

201447004A

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 片山 和彦

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 片山 和彦

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）による委託業務として、片山和彦が実施した平成26年度「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

片山 和彦	7
-------	---

II. 委託業務成果報告（業務項目）

ノロウイルス GI 型キャプシド遺伝子の分子進化に関する研究

木村 博一・四宮 博人	23
-------------	----

下痢症ウイルス水環境サーベイランスの研究

片山 浩之	29
-------	----

タイ王国東北部における、下水および臨床検体に分布するノロウイルスの分子疫学

本村 和嗣	31
-------	----

わが国で検出された G2 ロタウイルス株の全ゲノムレベルでの分子進化

中込 治	35
------	----

ロタウイルスの網羅的ゲノム解析と分子疫学調査

藤井 克樹	37
-------	----

北海道におけるロタウイルス胃腸炎の分子疫学的検討

津川 毅	41
------	----

家畜の A 群ロタウイルス及び糞便由来の新規ウイルスの分子疫学解析

水谷 哲也・長井 誠	44
------------	----

電子顕微鏡による下痢症ウイルスの構造解析

村田 和義	46
-------	----

ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの発現精製と結晶構造解析 朴 英斌	4 8
ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼによる in vitro RNA 合成系の構築 下池 貴志	5 2
ノロウイルスタンパク質の構造と機能に関する研究 染谷 雄一	6 1
ノロウイルスのホストトロピズムの研究、モデル動物の研究 中西 章	6 4
インシリコモデリング・スクリーニング 横山 勝	6 7
ヒトノロウイルス代替 calicivirus による不活性化薬剤の探査と薬剤抵抗性獲得 高木 弘隆	7 2
ロタウイルスリアレンジメント変異株 KU-24 の解析 谷口 孝喜・河本 聡志	8 3
ロタウイルスのリバースジェネティクスの開発に向けて 芳賀 慧	8 7
III. 学会等発表実績	9 3

I . 委託業務成果報告書（総括）

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（総括）

下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究

業務主任者	片山和彦	国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長
担当責任者	木村博一	国立感染症研究所 感染症疫学センター第六室 室長
担当責任者	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所 所長
担当責任者	谷口孝喜	藤田保健衛生大学 教授
担当責任者	津川毅	札幌医科大学臨床研修センター・小児科 特任助教
担当責任者	中西章	国立長寿医療研究センター老化制御研究部遺伝子治療研究室 室長
担当責任者	中込治	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
担当責任者	本村和嗣	大阪大学微生物病研究所 日本-タイ 新興再興感染症共同研 究センター 特任准教授（常勤）
担当責任者	村田和義	自然科学研究機構生理学研究所 准教授
担当責任者	片山浩之	東京大学大学院工学系研究科 准教授
担当責任者	水谷哲也	東京農工大学 教授
担当責任者	染谷雄一	国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官
担当責任者	下池貴志	国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官
担当責任者	藤井克樹	国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官
担当責任者	朴英斌	国立感染症研究所 ウイルス第二部 研究員
担当責任者	芳賀慧	国立感染症研究所 ウイルス第二部 研究員
担当責任者	横山勝	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究 官
担当責任者	高木弘隆	国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室 研究員
研究協力者	戸高玲子	国立感染症研究所ウイルス第二部 非常勤職員
研究協力者	三木元博	国立感染症研究所ウイルス第二部 協力研究員
研究協力者	小林美保	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	塚越博之	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	吉澄志磨	北海道衛生研究所
研究協力者	古川紗耶香	青森県環境保健センター
研究協力者	植木洋	宮城県保健環境センター

研究協力者	水越文徳	栃木県保健環境センター
研究協力者	本谷匠	茨城県衛生研究所
研究協力者	篠原美千代	埼玉県衛生研究所
研究協力者	鈴木理恵子	神奈川県衛生研究所
研究協力者	佐原啓二	静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者	左近直美	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	重本直樹	広島県立総合技術研究所保健環境センター
研究協力者	岡本玲子	山口県環境保健センター
研究協力者	調恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	山下育孝	愛媛県衛生環境研究所
研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	清水英明	川崎市健康安全研究所
研究協力者	岡部信彦	川崎市健康安全研究所
研究協力者	小平彩里	名古屋市衛生研究所
研究協力者	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
研究協力者	高橋知子	岩手県食肉衛生検査所
研究協力者	岩切章	宮崎県小林食肉衛生検査所
研究協力者	黒田誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター
研究協力者	山下明史	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター
研究協力者	加納和彦	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター
研究協力者	河本聡志	藤田保健衛生大学 講師
研究協力者	長井 誠	東京農工大学 特任准教授
研究協力者	朴三用	横浜市立大学 教授

研究要旨

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) による流行性胃腸炎、冬期集団食中毒の発生は、毎年世界的規模で発生し、ヒト社会活動や経済活動に大きなダメージを与えている。一方、ロタウイルス (RV) は、乳幼児を中心に重症ウイルス性下痢症を引き起こし、死亡例も多いことから問題となってきた。これらのウイルスの我が国の流行状況、ならびにアジア地域における流行状況を把握し、効果的な感染制御を実施するため、研究を開始した。分子疫学的研究では、感染研・地研の情報ネットワーク、J-GRID 拠点ラボとのネットワークにより、感染患者（顕性感染者）約 1200 検体の収集を行い、NoV, SaV, RV 網羅的なウイルスの全遺伝子解析を実施し、遺伝子配

列の時系列変遷データの蓄積が始まった。不顕性感染者を含むヒト集団での流行株を捉えるため、河川水、海水など、水環境に含まれる NoV, SaV, RV の遺伝子配列を次世代シーケンサー (NGS) で網羅的に解析する方法の検討・実施を行った。さらに、分子生物学的研究では、感染制御にかかる研究を推進するため、疫学情報から読み取れるウイルスの抗原性変化、病原性変化を検証し、リバーシジェネティックスに代表される分子生物学的研究手法、構造生物学的研究手法を用いて、新規ワクチン、消毒薬、抗ウイルス薬を開発する試みを開始した。同時に、ワクチンの評価システム構築、感染モデル動物の開発、抗ウイルス薬、消毒薬開発も視野に入れ、研究を推進した。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) による流行性胃腸炎、冬期集団食中毒の発生は、毎年世界的規模で発生し、ヒト社会活動や経済活動に大きなダメージを与えている。一方、ロタウイルス (RV) は、乳幼児を中心に重症ウイルス性下痢症を引き起こし、死亡例も多いことから問題となってきた。NoV, SaV, RV は、いずれも遺伝子型が多いことに加え、遺伝子変異、相互組換えが頻発し、毎年宿主免疫応答を回避する株が出現、流行を繰り返す。

本研究では、分子疫学研究による下痢症ウイルスの流行予測プログラム構築と、ワクチン、抗ウイルス薬、消毒薬開発を行う分子生物学的基礎研究が両輪となり、ウイルスの総合的な感染制御を目指す。

分子疫学研究では、感染研・地研の情報ネットワークを用いた感染患者の NoV, SaV, RV 網羅的なウイルスの全遺伝子解析で、遺伝子配列の変遷データが蓄積するとともに、不顕性感染者を含むヒト集団での流行株を捉えるため、河川水、海水を定期的にサンプリングし、そこに含まれる NoV, SaV, RV の遺伝子配列を次世代シーケンサー (NGS) で網羅的に検出する。これらのデータに時間のファクターを加え、時系列分子疫学解析と数理予測プログラムを融合させ、流行株予測法の開発を試みる。

本年度は、感染研・地研のネットワーク、文部科学省のアジア地域ネットワーク J-GRID より 2000 年以降今年度までに採取され、保管された下痢症ウイルス患者検体の収集と、それらからの塩基配列データ取得を開始した。同時に、疫学情報から読み取れるウイルスの抗原性変化、病原性変化を検証し、リバーシ

ジェネティックスに代表される生化学的研究手法、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡による構造生物学的研究手法を用いて、新規ワクチン、消毒薬、抗ウイルス薬を開発する試みを開始した。

B-1. 研究方法 (分子疫学研究)

<材料>

(ヒト患者便検体)

2003 年から 2014 年の間に、担当責任者および研究協力者によって下痢症ウイルスの検査を行った感染性胃腸炎症例の便検体約 1000 検体を対象とした (四宮・木村・衛生研究所研究協力者)。さらに、J-GRID 研究タイ拠点 (本村) から下痢症ウイルス感染患者便検体、同じくインド拠点 (片山和) からロタウイルス感染患者便検体合計約 200 検体を対象とした。ロタウイルスについては、大学関連病院ベースの小児重症入院症例サーベイランスによって収集された便検体約 200 検体も解析対象とした (中込・津川)。

ヒトの便検体に関しては、主に以下の条件を満たした検体を解析対象とした。ヒトノロウイルス体外診断薬クイックナビ™-ノロ2 (デンカ生研) 陽性検体または、RT-PCR で十分に検出可能なバンドを検出できた検体、もしくは QRT-PCR によって、 10^6 copies/test 以上の RNA 濃度を有する検体のみを解析対象とした。ロタウイルスについては、ロタクロン (ELISA 検出キット) で陽性を呈した患者糞便試料、もしくは、ロタウイルス RNA-PAGE で 11 本のロタウイルス RNA セグメントを確認可能であった検体を解析対象とした。

(家畜便検体)

人獣共通感染症の可能性を鑑み、ウシ、ブタ、ウマなどの家畜から採取した便検体も対象と

した。東京農工大学を中心とするネットワーク（水谷・長井）、全国の食肉試験所などに関係する研究機関（畜産食肉試験所の研究協力者）から、便検体約 50 検体を採取した。

（下水、河川水、海水）

ヒト集団、家畜集団において不顕性感染を起こしている下痢症ウイルスに関する調査研究を進めるために、東京、タイの河川水、東京湾などの海水を用いて、網羅的ウイルスゲノム検出に用いた（片山浩・本村）。

＜方法＞

下痢症ウイルス感染が明らかな、もしくは疑われるヒト並びに家畜の便検体は、PBS により 10%懸濁液を作製後、RNA 抽出キット（QIAGEN 社 Viral RNA, Roche 社 HiPure Viral RNA, Lifetechnologies 社 Trizol RNA extraction reagent など）を用いて RNA を精製した。

cDNA 合成と MiSeq 用のライブラリー作製は、NEB 社 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina を用いて実施した。

網羅的下痢症ウイルスゲノム塩基配列解析は、Illumina 社 MiSeq と MiSeq reagent kit version 2 300 cycle キットを用いて実施した（24 検体を 1 キットで同時解析した）。

得られた塩基配列データは、国立感染症研究所病原体ゲノム解析センターによって構築された ViralTAP 塩基配列解析ソフトウェア、CLC 社 Genomics Work Bench, 5'3' 社 Sequencher, ゼネティックス社 Genetix version 17 を用いて解析した。

本年度は、分子疫学に供するデータ蓄積が十分ではないため、DDBJ, Genbank, EMBL の 3 大データベースより、下痢症ウイルスデータをダウンロードして集中管理運営している GatVirusWeb より、ダウンロードして時系列分子系統解析に用いた。

時系列分子系統解析は、KAKUSAN4, Tracer, DataMonkey, Beast などのソフトウェアにより、ベイジアン MCMC 法によるコンピューティングを行った。さらに、宿主免疫による選択圧に関して解析するため、LEPS⁵, BCPRED⁶, FBCPRED⁶, BepiPred⁷, Antigenic⁸ および LBtope⁹ を併用して T cell, B cell エピトープ解析を行った。

（倫理面からの配慮について）

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C-1. 研究結果・考察（分子疫学研究）

（1）下痢症ウイルスの次世代シーケンス

ノロウイルス感染または、サポウイルス感染が明らかな、ヒトの便検体は、QRT-PCR によりウイルス RNA titer を測定後、 10^6 copies/test 以上の RNA 濃度を有する検体のみを Illumina 社 MiSeq による解析を行うべく RNA 精製に使用した。MiSeq によるランは 1 ランにつき 24 サンプルを同時処理しつつ解析を継続した結果、現時点で約 240 検体のシーケンスが終了した。ロタウイルス感染患者便検体については、約 120 検体のシーケンスが終了した。原因不明の下痢症患者検体については 48 検体のシーケンスが終了した。内訳については、現在集計中である（国立感染症研究所ウイルス第二部メンバー、流動研究員；団海燕、藤本陽ほか）。

（2）データベース配列を用いたノロウイルス GI の時系列進化解析

ノロウイルス (NoV) GI 全長キャプシド遺伝子の分子進化に関する研究を行った。解析領域のベイジアン MCMC 法による時系列系統解析、ベイジアンスカイラインプロット解析、Positive/Negative selection site の検索およびエピトープ予測を行った。時系列系統解析の結果から、NoV GI は、ブタ NoVGII から、約 4000 年前、ウシ NoVGIII から 3000 年前に分岐し、その後、約 830 年間を経て、速い速度(約 10^3 substitutions/site/year)で独自に進化してきたことが示唆された。また、positive selection site は 2 箇所のみで、P2 ドメインの血液型物質結合部位におけるエピトープも少なかった。このことからキャプシド蛋白は中和抗体宿主からの生体防御の圧力を受けにくく、かつ中和抗体が誘導されにくい性質を有することが推測された（木村、四宮、片山和ほか、地研研究協力者）。

（3）水環境中のノロウイルス調査

下水中のノロウイルス調査（タイ）を行った（本村）。結果、ウドンターニ県由来の下水 (n=13) より、GI.2, GI.3, GI.4, GI.10, GI.12 が検出された。ブンカーン県由来の下水 (n=7) より、GI.2, GI.3, GI.4, GI.8, GI.15 が検出された。異な

る遺伝子型が検出された。GII では、ウドンターニ県由来の下水(n=11)より、GII.2, GII.3, GII.4, GII.10, GII.6 が検出された。ブンカーン県由来の下水(n=6)より、GII.2, GII.4, GII.15 が検出された。臨床検体では、GII のみしか検出されなかった。ウドンターニ県では 19 検体、ブンカーン県では 2 検体であった。GII.3, GII.4, GII.11 が検出された。GII.4 は、21 検体中 18 検体を占めていた。更に、GII.4 18 検体中、11 検体が Sydney 2012 であった。臨床検体の季節変動との関連性について調べた。GII 21 検体中、17 検体が 12-1 月に検出されていた。

下水環境中には、GI そして GII、多種多様な遺伝子型が検出されていた。しかし、近辺の病院で得られた入院由来の臨床検体では、GII のみで、大半が GII.4 であった。このことより、GI もしくは GII.4 以外の GII の遺伝子型は病原性が低く、下痢症が重症化せず、病院で検出されない可能性が考えられた(本村)。

雨天後の東京湾において、ウイルスを経時的に採取し、濃度変動の調査を試みた。従来よりも大容量の水試料からウイルスを濃縮した結果、ウイルス測定における酵素反応が阻害されるという現象が見られた。今後、阻害を抑制するためのウイルス検出前処理法の開発が必要であることが分かった(片山浩)。

(4) ロタウイルスの分子疫学

ロタウイルスワクチンがロタウイルスの野生株に及ぼす影響を評価する基盤情報として、わが国で過去 31 年間に検出された 19 株の G2 ロタウイルス株の全遺伝子分節の塩基配列を決定した。わが国の 19 株とデータベース上の 131 株を合わせた、150 株の G2 株の各遺伝子分節ごとの分子系統的解析から G2 ロタウイルス株は、突然変異の蓄積と遺伝子分節再集合を通して、allele を変化させながら段階的に進化してきていることが分かった(中込、藤井、片山)。

北海道におけるロタウイルス胃腸炎の疫学的検討では、外来患者の散発例と過去に乳児院で発生した集団発生例において検討した。2010 年～2014 年の外来患者の 193 検体(年間 24～50 検体)の解析では、年毎に G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]が単独あるいは複数同時に流行した。1981 年～2001 年における乳児院での 8 集団発生例では、G1P[8]が 4 流行、G3P[8]が 2 流行、G2P[4]と G4P[8]が各 1 流行あり、全 11 分節の遺伝子型は典型的な Wa 様、DS-1 様の遺

伝子型構成であった。北海道地区のロタウイルスの疫学像は、本州の疫学像と大きな差があることが明らかになった。さらに、本州の疫学像も地域による差が大きいことが明らかにされていることから、ロタウイルスの場合、地域特異性を考慮に入れた疫学調査を行う必要があることが明らかになった。

2013/14 年シーズンは秋田 27 検体、京都 15 検体、愛知 6 検体、山口 19 検体の合計 67 検体を収集した。このうち ELISA 法で RV 陽性(OD 値 0.15 以上)を示したのは秋田 2 検体、愛知 6 検体、山口 7 検体の合計 15 検体のみであり、京都の検体は全て陰性であった。RV 陽性検体は全て 2014 年 1-3 月に収集した検体であった。VP7 シークエンス解析の結果、その遺伝子型分布は G1 が 1 検体(6.7%)、G2 が 8 検体(53.3%)、G9 が 6 検体(40.0%)であった。この G1 株は、シークエンス解析結果と PAGE の結果から、Wa-like G1 であると推定された。また、採取された地域別に見ると、秋田は 2 検体とも G9、愛知は G1 が 1/6、G2 が 3/6、G9 が 2/6 であり、山口は G2 が 5/7、G9 が 2/7 であった。2012 年および 2013 年に大きな流行をもたらした DS-1-like G1 株は 1 例も見られなかった。RV の流行株は、シーズンごと・地域ごとに大きく異なることが、これまでの調査から明らかになっている。また、特定の遺伝子型のウイルスがしばらく流行すると、そのウイルスに対する集団免疫が形成され、それ以外のウイルスが流行し易くなる環境が生まれる。しかし毎年新生児(=新しい感受性集団)が生まれるため、同じ遺伝子型のウイルスが一定の間隔を置いて再び流行する可能性がある。つまり、DS-1-like G1 株が一旦調査の網にかからなくなっても、水面下で小規模な感染集団として維持され、数年後に再び現れる可能性は十分に考慮しなければならない(藤井、芳賀、団、中込、片山)。

(5) 家畜におけるヒトロタウイルスワクチン株侵入に関するモニタリング

家畜の糞便から直接 RNA を抽出し、次世代シーケンス、RNA PAGE および RT-PCR を実施した。ロタテックの遺伝子配列を見分けるため、遺伝子解析ソフトを用い、ロタテックの遺伝子配列を参照としたマッピングによる簡便な解析法を確立し、これを用いて野外サンプルの解析を実施した。

ウシの下痢便について解析を行ったが、ロ

タテックの侵入は認められなかった。ブタおよびウマロタウイルスの解析でもロタテックの侵入を認めなかったが、ブタロタウイルスではヒトロタウイルスとの遺伝子再集合の可能性を示すスーパーショート RNA 泳動パターンを示す株が3株検出され、ウマロタウイルスではウシロタウイルスと相同性の高いNSP4遺伝子を保有する株が20株認められた。ブタロタウイルスおよびウマロタウイルスの解析から、日本国内のヒトおよび家畜間に異種間伝播が起こっている可能性が示唆され、家畜のロタウイルスのモニタリングも今後続けていく必要があると思われた(水谷・長井)。

D-1. 結論

今年度は、2003年から2014年までの下痢症ウイルス感染患者検体を対象とする国内外の下痢症ウイルス分子疫学をスタートさせた。次世代シーケンサー(MiSeq)を用いた完全長ゲノム塩基配列解析は、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスに関する疫学研究の基盤となりえることが明らかになった。ウイルス別の疫学調査の結果、ノロウイルス、サポウイルスは類似しており、進化速度が速く、約 10^3 substitutions/site/year で進化してきたことが明らかになった。ロタウイルスは地域によって流行している株に差があり、伝播して拡散していく速度が遅いことが明らかになった。また、ロタウイルスはゲノムセグメントを入れ替えることができ、この入れ替えによって高速に宿主域を変えることができる。ロタウイルスは、人獣共通感染症として注目し、今後ともヒトと家畜両方の調査を継続していく必要がある。水環境の調査は、患者集団とは異なる遺伝子型分布を示していた。この結果は、多くの不顕性感染者の存在を示唆していた。今後継続して調査を続ける必要がある。

B-2. 研究方法 (分子生物学的研究)

<材料>

(リバーシジェネティクス用クローン)

pHuNoV_{U201F} (旧称: HuNoV pKS-U201F) を骨格として、U201株 cDNA 部分を MNV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pMNV_{STF} (旧称: pKS-MNV-F) を構築した。さらに、GII.4 2006b Sagal 株, GII.4 P4/GII.3 キメラウイルス THC04-577 株、プロトタイプノロウイルス

GI.1 NV68 株のゲノムにそれぞれ置き換えた pHuNoV_{Sagal1F}, pHuNoV_{THC04-577F}, pHuNoV_{NV68F} をそれぞれ作製して感染性粒子産生の確認を行うために用いた。

マウスノロウイルス (MNV) としては、マウス糞便より RAW264.7 細胞で分離培養され間もない MuNoV S7 株 (日本大学遠矢幸伸先生、国立感染症研究所高木、片山和より分与) を用いた。RAW264.7 細胞は ATCC より購入した。

クライオ電子顕微鏡観察には、バキュロウイルス発現系を用いて作製した MNV ウイルス様中空粒子 (MNV-VLP) とリバーシジェネティクスで pMNV_{STF} より作製した感染性 MNV 粒子を用いた。

不活化剤の検討に用いるウイルスとして、ネコカリシウイルス FCV-ym3 (accession KJ551382)、FCV-F9(ATCC、VR-782)、FCV-Gon (accession KJ551380)、FCV-ITO (accession KJ551381) を CRFK 細胞で増殖させ、精製して用いた。

<方法>

(1) 電子顕微鏡による構造解析

バキュロウイルス発現系により作製したノロ・サポウイルス VLP を精製し、クライオ電子顕微鏡にて画像を取得した。その後、粒子の構造を三次元再構成した。得られた構造を多種のウイルスのそれと構造比較するとともに、ホモロジーモデリング法により、ウイルスキャプシドの分子構造構築を行った。ロタウイルスは、ロタウイルス感染細胞を化学固定・樹脂包埋して超薄切片を作製した。薄層切片の連続傾斜像を撮影し、電子線トモグラフィーによるウイルスの立体再構築を行った。

(2) RdRp の活性測定と X 線結晶構造解析

コールドショックプロモーター下に 5'末端に His-tag と Trigger factor (TF) を配置し、その直下流に RdRp をクローニング、His-tag と Trigger factor (TF) 融合タンパク質として低温管理下において、大腸菌で過剰発現させた。その後、His-tag-Trigger factor (TF) を RdRp から切り離し、RdRp を精製し、活性測定、X 線結晶構造解析に用いた。

(3) ノロウイルス Genogroup I に関する研究 Genogroup I の 9 つ全ての Genotype に属するノロウイルス株の VLP を昆虫細胞で得られるよう、VP1 タンパク質をコードする ORF2 を (株

によっては VP2 タンパク質をコードする ORF3 も共に) バキュロウイルストランスファーベクターにサブクローニングし、Sf9 細胞で組換えバキュロウイルスを作製した。

(4) ノロウイルスホストトロピズムの研究
MNV は、MOI=0.01 であるいは MOI=5 で RAW264.7 細胞に感染継代を 8 代にわたって行った。各継代の培養上清を低速遠沈で細胞片等を除いた後、SW50.1 rotor、45000rpm、1.5 時間の超高速遠沈でウイルスをペレットとして採取した。ペレットより QAmp viral RNA mini kit (Qiagen) で RNA を抽出し、Superscript III (Invitrogen)により poly-dT をプライマーとして cDNA を作成し、cycle sequencing 解析あるいは、次世代シーケンサー (Illumina, MiSeq) により遺伝子配列を解析した。

(5) ノロウイルス RdRp のインシリコ解析
ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングを行うために、RNA 合成する時の構造を分子動力学計算により構築した。分子動力学シミュレーションには Amber11 プログラムパッケージの pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN を用いた。分子動力学シミュレーションにより得られたトラジェクトリーを用いて、AmberTools の ptraj モジュールにより、シミュレーション開始時の構造からの RMSD (Root Mean Square Deviation: 平均二乗偏差)、および平衡構造に達してからの C α の RMSF (Root Mean Square Fluctuation: 根平均二乗揺らぎ) を計算した。

(6) ノロウイルス不活化剤の研究
ヒトノロウイルスの代替 calicivirus である feline calicivirus (FCV) と murine norovirus (MNV) を用いて不活性化薬剤とされる新規エタノール製剤 4 種類、クエン酸及びリンゴ酸、H₂O₂ について不活性化効果を検討した。

(7) ロタウイルスリアレンジメント変異株の解析

・細胞とウイルス

サル腎臓由来細胞株 MA104 および CV-1 は、Eagle's MEM+5% FCS で培養した。ヒトロタウイルス KU 株および KU-24 株は、MA104 細胞で増殖させた。

・リアレンジメント変異株 KU-24 の分離

KU 株の限界希釈の過程で検出されたセグメント 11 にリアレンジメント変異を有する KU-24 株を、プラーク純化により分離した。

・抗血清

抗 NSP5 ポリクローナル抗体は、大腸菌で発現させたサルロタウイルス SA11-L2 株の完全長 NSP5 をウサギに免疫して得た。

・ウエスタン ブロットニング

KU-24 株を感染させた MA104 細胞ライセートを SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF メンブレンにトランスファーした。ロタウイルス蛋白質は、一次抗体として抗 NSP5 ポリクローナル抗体、抗 VP6 ポリクローナル抗体および抗 NSP4 ポリクローナル抗体と、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた化学発光により検出した。

・ロタウイルスの一段階増殖

KU-24 株を MOI=5 で MA104 細胞に感染させ、2、5、8、11、14 時間後におけるウイルス感染価を CV-1 細胞を用いたプラークアッセイにより決定した。

・変異型 KU-24 株と野生型 KU 株との競合感染

KU-24 株と KU 株を 1:1、10³:1 および 10⁵:1 (MOI=1) の比率で MA104 細胞に同時感染させ、細胞ライセートを用いて MA104 細胞で継代を行った。

(8) ロタウイルスプラスミドベースリバースジェネティックスの開発研究

感染細胞中に存在するロタウイルス mRNA を、pKS プラスミド (ノロウイルスのリバースジェネティックスに用いたプラスミド) にクローニングした。5'側にハンマーヘッドリボザイム、3'側に HDV リボザイムを組み込み、細胞中で 11 本のロタウイルス mRNA を供給できるようにした。最終的には、シングルプラスミドトランスフェクション用に、ロタウイルスゲノム 11 本すべてを直列にクローニングした。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C-2. 研究結果・考察 (分子生物学的研究)

(1) ノロウイルスのリバースジェネティックスシステム構築と応用

リバースジェネティックスに用いるために構築した pHuNoV_{U201F} (旧称: HuNoV pKS-U201F)、pMNV_{S7F} (旧称: pKS-MNV-F) pHuNoV_{Saga1F},

pHuNoV_{TCH04-577F}, pHuNoV_{NV68F} は、それぞれ 293T 細胞、もしくは COS7 細胞で新生感染性ウイルスを産生した (片山和、戸高、中西)。今後研究の進展によって得られる疫学情報に基づき、これらのコンストラクトの遺伝子を操作し、弱毒化ウイルスの作製とワクチンシードへ応用、ウイルス複製阻害剤の研究、ワクチン評価のためのマウスに感染可能なヒトとマウスノロウイルスのキメラウイルスの作製などにこれらのコンストラクトを応用可能である。

(2) ノロ、サポ、ロタウイルスの構造解析

MNV-S7 株 VLP から 20Å 分解能の三次元構造を得た。このキャプシド構造は P-, S-ドメインの間の隙間が小さく、これまで知られている MNV GV.1 よりもヒト NV GI.1 に近いことがわかった。また、サポウイルス VLP の 8 Å 分解能の三次元構造を再構成し、これに構造的に近い Vesivirus の構造モデルを使ってホモロジーモデリングを行い、分子モデルを構築した。

(村田、片山和、三木)。ロタウイルスを含む宿主細胞樹脂切片のトモグラムから 15 個のウイルス粒子を切り出し平均化した結果、未成熟の粒子では、キャプシドの外側にある VP4 が見られなかった。また、ウイルスの中心に格納された 11 本ある RNA セグメントがキャプシドの 5 回対称軸から伸びているような形態が観察された。

(3) ノロウイルス RdRp の活性と構造の研究

HuNoV GII.3 U201 株, MNV-S7 株の RdRp を大腸菌で発現し、精製することに成功した。これらの RdRp には、RNA の転写活性があり、活性のあるネイティブな RdRp であることが分かった。結晶構造解析の結果、ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の RdRp、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の RdRp は、クロズドコンフィグレーションで

あることが明らかになった。結晶構造解析に用いた RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフ: GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無しで *de novo* RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。CAUCUUCAUUCAC との共結晶化、GUGAAUGAAGAUG との共結晶化、この部分の完全二重鎖との共結晶化を進め、RNA を抱き込んだオープンコンフィグレーションの RdRp の結晶の作製、構造解析を行う必要がある (朴英斌、片山和、下池、朴三用)。

(4) ノロウイルス Genogroup I に関する研究
Genogroup I の 9 つ全ての Genotype に属するノロウイルス株の VLP を発現する組換えバキュロウイルスを作成し、VLP 調製のための準備が整った。Genogroup I の種々の株の中でも我が国分離頻度の高い GI.4 および GI.6 は、P ドメインタンパク質の発現系を大腸菌で作成した (染谷、片山和)。

(5) ノロウイルスのホストトロピズムの研究

培養が出来ない HuNoV に代えて、培養細胞 RAW264.7 でよく増殖する MNV を用い、細胞継代に伴って発生する遺伝子割合変化を次世代シーケンスで解析した。ウイルスの遺伝子配列割合は予想以上にダイナミックに変化していたが、殆どの遺伝子変異は、培養細胞での増殖に機能的な差異は無いことが示唆された。今後は、キャプシドタンパク質 P domain での変異を中心に解析を行う (中西、片山、戸高)。

(6) ノロウイルスのインシリコモデル

ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングに用いる構造を構築するために、分子動力学シミュレーションを行い、ノロウイルスポリメラーゼの平衡構造を得た。核酸類似体のインシリコスクリーニングに必要である活性中心の構造を明らかにした。

(7) ノロウイルス不活化法の研究

ヒトノロウイルスの代替 calicivirus である feline calicivirus (FCV) と murine norovirus (MNV) を用いて不活性化薬剤とされる新規エタノール製剤 4 種類、クエン酸及びリンゴ酸、H₂O₂ について不活性化効果を検討した。新規エタノール製剤は薬剤抵抗性株である FCV-ym3 に対し、速やかな不活性化効果を示したが、他のノンエンベロープウイルスでは十分な効果は認められなかった。2 種の有機酸では FCV で不活性化効果が認められたが、MNV に対しては全く認められなかった。エタノール高感受性の MNV は 40~50% エタノール処理を繰り返すことで抵抗性株が出現した。抵抗性株と元株との核酸配列を比較すると 52 か所に変異が認められた。2% H₂O₂ による不活性化効果はウイルス株及び種類により異なっていた。FCV-ym3 や MNV では十分な効果がなかった。また H₂O₂ に対する抵抗性株については供試ウイルスのうち、FCV-F9 のみで出現が確認された。

(8) ロタウイルスリアレンジメント株の研究
ロタウイルスのリバースジェネティクス系を

これまでその開発に至っていないセグメントにおいても展開する目的で、セグメント 11 に 3 塩基欠失 (Δ 423-425) を有するリアレンジメント変異株 KU-24 を分離し、そのウイルス学的形質を解析した。KU-24 株は野生型 KU 株と同程度の増殖能を示したが、ウイルス粒子へのパッケージング効率は、変異型セグメント 11 < 野生型セグメント 11 であることが競合感染実験により示された。KU-24 株の 2 つのリバートウイルスはともに 423-425 位置に遺伝子配列の挿入を有することから、この領域のシーケンスがセグメント 11 のパッケージングに重要なシグナルを含んでいる可能性が示された。KU-24 株をヘルパーウイルスとして用いることで、パッケージング効率の違いを選択条件とした NSP5/6 遺伝子を標的としたリバースジェネティクス系の開発につながるものと期待される。

(9) ロタウイルスのプラスミドベースリバースジェネティクスの開発研究

5'RACE と NGS により、ロタウイルス感染細胞中の (+) 鎖 RNA の 5' 末端には既知の配列に加えて、G がもう一塩基付加されている配列が存在していることを示した。また、VP4 及び VP6 を単一のプラスミドにより 293FT 細胞に発現させることに成功した。今後遺伝子数を増やし、最終的に 11 ゲノムセグメント全てを一つのプラスミドクローンから発現可能か否かを検討する。

D-2. 結論

今年度は、分子疫学研究に用いる検体の収集が続いているため、疫学研究は未だ道半ばである。十分な塩基配列データが得られてい中で、分子生物学的研究を先行させた。ヒトノロウイルス、マウスノロウイルスのリバースジェネティクスの完成は、疫学研究、分子生物学研究から導かれる核酸やアミノ酸の変異の意義づけ、ウイルス複製に関する薬剤の効果を、実際にウイルス遺伝子を操作しながら試験管内で調べることを可能とした。この成果が基盤となり、複製酵素である RdRp の活性測定と構造解析、ノロウイルス VLP と感染性粒子の形状比較、病原性発現機構の解析がスタートし、ノロウイルスの感染制御に関するウイルス学的側面からのアプローチが可能となった。また、ウイルスが遺伝子のどの部分を変化させ、ホストに適合していくのかを研究した成果をリバースジェネティクスで反映させ、宿主細胞への病原

性発現機構を明らかにすることができるようになった。

構造解析の情報蓄積が不足していたノロウイルス genotype I (GI) ウイルスの VLP の構造解析が進み始めた。今後、疫学情報の充実と共に、核酸の経時的変遷が、ウイルス粒子構造、ウイルス酵素活性にどのように影響を与えているのかをリバースジェネティクスやバキュロウイルス発現システムによる VLP 作製によって、実証しつつ研究を進めることができる。

ロタウイルスについては、リバースジェネティクスの応用と改変が進んだ。また、構造解析の結果、ロタウイルスのゲノム RNA が内殻にぶら下がっている可能性が示唆された。疫学情報を重ね、11 本のゲノムセグメントをパッケージするメカニズムの研究を行うことが可能となりつつある。これは、新しい抗ウイルス剤の開発、消毒薬の開発に直結する。

来年度は、疫学データの蓄積も進み、塩基配列の時系列変遷などの情報が提供できるようになる。そうなれば、VLP や感染性粒子の構造を明らかにしつつ、これらの影響する変異を実証し、ワクチンシーズ構築、新しい抗ウイルス剤の開発、消毒薬の開発を加速できると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.
- (2) Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* doi:

- 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.
- (3) Nagai M, Aoki H, Sakoda Y, Kozasa T, Tominaga-Teshima K, Mine J, Abe Y, Tamura T, Kobayashi T, Nishine K, Tateishi K, Suzuki Y, Fukuhara M, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Nakamura S, Kida H, Shirai J. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 26(4): 547-552. [Epub ahead of print] Jul 15, 2014.
- (4) Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One.* 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.
- (5) Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol.* 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.
- (6) Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014 .
- (7) Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* 174, 577-583, 2014.
- (8) Nagai M, Shimada S, Fujii Y, Moriyama H, Oba M, Katayama Y, Tsuchiaka S, Okazaki S, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 2015 Feb 9. pii: S0378-1135(15)00055-3. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.002. [Epub ahead of print]
- (9) Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, Kondo T, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Arch Virol.* 2015 Feb 25. [Epub ahead of print]
- (10) Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Yamakawa M, Shirai J. Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01573-14. doi: 10.1128/genomeA.01573-14.
- (11) Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01553-14. doi: 10.1128/genomeA.01553-14.
- (12) Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):32-53. doi: 10.1128/CMR.00011-14. PMID: 25567221 [PubMed - in process]
- (13) 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol. 35 No. 3 Mar. 2014.

- (14) 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版 IASR ノロウイルス特集号 vol. 35 No. 7 July 2014.
- (15) 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol. 17 No. 1 12-15, 2014.
- (16) 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No. 4723, 59-60, 2014.
- (17) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 10-12, 2014
- (18) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 14-19, 2014
- (19) 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策ICTジャーナル vol. 9 No. 4 2014.
- (20) 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.
- (21) 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.
- (22) 片山和彦 ウイルス性胃腸炎 SRL社宝函 vol. 35, No. 4, p23-34, 2015.
- (23) 片山和彦 Luncheon Seminar Report No. 1 ノロウイルス -感染制御を目指した研究の歩みと最新の成果- デンカ生研, p1-4, リーフレット、2015/02/24
- (24) 片山和彦 ヒトに感染するノロウイルスの感染様式の研究 黎明 vol23, pi-ii, 2014.
- Suzuki Y and Katayama K., Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.
- (4) Yoshida K., Zhou Y., Takai-Todaka R, Katayama K and Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.
- (5) Katayama K. Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka t. Guix S, Sharp TM., Atmer RL., Crawford SE and Estes MK. Reverse genetics system of Human and Murine Norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.

(国内)

- (1) 片山和彦 衛生微生物技術協議会 ノロウイルスレファレンスセンター報告 平成 26 年 6 月 26-27 日 船堀
- (2) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西章、脇田隆字、片山和彦 レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み 第62回日本ウイルス学会学術集会 平成26年11月11日
- (3) 下池貴志、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦 ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの in vitro 転写活性 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 平成 26 年 11 月 11 日

3. その他

(講演会・シンポジウムなど)

- (1) 片山和彦 平成 26 年 6 月 13 日 戸山学習館研修 ノロウイルスなんてこわくない！ 感染研戸山庁舎
- (2) 片山和彦、藤井克樹 平成 26 年 6 月 19 日 ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン 講義 対象：横浜市立大学医学部社会予防医学教室 感染研村山庁舎
- (3) 片山和彦 平成 26 年 6 月 24 日 ノロウイルスなんて怖くない 知の広場・シラバス 感染研戸山庁舎
- (4) 片山和彦 平成 26 年 6 月 26 日 衛生

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) Katayama K, Park YB, Takai-Todaka R, Haga K. Investigation of Human Norovirus evolution in human body. Japan-Taiwan joint meeting. Taipei, Taiwan. Sep 11, 2014.
- (2) Katayama K and Park YB. A plasmid based human norovirus reverse genetics system. International meeting of the federation of Korean microbiological societies (MSK) symposium Oct 29-31, 2014.
- (3) Miki M, Park YB, Haga K, Doan HY,

- 微生物技術協議会 第 35 回研究会 ノロウイルス・ロタウイルス レファレンスセンター会議、報告
- (5) 片山和彦 平成 26 年 7 月 12 日 日本ウイルス学会北海道支部 第 48 回夏季シンポジウム“ウイルス研究の基礎から応用への橋渡し”(北海道上川郡美瑛町白金温泉 国立大説青少年交流の家) 特別講演 ノロウイルス研究のトピックス
- (6) 片山和彦 平成 26 年 7 月 28 日 メディア意見交換会 “知っているようで知らないノロウイルス” 感染研戸山庁舎
- (7) 片山和彦 平成 26 年 8 月 23 日 ノロウイルス感染症の高齢者施設における実態と対策 ノロウイルスの最近の流行状況 第 6 回 J 感染制御ネットワークフォーラム 教育セミナー10 宮城県仙台市
- (8) 片山和彦 平成 26 年 8 月 1 日 第 39 回食品衛生懇話会 “食品安全行政の現状と最近の諸問題について・ノロウイルスの最近の知見について 日本食品衛生協会 渋谷区神宮前
- (9) 片山和彦 平成 26 年 8 月 18 日 愛知県感染症予防指導者セミナー ノロウイルスの最近の知見について 愛知県名古屋市
- (10) 片山和彦 平成 26 年 9 月 8 日 小金井市医師会講演会 “知っているようで知らないノロウイルス” 東京都小金井市
- (11) 片山和彦 平成 26 年 10 月 4 日 感染研公開 クイズ・これであなともノロ博士 感染研戸山庁舎
- (12) 片山和彦 平成 26 年 10 月 19 日 小児感染症学会 ランチョンセミナー ノロウイルスの最近の知見 東京都京王プラザホテル
- (13) 片山和彦 平成 26 年 10 月 21 日 ノロウイルス 郡山市保健課・日本食品衛生協会 福島県郡山市
- (14) 片山和彦 平成 26 年 10 月 22 日 医師卒後研修会 下痢症ウイルスについて 感染研戸山庁舎
- (15) 片山和彦・染谷雄一 IPV 検定について WHO 研修 マレーシア研修生受け入れ、講義 感染研村山庁舎
- (16) 片山和彦 平成 26 年 11 月 25 日 第 15 回北多摩北部感染対策研究会 ノロウイルス感染症 国立療養所東京病院講義室
- (17) 片山和彦 平成 26 年 11 月 9 日 ウイルス学会サテライトセミナー 横浜市民講座 “ノロウイルス” 日本ウイルス学会・神奈川県横浜市
- (18) 片山和彦 平成 26 年 11 月 15 日 “知っているようで知らないノロウイルス” 健康公開講座 NHK 横浜放送局共催横浜市民講座・神奈川県横浜市
- (19) 片山和彦 平成 26 年 11 月 27 日 特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会 “知っているようで知らないノロウイルス” 日本橋
- (20) 片山和彦 平成 27 年 2 月 7 日 第 11 回日本小児消化管感染症研究会 教育講演 大阪大学中之島センター・大阪市
- (新聞) 指導、監修
- (1) 北海新聞 ノロウイルス 相次ぐ胃腸炎の集団発生 2014年1月28日
- (2) 西日本新聞 ノロ感染源あなたかも 2014年1月28日 夕刊
- (3) 新潟新聞 ノロ誰でも感染源に 2014年1月27日
- (4) 秋田さきがけ 誰もが感染源に ノロウイルス相次ぐ集団発生 2014年1月30日
- (5) 岐阜新聞 あなたもノロ感染源? 2014年2月3日
- (6) 京都新聞 ヒトからヒトへノロウイルス 2014年2月4日
- (7) 山梨新聞 ノロウイルス感染防げ 2014年2月3日
- (8) 四国新聞 ノロウイルス意識変えて 2014年1月31日
- (9) 千葉日報 あなたも感染源に? 2014年2月7日
- (10) 毎日新聞 封じ込め難しいノロ 2014年3月15日
- (11) 少年写真新聞 中学保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- (12) 少年写真新聞 高校保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- (その他)

- (1) ロタウイルス検出マニュアル
- (2) EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccine (inactivated). Proposed replacement of: TRS 910, Annex 2

F. 健康危険情報
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）