

マイクロ流路チップを用いた インフルエンザ遺伝子検査の評価

方法

- 【研究期間】2011年12月～2012年3月
 【対象】インフルエンザ感染症が疑われ同意が得られた46例
 【検体】鼻腔ぬぐい液、鼻かみ液
 【検査】- 昭和病院小児科外来
 : POC 遺伝子検査システム (A・B型, H1pdm・H3亜型)
 : IC法 (クイックナビ™-Flu デンカ生研 - A・B型)
 【確定診断】- 国立感染症研究所
 : リアルタイム RT-PCR法 (A・B型, H1pdm・H3亜型)
 : ウイルス分離

結果①

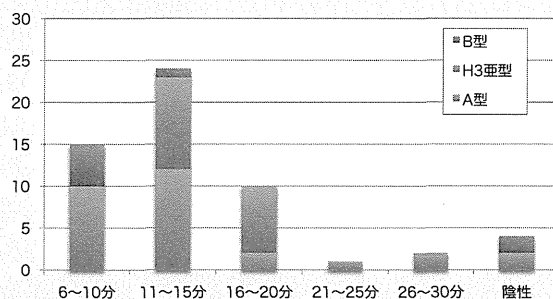
	リアルタイム RT-PCR法	POC遺伝子検査 システム	迅速診断キット (IC)
A型	24例	24例	24例(うち2例)
H1pdm亜型*	0例	0例	
H3亜型	24例	22例	
B型	8例	6例	9例(うち2例)
検出せず	14例	14例	13例**
合計	46例	46例	46例

- * 研究期間中にH1pdm亜型の検出は無かった
 ** rRT-PCR・ウイルス分離陽性A型2例、B型1例を含む(偽陰性)
 ()は偽陽性が疑われる例数 (rRT-PCR・ウイルス分離ともに陰性)

結果②

	A型		H3亜型		B型	
	感度	特異度	感度	特異度	感度	特異度
rRT-PCR	100%	100%	100%	100%	100%	100%
POC LAMP	100%	100%	91.7%	100%	75%	100%
IC	91.7%	85.7%	-	-	87.5%	87.5%

結果③陽性判定までの判定時間



マイクロ流路チップ

核酸抽出時

- ① 検体間のクロスコンタミネーションの可能性 ← ピペット操作による

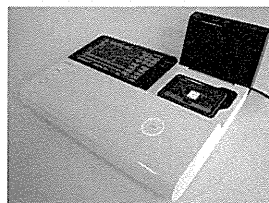
反応試薬調整時

- ② 増幅産物(あるいは検体)のキャリーオーバーコンタミネーションの可能性
 ③ 検体数が多いほど操作が煩雑 ← 試薬の乾燥化で調整が簡便
 ④ 陽性・陰性対象が必要(コンタミネーションの原因になりうる)

反応時間、他

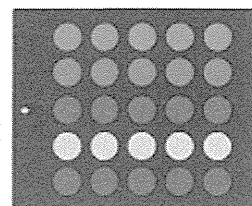
- ⑤ 反応時間および結果判定に少なくとも40minは必要 → 20min以内に判定
 ⑥ 遺伝子検査ではクリーンな環境および設備が必要
 ⑦ 遺伝子検査に熟練する必要がある

システム



- ・小型
- ・バッテリー駆動
- ・全自動
- ・迅速検査
- ・コンタミネーションフリー

マイクロ流路チップ



- Virus A
- Virus B
- Virus C
- Virus D
- Control

- ・反応試薬調製が不要
- ・一度に複数の核酸検査が行える(マルチウェル)
- ・サンプルの充填が容易
- ・コンタミネーションフリー

誰でも・どこでも・簡単に・短時間で・
 高感度・特異的に・複数の・遺伝子検査を一度に行える

PCR等などの遺伝子検査における コンタミネーションの問題

陽性コントロール由来の増幅産物が被検体に混入した事例

陽性コントロール由来の増幅産物かどうか
簡便に識別する方法が必要

マーカー入り陽性コントロールの作製・判別法の開発

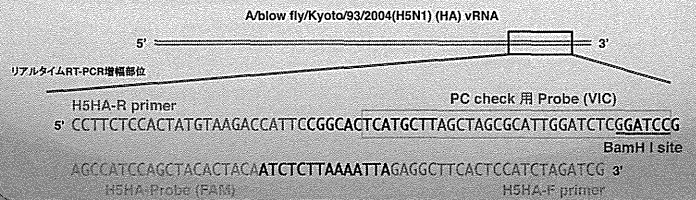
全国の地方衛生研究所に配布・研究会の開催(2012.9)
(コンタミネーションの防止・識別法の周知徹底)

インフルエンザ遺伝子診断検査時の新規陽性コントロール (陽性コントロール由来産物の混入を判別できるマーカー入り) の作製とその判別法の検討

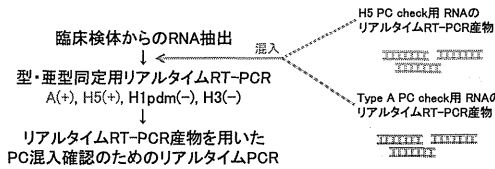
・目的
インフルエンザ遺伝子診断検査時に、検査サンプルへの陽性コントロール由来の増幅産物の混入が起こり、検査結果を疑陽性として判定してしまうことは検査上問題である。このような陽性コントロール由来の増幅産物の混入が疑われた場合に、迅速にその混入の有無を判別することは検査の信頼性を向上させる上で有用である。そこで、陽性コントロール由来の増幅産物の混入を判別できるような新規陽性コントロールの作製とその判別法の検討を行った。

・方法
新規H5/TypeA 陽性コントロール(PC)として、インフルエンザウイルス遺伝子に存在しない人工的な遺伝子配列(PC check用 Probe配列)を挿入した人工合成RNAを作製した。検査時に新規陽性コントロール由来産物の混入が疑われた場合に、PC check用 Probe (H5/TypeA) (VIC)を用いてリアルタイムRT-PCR増幅産物を対象としたDuplexリアルタイムPCRを行い、その増幅産物が陽性コントロール由来のものであるかの判別を行う。

陽性コントロール由来産物の混入を判別できる陽性コントロール(PC check用 RNA)の作製 (H5 HA)

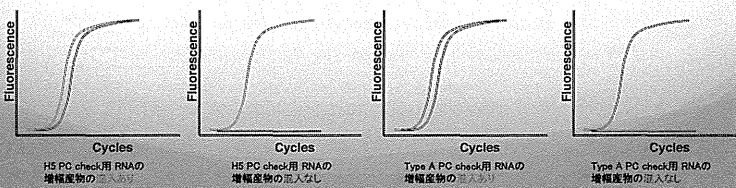


PC check用 Probeによる陽性コントロール由来産物の混入有無の判別例



H5 primer & probe
+
PC check用 probe

Type A primer & probe
+
PC check用 probe

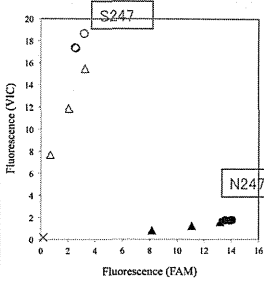


薬剤耐性マーカー検出系の構築

①S247N検出系の構築

H1N1pdmウィルスの薬剤耐性株は、NAタンパク質にH275Y変異を持つが、H275Y+S247N株になると、劇的な薬剤耐性能を獲得する。
従来のreal-time duplex RT-PCR法を使用したH275Y検出系に加え、S247N検出系を構築した。

(Takayama, I. et al. J. Med. Virol. 188, 73-75, 2013)



A/Narita/1/2009 (NA)
 650 679 680 690 F primer 700
 GAGTTGGAGA AACCAATATAT TGAGAACACA AGAGTCTGA TGTGCATGTG
 710 720 730 S247N用 probe 750
 TAAATGGTTC TTGCTTTAC GTAATGACCG ATGACCAAG TAATGGACAG
 760 770 780 790 800
 GCCTCATACA AGATCTTCAG AATAGAAAG GGAAGATAG TCAAATCAGT
 810 820 H275Y用 probe 840 850
 CGAAATGAAT GCCCTAATT ACTATGA GGAATCTCC TGTTACTCTG
 R primer 860 870 880 890 900
 ATTCTAGTGA AATCACATGT GTGTGCAGGG ATAAC TGCA
 TGGCTCGAAT

日本は、世界で最も多く薬剤を使用している
→薬剤耐性株サーベイランスの強化は、重要課題

インフルエンザ以外の呼吸器感染症

簡易診断法がない

実態調査・診断法の構築が必要

目的・方法

- 呼吸器感染症の原因ウイルス実態把握を目的
- 6歳未満の乳幼児呼吸器感染症検体 512検体(2010年1月～2011年2月採取)を対象に、19呼吸器ウイルス(別表)の遺伝子検出 (Multiplex real-time PCR法)を実施

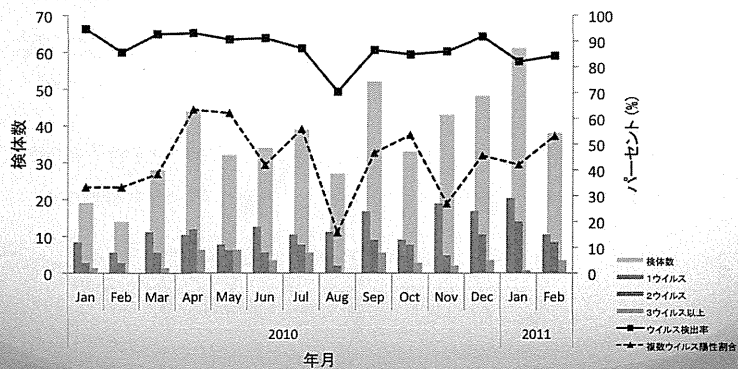
月別ウイルス検出状況

	2010年												2011年		Total	
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月		
アデノウイルス	2	2	4	7	10	6	6	2	17	9	5	14	5	8	97	
インフルエンザウイルスA型	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	3	9
インフルエンザウイルスA (H1N1) pdm09	9	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	13	5	41
インフルエンザウイルスB型	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	4
インフルエンザウイルスC型	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
エンテロウイルス	1	0	0	3	2	2	10	7	5	2	1	1	0	0	0	34
コロナウイルスNL63	0	0	0	1	0	0	2	0	6	2	1	2	5	1	21	
コロナウイルス229E	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
コロナウイルスOC43	0	0	1	1	0	5	4	1	1	2	1	3	5	7	31	
コロナウイルスHKU1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
パラインフルエンザウイルス1型	0	0	0	2	1	1	3	0	1	2	0	0	0	0	0	10
パラインフルエンザウイルス2型	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2	3	0	0	0	9
パラインフルエンザウイルス3型	1	0	1	17	15	4	3	0	1	0	0	0	0	0	2	44
パラインフルエンザウイルス4型	0	0	0	0	0	1	2	2	3	4	1	4	2	5	24	
ヒトボカウイルス	1	1	3	20	13	7	9	0	8	4	2	2	5	7	82	
ヒトパルボウイルス	1	2	12	6	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	26	
ライノウイルス	5	1	7	22	16	13	5	12	12	23	16	12	12	12	172	
RSウイルスA	6	2	5	2	1	4	9	4	10	0	6	5	1	61		
RSウイルスB	0	0	0	2	0	0	2	0	11	10	5	12	12	1	55	
Total	27	16	39	83	60	49	63	22	78	48	48	70	71	55	729	

* conventional RT-PCR も実施し、結果に反映

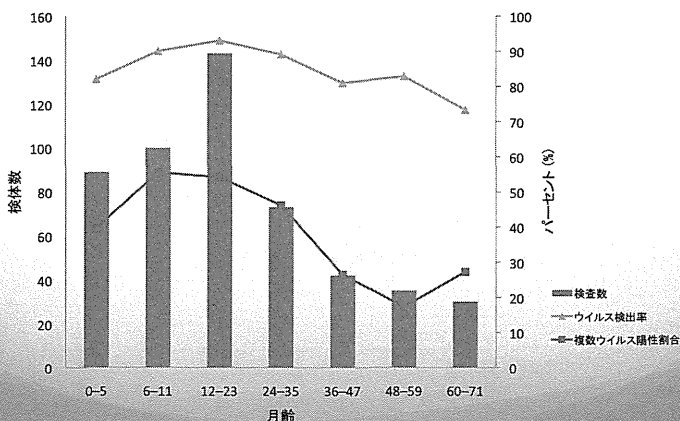
月別呼吸器ウイルス検出状況

(2010年1月～2011年2月採取検体)



年齢別ウイルス検出率と複数ウイルス陽性割合

(2010年1月～2011年2月採取検体)



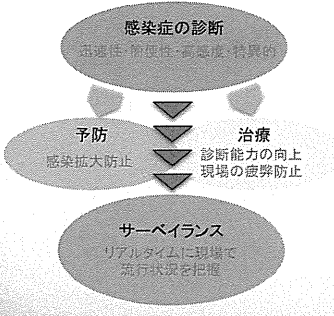
まとめ

- 512検体から729のウイルスを検出した
- 調査対象である19ウイルスすべてを検出した
- 年齢別ウイルス検出状況においては、ウイルス検出率に大きな差は認められなかったが、ウイルス陽性検体に占める複数ウイルス陽性検体の割合は、3歳未満で高い傾向が認められた。低年齢層の乳幼児については、呼吸器ウイルスの感染リスクが高いことが示唆された。

マイクロ流路チップを用いた
呼吸器感染症ウイルス診断キットの開発

予防・診断・治療に応用

マイクロ流路チップを用いたPOC遺伝子検査システム (ベッドサイド遺伝子診断)



- 検査精度の向上
 - 感染拡大防止
 - 患者への適切な医療の提供
 - 感染症診断の技術水準向上
- 検査の簡略化・検査時間の短縮
 - 検査負担・医師等の疲弊軽減
 - 人的資産の活用
- サーベイランス
 - 迅速な流況状況の把握(オンライン化)
 - 検査負担軽減により高度な解析が可能
 - 検査技術の低い海外での活用

マルチプレックス遺伝子検査
 ・インフルエンザウイルスの検出
 亜型同定: A/B, H1pdm, H3, H5
 ・呼吸器感染症ウイルスの検出

平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

5

研究課題：網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価課題番号：H23-新興-一般-005予定期間：H23年度からH25年度まで研究代表者：片山 和彦所属研究機関：国立感染症研究所所属部局：ウイルス第二部第一室職名：室長年次別研究費(交付決定額)：1年目 35,529,000円 2年目 29,559,000円**I. 研究の意義**

- (1) ロタウイルス (RV) は、乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因である。我が国の総患者数は年間 80 万人、うち重症例 78000 人と推定され、予後の悪い RV 脳症や死亡例も存在する。平成 23 年から相次いで導入されたヒト A 群ロタウイルス (ヒト RVA) のワクチン (単価：ロタリックス、5 価ロタテック) を評価するため、少なくとも VP7 (G タイプ)、VP4 (P タイプ) をカバーした全国規模のサーベイランスシステムの構築が必須である。
- (2) インフルエンザのように動物とヒトとの間のリアソータントも考慮に入れ、ヒト、動物の RVA 全ゲノム配列の蓄積を行う。ヒト重症例から分離された RVA ゲノム全長塩基配列は、病原性発現機構、重症化機構、脳炎との関係を解く糸口となる。アジア近隣諸国における分子疫学情報の蓄積も効果がある。
- (3) ロタテックはウシ RVA とヒト RVA のリアソータント 5 種類からなるワクチンである。本ワクチンの恒常的な接種によりウシ-ヒト RVA 間リアソータント出現が加速する懸念がある。ウシ、ブタなどの RVA 分子疫学を実施し、ヒト-身近な動物間 RVA のリアソートによる病原性変化に備える必要がある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 国家レベルで RVA の分子疫学調査基盤を構築し、RVA ワクチン導入効果を多角的に評価する。RVA ワクチン導入前後の全国規模の疫学データと正確な臨床データに裏づけされたバックグラウンド情報を網羅的に収集し、ワクチン導入の効果を検討する。A 群以外の B, C 群ロタウイルス (RVB, RVC) にも適応すれば、食中毒、人獣共通感染症としての RVA, RVB, RVC 感染症の予防衛生戦略策定に役立つ。
- (2) RVA 病原性発現機構の基礎的研究と関連付けた分子疫学手法を構築することで、RVA 病原性制御戦略、RVA ワクチン作用機序解明、更には、新規 RVA ワクチン開発が期待できる。
- (3) 国内の RVA 分子疫学だけでなく、アジア近隣諸国の RVA 流行を研究することで、RVA 流行予測、予測に基づいた感染予防対策を策定できる。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者：片山和彦

- (1) 疫学研究並びに RV 分子疫学構築を統括した。
- (2) 次世代シーケンサー、RNA-PAGE による疫学解析手法を導入した。
- (3) 平成 23-24 年度流行期に収集した 149 検体のうち 116 検体が VP7 の RT-PCR 法陽性であった。

・研究分担者(中込治、中込とよ子)

- (1) 全国の RVA 分子疫学における小児科拠点の選出、交渉、臨床的研究のコーディネートを行った。
- (2) RVA 分子疫学の基本手法を用いたスクリーニング体系を構築した。
- (3) わが国の 5 歳未満の RVA 下痢症発生をモデルとするシミュレーションを行った。その結果、入院患者は年間 33,000 人、外来受診者が 68 万人となり、入院と外来にかかる直接費用がそれぞれ 43 億円と 88 億円と推定され、間接費用を含めた総額は 241 億円となった。このモデルでワクチンを導入すると、RVA ワクチンが費用対効果に優れたものであると結論された。

・研究分担者(神谷元、辰巳正純)

- (1) RVA サーベイランスを実施しているアメリカの CDC と協議し、情報収集を行うとともに、サーベイランスの条件、セットアップに関するノウハウを持ち帰った。
- (2) 北海道の RVA 分子疫学における小児科拠点の選出、交渉、臨床研究を行った。

・研究分担者(小林宣道)

- (1) アジアにおけるヒト RVA の全ゲノム配列に基づく分子疫学的研究を行なった。検出頻度の高い遺伝子型として、中国の G1P[8]RVA 3 株、希な遺伝子型として日本、インドネシア、タイで分離された G1P[9]、G4P[10]、G9P[19]を解析した。希な遺伝子型は、動物から伝播した可能性や、ヒト-動物間 RVA のリアソートで形成された可能性を示唆した。

・研究分担者(谷口孝喜)

- (1) RVA のリバーシジェネティクスを用いて、VP4 上のトリプシン切断領域にフェーリン認識配列を導入した組換え RVA を作製し、トリプシン非存在下での RVA 多段階増殖の可能性を試みた。No. 241 のアルギニンでの開裂は、ウイルス増殖の必須条件ではないことを明らかにした。
- (2) オルソレオウイルスにおける遺伝子操作系の諸条件を詳細に検討し、ヘルパーウイルスを利用しないプラスミドベースの RVA リバーシジェネティクス系開発を継続中。

・研究分担者(水谷哲也)

- (1) 日本の畜産現場におけるウシ RVA の感染実態を調べるため、ウシ RVA の高効率検出法を検討した。ヒト用迅速診断キットはウシ RVA を検出可能であり、栄研ロタが高感度であった。MA-104 細胞を用いた回転培養が比較検討した方法の中で最も高感度であった。

・研究分担者(藤井克樹、村上耕介、下池貴志、高木弘隆、ハンスマン・グラント)

- (1) ノロウイルスの粒子を形成する VP1 のうち、ウイルス粒子の時部分を形成する P 領域に RVA の VP8 領域を組み込み組み替えタンパク質として発現させることに成功した。
- (2) RVA の全 11 セグメントの全塩基配列解析を効率的に行うため、全セグメントを特異的に増幅可能な RT-PCR 法を確立した。
- (3) 平成 23-24 年度採取患者便 149 検体は、G1 60.3%、G3 6.9%、G9a 22.4%、G9b 10.3%であった。G9b は、ブタ RVA に類似したセグメントを有し、ブタ-ヒト間リアソータントが疑われた。
- (4) マイクロチップ電気泳動機を最適化し、RNA-PAGE による RVA 分子疫学手法開発に成功した。
- (5) MA104、CV-1 細胞をクローニングし、臨床材料から高効率で RVA 分離可能な細胞を樹立した。

IV. 平成 25 年度の課題

- (1) 検体のサンプリング、解析を推進させ、1000 検体を目指したデータ蓄積を継続する。
- (2) マイクロチップ電気泳動機を用いた RNA-PAGE パターン蓄積を継続する。
- (3) 基礎的研究、動物-ヒト間リアソータントの検出を進め、RV の病原性変化に備える。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) RVA に関する基礎的・疫学的データの乏しい我が国において、RVA の分子疫学研究の基盤を構築できれば、ワクチン導入前後の RVA 流行株の変化を監視することにより、ワクチンの効果と野外株への影響を評価することができる。
- (2) 日本周辺のアジアにおける RVA の流行状況、流行株の遺伝学的性状を明らかにすることは、日本での流行株の予測のためにも重要であり、医療者への情報提供により感染対策に役立てることができる。
- (3) VP4 における抗原モザイクを有する感染性 RVA や VP7 の抗原モザイク感染性 RVA を利用し、これまでの発想とは大きく異なる次世代の RVA ワクチン開発が可能となる。
- (4) 動物 RVA の疫学は、ヒト-動物リアソータントを常時監視し、緊急時の行政対応に貢献できる。
- (5) 大腸菌ですでに確立されている「DNA パターン分析」をモデルとして RNA-PAGE ライブラリによる、迅速、簡便かつ施設間差の無い RV サーベイランスを推進できる。

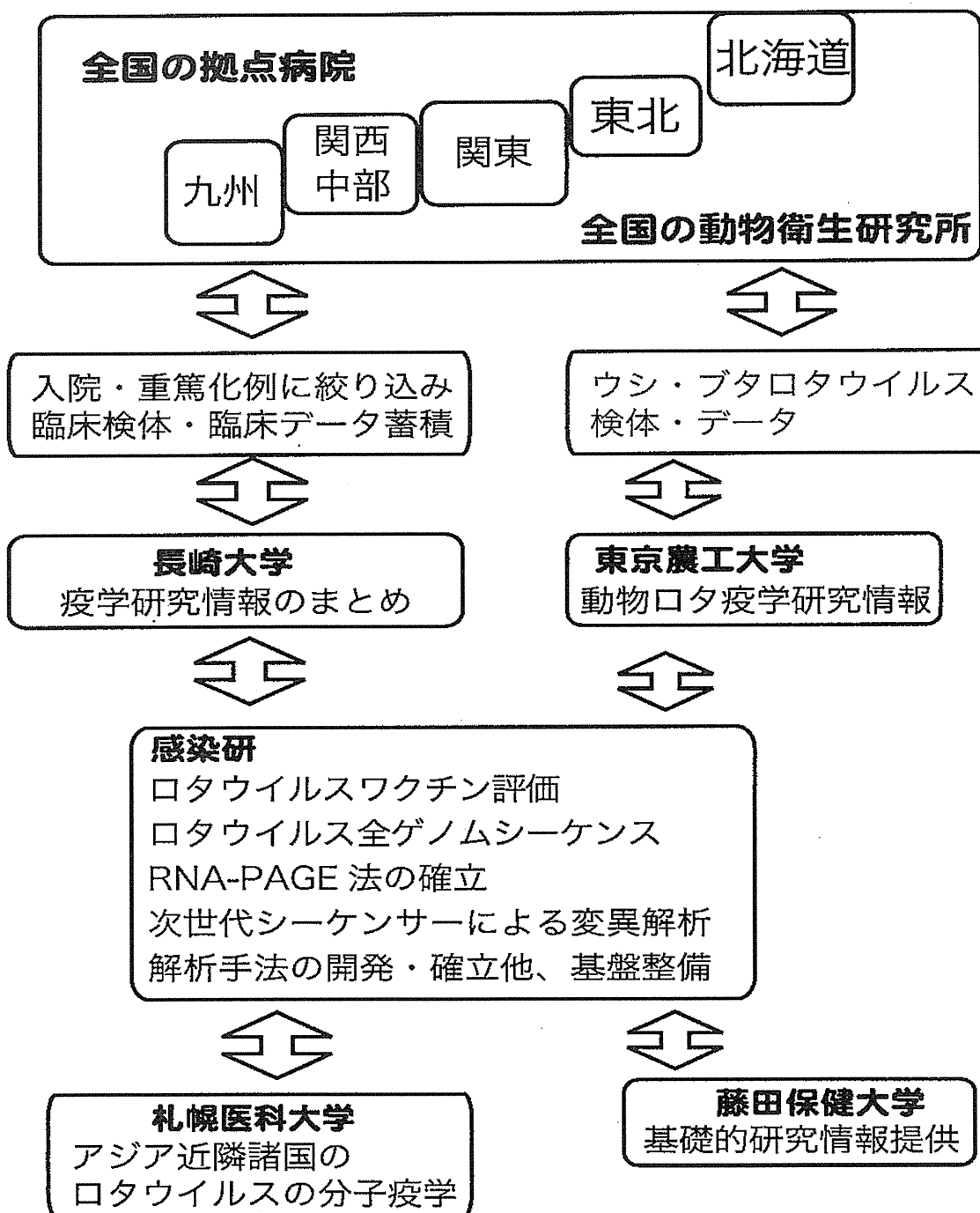
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moiguchi K, Taniguchi K: Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to afurin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J Gen Virol* 92(2914-2921, 2011
2. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group: Rotavirus-associated gastroenteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. *Jap J Infect Dis* 64(6):482-487, 2011
3. Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. *Arch Virol* 2011;156(11):1969-78.
4. Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:471-477.
5. Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirota Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*. 56: 630-638, 2012.
6. ロタウイルスワクチンに関するファクトシート(平成 24 年 9 月 12 日 原案 vol. 11)提出

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

ロタウイルスのアクティブサーベイランスと ロタウイルスワクチン評価



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1985年 株式会社 ビー・エム・エル 基礎研究部 研究員

1990年 同主席研究員

1990年 国立予防衛生研究所（現、感染症研究所）協力研究員

2000年 東京大学大学院農学生命研究科（吉川泰弘教授） 獣医学博士 第14586号

2001年 国立感染症研究所 ウイルス第2部 主任研究官

2005年～2007年 米国ベイラー医科大学分子ウイルス学部メアリー・エステス教授の研究室にリサーチアソシエートとして長期出張、共同研究を行った。

2009年～ 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 室長

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

国立遺伝学研究所 DDBJ センター長 五条堀孝

名古屋市立大学教授 鈴木善幸

元名古屋市立大学教授 現国際医療センター（千葉）センター長 溝上雅史

元国立予防衛生研究所所長 大谷明

元国立予防衛生研究所所長 山崎修道

元国立予防衛生研究所所長 宮村達夫

国立感染症研究所獣医科学部長 山田章雄

元国立感染症研究所ウイルス第二部 第一室長 武田直和

元東京大学農学部獣医学部 教授 吉川泰弘

岡崎生理学研究所 教授 永山國昭

岡崎生理学研究所 准教授 村田和義

名古屋大学教授 松田幹

兵庫県立大学 環境人間学部 教授 北元憲利

堺市衛生研究所 所長 田中智之

米国ベイラー医科大学教授 Estes., Mary, K.

米国 NIH Dr. Green., Kim. Dr. Kwang., Peter J.

米国 CDC Dr. Vinje., Jan, Dr. Tate,. Jacqueline.

米国オハイオ州立大学 教授 Saif Linda J.

オーストラリア NSW 大学 教授 White Peter

オランダ王立大学 教授 Koopmans., Marion

・主な研究課題

1. 患者血清中 HCV-RNA の消長および体内進化と病態との関係の研究
2. HCV ゲノタイプ 2a の特徴の解析
3. HCV-IRES の研究
4. 新たに報告された肝炎ウイルス TTV に関する研究
5. 豚コレラウイルス IRES の研究

6. GBV-C ウイルスのゲノム構造と分子進化に関する研究
7. ムンプスウイルス株分別法の研究
8. ブラビウイルス科の uncapped ウイルスのゲノム構造と分子進化の研究
9. Norovirus の高感度検出に関する研究
10. Norovirus のゲノム構造解析とゲノタイピング法の研究
11. Norovirus の RNA ポリメラーゼ (RdRp) の研究
12. Norovirus の複製機構に関する研究
13. Norovirus の粒子形成機構に関する研究
14. Norovirus の中空粒子の応用研究
15. Norovirus の分子疫学に関する研究
16. Norovirus のレセプター分子の探求
17. Sapovirus のゲノム構造に関する研究
18. Sapovirus のゲノグルーピング法に関する研究
19. Sapovirus の複製機構に関する研究
20. Sapovirus の粒子形成機構に関する研究
21. Sapovirus の分子疫学に関する研究
22. ヒトノロウイルスのモデルとしてのマウスノロウイルスに関する基礎研究
23. ヒトおよびマウスノロウイルスの機能的レセプターの探索
24. ワクチンデザインのためのヒトノロウイルス P ドメインの結晶構造解析
25. ヒトに感染するカリシウイルスのモデルとしてのベジ、ラゴウイルスの研究
26. サポウイルスの機能的レセプターの探索
27. サポウイルスの P ドメイン検索と結晶構造解析の試み
28. 経口生ポリオワクチン品質管理に関する研究
29. 不活化ポリオワクチンに関する研究

・ これまでの研究実績

Miki M and Katayama K. In silico 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 387, 1-6, 2012

Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 56(11):760-770, 2012.

Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T and Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 312, 1-10, 2012.

Fujii Y, Shimoike T, Takagi T, Murakami T, Todaka-Takai T, Park YB and Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction . *Microbiol Immunol*. 56: 630–638, 2012.

Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill F, Atmar RL, Katayama K, Utama B, Estes MK. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012)

Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.*, vol157, 349-52, 2012.

Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim*. vol. 61, 35-40, 2012.

Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang O, Saif LJ, and Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, 2012 online.

Hansman, GS., Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JRH., Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, and Kwong PD. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle *Journal of virology* vol. 86, 3635-3646, 2012.

Hansman, GS., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, JS., Chuang, GY., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C.A., Kwong, PD. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *Journal of virology* vol. 86, 284-92, 2012.

Hansman, GS., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, JS., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.

Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic

- diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology*. Vol. 52, 181-4, 2011.
- Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol*. Vol. 55, 108-14. 2011.
- Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., Katayama, K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Res.* vol.90, 9-16, 2011.
- Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama, K. Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547.2010.
- Sharp, T. M., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5(10) e13130, 2010.
- Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama, K. Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.* 84(16): 8085-97, 2010.
- Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama, K. Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of sapovirus in oysters . *Microbiol Immunol*. 54(8):483-6, 2010.
- Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama, K. Takeda N, Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol*. 82(7):1247-54, 2010.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama, K. Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 76(8):2461-7, 2010.
- Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama, K. Takeda N, Oka T. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol*. 82(4):720-6, 2010.
- Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama, K.

- Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547.2010.
- Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama, K, Wakita T, Takeda N. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 53 (1): 49-52., 2009.
- 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, and Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis 1 and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol*. 81(6):1117-27. 2009.
- Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama, K, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 62 (6): 504-506., 2008.
- 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. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 14 (7): 1169-1171., 2008.
- 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. 2008.
- Hansman, G. ., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in medical virology* 17:133-141, 2007.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., Estes, M. K. Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells. *Journal of Virology* 81:12238-12248. 2007
- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama, K, Takeda N, Omura T. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-5. 2007
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama, K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.2007.

- 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. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14: 1169-71, 2007
- Oka, T., Yamamoto, M., Katayama. K., Hansman, G. S., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *Journal of General Virology* 87:3329-3338, 2006.
- Oka, T., Katayama. K., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F. T., White, P. A., Takeda, N. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 78:1347-1353, 2006.
- Oka, T., Katayama. K., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F. T., White, P. A., Takeda, N. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 78:1347-1353, 2006.
- Oka, T., Hansman, G.S., Katayama. K., Ogawa, S., Nagata, N., Miyamura, T., Takeda, N. Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Archives of Virology* 151:399-404, 2006.
- Katayama. K., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S., Takeda, N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology* 151:1291-13088, 2006.
- Hansman, G. S., 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. *Journal of General Virology* 87:99-919, 2006
- Hansman GS, Takeda N, Katayama. K., Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 12: 141-143, 2006.
- Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama. K., Takeda N: Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol* 151: 551-561, 2006.
- Hansman GS, Oka T, Katayama. K., Takeda N.: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS lett* 580: 4047-50, 2006.
- Wu, F.T., Oka, T., Katayama. K., Wu, H.S., Donald Jiang, D.S., Miyamura, T., Takeda, N., Hansman, G.S. Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Archives of*

Virology 151(7): 1319-27, 2006

Hansman,G.S., Takeda,N., Oka,T., Oseto,M., Hedlund,K.O., Katayama, K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. Emerging Infectious Diseases 11:1916-1920, 2005.

Oka,T., Katayama, K., Ogawa,S., Hansman,G.S., Kageyama,T., Ushijima,H., Miyamura,T., Takeda,N. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. Journal of Virology 79:7283-7290, 2005.

Oka,T., Katayama, K., Ogawa,S., Hansman,G.S., Kageyama,T., Miyamura,T., Takeda,N. Cleavage activity of the sapovirus 3C-like protease in Escherichia coli. Archives of Virology 150:2539-2548, 2005.

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. Journal of Medical Virology 76:129-136, 2005.

Hansman,G.S., Natori,K., Ushijima,H., Katayama, K., Takeda,N. Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. Archives of Virology 150:1433-1437, 2005.

Hansman, G. S., Matsubara, N., Oka, T., Ogawa, S., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K. Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. Archives of Virology 150:2529-2538, 2005.

Hansman,G.S., Kuramitsu,M., Yoshida,H., Katayama, K., Takeda,N., Ushijima,H., Surenkhand,G., Gantolga,D., Kuroiwa,C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. Emerging Infectious Diseases 11:180-182, 2005.

Oka,T., Katayama, K., Ogawa,S., Hansman,G.S., Kageyama,T., Ushijima,H., Miyamura,T Takeda,N. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. Journal of Virology 79: 7283-7290, 2005.

Hansman GS, Katayama, K., Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. Virology Journal 2:13, 2005.

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 11: 180-182, 2005.

- 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. *Archives of Virology* 150: 21-36, 2005.
- 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* 57: 276-278, 2004.
- Katayama, K., Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10: 1874-1876, 2004.
- 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.* 42: 2988-2995, 2004.
- Hansman GS, Doan LT, K Nguyen 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* 149: 1673-1688, 2004.
- 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 of Clin Micro* 42: 1305-1307, 2004.
- 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 of Virol.* 78: 3889-3896, 2004.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama, K. A broad-detecting and high-sensitive assay for Norwalk-like viruses by using real-time quantitative RT-PCR. *Clin Micro* 41: 1548 ? 1557, 2003.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 299: 225 ? 239, 2002.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, and Katayama, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J of Virol Meth* 100: 107-114, 2002.

- Fukushi S, Okada M, Stahl J, Kageyama T, Hoshino FB, Katayama, K. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J of Bio Chem* 15; 276: 20824-6, 2001.
- Fukushi S, Okada M, Kageyama T, Hoshino FB, Nagai K, Katayama, K. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C virus genome. *Virus Research* 73: 67-79, 2001.
- Hoshino FB, Katayama, K., Watanabe K, Takahashi S, Uchimura H and Ando T. Heterogeneity found in the cag A gene of *Helicobacter pylori* from Japanese and non-Japanese isolates. *J Gastroenterol* 35: 890-897, 2000.
- Kurihara C, Ishiyama N, Nishiyama Y, Fukushi S, Kageyama T, Katayama, K., Miura S. Molecular characterization of hepatitis C virus genotype 2a from entire sequences of four isolates. *Journal of Medical Virology* 64:466-75. 2001.
- Kurihara C, Ishiyama N, Nishiyama Y, Katayama, K., Miura S. Changes of DNA Titer and Sequence Variance of TT Virus in Hepatic Disorders. *Hepatology Research* 26; 19:212-224, 2001.
- Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama, K., Fukushi S and Mishiro S. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J of Medical Virol* 61: 165-170, 2000.
- Suzuki S, Katayama, K., Fukushi S, Kageyama T, Oya A, Okamura H, Tanaka Y, Mizokami M, Gojobori T. Slow evolutionary rate of GB virus C/ hepatitis G virus. *J of Mol Evol* 48: 383-389, 1999.
- Fukushi S, Okada M, Kageyama T, Hoshino FB and Katayama, K. Specific interaction of a 25-kilodalton cellular Protein, a 40S ribosomal subunit protein, with the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genome. *Virus Genes* 19: 153-161, 1999.
- Miyakawa H, Kawaguchi N, Katayama, K., Noyama T, Kitaazawa E, Kikuchi K, Fujikawa H, Abe K, Kako M. cDNA sequencing of branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC)-E2 in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology Res.* 14: 70-77, 1999.
- Saito T, Matsumoto S, Nojiri O, Kageyama T, Fukushi S, Ishiyama N, Kurihara C, Katayama, K. Multicyclic reverse transcription-polymerase chain reaction assay system for quantification of GB virus-C/hepatitis G virus RNA in serum. *Journal of Virological Methods* 74: 185~191, 1998.

- Hino K, Moriya T, Ohno N, Takahashi K, Hoshino H, Ishiyama N, Katayama, K, Yoshizawa H, Mishiro S. Mother-to-infant transmission occurs more frequently with GB virus C than hepatitis C virus. Archives of Virology 143: 66-72, 1998.
- Katayama, K, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Kurihara C, Ishiyama N, Okamura H, Oya A. Full-length GBV-C genomes from nine Japanese isolates: characterization by comparative analyses. Archives of Virology 143: 1063-1075, 1998.
- Katayama, K, Fukushi S, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Oya A. New variant groups identified from HGV isolates. Archives of Virology 142(5): 1021-1028, 1997.
- Fukushi S, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Oya A, Katayama, K. The Sequence Element of the Internal Ribosome Entry Site and 25 kilodalton Cellular Protein That Contribute to Efficient Internal Initiation of Translation on Hepatitis C Virus RNA. J Virology 71: 1662-1666, 1997.
- Ishiyama N, Katayama, K, Kurihara C, Okamura H, Fukushi S, Nakajima H, Yokokawa J, Takahashi S, Oya A, Saito S. Variation in Interferon Sensitivity Associated with Mutation in the 5'noncoding region of HCV subtype 1b. Gastroenterology 110 (4): A1218, 1996.
- Fukushi S, Kurihara C, Ishiyama N, Okamura H, Hoshino FB, Oya A, Katayama, K. Nucleotide Sequence of the 5'Noncoding Region of Hepatitis G Virus Isolated From Japanese Patients: Comparison with Reported Isolates. Biochemical and Biophysical Research Communications 226: 314-318, 1996. .
- Ishikawa K, Nagai H, Katayama, K, Tsutsui M, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Saitoh A, Takagi M, Gotoh K and Yamada A. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. Arch Virol 140(8): 1385-1391, 1995.
- Katayama, K, Kurihara C, Fukushi S, Hoshino FB, Ishikawa K, Nagai H, Ando T and Oya A. Characterization of the Hog Cholera Virus 5' terminus. Virus Genes 10(2): 185-187, 1995.
- Fukushi S, Katayama, K, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Ando T, and Oya A. Complete 5'noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. Biochemical and Biophysical Research Communications 199(2): 425-432, 1994.
- Katayama, K, Oya A, Tanabayashi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamazaki S and Yamada A. Differentiation of mumps vaccine strains from wild viruses by single-strand conformation

polymorphism of the P gene. *Vaccine* 11(6): 621-623, 1993.

Ishiyama N, Katayama, K., Ishimi N, Takahashi S, Igarashi H, Nakajima H, Saito S, Aoyagi T, Ando T and Oya A. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA by Multicyclic RT-PCR. *International Hepatology Communications* 1: 72-79, 1993.

Ohosone Y, Katayama, K., Ando T, Arima K, Hanada T, Obana M, Matsuoka Y, Irimajiri S. The association of serum hepatitis C virus RNA with serum aminotransferase activities. *Scand J Infect Dis* 24: 459-450, 1992.

Terada S, Kawanishi K, Katayama, K. Minimal Hepatitis C Infectivity in Semen. *Annals of Internal Medicine* 117: 171, 1992.

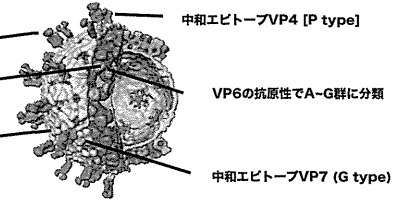
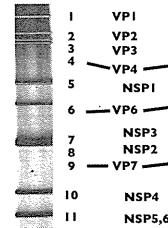
網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築と ワクチン評価

(H23-新興-一般-005)

平成24年度(2年目) 成果中間報告

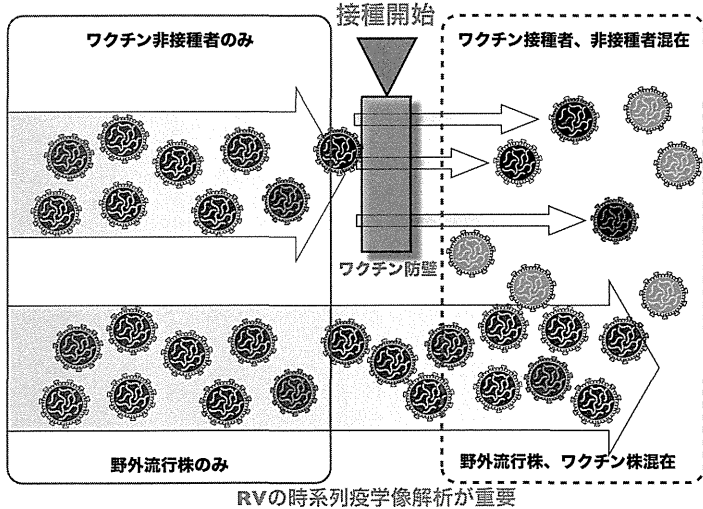
ロタウイルス(RV)

Double stranded
11 segment RNA



広く哺乳類に分布(人獣共通感染症 + 新規リアソータント出現 = 病原性が変化し安い)
11本のゲノムセグメント + リアソータント = 多様性に富む VP6でA, B, C, (G type)[P type]
ヒトへの感染はG1P[8]が半数を占めるが、G1~9, P[8]以外など多種類流行
10¹²粒子/g stool、感染力強、ワクチン以外の効果的防御方法無し

RVワクチン接種により、より複雑な疫学像を呈する



本研究班の構成・活動

臨床疫学研究

臨床疫学グループ

RV感染症の予防戦略

ワクチン評価・提言

基礎ウイルス学 分子疫学基盤構築

ウイルス学グループ

- 入院症例に解析対象を絞り込む侵襲型(臨床情報あり)分子疫学調査
- RVの全ゲノムセグメント疫学情報を蓄積しつつ、RVワクチン作用機序を研究し、重篤化に関与する因子の同定を試みる
- 脆弱なRVの国家的分子疫学調査の基盤構築によりデータ充実を図る
- 得られたエビデンスに基づき現行ワクチン・新規ワクチンを評価する

疫学グループ2年間の成果

RV感染症による入院患者のアクティブサーベイランス基盤構築
医学倫理基準に従った疫学調査法の整備
臨床情報シート、同意書などの基本フォーマット作成、
採便拠点病院とのネットワーク構築

公立南丹病院、小樽協会病院、江南厚生病院、福岡市立こども病院、
由利組合病院、宮城県立こども病院、公立昭和病院、
札幌医大、長崎大学、山口大学、秋田大学、東京医科大学

便検体と患者臨床情報の蓄積開始、初流行年度約200検体
今年度、合計500検体以上に達する予定

今後の展開

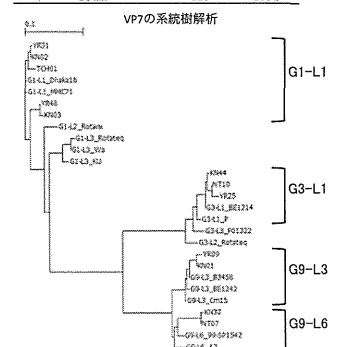
RV感染症による入院率や腸重積症の合併率、脳炎・脳症合併率
の算出を行う。ワクチンによる重篤度阻止効果を評価する。

全セグメント増幅プライマーセットの開発に成功

Primer name	Sequence (5'-3')
VP1 C-0088F	AAAGCTRTACAAATGGGAG
VP1 C-3292R	CAGATCTAGAGCTGCAAC
VP2-5pme e	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
VP2 C (-29)F	TACAGTTCCTTCAATAGGGS
VP3 C-0019F	AGTAGAGGCTTTTACTCTGT
VP3 C-289R	TGCACATGACATCTTCTGTA
VP4 C-0111F	TGGCTTCGCTCAATATAGACA
VP4 C (+3)Rd-R	GGGCTTCAATCTCT
VP4-1	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
V4-5	GGTCAATCTCTCACT
VP7 C (D)F	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
VP7 C (+3)Rd-R	GGGCTTCAATCTCTCACT
R14-1	GGCTTTTATAGAGCTCTGTG
NSP1 C (-18)Rev	CTAGGCGCCTCTAGT
NSP2-5pme e	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
NSP2-3pme e	GGTCAATGAGCTCTTCTGTA
NSP3-5pme e	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
NSP3-3pme e	GGTCAATGAGCTCTTCTGTA
NSP4 C-0035F	CTTTTAAAGTCTCTTCTGTA
NSP4 C-743R	TAGAGCAATCTCTCAATAG
N5-5pnt	GGCTTTAAGGCTCTAATGG
N5-3pnt	GGTCAATGAGCTCTTCTGTA

ロタウイルスのVP7遺伝子を用いた型解析結果

VP7 genotype	Num ber	rate (%)
G1 Lineage1	70	60.3
G3 Lineage1	8	6.9
G9 Lineage3	26	22.4
G9 Lineage6	12	10.3
Total	116	100.0



RT-PCRによるロタウイルスの11セグメントの増幅



全セグメント塩基配列の蓄積容易になった