便乳剤を遠心後、上清300ulとラテックス標識抗体をチューブ内で反応させ、その後、ストリップを挿入し、

検体の浸透と共に固相抗体と反応させた。検体中にNoV抗原が存在すれば、2本の反応線が、NoV抗原がなければ抗マウス抗体のみとの一本の反応線が15分の反応時間で目視で出来る。

3) NoV 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ヘルスク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の発現を確認した。

C. 結果

1) イムノクロマトの構築

RT-PCR法との一致率は89.2%、感度81.0%、特異性100%であった。

NoVの遺伝子型との反応性を見ると、GIでは、GI/1-4, 6, 11の6遺伝子型、GIIでは、GII/1-8, 12-15, 17の13遺伝子型との反応が見られた。VLPsを用いた検出感度では、GI:6.25~25.00 ng/ml, GII: 0.78~12.5ng/mlであった。糞便材料のコピー数を見ると 10^4 ~ 10^5 copy/グラムであった。

2) NoV P粒子の発現

大腸菌発現蛋白をFPLC及びSDS-PAGEで解析すると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。

3) モノクローナル抗体の作成

現在このP蛋白をマウスに免疫中である。

D. 考察

ノロウイルスは感染力の強いウイルスと考えられ、10~100個のウイルス粒子による感染成立が報告されている。また、様々な環境にも抵抗性があり、安定して感染性を保っているとも言われている。

ノロウイルス感染の特徴は、一度感染が発生すると発端者を中心に多くの人々が二次感染に巻き込まれ、大小の集団発生に発展することにある。ノロウイルスの主症状は嘔吐、下痢、腹痛等であり、このような症状はノロウイルス感染に限らず、色々な病原微生物で発症する。初発症状のみでノロウイルス感染拡大対策を講じることはきわめて難しい。従って、幼稚園、学校、病院、老人施設などの施設内での感染拡大を初期の段階から防止するには、迅速かつ感度・特異性の高い診断手段が求められる。

既に広く実用化されているノロウイルス抗原検出 ELISA 法は、集団発生などでの多検体処理に優れている。

今回開発したイムノクロマト法は ELISA 法と同等の感度、特異性を有している。イムノクロマト法の特徴は測定時間が15分、検体処理時間を入れても30分以内に、目視で陽性・陰性の判定できる点にある。老人施設などではベッドサイドでも測定が可能であり、患者の症状にあわせて診断が即応できる点が大きな利点と考える。

集団感染に伴う医療費の経費は限りなく大きい。早期の的確な診断、的確な対応は医療費削減などの経済効果に大きく繋がっていくものと考えられる。

しかしながら、今回開発したイムノクロマト法は、RT-PCR法との比較ではまだ感度の面で不十分であると言わざるを得ない。

これらをもとめるためには、優れた特異抗体が必要不可欠である。

ノロウイルスの構造、抗原性等が詳しく解析されるようになり、ノロウイルスのカプシドを構成する P ドメインの P particle(蛋白)はノロウイルスの細胞結合性に大きく関与していると考えられている。大腸菌発現による P 蛋白に対するモノクローナル抗体は、細胞結合性(受容体)の抗原決定基をさらに絞り込められ、より感度や特異性の高い抗原決定基を認識する測定系の開発に繋がると思われる。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。今後の課題として、研究が進行中である。

E. 結論

操作性および簡便性、短時間でベッドサイドでも測定可能なノロウイルス抗原検出イムノクロマト法を開発した。現在多くの医療機関で汎用される様になった。RT-PCR 法との一致率は、89.2%、感度 81.0%、特異性 100%の精度を有する。

ノロウイルスキャプシド蛋白の一つである P particle を用いて作製される抗体はより感度・特異性の高いノロウイルス抗原検出系の構築に寄与することが出来る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang and Mary K. Estes: High

- efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50:883-888
- 2) Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T: Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59:140-141
- 3) Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T: Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59: 2007-272
- 4) Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
- 5) 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, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
- 6) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和: 世界的に見たノロウイルスの現状。
臨床と微生物 2006; 33:385-391
- 7) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和: 新興・再興感染症の感染制御の実際。治療学 2006; 40:79-82
- 8) 小林宣道、田中智之: ノロウイルス感染症. *Pharma Medica* 2006;24:21-25
- 9) 田中 智之、武田直和:
ノロウイルスの現状と院内感染対策
感染症 2007; 37(3): 94-104.
- 10) 田中智之、奥田真珠美:
ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策
小児科診療 2007; 70(6): 985-990
- 11) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和: 院内発生時における感染拡大防止対策 -ノロウイルス
月刊薬事 2007; 49(11): 37-42
- 12) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和: 調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒
食と健康 2007; 10: 6-14
- 13) 田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和:
ノロウイルス迅速抗原検査
検査と技術 2007; 36(3): 235-239,
- 14) 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 Japan 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.* 2008; 82(222), 11247-11262.
- 15) 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* 2008; 33: 43-49
- 16) Tajiri H, Kiyohara Y, Tanaka T, Etani Y, Mushiake S: Abnormal computed tomography findings among children with viral gastroenteritis and symptoms mimicking acute appendicitis. *Pediatric Emergency Care.* 2008; 24(9):601-4.
- 17) 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 2008; 57(7), 2002-2003
- 18) 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* 2008; 36(13); 1393-1399.
- 2) 学会発表
- 1) Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006.5.
- 2) 三好龍也、内野清子、田中智之: ノロウイルス感染者のウイルス排泄期間と排出コピー数。第54回日本ウイルス学会学術集会。名古屋、2006.11
- 3) 田中智之、三好龍也、内野清子、田尻仁: ノロウイルス感染拡大防止のための一考察。第46回日本臨床ウイルス学会。富山市 2007.6.
- 4) 福田伸治、三好龍也、内野清子、中村武、吉田永祥、田中智之: 市販ノロウイルス検査キットの評価。28回衛生微生物技術協議会第9研究岡山市 2007.7.
- 5) 熊谷邦彦、石川和子、三上俊之、阿部幸一、畑山一郎、田中智之、武田直和: 市販生カキの中腸腺及びパック内浮遊水からのノロウイルス検出。第61回日本細菌学会東北支部総会、仙台市 2007.8.
- 6) 田中 智之: ノロウイルス食中毒と二次感染。第28回日本食品微生物学会学術総会 ランチオンセミナー 東京都 2007.9

7) 太田真紀子、中長摩利子、木村定美、最上友紀子、鈴木保宏、中山雅弘、田中智之、位田 忍:

ノロウイルス腸炎に関連した Rey 症候群を発症した乳児クローン病の一例.

第 34 回日本小児栄養消化器肝臓学会

仙台市 2007.10.

8) 田中智之、田尻 仁:

ノロウイルス迅速検査キットの開発.

第 56 回日本感染症学会東日本地方会
東京都 2007.10.

9) 中村 武、三好龍也、内野清子、福田伸治、田中智之:

市販ノロウイルス検査キットの評価.

第 55 回日本ウイルス学会学術集会
札幌市 2007.10.

10) 北元憲利、三好龍也、内野清子、

Grant S.Hansman、武田直和、田中智之:
サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性.

第 55 回日本ウイルス学会学術集会
札幌市 2007.10.

11) Tomoyuki Tanaka, Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Tadahito Kanda, Hironori Sato, Tomoichiro Oka, Hansmann Grant, Naokazu Takeda and Norovirus Surveillance Group of Japan:

Molecular epidemiology of noroviruses during 2006/2007-winter season in Japan.

3rd International Calicivirus Conference
Cancun, Mexico 2007.11.

12) Tomoyuki TANAKA, Daisuke

KATO, Kunio KAMATA, Tatsuya MIYOSHI¹⁾, Kiyoko UCHINO, Hisaaki

YOSHIDA, Hitoshi TAJIRI, Masumi OKUDA, Yoshiko NAKAYAMA, Yoshiro HIRAYAMA, Noritoshi KITAMOTO, Grant S. Hansman and Naokazu TAKEDA:

A First Authorized Immunochromatography Kit for Rapid Norovirus Diagnosis.

The 7th China Japan International Conference of Virology . 2008, Tokyo

13) 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
岡山市 2008.10.

14) 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
岡山市 2008.10.

15) 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
岡山市 2008.10.

16) 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
岡山市 2008.10.

17) 東方美保、齊藤博之、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
岡山市 2008.10.

18) 齊藤博之、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
岡山市 2008.10.

- 19) 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、薮本 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
岡山市 2008.10.

- 20) 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
名古屋市 2008.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況
出願中