

## ロタウイルスリアレンジメント変異株 KU-24 の解析

担当責任者 谷口 孝喜 藤田保健衛生大学 教授  
研究協力者 河本 聡志 藤田保健衛生大学 講師

### 研究要旨

ロタウイルスゲノムは 11 本の分節 2 本鎖 RNA で構成される。リアレンジメントは、各セグメントにおける塩基配列の部分的な重複や欠失により起こる。本研究では、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 ( $\Delta 423-425$ ) 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 つのリバース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。

### A. 研究目的

ロタウイルス研究では、個々のウイルス遺伝子をクローニングして、それぞれを培養細胞に発現させるといったフォワードジェネティクス的手法が用いられ、多くの知見が得られてきた。しかし、各々のウイルス遺伝子ごとに得られた情報を単純に総和しても、実際のウイルス増殖や病原性発現の機構を理解することはできず、感染性ウイルスでの検証が必要不可欠である。そこで、感染性ウイルスを設計し作製することができるリバースジェネティクスの研究手法が理想的である。

われわれが世界に先駆けて開発したロタウイルスにおけるリバースジェネティクスは、ヘルパーウイルスを必要とするため、組換えウイルスを単離するための選択条件が必要であり、

その条件が確立されているのは、11 本のセグメントのうち VP4、NSP2 および NSP3 の 3 本に過ぎない。本研究では、残る 8 本のセグメントについても組換えウイルスを単離するための選択条件を開発し、ロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系を展開させることを目的としている。

リアレンジメントは、各セグメントの部分的な重複や欠失により起こる。リアレンジメント変異を有するウイルス株の dsRNA セグメントを PAGE 解析すると、変異を有するセグメントが通常的位置ではなく、移動度が異常に小さいか大きくなる。リアレンジメントの殆どは遺伝子配列の部分的な重複によるものであり、VP6、NSP1-5/6 セグメントで報告されている。このタイプのリアレンジメント変異の多くの場合、発

現ウイルス蛋白質は野生型であり、ウイルス感染性は影響を受けない。一方で、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 > 野生型セグメントであることが知られているが、そのメカニズムは不明である。他方の遺伝子配列の欠失によるリアレンジメントは稀であり、これまで NSP1 セグメントでのみ報告されている。この場合、発現 NSP1 蛋白質は短くなっており、一般的にこれら NSP1 セグメントのリアレンジメント変異株のプラークサイズは野生型に比べて小さい。

今回、ヒト KU 株の限界希釈から、セグメント 11 に 3 塩基欠失 ( $\Delta 423-425$ ) を起こしたリアレンジメント変異株 KU-24 を分離し、変異型セグメント 11 のウイルス粒子へのパッケージング効率を解析することで、KU-24 株が NSP5/6 セグメントを標的とするリバーシジェネティクス系を開発する際にヘルパーウイルスとして活用できる可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 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。

### ウェスタン 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、 $10^3:1$  および  $10^5:1$  (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。

## C. 研究結果

ヒト KU 株の限界希釈から分離した KU-24 株のセグメント 11 は 3 塩基欠失 ( $\Delta 423-425$ ) を起こしており、ロタウイルス株 (ヒトおよび動物由来) 間で極めて高度に保存されている NSP5 上の E135 を欠失していた。まず、KU-24 株の NSP5 発現を検討したところ、VP6 および NSP4 とともに野生型 KU 株と発現量および発現パターンは同様であり、セグメント 11 における 3 塩基欠失 ( $\Delta 423-425$ ) は NSP5 発現に顕著な影響を与えていないことが示された。次に、KU-24 株の増殖能を MA104 細胞における一段階増殖曲線により検討したところ、KU-24 株は野生型 KU 株と同程度の増殖能を示した。CV-1 細胞を用いたプラーク形成能でも違いは見ら

れなかった。

ついで、KU-24 株と野生型 KU 株との競合感染実験で、変異型セグメント 11 と野生型セグメント 11 とのパッケージング効率の違いの有無を検討した。KU-24 株と KU 株の比率が 1:1 の場合、6 回の継代後には変異型セグメント 11 は PAGE 解析で検出限界以下となった。さらに、KU-24 株と KU 株の比率が  $10^3$ :1 および  $10^5$ :1 の場合でも、各々 14 回および 20 回の継代後には変異型セグメント 11 は野生型セグメント 11 とほぼ完全に置換した。

KU-24 株のセグメント 11 が示す野生型セグメント 11 に対する非優先的なパッケージング効率に 3 塩基欠失変異 ( $\Delta 423-425$ ) が関与していることを確認するため、KU-24 株の 2 つのリバタントウイルス KU-24R1 と KU-24R2 を回収したところ、これら 2 株はともに 423-425 位置に E135 を回復するような遺伝子配列の挿入を有していた。

#### D. 考案

KU-24 株はセグメント 11 が 3 塩基欠失 ( $\Delta 423-425$ ) によるリアレンジメントを起こしているが、野生型 KU 株と同程度の増殖能を示した。一方で、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 であることが示された。KU-24 株の 2 つのリバタン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唆された。

#### E. 結論

KU-24 株のセグメント 11 は 3 塩基欠失 ( $\Delta 423-425$ ) によるリアレンジメントを起こし、野生型のセグメント 11 に対して非優先的にウイルス粒子へパッケージングされることが明

らかになった。リバーズジェネティクス系の開発においては、野生型セグメント 11 をコードするプラス鎖 RNA 発現プラスミド (T7 プラスミド) とともに、KU-24 株をヘルパーウイルスとして利用することで、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ズジェネティクス系の開発につながるものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. **Komoto S**, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, **Taniguchi K**: Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Vet Microbiol* 174:577-583, 2014.
2. **Komoto S**, Wandera Apondi E, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirato H, Tsuji T, Ichinose Y, **Taniguchi K**: Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: identification of porcine-like NSP4 genes. *Infect Genet Evol* 27:277-293, 2014.
3. 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* 171:66-73, 2014.

国際会議

なし。

2. 学会発表

国内会議

1. 河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、谷口孝喜。タイで検出された G10P[5]ブタロタウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会; 横浜. 2014.
2. 井手富彦、河本聡志、守口匡子、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜。ミャンマーにおける G12P[6]および G12P[8]ヒトロタウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会; 横浜. 2014.

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。

## 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

担当責任者 芳賀 慧 国立感染症研究所 ウイルス第二部 任期付研究員

### 研究要旨

ロタウイルスのヘルパーウイルスを用いないリバースジェネティクスシステムは未だ開発されていない。本研究では、その開発に向けてロタウイルス感染細胞中の（+）鎖 RNA の 5'末端のゲノム配列を解読した。その結果、既知の配列に G がもう一塩基添加されている配列の存在を示した。しかしながら、その配列のウイルス学的意義は今後より詳細な解析を必要とする。次に、同一細胞中に 11 分節のロタウイルスゲノムを導入するためのプラスミドベクターを開発するための基礎検討を行った。セグメント 4 (VP4) とセグメント 6 (VP6) の両端にリボザイム配列を付した単一プラスミドベクターを作製し細胞に導入した結果、VP 4 及び VP 6 の発現を確認した。今後遺伝子数を増やし発現可能か検討する。

### A. 研究目的

ロタウイルスは、乳幼児の急性胃腸炎の主な原因ウイルスである。また、11 本の二重鎖 RNA セグメントをゲノムとして有し、動物全般に広く感染する人獣共通感染症のウイルスとしても知られている。ロタウイルスでは、効率の良いリバースジェネティクスシステムが構築されていないため、ウイルスのライフサイクル、それに伴う病原性発現機構の研究が遅れている。本研究課題では、ヘルパーウイルスを用いずにプラスミドのみでウイルス産生可能な簡便かつ効率的なロタウイルスのリバースジェネティクスシステムの構築を試みる。

### B. 研究方法

感染細胞中に存在し mRNA および複製の鋳型として存在する（+）鎖 RNA を、外来プラスミドとして細胞中に導入し感染細胞を再現できれば効率の良い RGS が構築可能と考えた。そこで、まず感染細胞中の 11 本の（+）鎖 RNA

の各々の末端配列を RACE や次世代シーケンサー（NGS）を用いて同定する。次に同定した配列を付したゲノム分節の両末端にリボザイムの配列を配置した発現プラスミドを作製する。リボザイム配列は、ロタウイルスにはポリ A 配列がなくゲノム配列を忠実に再現する為に用いている。ヘルパーウイルスを用いた系を用いて、作製したプラスミドを細胞に導入し、ヘルパーウイルスに効率的な組み換えが起こるか評価する。組み換え効率の改善が確認出来た場合、11 本すべての発現プラスミドを作製し、ヘルパーウイルスフリーの系の作製を試みる。

### C. 研究結果

細胞中の（+）鎖 RNA を RACE と NGS を組み合わせて解析した結果、既知の配列より一塩基多く“G”が添付している配列を確認した。各分節それぞれに G が添付している配列が存在し、各セグメントの全体の約 10～40% の割合で存在した。

この G を付加したセグメント 4 (VP4) を、両末端にリボザイムの配列を配置した発現プラスミドに導入し発現を試みた。ポリ A 配列が無いにも関わらず、293FT 細胞に置いて VP4 を発現することに成功した。

この導入した細胞にヘルパーウイルスを感染させ、VP4 が組み替わる効率が G の有無で変化するか検討した。外来性の VP4 は、同義置換の変異を入れておき、制限酵素による切断パターンが、本来の VP4 と異なるよう設計した。外来 VP4 とヘルパーウイルスを導入した細胞よりウイルスを回収し、RNA を精製後、逆転写して PCR を行い、制限酵素で切断して、ウイルス中の外来 VP4 の量を定量することを試みた。しかしながら、外来 VP4 を導入するのに用いたプラスミドの混入の可能性が否定できず、系の再構築を現在行っている。

最後に、今回用いたベクターを改良し、単一ベクターで複数の遺伝子を発現可能か検討した。各発現遺伝子をリボザイムで挟み、転写後に切断されそれぞれの mRNA からそれぞれのタンパクが発現するかどうか確かめた。今回は、VP4 と VP6 を単一ベクター上に組み込み、293FT 細胞に導入し、それぞれのタンパクが発現するか確かめた。その結果、免疫染色により VP4 及び VP6 が細胞で発現していることを確認した。

#### D. 考案

ロタウイルス感染細胞中には、約 10~40% の割合で既知の配列より G が一塩基多い配列が含まれていることがわかった。しかしながら、この配列のウイルス学的な意義は不明であり、今後の検討課題である。その一つとして、ヘルパーウイルスをもちいて組み替え効率に変化するかどうか検討しているが、現在評価系を再構築している段階である。外来 VP4 を、プラスミドの代わりに *in vitro* 合成し RNA で細胞に導入を試みた。仮に複製、ウイルスへの取り込み

へと進んだ場合、(-) 鎖 RNA が合成されているはずなので、この (-) 鎖を鋳型に一連の逆転写、PCR、制限酵素処理を行おうと考えている。この方法を用いれば、新規に産生されたウイルスの RNA のみを評価することが可能になる。

VP4 と VP6 を単一ベクターに組み込むことにより、一つのベクターで複数の遺伝子が発現可能であるということを示した。しかしながら、抗 VP4 抗体、抗 VP6 抗体ともにマウスのモノクローナル抗体しかなく、同一細胞中で発現しているかどうかは確認できていない。今後、各遺伝子の発現を確認するために各遺伝子に対する抗体を入手もしくは作製する必要がある。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年記入)

(1) Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, **Haga K**, Fujii Y, Katayama K, Taniguchi K: Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Vet Microbiol* 174:577-583, 2014.

##### 2. 学会発表

(1) 河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、谷口孝喜. タイで検出された G10P[5]ブタロタウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会; 横浜. 2014.

(2) 井手富彦、河本聡志、守口匡子、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜. ミャンマーにおける G12P[6]および G12P[8]ヒトロタウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会; 横浜. 2014.

**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

### Ⅲ. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）   | 発表者氏名   | 発表した場所（学会等名）  | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|---|---|--------|--------|
| Investigation of Human Norovirus evolution in human body. (口頭)   | Katayama K, Park YB, Takai-Todaka R, Haga K.  | Japan-Taiwan joint meeting. Taipei, Taiwan.   | 14年9月  | 国外     |
| A plasmid based human norovirus reverse genetics system. (口頭)  | Katayama K and Park YB.   | International meeting of the federation of Korean microbiological societies (MSK) symposium | 14年10月 | 国外     |
| Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant. (口頭)                     | Miki M, Park YB, Haga K, Doan HY, Suzuki Y and Katayama K.  | 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan.               | 15年1月  | 国外     |
| Functional complementation of VP2 in murine norovirus. (口頭)  | Yoshida K., Zhou Y., Takai-Todaka R, Katayama K and Nakanishi A.  | 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan.               | 15年1月  | 国外     |
| Reverse genetics system of Human and Murine Norovirus. (口頭)  | Katayama K. Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka t. Guix S, Sharp TM., Atmer RL., Crawford SE and Estes MK. | 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan.               | 15年1月  | 国外     |
| Continued circulation of novel G1P[8] double-reassortant strains carrying the DS-1-like genotype constellation in Japan (ポスター) | Yoshiki Fujii, Yen Hai Doan, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Kazuhiko Katayama                                     | 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan.               | 15年1月  | 国外     |
| 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(口頭)  | 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  | 横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）  | 14年11月 | 国内     |
| ノロウイルスRNA依存的RNAポリメラーゼのin vitro転写活性（ポスター）   | 下池貴志、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦   | 横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）  | 14年11月 | 国内     |
| ノロウイルスGII.4 カプシドにおける共変異部位の推定(口頭)   | 横山 勝、中村浩美、佐藤裕徳.   | 横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）  | 14年11月 | 国内     |

|  |  |   |        |    |
|--|--|---|--------|----|
| カリシウイルスプロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価。(口頭)   | 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、遠矢幸伸、片山和彦、佐藤裕徳.   | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化(口頭)   | 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、田村務、吉澄志磨、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan.   | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| ノロウイルスRNA依存的RNAポリメラーゼのin vitro転写活性(ポスター)   | 下池貴志、朴英斌、戸高玲子、朴三用、脇田隆宇、片山和彦  | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| ロタウイルスの分子疫学とロタウイルスワクチン(口頭・シンポジウム)  | 藤井克樹   | 東京 第63回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会              | 14年10月 | 国内 |
| Impact of next generation sequencing technologies on whole genome analysis of rotaviruses(口頭・シンポジウム) | 藤井克樹   | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| Molecular evolutionary study of rotavirus genome using next generation sequencer(口頭)                 | 藤井克樹   | 東京 感染症制御セミナー(NIID International Seminar on Infectious Diseases) | 15年1月  | 国内 |
| タイで検出されたG10P[5]ブタロタウイルスP343株ゲノムの全塩基配列解析、ポスター   | 河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、谷口孝喜                                       | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| ミャンマーにおけるG12P[6]およびG12P[8]ヒトロタウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析(ポスター)  | 井手富彦、河本聡志、守口匡子、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜 | 横浜(第62回日本ウイルス学会学術集会)  | 14年11月 | 国内 |
| 環境ウイルスとヒト集団の関わり(口頭)  | 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝.   | 横浜(第37回日本分子生物学会)  | 14年11月 | 国内 |
| ノロウイルスの多様性と進化の制約(ポスター)   | 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝  | 横浜(第37回日本分子生物学会)  | 14年11月 | 国内 |
| ノロウイルスなんてこわくない!(口頭)  | 片山和彦   | 東京(戸山学習館研修・感染研戸山庁舎)   | 14年6月  | 国内 |
| ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン(講義)   | 片山和彦、藤井克樹  | 東京(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)                                | 14年6月  | 国内 |

|  |           |                                   |        |    |
|--|-----------|-----------------------------------|--------|----|
| ウイルス研究の基礎から応用への橋渡し（口頭）                         | 片山 和彦     | 旭川（日本ウイルス学会北海道支部第48回夏季シンポジウム）     | 14年7月  | 国内 |
| 知っているようで知らないノロウイルス（口頭）                         | 片山 和彦     | 東京（メディア意見交換会・感染研戸山庁舎）             | 14年7月  | 国内 |
| ノロウイルス感染症の高齢者施設における実態と対策<br>ノロウイルスの最近の流行状況（口頭） | 片山 和彦     | 仙台（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）  | 14年8月  | 国内 |
| 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（口頭）      | 片山 和彦     | 東京（第39回食品衛生懇話会・日本食品衛生協会）          | 14年8月  | 国内 |
| ノロウイルスの最近の知見について（口頭）                           | 片山 和彦     | 名古屋（愛知県感染症予防指導者セミナー）              | 14年8月  | 国内 |
| 知っているようで知らないノロウイルス（口頭）                         | 片山 和彦     | 東京（小金井市医師会講演会）                    | 14年9月  | 国内 |
| クイズ・これであなともノロ博士                                | 片山 和彦     | 東京（感染研一般公開・感染研戸山庁舎）               | 14年10月 | 国内 |
| ノロウイルスの最近の知見（口頭）                               | 片山 和彦     | 東京（小児感染症学会 ランチョンセミナー）             | 14年10月 | 国内 |
| ノロウイルス（口頭）                                     | 片山 和彦     | 郡山（郡山市保健課・日本食品衛生協会）               | 14年10月 | 国内 |
| 下痢症ウイルスについて（口頭）                                | 片山 和彦     | 東京（医師卒後研修会・感染研戸山庁舎）               | 14年10月 | 国内 |
| IPV検定について（講義）                                  | 片山和彦、染谷雄一 | 東京（WHO研修 マレーシア研修生受け入れ、感染研村山庁舎）    | 14年10月 | 国内 |
| ノロウイルス感染症（口頭）                                  | 片山 和彦     | 東京（第15回北多摩北部感染対策研究会・国立療養所東京病院講義室） | 14年11月 | 国内 |
| ノロウイルス（口頭）                                     | 片山 和彦     | 横浜（ウイルス学会サテライトセミナー 横浜市民講座）        | 14年11月 | 国内 |
| 知っているようで知らないノロウイルス（口頭）                         | 片山 和彦     | 横浜（健康公開講座 NHK横浜放送局 共催横浜市民講座）      | 14年11月 | 国内 |
| 知っているようで知らないノロウイルス（口頭）                         | 片山 和彦     | 東京（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） | 14年11月 | 国内 |
| ノロウイルス（口頭）                                     | 片山 和彦     | 大阪（第11回日本小児消化管感染症研究会 教育講演）        | 15年2月  | 国内 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目）  | 発表者氏名   | 発表した場所<br>（学会誌・雑誌等<br>名）                 | 発表した時期 | 国内・外の<br>別 |
|---|---|--|--------|------------|
| Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA                                | Katayama K,<br>Murakami K, Sharp<br>TM, Guix S, Oka T,<br>Takai-Todaka R,<br>Nakanishi A,<br>Crawford SE,<br>Atmar RL, Estes<br>MK.   | Proc.Natl.Acad.Sci.U<br>SA               | 14年9月  | 国外         |
| Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing aDS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. | Yoshiki Fujii,<br>Toyoko Nakagomi,<br>Naoko Nishimura,<br>Atsuko Noguchi,<br>Sinobu Miura,<br>Hisato Ito, Yen Hai<br>Doan, Tsutomu<br>Takahashi, Takao<br>Ozaki, Kazuhiko<br>Katayama, Osamu<br>Nakagomi  | Infect Genet Evol.<br>2014, 28:426-33.   | 14年12月 | 国外         |
| Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission.                            | Satoshi Komoto,<br>Yaowapa<br>Pongsuwanna,<br>Tomihiko Ide,<br>Mitsutaka Wakuda,<br>Ratigorn<br>Guntapong, Francis<br>Ekow Dennis, Kei<br>Haga, Yoshiki Fujii,<br>Kazuhiko<br>Katayama, Koki<br>Taniguchi | Vet Microbiol. 2014,<br>174(3-4):577-583 | 14年12月 | 国外         |
| Identification of Novel Ghanaian G8P[6] Human-Bovine Reassortant Rotavirus Strain by Next Generation Sequencing.  | Francis E. Dennis,<br>Yoshiki Fujii, Kei<br>Haga, Susan<br>Damanka, Belinda<br>Lartey, Chantal A.<br>Agbemabiese,<br>Nobuo Ohta,<br>George E. Armah,<br>Kazuhiko Katayama                                 | PLoS One 2014,<br>9(6):e100699.          | 14年6月  | 国外         |

|  |  |  |              |           |
|--|--|--|--------------|-----------|
| <p>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.</p> | <p>Tsune-yuki Masuda, Makoto Nagai, Hiroshi Yamasato, Shinobu Tsuchiaka, Sachiko Okazaki, Yukie Katayama, Mami Oba, Naomi Nishiura, Yukiko Sassa, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Satoshi Koyama, Junsuke Shirai, Koki Taniguchi, Yoshiki Fujii, Reiko Todaka, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani</p> | <p>Vet Microbiol 2014, 171(1-2):66-73</p>        | <p>14年6月</p> | <p>国外</p> |
| <p>H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes</p>   | <p>Makoto Nagai, Saya Shimada, Yoshiki Fujii, Hiromitsu Moriyama, Mami Oba, Yukie Katayama, Shinobu Tsuchiaka, Sachiko Okazaki, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Satoshi Koyama, Junsuke Shirai, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani</p>  | <p>Veterinary Microbiology</p>                   | <p>印刷中</p>   | <p>国外</p> |
| <p>Whole genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s</p>  | <p>Manabu Nemoto, Makoto Nagai, Hiroshi Tsunemitsu, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Junsuke Shirai, Takashi Kondo, Yoshiki Fujii, Reiko Todaka, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani</p>  | <p>Archives of Virology</p>                      | <p>印刷中</p>   | <p>国外</p> |
| <p>A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan.</p>   | <p>Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H.</p>  | <p>Microbiol Immunol.58(9): 536-9. Sep, 2014</p> | <p>14年9月</p> | <p>国内</p> |

|   |   |   |        |    |
|---|---|---|--------|----|
| Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP.                        | Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Yamakawa M, Shirai J.          | Genome Anounc.2015 Feb 12;3(1)            | 15年2月  | 国内 |
| Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. | Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. | Genome Anounc. 2015 Feb 12;3(1)           | 15年2月  | 国内 |
| Comprehensive review of human sapoviruses.  | Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ.   | Clin Microbiol Rev. 2015 Jan;28(1):32-53. | 15年1月  | 国内 |
| ロタウイルス概要  | 片山 和彦   | IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.     | 14年3月  | 国内 |
| ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014年版  | 片山 和彦   | IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.     | 14年7月  | 国内 |
| ノロウイルス感染症とその対策  | 片山 和彦   | 救命救急 vol.17 No.1 12-15, 2014.             | 2014年  | 国内 |
| 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  | 片山 和彦   | 日本医事新報 No.4723, 59-60, 2014.              | 2014年  | 国内 |
| 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは   | 片山 和彦   | 調剤と情報 vol.20 No.12, 10-12, 2014           | 2014年  | 国内 |
| 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  | 片山 和彦   | 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19, 2014           | 2014年  | 国内 |
| 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  | 片山 和彦   | 感染症対策ICT ジャーナル vol.9 No.4 2014.           | 2014年  | 国内 |
| ノロウイルスの感染予防   | 片山 和彦   | 少年写真新聞社 中学保健ニュース Dec.18, 2014.            | 14年12月 | 国内 |
| ノロウイルスの感染予防   | 片山 和彦   | 少年写真新聞社 高校保健ニュース Dec.18, 2014.            | 14年12月 | 国内 |
| ウイルス性胃腸炎  | 片山 和彦   | SRL社 宝函 vol.35, No.4,p23-34, 2015.        | 2015年  | 国内 |
| 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-  | 片山 和彦   | デンカ生研、p1-4、リーフレット、2015/02/24              | 15年2月  | 国内 |
| ヒトに感染するノロウイルスの感染様式の研究   | 片山 和彦   | 黎明 vol23, pi-ii, 2014.                    | 2014年  | 国内 |

## 学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 東京大学大学院 工学系研究科

### 1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）                      | 発表者氏名                  | 発表した場所（学会等名）        | 発表した時期   | 国内・外の別 |
|---|------------------------|---------------------|----------|--------|
| 親水活動による感染リスク評価に向けた東京湾沿岸域の降雨後ウイルス汚染実態調査口頭とポスター | 浅見達也, 柴田智世, 片山浩之, 古米弘明 | 山梨（第51回環境工学研究フォーラム） | 2014年12月 | 国内     |

### 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

本年度なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 国立大学法人 大阪大学 微生物病研究所 日本一タイ新興再興感染症共同研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）  | 発表者氏名  | 発表した場所（学会等名）   | 発表した時期     | 国内・外の別 |
|---|--|--|------------|--------|
| Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastro-enteritiss. 口頭   | <b>Motomura, K.</b> , Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan.  | Asian-African research forum on emerging and reemerging infections.  | 2014       | 国内     |
| Introduction of application study on NGS. 口頭  | <b>Motomura K</b>  | Asian-African research forum on emerging and reemerging infections.  | 2014       | 国内     |
| Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. 口頭  | <b>Motomura K.</b> , Yokoyama M., Ode H., Oka T., Katayama K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Takeda N., Norovirus Surveillance Group of Japan.   | Asian-African research forum on emerging and reemerging infections.  | 2014       | 国内     |
| Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 口頭   | Saeng-aroon S., Loket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., <b>Motomura K.</b> , Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. | Asian-African research forum on emerging and reemerging infections.  | 2014       | 国内     |
| Distribution of Norovirus Genotypes through Genomic Analysis in Japan and Thailand. 口頭  | <b>Motomura K.</b> , Takeda N.   | JGRID Vietnam-Thailand seminar   | 2014       | 国外     |
| Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis ポスター  | <b>Motomura, K.</b> , Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N.1, Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan.   | XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada. | 2014       | 国外     |
| Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks 口頭                               | Sato H., Yokoyama M., Nakamura H., <b>Motomura, K.</b> ,   | XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada. | 2014       | 国外     |
| Genetic evolution of norovirus for survival in human population as a strategy 口頭  | <b>Motomura, K.</b> , Norovirus Surveillance Group of Japan.   | 慶州 DASAN Conference  | 2014.10.17 | 国外     |
| Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca <sup>2+</sup> channel 口頭 | Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., <b>Motomura K.</b> , Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I.  | World Muscle Society   | 2014       | 国外     |

|   |   |                       |      |    |
|---|---|-----------------------|------|----|
| ノロウイルス感染者体内における混合感染の解析 口頭   | 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、  | 福岡 第88回日本感染症学会学術集会    | 2014 | 国内 |
| ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析 口頭   | 本村和嗣、飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦亙、佐藤裕徳、田中智之、武田直和   | 横浜 (第62回日本ウイルス学会学術集会) | 2014 | 国内 |
| ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化 口頭   | 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan  | 横浜 (第62回日本ウイルス学会学術集会) | 2014 | 国内 |
| Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 口頭 | Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., <b>Motomura K.</b> , Shioda T. | 横浜 (第62回日本ウイルス学会学術集会) | 2014 | 国内 |
| ノロウイルスの多様性と進化の制約 (ポスター)   | 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝   | 横浜 (第37回日本分子生物学会)     | 2014 | 国内 |

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文 (発表題目)  | 発表者氏名   | 発表した場所 (学会誌・雑誌等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|---|-------------------|--------|--------|
| Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca <sup>2+</sup> channel | Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., <b>Motomura K.</b> , Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. | Hum Mol Genet.    | 2014   | 国外     |

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 長崎大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）   | 発表者氏名   | 発表した場所（学会等名）  | 発表した時期   | 国内・外の別 |
|--|---|---|----------|--------|
| Molecular evolution of G2P[4] rotavirus strains at the whole genome level. | Doan, Y.H.,<br><b>Nakagomi, T.</b> ,<br>Aghemabiese, C.A. | New Delhi, India (The 11th International Rotavirus Symposium) | 2014年9月  | 国外     |
| ロタウイルスの分子疫学：マラウイにおけるG12P[6]株の突発出現の背景、口頭                                    | 中込とよ子、中込治、団海燕   | 横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）  | 2014年11月 | 国内     |
| 自己対照症例系列(SCCS)法によるロタウイルスワクチンの腸重積発症リスクの評価、口頭                                | 金子美穂、中込とよ子、中込治  | 福岡（第18回日本ワクチン学会学術集会）  | 2014年12月 | 国内     |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目）   | 発表者氏名  | 発表した場所（学会誌・雑誌等名）               | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|--|--------------------------------|--------|--------|
| A retrospective, hospital-based study to determine the incidence of rotavirus hospitalizations among children less than 5 years of age over a 10-year period (2001-2011) in Akita prefecture, Japan. | Kinoshita S, Noguchi A, Miura S, Nakagomi T,<br><b>Nakagomi O</b> ,                                    | Jpn J Infect Dis 67(6):464-468 | 14年12月 | 国内     |
| 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  | Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan YH, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K | Infect Genet Evol 28:426-433.  | 14年8月  | 国外     |

## 学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 札幌医科大学 臨床研修センター・小児科

### 1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）   | 発表者氏名           | 発表した場所（学会等名）                  | 発表した時期   | 国内・外の別 |
|--|-----------------|-------------------------------|----------|--------|
| ロタウイルス～その病原性とワクチンについて～、口頭  | 津川毅             | 札幌（第55回日本臨床ウイルス学              | 2014年6月  | 国内     |
| ロタウイルスの病原性とワクチン制御、口頭   | 津川毅             | 美瑛（日本ウイルス学会北海道支部第48回夏季シンポジウム） | 2014年7月  | 国内     |
| ロタウイルスワクチン、口頭  | 津川毅             | 東京（第26回ウイルス性下痢症研究会）           | 2014年11月 | 国内     |
| Molecular biological mechanism of rotavirus virulence and vaccine、口頭 | Takeshi Tsugawa | 横浜（第62回日本ウイルス学会）              | 2014年11月 | 国内     |
| 乳児院におけるロタウイルス胃腸炎8流行の分子生物学的解析、ポスター                                    | 近藤謙次、津川毅、堤裕幸    | 横浜（第62回日本ウイルス学会）              | 2014年11月 | 国内     |

### 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目）               | 発表者氏名 | 発表した場所（学会誌・雑誌等名） | 発表した時期          | 国内・外の別 |
|----------------------------|-------|------------------|-----------------|--------|
| ロタウイルスワクチンと腸重積症            | 津川毅   | 感染症内科            | 2014;2:326-333  | 国内     |
| ロタウイルスワクチン～開発の歴史、現状と今後の課題～ | 津川毅   | 小児科臨床            | 2014;67:541-550 | 国内     |
| ロタウイルスワクチンの接種について          | 津川毅   | Vaccine Digest   | 2014;5:5-6      | 国内     |

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究」

機関名 東京農工大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）                           | 発表者氏名   | 発表した場所（学会等名）        | 発表した時期  | 国内・外の別 |
|--|---|---------------------|---------|--------|
| 日本で分離されたG3およびG14型ウマロタウイルスの全ゲノム解析（口頭）               | 根本 学、長井 誠、恒光 裕、大松 勉、白井淳資、近藤高志、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦、水谷哲也                     | 札幌（第157回日本獣医学会学術集会） | 2014年9月 | 国内     |
| スーパーショートRNA泳動パターンが認められたH2 NSP5遺伝子型のブタロタウイルスの検出（口頭） | 長井 誠、島田紗彩、藤井克樹、森山裕充、大場真己、片山幸枝、土赤 忍、岡崎祥子、大松 勉、古谷哲也、小山哲史、片山和彦、白井淳資、水谷哲也 | 札幌（第157回日本獣医学会学術集会） | 2014年9月 | 国内     |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目）  | 発表者氏名   | 発表した場所（学会誌・雑誌等名）                   | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|---|------------------------------------|--------|--------|
| 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. | Tsuneyuki Masuda, <b>Makoto Nagai</b> , Hiroshi Yamasato, Shinobu Tsuchiaka, Sachiko Okazaki, Yukie Katayama, Mami Oba, Naomi Nishiura, Yukiko Sassa, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Satoshi Koyama, Junsuke Shirai, Koki Taniguchi, Yoshiki Fujii, Reiko Todaka, Kazuhiko Katayama, <b>Tetsuya Mizutani</b> | Vet Microbiol 2014, 171(1-2):66-73 | 14年6月  | 国外     |
| Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP.  | Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, <b>Mizutani T</b> , Yamakawa M, Shirai J.  | Genome Announc.2015 Feb 12;3(1)    | 15年2月  | 国内     |