

タイリクヤチネズミ(7/39)が Puumala 型抗原に反応する抗体を保有していた。抗体陽性のセスジネズミから RT-PCR によりのウイルスの M 遺伝子の検出を試みたところ、7 例全例のハントウアカネズミが PCR 陽性となった。増幅された遺伝子 4 例の塩基配列を決定したところ、これらはいずれの遺伝子においても互いに 99%以上の配列が一致していた。また、2000 年のハバロフスクで得られた HFRS 患者のウイルス遺伝子とも 97%以上の高い一致率を示した。したがって、極東ロシアではセスジネズミによって Far East 型のハンタウイルスが媒介され、HFRS を引き起こしていることが判明した。また、Far East 型は既知のハンタウイルスのとの比較で Hantaan 型に 90%と最も高い一致率を示した。極東ロシアではハントウアカネズミによって保有される Amur 型のウイルスも HFRS の原因になることを昨年度の報告で紹介した。しかし、Far East 型は Amur 型とは 82%の一致率しか示さず、Amur 型よりも Hantaan 型により近いことが明らかになった。さらに、系統樹解析によっても Far East 型は Hantaan 型の系統に含まれ、Amur 型とは明らかに異なる系統のウイルスであることが判明した。また、抗体陽性のタイリクヤチネズミ 7 例中 3 例からもハンタウイルスの S 遺伝子が検出され、そのうち一例の S 遺伝子全長の塩基配列を決定した。しかし、ハバロフスクの HFRS 患者の中には本ウイルスに対する抗体は存在せず、タイリクヤチネズミ由来ウイルスが HFRS の原因とはなりにくいことが示唆された。

D. 結論

今回得られた成績から、極東ロシアでは

ハントウアカネズミとセスジネズミが重症型 HFRS の原因となるハンタウイルスを保有するということが判明した。これらのげっ歯類の生息環境に近接して居住する一般住民や生息区域内での就業者に対して HFRS の流行情報とげっ歯類の防除に関する情報提供を行うことで、HFRS の発生数を相当数減少させることができると思われる。また、極東ロシアで重症型の HFRS が多発し、日本で発生がないのは日本にはセスジネズミがほとんど分布しないこと、ハントウアカネズミが北海道にしか分布せず、しかも生息数が限られていることが主な原因と結論づけられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 荻和宏明. ハンタウイルス感染症の疫学. バムサ会誌 2004 15(4): 16-22.
- 2) Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Iwasa M, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Iwasaki T, Takashima I. Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model. Jpn J Vet Res. 2004 51(3-4): 143-149.
- 3) 荻和宏明 腎症候性出血熱. 畜産の研究 2004 58(1): 42-45.
- 4) Lokugamage N, Kariwa H, Lokugamage K, Hagiya T, Miyamoto H, Iwasa MA, Araki K, Yoshimatsu K,

- Arikawa J, Mizutani T, Takashima I. Development of an efficient method for recovery of Puumala and Puumala-related viruses by inoculation of Mongolian gerbils. *J Vet Med Sci.* 2003 Nov;65(11):1189-94.
- 5) Lee BH, Yoshimatsu K, Araki K, Ogino M, Okumura M, Tsuchiya K, Kariwa H, Arikawa J. Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species. *Arch Virol.* 2003 Oct;148(10):1885-97.
- 6) Kariwa H, Tanabe H, Mizutani T, Kon Y, Lokugamage K, Lokugamage N, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Synthesis of Seoul virus RNA and structural proteins in cultured cells. *Arch Virol.* 2003 Sep;148(9):1671-85.
- 7) Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol.* 2003 Oct;12(5):491-9.
- 8) Goto A, Hayasaka D, Yoshii K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine.* 2003 Sep 8;21(25-26):4043-51.
- 9) Shirato K, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Discrimination of West Nile virus and Japanese encephalitis virus strains using RT-PCR RFLP analysis. *Microbiol Immunol.* 2003;47(6):439-45.
- 10) Miyamoto H, Kariwa H, Araki K, Lokugamage K, Hayasaka D, Cui BZ, Lokugamage N, Ivanov LI, Mizutani T, Iwasa MA, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype. *Arch Virol.* 2003 Aug;148(8):1543-56.
- 11) Araki K, Yoshimatsu K, Lee BH, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J. Hantavirus-specific CD8(+)-T-cell responses in newborn mice persistently infected with Hantaan virus. *J Virol.* 2003 Aug; 77(15): 8408-17.
- 12) Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Obara M, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Ivanov L, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Virol Methods.* 2003 Mar;108(2):171-9.

- 13) Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Inanami O, Yamamori T, Goto A, Ako Y, Miyoshi H, Miyamoto H, Kariwa H, Kuwabara M, Takashima I.

Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol Biol.* 2003 Feb;12(1):61-6.

2. 学会発表

- 1) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス replicon および packaging system の構築：第 135 回 日本獣医学会、東京(2003, 3)
- 2) 後藤明子、好井健太郎、小原真弓、植木智隆、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンペロープ糖蛋白の糖鎖欠損がウイルス粒子形成に与える影響：第 135 回日本獣医学会、東京(2003, 3)
- 3) 白戸憲也、木村亨史、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ウエストナイルウイルス(WNV)NY 株および Eg101 株のマウスにおける病原性の比較：第 135 回日本獣医学会、東京(2003, 3)
- 4) 高島郁夫：ウエストナイルウイルスの現状とその対策：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)
- 5) 植木智隆、早坂大輔、後藤明子、好井健太郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスの感染性 cDNA を用いた病原性解析：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)
- 6) 赤穂芳彦、水谷哲也、三好洋嗣、小林正之、白戸憲也、江下優樹、木村亨史、山盛 徹、稲波 修、苅和宏明、梅村孝司、桑原幹典、高島郁夫：西ナイルウイルスの感染における JNK の役割：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)
- 7) Nandadeva Lokugamage, 苅和宏明、Kumari Lokugamage、萩谷友洋、岩真宏、宮本大伸、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、苅和宏明、高島郁夫：Isolation of Puumala-related virus from *Clethrionomys rufocanus* in Sakhaline, Russia: 第 136 回日本獣医学会、青森 (2003,10)
- 8) 岩佐真宏、苅和宏明、萩谷友洋、崔百忠、水谷哲也、高島郁夫：自然環境下で生息するエゾヤチネズミ集団におけるハンタウイルスの感染動態について：第 136 回日本獣医学会、青森 (2003, 10)
- 9) 萩谷友洋、苅和宏明、前田顕司、岩佐真宏、宮本大伸、Nandadeva Lokugamage, Kumari Lokugamage, 荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、高島郁夫：北海道、サハリンおよび極東ロシアにおける *C. rufocanus* と Puumala-related ハンタウイルスの共進化の解析：第 136 回日本獣医学会、青森(2003, 10)
- 10) 苅和宏明、ロクガマゲ クマリ、ロクガマゲ ナンダデバ、岩佐真宏、萩谷友洋、宮本大伸、荒木幸一、吉松組子、有川二郎、水谷哲也、高島郁夫：極東ロシアにおけるハンタウイルスの多様性：第 51 回 日本ウイルス学会、京都(2003, 10)

- 11) 宮本 剛、吉松組子、荒木幸一、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：SNV NP の抗原性の解析と血清診断法の確立：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 12) 後藤明子、好井健太郎、小原真弓、植木智隆、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのエンベロープ糖蛋白の糖鎖欠損がウイルス粒子形成に与える影響：第 51 回 日本ウイルス学会、京都 (2003, 10)
- 13) 水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、木村亨史、高崎智彦、梅村孝司、苺和宏明、倉根一郎、高島郁夫：蚊の細胞へのウエストナイルウイルスの侵入における活性化 JNK の重要性：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 14) 早坂大輔、好井健太郎、岩崎琢也、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sub-genomic replicon の作製：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 15) 白戸憲也、木村亨史、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：West Nile ウイルス NY 株および Eg101 株のマウスにおける病原性の比較：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 16) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、水谷哲也、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス replicon RNA の trans-complementation によるパッケージング系の構築：第 51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 17) 荒木幸一、吉松組子、Lee Byoung-Hee、苺和宏明、高島郁夫、有川二郎：Adult げっ歯類でのハンタウイルス持続感染とウイルス特異的 CD8T 細胞応答：51 回 日本ウイルス学会、京都、(2003, 10)
- 18) Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, infection of West Nile virus. The 37th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, Texas, U.S.A.
- 19) Kariwa H, Hagiya T, Miyamoto H, Lokugamage K, Lokugamage N, Iwasa MA, Araki K, Ivanov LI, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Diversity of hantaviruses circulating in Far East Russia. The 37th Annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, Texas, U.S.A.

ハンタウイルス感染症の診断法の開発に関する研究

分担研究者 有川 二郎 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 教授

研究要旨：アジアにおけるハンタウイルス感染症の流行を診断するために、新たに 2 種類のハンタウイルス(Thailand (THAIV))および Thottapalayam virus (TPMV)の診断系を開発した。THAIV の抗原性を比較した結果、ネズミ亜科由来ハンタウイルス(Hantaan (HTNV)、Seoul virus (SEOV)と抗原性が近かったが、中和反応で区別できることが明らかとなった。一方 TPMV の抗原性の解析を行った結果、げっ歯類由来のハンタウイルスとは抗原性が大きく異なることが明らかとなった。組み換え核蛋白(NP)を大腸菌およびバキュロウイルスを発現ベクターとして昆虫細胞中に発現させ抗原性を確認した。その結果、TPMV NP はリニアエピトープを欠くため、大腸菌で作製した組み換え抗原は診断抗原として不適切であることが明らかとなった。一方、バキュロウイルスベクターによって昆虫細胞中で作られた組み換え蛋白は ELISA 抗原として有用であることが分かった。また、げっ歯類におけるハンタウイルス保有状況を調査するために、抗原診断システムを検討した。モノクローナル抗体 E5/G6 は HTNV, SEOV, PUUV のリニアエピトープを認識する。この抗体のエピトープを決定しその結合スペクトルを合成ペプチドを用いて検討したところ、を南北アメリカのハンタウイルス肺症候群の原因ウイルス Sin Nombre virus (SNV)、Andes virus (ANDV)など全てと反応した。すなわち、E5/G6 抗体はネズミ亜科、ハタネズミ亜科、アメリカネズミ亜科由来のハンタウイルスすべてと反応した。この抗体を用いることで、げっ歯類の肺材料から免疫組織染色および Western blotting により広い範囲のハンタウイルスを漏らすことなくスクリーニングする事が可能となる。

A. 研究目的

ハンタウイルス感染症は、げっ歯類媒介性の人獣共通感染症で、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)が知られている。ハンタウイルスのうち、Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Dobrava (DOBV) および Puumala (PUUV)の少なくとも 4 つ

の血清型が HFRS の原因となる。また Sin Nombre virus を始めとするアメリカネズミ亜科のげっ歯類によって媒介されるハンタウイルスは HPS の原因ウイルスである。HTNV および SEOV および DOBV はネズミ亜科のげっ歯類、そして PUUV はハタネズミ亜科のげっ歯類によって媒介される。3つのグルー

ブのウイルスは互いに抗原性が大きく相違し交差反応性が低いことから、ハンタウイルス感染症の血清診断を行うためには少なくともそれぞれのグループの代表ウイルスを用いて3種類の抗原が必要であると考えられる。また、げっ歯類からハンタウイルス抗原を検出する場合でも、3種類の抗血清が必要である。

一方、東南アジア地域を中心に、研究報告は少ないものの、ハンタウイルス抗体陽性の人や齧歯類が確認されている。これまでも、インドにおいて食虫目のスクスより分離されたハンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV)は最も特殊なハンタウイルスである。また、げっ歯類からはタイの *Badicota indica* から分離された THAIV が報告されている。このため、不明熱とされている中にハンタウイルス感染症が存在する可能性も考えられている。一般に、東南アジアは現在のげっ歯類の起源となる動物が出現した地域と考えられており、そのため、現在でも多種類のげっ歯類が生息しているがそれらにおける TPMV や THAIV の存在やその他のハンタウイルスの感染の実態についてはほとんど明らかにされていない。

本研究では、TPMV や THAIV のウイルスの抗原性、交差反応性を免疫血清および単クローン性抗体を用いて明らかにし、診断法を準備することを試みた。また、種々のげっ歯類より未知のハンタウイルスを検出する試薬として、モノクローナル抗体 E5/G6 の汎用性を合成ペプチドを用いて検討した。

B. 研究方法

「ウイルス」: TPMV はハワイ大学の R. Yanagihara 博士から、THAIV は韓国の HFRS reference center より分与された。

「抗原」: TPMV および THAIV を VERO E6 細胞に感染させ、ガラスプレート上に固着後アセトン固定し、間接蛍光抗体法 (IFA) 抗原とした。TPMV NP の全長をプラスミドベクターを用いてヒスチジンタグ融合タンパクとして大腸菌に、あるいはバキュロウイルスベクター (AcNPV: BAC-TO-BAC GIBCO BRL) を用いて昆虫細胞 (High Five) に発現させた。ヒスチジンタグ融合タンパク、ハンタウイルス感染細胞、組み換えバキュロウイルス感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。

「ELISA、Western blotting、中和試験」: ヒスチジン-NP はニッケルキレートカラムを用いて粗精製しプレートに直接固相化した。Western blotting 中和試験は既報の方法に従った。

「患者血清、免疫血清」: HTNV/SEOV に感染した中国・韓国・日本の患者血清、THAIV に感染したと考えられるタイの *Badicota indica* の血清を用いた。TPMV を接種したマウス血清および HTNV, PUUV に対するおよそ 50 種類のマウス単クローン性抗体を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清 (患者血清) は何れも、韓国、中国の研究所から分与されたものである。当

該研究所で既に研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題は無い。各種免疫血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

C. 研究結果

1. TPMV の抗原解析:

作製した TPMV 感染マウス血清は TPMV には IFA 抗体価 12,800 倍と強い反応が見られたが、HTNV、PUUV 等には <40 と反応はみられなかった。次に診断用抗原として組み換え NP 抗原の作製を行った。バキュロウイルス抗原は IFA で Native 抗原 (TPMV 感染 VERO E6 細胞) と同様の強い抗原性をもつことが確認された。しかしながら TPMV の NP は native 抗原、大腸菌抗原、バキュロウイルス抗原の何れも Western blotting で抗血清との反応性を欠き、リニアエピトープを持っていないことが明らかとなった。

2. THAIV の抗原解析:

分与されたウイルスを哺乳マウスに接種して継代することにより、高力価ウイルスを得ることが出来た。分与されたウイルスのゲノム配列を決定し比較したところ、既報の Thailand 741 株に非常に近縁な株であることが明らかとなった。このウイルスを用いて抗原性の比較を試みたところ、抗原的にはネズミ亜科に由来する他のハンタウイルス、HTNV、および SEOV と同様のグループに属

することが分かった。しかしながら、交差中和試験では、THIV 感染、*Badicota indica* 血清は、HTNV と SEOV に対し <40 の中和抗体価であるのに対し、THAIV には 80 の中和抗体価を示した。また、HTNV と SEOV による患者血清もほとんど THAIV を中和しなかった。このように THAIV は中和試験で明らかに他のウイルスを区別できることが示された。

3. 検出試薬:

モノクローナル抗体 E5/G6 は、Hanttan virus の NP のリニアエピトープに結合する抗体である。このエピトープは、感染した場合には抗体が誘導されない特徴をもつ領域である。既報の多くのハンタウイルス NP の遺伝子配列を基に、対応する部分についてペプチドを合成し、E5/G6 抗体との反応性を検討した。その結果、TPMV を除く全てのハンタウイルス、すなわち、げっ歯類由来のハンタウイルス全てと反応した。このため、この抗体はげっ歯類の肺を抗原とする Western blotting で抗原検出スクリーニングを行うためなど、広くハンタウイルス検出に非常に有用であることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度、TPMV について単クローン性抗体を用いて抗原性の解析を行ったところ、外被タンパク GP の一部にのみ交差反応が認められ、NP に関しては全く交差反応性を示さなかった。そこで今年度は TPMV の NP を診断

抗原として用いることを目的とした。他のハンタウイルスと異なり、TPMV 感染で NP のリニアエピトープに対する抗体誘導が見られなかった。一般に大腸菌抗原は立体構造依存性のエピトープの再現効率が低いことから、TPMV の診断抗原として、大腸菌抗原は不適切であることが示された。以上の結果からバキュロウイルス抗原を用いた診断系の構築が次の課題である。

THAIV に関しては、基本的な抗原解析を終了し、中和試験で区別する体制を整えた。このため、東南アジア地区のハンタウイルス陽性例中に、あるいは東南アジア地区からの不明熱とされる帰国者中に THAIV 罹患者が存在するかどうか、中和試験で判定することが可能となった。

NP には HTNV、PUUV および SNV に共通なエピトープがごくわずかしか存在しない。このため、全てのハンタウイルス感染を血清学的に摘発するためには3種類のウイルスを用いて抗体検出することが必要である。しかし、抗原を検出する際には、E5/G6 抗体を用いた Western blotting 等により、全ハンタウイルスをスクリーニングすることが可能であることが明らかになった。特に、感染齧歯類は肺中にウイルス抗原を持続的に保有していることが知られており、肺材料を用いた Western blotting によるスクリーニングとその後の PCR 法やウイルス分離などを行うことにより正確かつ迅速な罹患げっ歯類の摘発が可能となると考えられる。

E. 結論

本研究によって、TPMV, THAIV を加えたさらに広範囲なハンタウイルス感染症の診断体制を整えた。広い交差反応性をもつ E5/G6 抗体を用いることにより、ハンタウイルス感染げっ歯類を広範囲に摘発する検出法を示した。さらに広範囲な未知のハンタウイルス感染症を含む、疫学的調査研究が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Araki, K., Morimatsu, M., Ogino, M., Ebihara, H. and Arikawa, J. "The Multimerization of hantavirus nucleocapsid protein depends on type-specific epitopes." *J. Virol.* 77(2):943-952(2003)
- 2) Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B.H., Araki, K., Lundkvist, A., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K. and Arikawa, J. "Use of VSV pseudotypes bearing Hantaan or Seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test." *Clin. Diag. Lab. Immun.* 10(1):154-160 (2003)
- 3) Takakura, A., Goto, K., Itoh, T., Yoshimatsu, K., Takashima, I. and Arikawa, J. "Establishment of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

- for Detection of Hantavirus Antibody of Rats Using a Recombinant of Nucleocapsid Protein Expressed in Escherichia coli." *Exp. Anim.*, 52(1)25-30 (2003)
- 4) Lee, B.H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Ogino, M., Okumura, M., Tsuchiya, K., Kariwa, H., Arikawa, J. "Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species." *Arch Virol.* 148(10):1885-97.(2003)
2. 学会発表
- 1) Michiko Ogino , Kumiko Yoshimatsu , Hideki Ebihara , Koichi Araki , Byoung-Hee Lee and Jiro Arikawa "The Envelope Glycoproteins (G1 and G2) of Hantaan Virus Able to locate on infected Cell Surface and induce PH-dependent Cell Fusion." 12th NSV PISA, ITALY (2003.6.14-19)
- 2) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Wang, H., Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Takashima, I. : Antigenic and genetic diversity of hantaviruses isolated in far eastern Asian region. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology Malaysia (2003.12)
- 3) 荒木幸一、吉松組子、Byoung-Hee Lee、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：げっ歯類でのハンタウイルス持続感染成立メカニズム、第136回日本獣医学会学術集会青森 (2003.10)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

野生げっ歯類及びダニ類に由来する感染症の予防、診断及び疫学に関する研究

（分担研究項目：バベシア症の診断法の開発と疫学的研究）

分担研究者 辻 正義 酪農学園大学獣医学部実験動物学教室 助教授

研究要旨

B. microti は試験管内での人工培養ができないため、原虫をヒト赤血球で置き換えた SCID マウスへ接種する方法が、本原虫のヒトへ感染能を推定する唯一の方法である。NOD-scid マウスは、従来の C.B-17-scid マウスと比べヒト赤血球の生着性に優れており、この系統が赤血球置き換えマウスモデルの作成に有用であることが確認された。わが国での存在が確認されている 3 タイプ（穂別型、神戸型および北米型）の *B. microti* 様原虫の beta-tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し、その多様性を利用して、これら 3 タイプを迅速簡便に検出し型別できる PCR 法を開発した。わが国の *B. microti* 様原虫を媒介するマダニを特定するため、植生から採集したマダニのバベシア原虫保有状況を調査したところ、ヤマトマダニからかなり高頻度に穂別型が、北海道東部のシュルツェマダニからは北米型の *B. microti* および *B. divergens* 様の原虫が検出された。ハムスターへの媒介実験によって、ヤマトマダニおよびシュルツェマダニが、それぞれ、穂別型および北米型の *B. microti* のベクターであることが確認された。神戸型については、原虫を保有するマダニが検出されなかったため、ベクターの特定には至らなかった。

A. 研究目的

これまでに我々が中心となって進めてきたヒトバベシア症に関する疫学調査の結果、(1) 1999 年に見つかった国内初例は不顕性キャリアーからの輸血が原因であったこと、(2) わが国には抗原性および遺伝的性状の異なる 3 タイプの *Babesia microti* 様原虫（穂別型、神戸型、北米型）が存在すること、(3) 国内初症例は神戸型による感染であったが、全国的には穂別型が優占で、血清疫学調査から、この型の不顕性感染者がかなり存在すると推定されること、(4) アカネズミがこれらの 3 タイプの原虫の主要なレゼルボアであることなどが明かとなってきた。本年度は、これまでに我々が日本および近隣のユーラシア大陸の野ネズミ類生から分離あるいは検出した多くのバベシア原虫について、それらの多様性や相互の近縁関係を明らかにするため、beta-tubulin 遺伝子の塩基配列を調べ、進化系統解析を行った。また、わが国に存在するこれら 3 タイプの *B. microti* 様原虫を媒介するマダニは不明であったため、野外からマダニを収集し、それらのバベシア原虫の保有状況を調査するとともに、マダニからハムスターへの原虫媒介試験も行った。さらに、バベシア原虫がヒトへの感染能を有するか否かを調べるための実験系と

して有用なヒト赤血球置き換えマウスモデルについて、本実験モデルに使用するマウスの系統に関する基礎的検討も行った。

B. 研究方法

1) NOD-scid および C.B17-scid マウスにおけるヒト赤血球の寿命の測定

ヒト赤血球を生体蛍光染色試薬 PKH26 を用いて蛍光標識した。NOD/shi-scid および C.B17/Jcl-scid マウスに標識赤血球を接種し、経時的に採血を行った。顕微鏡下で蛍光標識された血球数を数えることにより末梢循環血液中のヒト赤血球残存率を測定した。

2) beta-tubulin 遺伝子の進化系統解析と型特異的 PCR 法の開発

米国およびヨーロッパ由来の実験室株に加えて、これまでに我々が日本各地で捕獲した野生げっ歯類からの分離株、ならびに、中国新疆ウイグル自治区、極東ロシアのウラジオストック近郊および韓国で捕獲された野鼠類の血液検体から検出された *B. microti* の DNA について、beta-tubulin 遺伝子を PCR で増幅し、それらの塩基配列を決定した。得られた塩基配列をアライメントし、近隣結合法により進化系統解析を行った。穂別型、神戸型および北米型のそれぞれの beta-tubulin 遺伝子の中で最も多様性に富んだ領域を見つけ、それらに相補的な PCR プライマーを設定した。どの *B. microti* 型にも共通なユニバーサルプライマーで1回目の PCR 増幅を行い、これに続いて、型特異的プライマーセットを用いた2回目の PCR を行う方法により、各型を特異的に検出できる型特異的 nested PCR を開発した。複数の検体について、型特異的 PCR 結果が、従来の 18S rRNA 塩基配列に基づく型別の結果と一致することを確認した。

3) マダニの収集

北海道内の5ヶ所（穂別、富良野、愛別、幌延、網走、根室）と淡路島で行い、植生からの旗ずり法により約4000匹のマダニを採取した。種の同定は形態の特徴にもとづいて行った。各採取地域ごとに同種のマダニ3~5匹程度をプールし、SDS-Proteinase K 溶液中でホモジェナイザーを用いてよくすりつぶした後、フェノール法でDNA抽出を行った。バベシア原虫の検出は、*Babesia* 属の複数原虫種を広く検出できるプライマーセット、および、*B. microti* の18S rRNA に特異的なプライマーセットの両者を用いた nested PCR により行った。*B. microti* の型別は、上述の β -tubulin 遺伝子を標的とした型特異的 PCR によって行った。

4) マダニからハムスターへの原虫媒介実験

穂別型の原虫については、原虫汚染が確認されている地域で採集したヤマトマダニを直接ハムスターに吸血させる方法、および、それらのマダニに吸血刺激を与えた後、だ液線を採取し、そのホモジェネ

ートをハムスターへ接種する方法の2つを試みた。シュルツェマダニについては、実験室飼育で得られた幼ダニを北米型原虫を感染させたハムスターに吸血させることによって原虫を保有させ、次ステージの若ダニを非感染ハムスターへ吸血させることにより、媒介を試みた。

C. 研究結果

1) NOD-*scid* および C.B-17*scid* マウスにおけるヒト赤血球寿命

住血原虫モデルとなるヒト赤血球置き換えマウス作成の正否は、使用するマウスの系統によって大きく左右される。この要因を調べるため、NOD-*scid* および C.B-17*scid* マウスにおけるヒト赤血球寿命を調べた。マウス末梢循環中のヒト赤血球のクリアランス曲線は、C.B-17*scid* では1相性で半減期 3.9 時間であったのに対し、NOD-*scid* では投与後1時間以内の急激な減少（半減期 4.9 時間）およびそれ以降の緩やかな減少（半減期 16.3 時間）の2相性を示した。C.B-17*scid* ではヒト赤血球のクリアランス曲線に大きな個体差が見られたが、NOD-*scid* では個体差は少なかった。カンジダ死菌やチオグリコレートなどの非特異的免疫付活化剤の投与により、C.B-17*scid* におけるヒト赤血球の排除は著しく亢進したが、NOD-*scid* におけるヒト赤血球の排除亢進はわずかであった。NOD-*scid* マウスにおける非特異的異物排除活性化機構の低応答性が、ヒト赤血球の生着性を高める一要因となっている可能性が示唆された。

2) beta-tubulin 遺伝子の系統解析および型特異的 PCR の開発

米国およびヨーロッパから分与された *B. microti* に加え、わが国および近隣のユーラシア大陸で検出あるいは分離された北米型 18SrRNA 塩基配列を有する *B. microti* について、それらの beta-tubulin 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの原虫は同じ 18S rRNA 塩基配列を有するにもかかわらず、beta-tubulin 遺伝子に基づく進化系統解析の結果からは、3つのクラスターに明らかに別れることが判明した。すなわち、極東ユーラシア系統、北アメリカ系統 および 欧州・中国新疆系統の3つであり、これら3系統の原虫は抗原性の上でも交叉反応性に乏しく明瞭に互いを区別することができた。

beta-tubulin 遺伝子の塩基配列が rRNA 遺伝子より多様性に富んでいることに着目し、型特異的 nested PCR 法の開発を試みた。第1回目の PCR プライマーを北米型、神戸型、穂別型および Munich 型の全てに共通な塩基配列部分に設定し、第2回目の PCR プライマーを各型のそれぞれに特異的な部分に設定することで、PCR のみで *B. microti* 様原虫の検出と型別を同時に行うことが可能であった。本法による型別の結果は rRNA 遺伝子のシーケンシングによる結果と完全に一致することが確認され、簡便迅速な型別が可能となった。

3) 媒介マダニに関する野外疫学調査および媒介試験

B. microti 18S rRNA 特異的プライマーを用いた PCR で陽性であった 50 検体について、さらに *B.*

microti β -tubulin 特異的プライマーを用いて PCR を行ったところ、ヤマトマダニ 36 検体 (6.3%) およびシュルツェマダニ 2 検体 (0.3%) が陽性であった。これら 33 の陽性検体について、神戸型、穂別型、北米型の各 β -tubulin に特異的なプライマーを用いた型特異的 PCR を行ったところ、ヤマトマダニの 31 検体は全てが穂別型、シュルツェマダニの 2 検体は共に北米型であった。神戸型の原虫はどのマダニからも検出できなかった。以上の結果から、わが国における穂別型および北米型の *B. microti* 様原虫のベクターはそれぞれヤマトマダニおよびシュルツェマダニである可能性が示唆された。

ヤマトマダニが穂別型原虫のベクターであることを証明するため、実験室飼育のヤマトマダニの幼ダニから感染若ダニ 196 匹を作成し、ハムスターへの吸血媒介試験を行った。また、野外より採集したヤマトマダニ 60 匹についても同様に媒介試験を試みた。しかし、いずれの試験でも、マダニの原虫保有は確認されたものの、ハムスターへの媒介は成立しなかった。そこで次に、吸血媒介ではなく、ダニ唾液腺乳剤の直接接種を試みた。穂別型原虫の常在地で採集したマダニを 4 日間吸血させ、半飽血マダニを作成した。マダニ 25 を 1 群としてブリードし、それらの唾液腺乳剤をハムスター (2 匹/1 群) に接種した。乳剤の一部から抽出した DNA について穂別型原虫の有無を PCR で判定した。原虫陽性であった乳剤は 1 検体だけで、これを接種した 2 匹のハムスターでのみ原虫感染が認められ、それら以外では感染を確認できなかった。以上の成績から、野外のヤマトマダニが穂別型の感染性スポロゾイトを唾液腺内に保有していることを初めて証明することができた。マダニによる吸血媒介が成功しなかった理由は不明であるが、ハムスターと本来の宿主動物との違いによるものかもしれない。

シュルツェマダニが北米型原虫のベクターであることを証明するため、道東地方の野鼠から分離された北米型 *B. microti* NM69 株および実験室飼育シュルツェマダニの幼ダニを用いて媒介試験を試みた。NM69 株を感染させたハムスター(寄生率が 4~18%)に幼ダニを吸血させ、吸血開始後 3~4 日めに飽血落下した幼ダニ 3396 匹を作成した。これらを 25°C 飽和湿度条件下で飼育したところ、21 日目から脱皮が始り、約 80% が若ダニに成長した。経時的にダニから DNA を抽出し PCR で原虫残存状況を追跡したところ、飽血落下から脱皮前までは 100% 陽性であったが、脱皮後 1 ヶ月間の陽性率は 10%~40% であった。脱皮後 1 ヶ月以上経過させた若ダニ 302 匹を非感染ハムスター 13 匹に吸血させたところ、209 匹が飽血落下した。これら全てを PCR した結果、陽性は 10 匹 (4.8%) のみであった。3~4 週間後に、6 匹のハムスターで血液塗抹中に原虫を確認できたが、残り 7 匹については 3 ヶ月経ても原虫が出現せず PCR も陰性であった。以上のことから、シュルツェマダニは stage-to-stage で北米型の *B. microti* を媒介することが判明したが、幼ダニ時に取り込まれた原虫は次ステージへの成長過程でかなり減少することから媒介効率は高くないと考えられた。

バベシア属の原虫種を広く検出する PCR プライマーを用いることにより、北海道のマダニから *B. divergens* に近縁な 2 種類の原虫 (Kbs7-7 および Etb5) を検出した。しかし、これらの原虫の 18SrRNA 塩基配列は、欧州の *B. divergens* の配列とだけでなく、米国のシカ類に寄生する *B. odocoilei* の配列とも高い類似度 (97.9~99.4%) を示したため、rRNA 遺伝子情報だけから原虫種の同定を行うのは困難で

あった。そこで、これらの原虫の近縁関係をより明確にする目的で、beta-tubulin 遺伝子の塩基配列を調べ系統解析を試みた。Kbs7-7、Etb5、*B. divergens* MRNK 株 および *B. odocollei* Engeling 株の4つについて、beta-tubulin のアミノ酸 18 番～404 番に相当する領域を PCR で増幅した。得られた DNA のサイズは約 1.2kb で、5'末端付近に1つのイントロンを含んでいた。エクソン部分の塩基配列の類似度は、Kbs7-7 と *B. divergens* との間で 97.9%と最も高く、それ以外の組み合わせでも 89.9%～91.8%であった。一方、イントロン塩基配列の類似度は、Kbs7-7 と *B. divergens* との間でのみ非常に高かった(93%) が、それ以外の組み合わせでは 55～67%しかなかった。以上の結果から、わが国で検出された2種類の *B. divergens* 様原虫のうちの1つは、欧州の *B. divergens* と同種あるいは亜種である可能性が示された。

D. 考察

今日までに記載のあるバベシア原虫種は実に 100 種近くにもものぼるが、それらのうち、ヒトへの起病性が確定しているものは、*Babesia microti* と *Babesia divergens* の2種のみである。他の原虫種については、一般にヒトへの起病性はないか 或は 低いと信じられているが、そのことを証明する実験的根拠は乏しい。その主な原因は実験手段がないことで、事実、多くのバベシア原虫では試験管内での培養系が確立しておらず、ヒト赤血球への感染能を調べることは困難である。我々が開発したヒト赤血球置き換えモデルは、現時点で、このことを調べるのできる唯一の実験方法であるが、未だ多くの技術的問題をかかえており、必ずしも使いやすいモデルではない。本研究において、T および B 細胞の両者を欠損する SCID マウスにおけるヒト赤血球の生着性が、マウスの系統・遺伝的背景により大きく異なる理由の一端が明らかとなった。ごく最近、IL-2 受容体ノックアウトマウスと NOD - scid マウスを掛け合わせるにより、ナチュラルキラー細胞活性をほぼ完全に欠損させた NOG-scid マウスと呼ばれる次世代型の SCID マウスが開発されており、今後、赤血球置き換えモデルにおけるこのマウスの有用性についても検討する予定である。

野生小型げっ歯類に寄生するバベシア原虫については北米や欧州で古くから報告があり、北半球温帯全域には、*B. microti* と称されるただ1種類の均一な原虫集団が分布しているものと思われてきた。ところが最近、我々が日本の野鼠から北米のもの(狭義の *B. microti* =北米型)とは異なる rRNA 塩基配列を持った2種類の *B. microti* 様原虫(神戸型と穂別型)を相次いで分離したことから、*B. microti* と称される原虫には幾つかの遺伝子型(別種あるいは亜種の可能性もある)が存在することが判明した。また、我々は実験室株としていくつかの研究で用いられている欧州由来の Munich 株が北米型、神戸型および穂別型のいずれとも異なることも見つけた。このような状況から、疫学調査で *B. microti* 様原虫を検出・分離した場合、それらがどの遺伝子型なのかを判別する必要性が生じてきた。しかし、正確な遺伝子型別には rRNA 遺伝子のほぼ全長をシーケンシングする必要があり、そのことが迅速な調査の進展を阻む大きな要因となってきた。今回、型特異的 PCR 法が開発されたことで、今後の疫学調査が大きく

スピードアップすると期待される。

本研究における最も重要な成果の一つは、わが国に存在する3タイプの *B. microti* 様原虫の中の2つについて、それらを媒介するマダニ種を特定することができたことであろう。ヤマトマダニは全国的に広く分布しており、これまでに穂別型原虫が検出された地域 および レゼルボアであるアカネズミの生息域とも一致している。北米型の原虫が北海道で検出され、シュルツェマダニがそのベクターであることが確定した。シュルツェマダニはライム病ボレリアのベクターでもあることも確定していることから、本マダニの活動期におけるアウトドア活動に際しては十分な警戒を呼びかける必要がある。今回の調査では、神戸型原虫を保有するマダニは全く検出されなかったため、どのマダニが神戸型のベクターであるのか不明である。しかし、ヤマトマダニについては、神戸型の原虫を保有していた野鼠が捕獲された場所と同じ所で多数収集したにもかかわらず、穂別型のみしか検出されていないことから、ベクターである可能性は低いと思われた。

本研究におけるもう一つの重要な成果は、ヨーロッパにおけるヒトバベシア症の原因とされる *B. divergens* (あるいはその近縁種) が日本にも存在することが初めて確認されたことである。この原虫による感染はこれまでに 30 例程度しか報告されていないが、発症すると急性で致命的転帰をとることが多いため、非常に恐れられている。ヨーロッパではウシが自然宿主と考えられているが、わが国でレゼルボアとなる動物は不明である。原虫が分離されていないため、その形態的特徴や増殖様式、抗原性状性などについても全く不明である。ヨーロッパのものと同じ種であるのかどうかについても、更に厳密な検討を重ねる必要がある。

E. 結論

ヒト赤血球置き換え SCID マウスモデルは、人工培養のできない *B. microti* のヒトへ感染性を推定できる唯一の実験方法である。NOD-scid マウスは、従来の C.B-17scid マウスに比べヒト赤血球の生着性に優れており、この系統が赤血球置き換えマウスモデルの作成に有用であることが確認された。わが国での存在が確認された3タイプ(穂別型、神戸型および北米型)の *B. microti* 様原虫の beta-tubulin 遺伝子に見られる塩基配列の多様性を利用して、これら3タイプを迅速簡便に検出・型別できる PCR 法を開発した。わが国および近隣のユーラシア大陸に北米型の *B. microti* が分布することが確認されたが、それらは米国の分離株とは抗原性が異なるため、血清診断用の抗原として米国標準株ではなく日本の分離株を用いる必要があることが分かった。マダニのパベシア原虫保有状況調査およびハムスターへの媒介試験の結果、ヤマトマダニおよびシュルツェマダニが、それぞれ、穂別型および北米型の *B. microti* のベクターであることが判明した。神戸型を媒介するマダニは特定できなかった。北海道のマダニから *B. divergens* 様の原虫が初めて検出された。

F. 健康危険情報

ヨーロッパにおけるヒトバベシア症の原因とされる *Babesia divergens* (あるいはその近縁種) が日本にも存在することが初めて確認された。本原虫による感染はごく稀にしか起きないが、脾臓摘除の既往歴がある患者では非常に急性で致死的となるケースが多いので、迅速な診断と早期治療が極めて重要である。1999年に国内初症例が確認された *Babesia microti* によるヒトのバベシア症に関しても、それまでは、米国北東部に限局して見られる風土病で、日本には存在しないと思われていたことが診断と治療を遅らせた。現在でも、臨床現場で、バベシア症がわが国で起こり得るダニ媒介性人獣共通感染症であるとの認識はほとんどないので、特にマダニの活動時期を中心に、本病に対する警戒を呼び掛ける必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arai S., Tsuji M., Kaiho I., Murayama H., Zamot A., Wei Q., Okabe N., Kamiyama T., and Ishihara C. Retrospective seroepidemiological survey for human babesiosis in an area in Japan where a tick-borne disease is endemic. *J. Vet. Med. Sci.* 65 (3): 335-340, 2003.
- 2) Ishihara C., Zamoto A., Tsuji M., Wei Q., Azuma I., and Hioki K. Erythrocyte-replaced mouse model for hemoparasitic studies; comparison of NOD/shi-*scid* and C.B/Jcl-*scid* mouse upon acceptability of human erythrocytes. *J. Vet. Med. Sci.* 65(8): 831-837, 2003.
- 3) Zamoto A., Tsuji M., Wei Q., Cho S.-H., E-Hyun Shin E.-H., Kim T.-S., Leonova G. N., Hagiwara K., Asakawa M., Kariwa H., Takashima I., and Ishihara C. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the b-tubulin gene sequences. *J. Vet. Med. Sci.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 辻 正義、座本 綾、石原 智明、J. S. Gray, P. J. Holman わが国で検出された *Babesia divergens* 様原虫の β -tubulin 遺伝子に基づく系統解析、第 135 回日本獣医学会総会、東京都 2003 年 3 月 30~4 月 1 日。
- 2) 座本綾、坪井千絵子、辻正義、石原智明。わが国で分離された *Babesia microti* 様原虫のヒメネズミへの感染試験、第 135 回日本獣医学会総会、東京都 2003 年 3 月 30~4 月 1 日。
- 3) 座本 綾、辻 正義、浅川 満彦、石原 智明。エゾリスから検出された *B. microti* 様原虫、第 136 回日本獣医学会総会、青森市 2002 年 10 月 3~5 日。
- 4) 辻 正義、魏 強、座本 綾、川淵 貴子、石原 智明 *Babesia microti* 近縁種の CCT- η 遺伝子の比較、第 136 回日本獣医学会総会、青森市 2002 年 10 月 3~5 日。
- 5) 川淵 貴子、座本 綾、辻 正義、石原 智明。 *Babesia microti* 穂別株 35kDa/37kDa 主要膜抗原道

伝子の解析、第136回日本獣医学会総会、青森市 2002年10月3～5日。

6) 座本 綾、辻 正義、石原 智明 シュルツェマダニによる北米型 *Babesia microti* 媒介試験、第136回日本獣医学会総会、青森市 2002年10月3～5日。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L., Mizutani, T., Kariwa, H., Takahima, I.	Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnostics of tick-borne encephalitis.	J. Virol. Methods.	108	171-179	2003
Goto, A., Hayasaka, D., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.	A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness.	Vaccine	21	4043-4051	2003
Miyamoto, H., Kariwa, H., Araki, K., Lokugamage, K., Hayasaka, D., Cui, B. Z., Lokugamage, N., Ivanov, L. I., Mizutani, T., Iwasa, M.A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.	Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype	Arch. Virol	148	1543-1556	2003
Lokugamage, N., Kariwa, H., Lokugamage, K., Hagiya, T., Miyamoto, H., Iwasa, M.A., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Mizutani, T., Takashima, I.	Development of an efficient method for recovery of Puumala and Puumala-related viruses by inoculation of Mongolian gerbils	J. Vet. Med. Sci	65	1189-1194	2003
Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B-H., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J.	Hantavirus-specific CD8 ⁺ -T-cell responses in newborn mice persistently infected with hantavirus.	J. Virol.	77	8408-8417	2003
Kariwa, H., Tanabe, H., Mizutani, T., Kon, Y., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. Takashima, I.	Synthesis of <i>Seoul virus</i> RNA and structural proteins in cultured cells	Arch. Virol	148	1671-1685	2003

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Iwasaki, T., Takashima, I	Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model	Jpn. J. Vet. Res.	51	143-149	2004
薊和宏明	ハンタウイルス感染症の疫学	バムサ会誌	15	16-22	2004
Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Ogino, M., Okumura, M., Tsuchiya, K., Kareiwa, H., Arikawa, J.	Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species.	Arch. Virol	148	1885-1897	2003
Takakura, A., Goto, K., Itoh, T., Yoshimatsu, K., Takashima, I., Arikawa, J.	Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hantavirus antibody of rats using a recombinant nucleocapsid protein expressed in	Exp. Anim.	52	25-30	2003
Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B-H., Araki, K., Lundkvist, A., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.	Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing Hantaan or Seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test.	Clin. Lab. Immunol	10	154-160	2003
Yoshimatsu, K., Lee, B-H., Araki, K., Morimatsu, M., Ogino, M., Ebihara, H., Arikawa, J.	The multimerization of hantavirus nucleocapsid protein depends on type-specific epitopes.	J. Virol	77	943-952	2003
Arai, S., Tsuji, M., Maiho, I., Murayama, H., Zamoto, A., Wei, Q., Okabe, N., Kamiyama, T., Ishihara, C.	Retrospective seroepidemiological survey for human babesiosis in an area in Japan where a tick-borne disease is endemic.	J. Vet. Med. Sci.	65	335-340	2003

20030548

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。