

II. カキからの新しいロタウイルス濃縮法・溶出法の開発

研究要旨：カキからの新しいロタウイルス濃縮・溶出法を開発し、ロタウイルス検出を行った。この酸吸着-アルカリ溶出法と RT-nested PCR 法を組み合わせた方法は従来法に比べて、高感度であった。タイの市場またはカキ養殖場から購入した 120 個のカキのうち 4 サンプルから A 群ロタウイルス (G9:2, G3:1, G1:1) を検出した。

A 研究目的：カキからのウイルス検出はそのウイルス量が少ないことと、カキの組織中に検出法である PCR 反応に対する natural inhibitor が含まれていることから困難を伴う。そこでカキ中のウイルスを濃縮・溶出する方法を考案し、RT-nested PCR を用いて、A 群ロタウイルスの検出を行った。

B 研究方法：2005 年 8 月から 2006 年 2 月に、バンコック市内の様々な市場およびタイ南部の 10 カ所のカキ養殖場から合計 120 個のカキを購入した。貝柱を除いてカキ肉を細切し、1 サンプル 25 g とした。溶出法の検討のためには既知量のロタウイルスを 25g のサンプルに加えて室温で 60 分おいた。溶出法として①直接アルカリ溶出法、②酸吸着-中性溶出法、③酸吸着-アルカリ溶出法を検討した。溶出液から RNA を抽出し、RT-nested PCR 法にてロタウイルスの検出を行った。この際、one-step RT-PCR 法と RT 後 PCR を行う方法を比較した。

C 結果：One-step RT-PCR 法は RT 後 PCR を行う方法に比べ、高感度であることがわかったのを今後採用した。3 種類の溶出法を比較すると③酸吸着-アルカリ溶出法が最も低濃度までロタウイルスを検出した (表 1)。上記の方法を用いて 120 個のカキからロタウイルスの検出を行ったところ、4 個のカキがロタウイルス陽性となった (表 2)。その G タイプは G9 が 2 検体、G3 が 1 検体、G1 が 1 検体であった。

D 考察：カキを汚染しているロタウイルスを検出する方法を開発した。低いウイルス量で感染が成立するため、高感度の濃縮・検出法が期待され、今後この方法は公衆衛生の管理に有益と思われる。

E 研究発表
後述

F. 知的財産の出願・登録状況
特になし

表 1: Detection limits of three concentration methods for rotavirus seeded in oyster samples and determined using RT-nested PCR

Rotavirus (PFU/25 g ^a)	Acid adsorption-alkaline elution	Acid adsorption-neutral elution	Direct alkaline elution
5 × 10 ⁴	4+ ^b	3+	2+
2.50 × 10 ⁴	4+	3+	2+
1.25 × 10 ⁴	3+	2+	—
6.25 × 10 ³	2+	—	—
3.12 × 10 ³	1+	—	—
1.56 × 10 ³	— ^c	nd	nd

nd, not done.

^a Twenty five grams of oyster tissues were inoculated with various concentrations of rotavirus, homogenized, and concentrated by acid adsorption-alkaline elution, acid adsorption-neutral elution, or direct alkaline elution method.

^b 1+, 2+, 3+, 4+, degree of intensity of DNA bands from weak to strong positive results.

^c —, negative result.

表 2: Characteristics of the oyster samples where rotavirus was detected

Oyster sample	Date of collection	Source of collection	Rotavirus genotype	Fecal coliforms MPN/g ^a	<i>E. coli</i> MPN/g ^a
THOYS019	19 Sep 05	Oyster farm A	G9	230	230
THOYS020	19 Sep 05	Oyster farm B	G9	210	210
THOYS068	7 Nov 05	Oyster farm C	G3	35	35
THOYS108	12 Dec 05	Local market	G1	93	3.6

^a The oyster samples were examined for fecal coliforms and *E. coli* by multiple fermentation tube method. The acceptable level of fecal coliforms present in raw shellfish was < 20 MPN/g.

III. タイ国における糞便検体、カキ、環境水からのノロウイルスの検出

研究要旨：タイ国において、急性胃腸炎患者下痢便検体、カキ、環境水からノロウイルスの検出および分子疫学を行った。その結果、44.7%(患者検体)、38.1%(カキ)、13.2%(環境水)からノロウイルスが検出された。検出ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、患者検体ではGIIが多く、特にGII/4とGII/16が多かった。一方、カキおよび環境水からはGI/2とGI/8が検出された。

A 研究目的：タイ国において、非細菌性と判断された急性胃腸炎患者検体、カキ、環境水中のノロウイルスの検出を行った。

B 研究方法：2005年12月から2007年2月までにLupburi Hospitalに入院し、非細菌性の急性胃腸炎と診断された患者275名より下痢便検体を得た。一方、カキ118個(65個はバンコックのマーケットで購入、53個は産地で採取)、114カ所の環境水(59カ所の河川、55カ所の灌漑用水)を採取した。糞便検体は希釈し、遠心操作の後、上清を使用した。カキは中腸腺部分をホモゲネートし、酸、アルカリ、PEGで順に処理した。環境水は電荷膜で濃縮した。ウイルスRNAをQiagenのキットを用いて抽出した。RT-nested PCR法によりウイルスを検出し、陽性検体では遺伝子解析により、ゲノグループ、ゲノタイプを決定した。さらに系統樹解析を行った。

C 結果：表1に示すように、患者検体、カキ、環境水のそれぞれ44.7%、38.1%、13.2%でウイルスが検出された。ヒトの糞便検体からはGIIがGIの2倍検出されたが、カキ、環境水からは逆にGIがGIIの2倍認められた(表1)。遺伝子解析を行った結果、糞便検体ではGII/4、GII/16が大多数を占め、その次にGII/3、GII/6、GII/11、GII/2がみられた。GIではGI/2、GI/8が見られ、特にGI/2は共通して検出された。GIとGIIの混合感染は2検体で見られ、GI/8とGII/4、およびGI/2とGII/16であった。この結果からタイでは患者検体、環境中にGI、GIIの様々なゲノタイプが混在していることがわかった(表2)。

D 考察：タイのノロウイルス感染者にはGII、特にGII/4とGII/16が多く認められた。我が国ではGII/4とGII/3の多いことがわかっ

ている。一方、カキや環境水中にはGIIのみならずGIも多いことは我が国での結果と一致する。このことはGIとGIIのヒトに対する抗原性の相違、ヒトのノロウイルスに対する免疫能が近年変化してきたことを示しているのかもしれない。これらの研究は、経年的に、各地域において細かく継続的に行うことが必要である。

E 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muller WE, Ushijima H, Batel R, Krasko A, Borejko A, Meller IM, Schroder HC. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: Nitric oxide and ethylene determine the response in sponge cells. *Mutat Res* 2006 May 11; 597(1-2):62-72. Epub 2006 Jan 20.
- 2) Kawata K, Li Y, Liu H, Zhang XQ, Ushijima H. Specific factor for prenatal lead exposure in the border area of China. *Int J Hyg Environ Health* 2006 Jul; 209(4):377-383. Epub 2006 May 11.
- 3) Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic characterization of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 2006 Jul; 78(7): 971-978.
- 4) Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and genetic characterization of recombinant

- norovirus circulating in Eastern Russia. *Clin Lab* 2006; 52 (5-6): 247-253.
- 5) Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel recombinant norovirus in China. *Emerg Infect Dis.* 2006 May; 12(5): 857-858.
 - 6) Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Novel recombinant sapovirus, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2006 May; 12(5): 865-867.
 - 7) Schröder HC, Boreiko A, Koizhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, Ushijima H, Müller IM, Müller WE. Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *J Bio Chem* 2006 Apr 28; 281 (17): 12001-12009. Epub 2006 Feb 22.
 - 8) Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 2006 Jul; 78(7):986-994.
 - 9) Yagyu F, Sunada A, Kojima T, Ikeda M, Okitsu-Negishi S, Ushijima H. Detection of Norovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Kansenshogaku Zasshi* 2006 May; 80(3):275-276.
 - 10) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 2006 Jun 78(6):839-846.
 - 11) Schroeder HC, Breter HJ, Fattorusso E, Ushijima H, Wiens M, Steffen R, Batel R, Mueller WEG. Okadaic acid, an apoptogenic toxin for symbiotic/parasitic toxic annelids in the demosponge *Suberites domuncula*. *Appl Environ Microbiol* 2006 Jul; 72(7): 4907-4916.
 - 12) Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 2006 Oct; 78(10):1318-1324.
 - 13) Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 2006; 52 (9-10): 515-518.
 - 14) Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 2006; 52 (9-10): 519-525.
 - 15) Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 2006; 52(7-8):363-366.
 - 16) Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2006 Oct; 44(10):3784-3786.
 - 17) Ozeki N, Ushijima H, Knowles A, Asada Y. Analyses of transcultural stress factors and the mental well-being of female foreign residents in Japan. *J Jp Soc Psychosom Obstet Gynecol* 11(2): 141-151, 2006.

- 18) Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 2006 Nov; 44(11):4113-4119. Epub 2006 Sep 20.
- 19) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infect Genet Evol* 2007 Mar; 7(2): 247-253.
- 20) Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab*, 2007; 53(1-2): 41-48.
- 21) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet Evol* 2007 Mar; 7(2):279-284. Epub 2006 Dec 6.
- 22) Müller WEG, Belikov SI, Kaluzhnaya O, Perovic-Ottstadt S, Fattorusso E, Ushijima H, Krasko A, Schöder HC. Cold stress defense in the freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis*. Role of okadaic acid produced by symbiotic dinoflagellates, *FEBS J*. 2007 Jan; 274(1):23-36.
- 23) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Jan; 26(1): 21-27.
- 24) Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 2007 Mar; 88(pt 3): 932-941.
- 25) Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Trinh QD, Yan H, Hoang KT, Cao ATH, Hoang PL, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, 2007 May; 79(5): 582-590.
- 26) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizukami H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. *Plast Reconstr Surg* 2007 Jan; 119(1):227-234.
- 27) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, 2007 May, 81(9): 4645-4653. Epub 2007 Feb 7.
- 28) Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, 2007 May; 79(5): 633-638.
- 29) Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab* 53(3-4): 125-128, 2007.
- 30) Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA

- against coronavirus in breast milk. *Clin Lab* 78(3-4): 129-130, 2007.
- 31) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology*, 2007 May 361(2):243-252, Epub 2007 Jan 9.
- 32) Ushijima H. Foreword. Mother and child health in Asia and Africa. *Pediatrics International*, 2007 Apr: 49(2): 258-259.
- 33) Phengxay M, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: Study from Luangprabang province, Laos. *Pediatrics International*, 2007 Apr, 49(2): 260-5.
- 34) Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low-birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, 2007 Apr: 49(2): 266-272.
- 35) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition improvement for infants under 18 months old of Dai minority in Luxi, China. *Pediatr Int*. 2007 Apr; 49(2): 273-9.
- 36) Li L, Li K, Ushijima H. Moderate-vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatrics International*, 2007 May; 49(2): 280-285.
- 37) Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for prevention of mother to child transmission in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, 2007 Apr: 49(2): 286-292.
- 38) Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatrics International*, 2007 Apr: 49(2): 293-300.
- 39) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. 2007 Jun; 79:843-851.
- 40) Trinh DQ, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. *J Med Virol*, 2007 Jul: 79(7): 1009-1016.
- 41) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalamisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. *Jpn J Environ Entomol Zool*, 17(4):133-141, 2006.
- 42) X Xu, Liu Y, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M, Ushijima H, Kato, N. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptor and its responsive gene. *Neurosci Res*. 2007 Jun: 58(2):149-155. Epub 2007 Feb 23.
- 43) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H, Duan ZJ. Possible misidentification of G5P[6] rotavirus as a novel strain detected in humans for the first time. *J Clin Microbiol*, 2007 Jun: 45(6):2098-9; author reply 2009.
- 44) Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y.

- Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House and Household Insect Pests, 28(2):117-127, 2007.
- 45) Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol* 2007 Jul; 7(4):542-546. Epub 2007 Feb 17.
- 46) Okame M, Shiota T, Hansman G, Takagi M, Yagyu F, Takanashi S, Phan TG, Shimizu Y, Kohno H, Okitsu S, Ushijima H. Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA. *J Med Virol*, 2007 Aug; 79(8): 1180-1186.
- 47) Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in norovirus. *J Med Virol*, 2007 Sep; 79(8): 1388-1400.
- 48) Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. *J Clin Microbiol*, 2007 Jul; 45(7): 2287-2288. Epub 2007 May 23.
- 49) Muller WEG, Schlossmacher U, Eckert C, Krasko A, Boreiko A, Ushijima H, Wolf SE, Tremel W, Muller IM, Schroder HC. Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: Different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and trochaenae). *Eur J Cell Biol*, 2007 Aug; 86(8): 473-487, Epub 2007 Jul 19.
- 50) Trinh QD, Pham NTK, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Kozlov A, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitutions in the VP7 protein of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam during 2001-2004. *J Med Virol*, 2007 Oct; 79(10): 1611-1616.
- 51) Honma S, Chizhilov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky MD, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Amah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4] P[6], P[8], P[9] and P[14]) and VP7 (G1-G6, G8-G10 and G12) genes. *J Clin Microbiol*, 2007 Aug; 45(8):2641-8, 2007. [E-Pub]
- 52) Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan. *Clin Lab*, 2007; 53 (7-8): 405-412.
- 53) Sang XJ, Ushijima H, Okitsu S, Sugihara S, Yagyu F, Maneekarn N. Photocatalytic inactivation of diarrheal viruses by visible-light-catalytic titanium dioxide. *Clin Lab*, 2007 53(7, 8):413-21.
- 54) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, 2007 Sep; 81(18):10188-10194, 2007. Epub 2007 Jul 3.
- 55) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect, Genet Evol*, 2007 Sep; 7 (5) : 656-663, 2007. [Epub 2007 May 6].
- 56) Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Hoang PL, Pham LD, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography test for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with

- acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Tropical Pediatrics*, 2007 Aug; 53(4): 264-9, 2007. [Epub 2007 May 12].
- 57) Khamrin P, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Changing pattern of rotavirus G genotype distribution in Chiang Mai, Thailand from 2002 to 2004: Decline of G9 and reemergence of G1 and G2. *J Med Virol*, 2007 Nov; 79(11): 1775-1782.
- 58) Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AFM, Rahman M, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Clin Virol*, 2007 Nov; 40 : 218-223, Epub 2007 Sep 18.
- 59) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 2007 Dec; 79: 1921-1926, 2007.
- 60) Nguyen TA, Khamrin P, Trinh QD, Phan TG, Pham LD, Hoang LP, Hoang KT, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. *J Med Virol* 2007 Dec; 79: 1959-1965.
- 61) Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Muzutani T. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Method*, 2007 Dec; 146(1-2):372-4, 2007. Sep. 17; [Epub ahead of print]
- 62) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab*.53:567-70, 2007.
- 63) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan TG, Ushijima H. Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by conventional viral culture technique. *Clin Lab*, 53: 605-9, 2007.
- 64) Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *J Virol* 2007 Nov; 81(22): 12298-12306, Epub 2007. Sep 12.
- 65) Nguyen TA, Hoang LP, Pham LD, Hoang KT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005-2006. *J Med Virol*, 2008 Feb; 80(2):298-305.
- 66) Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods*, 2008 Feb; 147:360-363. Epub 2007 Oct 23.
- 67) Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Phan TG, Nishimura S, Katsumata N, Igarashi T, Okitsu S, Ushijima H. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroup I and II. *J*

- Virology, 2008 Mar; 148(1-2):1-8, Epub 2007 Dec 3.
- 68) Muller WE, Wang X, Kropf K, Ushijima H, Geurtsen W, Eckert C, Tahir MN, Tremel W, Boreiko A, Schlossmacher U, Li J, Schrodre HC. Bioorganic/inorganic hybrid composition of sponge spicules: Matrix of the giant spicules and of the comitalia of the deep sea hexactinellid *Monorhaphis*. *J Struct Biol*, 2008 Feb; 161(2):188-203. Epub 2007 Oct 26.
- 69) Santos N, Honma S, Timenetsky MD, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol*, 2008 Feb 46(2): 462-469. Epub 2007 Dec 5.
- 70) Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Dirapha P, Ultrarachkij F, Pungchitton S, Khamrin P, Ushijima H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol*, 2008, Feb 29; 122(1-2): 204-10, Epub 2007 Dec 4.
- 71) Nguyen TA, Hoang LP, Phan LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Use of sequence analysis of the VP4 gene to classify recent Vietnamese rotavirus isolates. *Clin Microbiol Infect*, 2008 Mar, 14(3):235-241. Epub 2008 Jan 10.
- 72) Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1169-73. Epub 2008 Jan 30.
- 73) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol*. 2008;153(4):667-74. Epub 2008 Feb 14.
- 74) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin. *Emerg Infect Dis*, 14(4): 686-688, 2008.
- 75) Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr*. 2008 Apr;54(2):102-13. Epub 2008 Mar 4.
- 76) Pham NTK, Trinh, QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 2008 Jul; 80(7):1222-1227.
- 77) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrheic. *Emerg Infect Dis*, 14(6): 985-986, 2008.
- 78) Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WE. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat Prod Res*. 2008 Jun; 25(3):455-474. Epub 2008 Apr 8.
- 79) Dey SK, Islam A, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiological and molecular analysis of astrovirus gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Trop Pediatr* 2008 Dec, 54(6):423-425. Epub 2008 Jul 9.
- 80) Khamrin P, Peerakome S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H,

- Maneekarn N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Virus Genes*. 2008 Aug 12; 37: 314-321. [Epub ahead of print]
- 81) Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 2008 Aug 19; 80(10):1749-1755. [Epub ahead of print]
- 82) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol* 89(pt 9): 2275-2279, 2008.
- 83) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J Med Virol* 2008 Nov 21; 81(11): 176-182.
- 84) Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. *J Med Virol* Nov 21; 81(11): 183-191.
- 85) Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Method*, 2009 Feb; 156:107-110. Epub 2008, Dec 4.
- 86) Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2009 Feb; 81(2): 345-353.
- 87) Dey SK, Hayakawa Y, Rhaman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2009 Jan; 15(1): 91-94.
- 88) Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009; 44: 161-163. Epub 2009 Jan 6.
- 89) Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print]
- 90) Usami M, Trinh QD, Yagyu F, Hayakawa Y, Inaba N, Okitsu S, Phan TG, Ushijima H. Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells, trophoblasts, and breast milk cells. *Clin Lab*, in press.
2. 学会発表
1. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan GT, Shiota T, Yagyu F, Ushijima H. Evaluation of a commercial norovirus ELISA kit using rVLP and stool samples. The 6th China Japan International Conference of Virology, June 22-24, 2006, Shanghai, China.

2. Ushijima H, Yagyu F, Okitsu S, Phan GT. Surveillance of viral infection associated with acute gastroenteritis in Japan. The 6th China Japan International Conference of Virology, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
3. Takanashi S, Katsumata N, Okitsu S, Shiota T, Phan TG, Igarashi T, Ushijima H. Development and evaluation of immunochromatography of norovirus: a novel rapid detection test for the highly communicable diseases. 40th Joint Working Conference on Viral Diseases, July 24-26, 2006, Sendai.
4. Duy Quang Trinh, Dey Shuvra Kanti, 高梨さやか, 柳生文宏, 沖津祥子, 牛島廣治 Amino acids substitutions in VP7 sequences of human rotavirus A serotype G1 strains isolated in Japan, China, Thailand and Vietnam in 2002-2003. 第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21, 東京)
5. Dey Shuvra Kanti, Duy Quang Trinh, 高梨さやか, 柳生文宏, 沖津祥子, 牛島廣治 Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. 第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21, 東京)
6. 柳生文宏, 砂田亜津子, 小島禎, 池戸正成, 沖津祥子, 牛島廣治 LAMP 法によるノロウイルスの検出。第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21, 東京)
7. Tung Gia Phan, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Hiroshi Ushijima Surveillance of viral infection associated with acute gastroenteritis in Japan. 第 47 回日本臨床ウイルス学会 (2006.6.4, 東京)
8. Pham Thi Kim Ngan, Khamrin Pattara, Nguyen Anh Tuan, Shuvra Kanti Dey, Phan Gia Tung, 沖津祥子, 牛島廣治 日本, バングラデシュ, タイ, ベトナムにおけるアイチウイルスの分子疫学 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
9. Trinh Duy Quang, Nguyen Anh Tuan, Phan Gia Tung, Khamrin Pattara, Yan Hainian, 沖津祥子, 牛島廣治 2001 年から 2003 年に日本, 中国, ロシア, タイ, ベトナムにおいて分離されたヒトロタウイルス G1, G2, G3, G4 の VP7 の遺伝子解析 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
10. Dey Shuvra Kanti, Nguyen Anh Tuan, Phan Gia Tung, 沖津祥子, 牛島廣治 バングラデシュ, ダッカにおけるノロウイルス胃腸炎の分子疫学 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
11. 沖津祥子, 柳生文宏, 西村修一, 杉田久美子, 西村忠史, 牛島廣治 ノロウイルス ELISA kit の使用評価 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会, 第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同総会 (2006. 10. 26-27, 東京)
12. 柳生文宏, 沖津祥子, 牛島廣治 RT-LAMP 法を用いた日本におけるノロウイルスの検出 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会, 第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同総会 (2006. 10. 26-27, 東京)
13. 高梨さやか, 沖津祥子, 柱新太郎, 松永貞一, 五十嵐隆, 牛島廣治 ノロウイルス胃腸炎患児血清からのウイルス遺伝子検出 第 38 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2006, 11.10-11, 高知)
14. 塩田智之, 大亀路生, 高梨さやか, 柳生文宏, 沖津祥子, 牛島廣治 ノロウイルス genus-specific モロクローナル抗体の作製と立体構造を含めた評価 日本ウイルス学会 第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
15. 高梨さやか, 沖津祥子, 柳生文宏, 塩田智之, 牛島廣治 ノロウイルス胃腸炎患児血清からのウイルス遺伝子検出 日本ウイルス学会 第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
16. Dey Shuvra Kanti, Phan Tung, Nguyen Tuan, 高梨さやか, 柳生文宏, 沖津祥子, 牛島廣治 Sapovirus infection among infants and children

- with acute gastroenteritis in Dhaka city, Bangladesh. 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
17. 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞におけるGプロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 18. Phan Ngan, Khamrin Pattara, Nguyen Tuan, Shuvra Dey, Phan Tung, 沖津祥子、牛島廣治 Isolation and molecular characterization of the Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 19. Khamrin Pattara, 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Novel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 20. Trinh Quang, Nguyen Tuan, Phan Tung, Khamrin Pattara, Yan Hainian, 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Amino acid substitutions in the VP7 sequences of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam in 2001-2003. 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 21. Nguyen Anh Tuan, Khamrin Pattara, Trinh Quang, Yagyu Fumihiko, Okitsu Shoko, Ushijima Hiroshi P genotyping of Vietnamese group A rotavirus and divergence of P[8] strains 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 22. 清水英明、顔海念, Pattara Khamrin, 沖津祥子、牛島廣治 日本、中国およびタイで検出されたアデノウイルス41型の genome type. 日本ウイルス学会第54回学術集会(2006.11.19-21, 名古屋)
 23. Phan TG, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of Norovirus infection in Japan, 2002-2007. 第48回日本臨床ウイルス学会(2007.6.2-3, 富山)
 24. 早川有子、伊藤千恵、横田佳昌、沖津祥子、牛島廣治. 母乳中の風疹IgA抗体量と褥婦の予防接種・罹患率に関する研究<第2報> 第22回日本母乳哺育学会学術集会(2007.9.29-30, 浜松)
 25. Dey Shuvra Kanti, 清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Molecular epidemiology of adenovirus infection of among hospitalized infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. 第55回日本ウイルス学会学術集会(2007.10.21-23, 札幌)
 26. ファム・ニヤン、カムリン・バタラ、グエン・トゥアン、シュブラ・デイ、ファン・トゥン、沖津祥子、牛島廣治. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. 第55回日本ウイルス学会学術集会(2007.10.21-23, 札幌)
 27. カムリン・バタラ、沖津祥子、牛島廣治. Detection and molecular characterization of bovine kobuviruses from diarrheic cattle. 第55回日本ウイルス学会学術集会(2007.10.21-23, 札幌)
 28. 高梨さやか、Phan Tung、沖津祥子、水口雅、五十嵐隆、牛島廣治. スリランカ・ペラデニヤ大学病院における小児ウイルス性胃腸炎の分子疫学的検討. 第39回日本小児感染症学会学術集会(2007.11.9-11, 横浜)
 29. Phan Tung、沖津祥子、牛島廣治. Viral infection in associated with acute gastroenteritis in Japanese children. 第39回日本小児感染症学会学術集会(2007.11.9-11, 横浜)
 30. Ushijima H, Phan YG, Dey SK, Nguyen AT, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu-Negishi S. Molecular epidemiology of Norovirus and sapovirus infection in Asia. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.
 31. Khamrin P, Nguyen AT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of

- the immunochromatography test for rapid detection of Norovirus antigen in stool samples. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.
32. Okitsu-Negishi S, Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Sato K, Masuoka Y, Shimizu Y, Ushijima H. Characterization of newly identified monoclonal antibody reacted with Norovirus GI and GII: Recognition of novel conformational epitope. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.
 33. Nguyen TA, Khamrin P, Phan TG, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. 第4回日本小児消化管感染症研究会 (2008.2.16, 新宿)
 34. 牛島廣治, 沖津祥子, 西尾治. 小児急性胃腸炎におけるノロウイルスのイムノクロマト法による迅速診断の評価. 第49回日本臨床ウイルス学会 (2008.6.14-15) 犬山
 35. Takanashi S, Phan TG, Katusmata N, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Development and evaluation of immunochromatography of Norovirus: A novel rapid detection test for a highly communicable disease. 11th annual Scientific Congress 2008 of the Sri Lanka College of Paediatricians. June 20 to 22, 2008, Kandy, Sri Lanka.
 36. Ushijima H, Phan TG, Dey SK, Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Molecular epidemiology of norovirus and sapovirus in Asia. IUMS 2008 (Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.
 37. Okitsu S, Nguyen TA, Khamrin P, Dey SK, Ushijima H. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. IUMS 2008 (Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.
 38. Khamrin P, Pham NTK, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Associations of bovine kobuvirus with diarrhea in cattle and Aichi virus with acute gastroenteritis in children. IUMS 2008 (Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.
 39. 牛島廣治, 早川有子, 清水優子, 沖津祥子, 山本直彦. HIV 陽性母乳の加熱不活性化についての研究. 第23回日本母乳哺育学会学術集会(2008.10.4-5) 岡山
 40. 牛島廣治, 早川有子, Phengxay Manilay, 清水優子, 沖津祥子, 山本直彦. どこでも出来る固形アルコール燃料と飲料アルミ缶を用いた HIV 陽性母乳の加熱不活性化について. 第23回日本国際保健医療学会学術集会 (2008.10.25-26) 東京
 41. カムリン・パタラ, 石田眞一, 沖津祥子, 牛島廣治. Immunochromatography test for rapid detection of Norovirus in stool samples. 第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 42. カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes of a novel combination of G3P[10] rotavirus strain. 第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 43. トンブラチュム・アクサラ, チャンイット・ウイスート, カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Detection of group A rotavirus and norovirus among children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand 2006. 第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 44. チャンイット・ウイスート, トンブラチュム・アクサラ, カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Genetic

- characterization of diarrheal viruses circulation among children with acute gastroenteritis in Japan in 2007-2008. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10.26-28) 岡山
45. 牛島廣治、西村修一、菊田英明、山本あつ子、杉田久美子、馬場常嘉、沖津祥子. イムノクロマト法によるノロウイルスの迅速診断. 第 40 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2008.11.15-16) 名古屋
46. Ushijima H, Khamrin P, Phan TG, Dey SK, Chan-It, W, Nguyen TA, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Molecular epidemiology of rotavirus in Asia. The 3rd International Workshop on Rotavirus Vaccine in China. 2-3 Dec. Kunming, China.
47. Khamrin P, Ushijima H, PhanTG, Dey SK, Chan-It W, Nguyen TA, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Animal-origin of unusual rotavirus strains circulating in Asia. The 3rd International Workshop on Rotavirus Vaccine in China. 2-3 Dec. Kunming, China.
48. 勝又紀子、岩附慧二、田口了示、藤原優、小林正明、西村修一、沖津祥子、牛島廣治. ノロウイルス抗原検出試薬「イムノサーチ NV」の基礎的及び臨床的検討. 第 47 回イムノアッセイ研究会 (2009.1.10) 東京
49. Ngan Thi Kim Pham, Pattara Khamrin, Manilay Phengxay, 沖津祥子、水口雅、牛島廣治. 日本、バングラデシュ、タイ、ベトナムより検出されたアイチウイルスのキャプシド領域の遺伝子解析. 第 5 回日本小児消化器感染症研究会(2009, 2, 14)大阪
50. Quang Duy Trinh, Pattara Khamrin, 清水英明、Manilay Phengxay, 沖津祥子、水口雅、牛島廣治. 日本及びタイの急性胃腸炎患児の便検体からのヒトパレコウイルスの検出と遺伝子解析. 第 5 回日本小児消化器感染症研究会(2009, 2, 14)大阪
- F. 知的財産の出願・登録状況
特になし

表1. タイにおける下痢便検体、カキ、環境水から検出されたノロウイルス

Norovirus	Stool samples (n=275) %	Oyster samples (n=118) %	Water samples (n=114) %
GI	10.2	25.4	7.9
GII	29.1	5.9	1.8
GI + GII	5.4	6.8	3.5
Total	44.7	38.1	13.2

表2. タイにおいて便検体、カキ、環境水より検出されたノロウイルスのゲノタイプ

Norovirus	Stool samples	Oyster samples	Water samples
GI	GI/2 (1)	GI/2 (2)	GI/2 (5)
	GI/8 (1)		GI/8 (1)
GII	GII/4 (22)	-	-
	GII/16 (21)		
	GII/3 (4)		
	GII/6 (3)		
	GII/2 (2)		
	GII/11 (2)		
	GII/12 (1)		
GI + GII	GI-8, GII-4 (1)	-	GI-2, GII-16 (1)
Total (sample numbers)	58	2	7

厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
「輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究」
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類から検出された
ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの遺伝子解析

入谷展弘（大阪市立環境科学研究所）
田村 務、西川 眞（新潟県保健環境科学研究所）
鈴木 宏（新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座公衆衛生学分野）
牛島廣治、沖津祥子（藍野健康科学センター、東京大学医学系研究科）
田中俊光（千葉市保健所）
古屋由美子、宮原香代子、片山 丘（神奈川県衛生研究所）
足立 聡（静岡県環境衛生科学研究所）
松本知美、岡本玲子（山口県環境保健センター）
大塚有加、山下育孝（愛媛県立衛生環境研究所）
藤本嗣人、秋山美穂、西尾 治（国立感染症研究所 感染症情報センター）

研究要旨

平成18～20年度に輸入生鮮魚介類から検出されたノロウイルス（NV）109株およびA型肝炎ウイルス（HAV）4株について遺伝子解析を行った。NVは少なくとも18種類の遺伝子型に分類され、GII.4型が最も多く検出された。HAVは、すべて1A型に分類された。今回、ウイルスに汚染された外国産生鮮魚介類を介して、国内に多種類のNVやHAVが持ち込まれていることが示された。輸入生鮮魚介類の安全確保には、効率的な食品からのウイルス検査法の確立および食品中のウイルス汚染の監視が重要であると考えられた。

A. 研究目的

日本には、膨大な生鮮魚介類が輸入され、消費されている。これらの食品について、ウイルス汚染実態を把握し、監視することは、食品の安全性の確保、リス

ク評価、安全な取り扱い方法の確立のために重要である。

今回、輸入生鮮魚介類から検出されたノロウイルス（NV）およびA型肝炎ウイルス（HAV）の分布や推移などについて

の実態把握と、ヒトから検出されたウイルスとの関連性の調査を目的とし、遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1) 輸入生鮮魚介類から検出された NV および HAV

平成 18~20 年度に輸入生鮮魚介類から検出された NV 109 株および HAV 4 株を用いた。NV が検出された生鮮魚介類は、アカガイ 37 検体、カキ 35 検体、ハマグリ 22 検体、タイラガイ 6 検体、バカガイ 5 検体、ブラックタイガー 3 検体、アサリ 1 検体であり、合計 7 種類であった(表 1)。産地国別では中国産 74 検体、韓国産 21 検体、ベトナム産 6 検体、フィリピン産 3 検体、ロシア産 2 検体、北朝鮮産 1 検体、アイルランド産 1 検体、ニュージーランド産 1 検体であり、合計 8 カ国であった(表 2)。NV が検出された生鮮魚介類の購入時期は、2005 年 10 月~2009 年 2 月であった(表 3)。HAV が検出された魚介類は中国産アカガイ 1 検体(2006 年 5 月購入)およびフィリピン産ブラックライガー 3 検体(2007 年 5 月購入分 2 検体および 2008 年 6 月購入分 1 検体)であった。

本報告書において使用したウイルス株名は、「株番号/産地国 2 文字コード/月年/魚介類名」(例: 2008 年 8 月購入中国産アカガイから検出されたノロウイルス株番号 123 →

123/CN/Aug08/ark_shell) で表した。

2) 系統樹の作成

NV 遺伝子の分子系統樹は、Capsid N 末端領域を対象とし、近隣接合(Neighbor joining)法により、作成した。分子系統樹の樹形は、ブートストラップを 1000 回行い、検定した。HAV 遺伝子については、VP1/2A 領域を対象とし、NV と同様に行った。

3) NV の遺伝子型別

NV の遺伝子型は、Katayama らの方法(Virology 299, 225-239, 2002)で型別し、片山らの番号(<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/graph/norotabl.pdf>)を用いた。型別に用いた NV 参考株は、「遺伝子型番号-株名」と表し、Fields Virology (5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, p949-979, 2007)で異なる番号が示されている場合は、Fields Virology の番号を [] 内に示した(例: II13-M7/99/US[II14])。

C. 研究結果

NV 遺伝子型別の結果、34 株が Genogroup I (GI)、75 株が GII に分類された。GI では、既報の遺伝子型に分類されたものが 18 株(52.9%)であり、GI. 2 型 1 株、GI. 3 型 1 株、GI. 4 型 9 株、GI. 5 型 1 株、GI. 7 型 1 株、GI. 8 型 1 株、GI. 10

型3株、GI.12型1株の合計8種類認められた(表4、図1)。GIIでは、既報の遺伝子型に分類されたものが71株(94.7%)であり、GII.1型1株、GII.2型2株、GII.3型13株、GII.4型42株、GII.5型1株、GII.6型7株、GII.8型1株、GII.13型1株、GII.14型2株、OHQW101[II.18]型1株の合計10種類認められた(表4、図2)。最も多く検出された遺伝子型はGII.4型(38.5%)であり、次いでGII.3型(11.9%)、GI.4型(8.3%)であった。また、既報の遺伝子型に分類されたNVは、ヒト由来NVと塩基配列の相同性が高く、遺伝的に近縁であった。一方、既報の遺伝子型に分類されなかったNVは20株(GI.NA型16株、GII.NA型4株)であり、ヒト由来NVにほとんど認められていない種類であった。これらの株の中には、DDBJ/EMBL/GenBank上に登録されている塩基配列(korea/C26/02/JP, korea/C25/01/JP, kanagawa/C36/04/JP, korea/C23/00/JP)に近縁な株も認められたが、詳細な分類には、より長い遺伝子領域について解析する必要がある。

食品別では、1検体であったアサリを除く全ての食品において、複数種類の遺伝子型が認められ、GII.4型、GII.3型およびGI.4型は5種類の食品から検出された(表1)。また、遺伝子型別できなかった20株中18株(90.0%)がアカガイから検出されており、アカガイ由来

NV株の48.6%を占めていた。

産地国別では、1検体であった北朝鮮、アイルランド、ニュージーランド以外の国から、複数種類の遺伝子型が認められ、GII.3型が最も多く(5カ国)、次いでGII.4型およびGI.4型(4カ国)であった(表2)。

購入時期別では、各年で複数種類の遺伝子型が認められ、GII.4型が2005年~2009年のすべてから検出された。次いでGII.3型(2005、2007、2008年)およびGI.4型(2006、2007、2008年)の検出頻度が高かった(表3)。特にGII.4型において、2005年10月~2006年9月に検出された15株は3つの遺伝的に近縁なグループ(図3、B~D)、2006年10月~2009年1月に検出された27株は1つの遺伝的に近縁なグループ(図3、A)に分類された。グループAは2006b変異株、Bは2006a変異株、Cは2004変異株、Dは主に2003/04~04/05シーズンに日本で流行していたことが報告されているGII.4型NV変異株(IASR, 26, 325-7および331-2, 2005)にそれぞれ近縁なグループであった。しかしながら、今回解析に用いた領域は保存性が高いため、図3の分子系統樹では各グループを支持するブートストラップ値が低く(A, 202; B, 625; C, 828; D, 662)、明確に分類できなかった。またすべてのGII.6型は、2008年2月~9月に購入した食品(カキ3、ハマグリ2、バ

カガイ1、アカガイ1)のみから検出された(表3)。

HAVについては、4株全てが1A型に分類された(図4)。

D. 考察

今回、NVが検出されたのは2005年10月～2009年2月の期間に購入され、8カ国から輸入された7種類の生鮮魚介類であった。検出されたNV株は、少なくとも18種類の遺伝子型に分類され、輸入生鮮魚介類は多くの種類のNVによって汚染されていた。既報の遺伝子型に分類されたNV株は、ヒト由来株と遺伝的に近縁であり、産地国でのヒトにおける流行が反映されているものと考えられた。特にGII.4型が輸入生鮮魚介類から最も多く検出されたことや時期によって遺伝子グループが変化していたことは、ヒトにおいて変異しながら世界的に流行していることが要因であると考えられた。一方、GII.6型のように一定時期の食品から検出された遺伝子型も存在した。大阪市では、GII.6型は過去2年間に検出されていなかったが、2008/09シーズンに集団事例から検出されるようになった。これらのGII.6型NV胃腸炎事例については、疫学的に輸入生鮮魚介類との関連性が認められず、2008/09シーズンにおける出現については不明である。新奇のNVが突然出現する可能性の一つとして、海外で流行

しているNVに汚染された外国産生鮮魚介類の輸入・消費が侵入経路となることも考えられた。アカガイに多かった未分類のNVについては、ヒトの流行でほとんど検出されておらず、今後の流行に注意する必要がある。

HAVは、NVと比較して検出数は少なかった。しかし、A型肝炎は重篤な疾患であり、長い潜伏期や抗体保有率の低さから、感染予防・拡大阻止が難しいため、予防対策が必要な重要疾患である。今回検出されたHAV株は1A型であり、世界各地で多く報告されている型であった。日本では、HAVの常在流行がみられておらず、輸入生鮮魚介類のHAV汚染が原因の一つとして考えられた。実際に、中国産ウチムラサキガイが原因とされたHAV食中毒の報告(IASR, 23, 119-120および273, 2002)もある。

ウイルスに汚染された外国産生鮮魚介類の輸入によって、国内に多種類のNVやHAVが持ち込まれていることが示され、他の胃腸炎ウイルスについても同様であると考えられた。これらのウイルスの国内での感染・流行の発見や予防対策には、食品およびヒトにおける監視や発生事例の詳細な調査・解析が必要となる。また、輸入食品の安全確保のためには、効率的な食品からのウイルス検査法の確立と継続した食品中のウイルス汚染の監視が重要であると考えられた。

E. まとめ

- ・ 輸入生鮮魚介類からは、少なくとも18種類の遺伝子型のNVが検出された。
- ・ 多数検出されたGII.4型(38.5%)、GII.3型(11.9%)およびGI.4型(8.3%)は、食品の種類、産地国、時期において、幅広く認められた。
- ・ GII.4型は、少なくとも4種類の遺伝的に近縁なグループに分類され、時期によって検出される遺伝子グループが異なっていた。
- ・ 遺伝子型別できたNV株は、ヒト由来株と遺伝的に近縁であったが、型別できなかったNV株は、ヒトでほとんど認められない種類であった。
- ・ HAVの検出数は少なかったが、世界で広く流行している遺伝子型であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H.: Genetic characterization of group

Rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004–2005. *Infection, Genetics and Evolution*, 2007; 7: 247–253.

Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan. *Clin Lab*. 2007, 53: 405–412.

Fujimoto T, Yoshida S, Munemura T, Taniguchi K, Shinohara M, Nishio O, Chikahira M, Okabe N. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. *Jpn J Infect Dis*. 2008 Nov;61(6):497–9.

Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot*. 2008 Aug;71(8):1689–95

Matsui K, Shimizu H, Yoshida A, Nagaoka E, Nishio O, Okuda K. Monitoring of adenovirus from conjunctival scrapings in Japan during 2005–2006. *J Med Virol*. 2008