

200400589A

厚生労働科学研究費

新興・再興感染症研究事業

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の
診断、疫学及び予防に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

平成 17 (2005) 年 3 月

主任研究者 高 島 郁 夫

北海道大学大学院獣医学研究科

目次

I. 総括研究報告

- 野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学
及び予防に関する研究 1
高島郁夫

II. 分担者研究報告

1. ハンタウイルス感染症の疫学 13
 莉和宏明
2. ハンタウイルス感染症の診断 20
 有川二郎
3. Q熱の診断と疫学 26
 福士秀人
4. ペットに寄生する節足動物による人獣共通感染症の疫学 29
 丸山総一
5. エルシニア感染症の疫学 34
 林谷秀樹
6. ダニ媒介性ウイルスの病原性 38
 岩崎啄也
7. バベシア感染症の診断法の開発と疫学 44
 辻 正義
8. 回帰熱の診断と疫学 50
 福長将仁

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 54

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 58

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

野生げっ歯類及び節足動物に由来する感染症の診断、疫学
及び予防に関する研究

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性の解明のために、感染性 cDNA クローンを作出し、E-タンパクと Ns5 タンパクのアミノ酸変異が神経毒力に相乗的に作用していることを明らかにした。ハンタウイルス属のアムールウイルスが一つの独立した血清型であることを明らかにした。マウスモデルを用いたハンタウイルスの持続感染の成立には、細胞性免疫の抑制が役割を果たしていると考えられた。Q 熱の病原体である *Coxiella burnetii* の国内分離株の多様性が示された。わが国で初めて猫ひっかき病患者から *Bartonella henselae* の分離に成功し、本症例にノミがベクターとして関与していたことを明らかにした。LAMP 法による *Yersinia pseudotuberculosis* および病原性 *Yersinia enterocolitica* の迅速診断法を開発した。これまで日本には神戸型および穂別型の *Babesia microti* のみが確認されていたが、北海道の根室地方に限局して北米型の *Babesia microti* が分布することを見出した。回帰熱ボレリア菌体表層抗原蛋白のエピトープ解析を行い、35Kda タンパクの 5 ヶ所の各々 15 アミノ酸上に抗原エピトープが存在することを示した。

研究分担者

苅和宏明・北海道大学・助教授
有川二郎・北海道大学・教授
福士秀人・岐阜大学・教授

丸山総一・日本大学・助教授
林谷秀樹・東京農工大学・助教授
岩崎琢也・長崎大学・教授
辻 正義・酪農学園大学・助教授
福長将仁・福山大学・教授

A. 研究目的

国内ではダニ媒介性脳炎の患者が発見され、原因ウイルスが分離された。ま

たハンタウイルス抗体陽性者、バベシア症患者、Q 熱患者、エルシニア感染症患者およびボレリア感染症患者在国内で確

認されている。これら 6 種の感染症については全国的な疫学調査が実施されていないため、汚染地や実際の患者数も不明のままである。海外ではダニ媒介性脳炎はロシアを中心にユーラシア大陸で毎年 10,000 人前後の患者発生があり、また新種のハンタウイルス性肺症候群の流行が北米、南米の諸国で発生し、これらの流行地へ渡航する日本人の感染が懸念されている。また日本へは毎年海外から 70 万匹以上のげっ歯類が輸入され、感染症の検査なしに愛玩動物として一般家庭で飼育されているため、上記の感染症にヒトが感染する危険性が存在する。そこで上記 6 種の感染症につき、精度の高い診断法を確立し、疫学調査を実施して国内汚染地の特定とヒトにおける感染状況の解明に努める。輸入げっ歯類について抗体調査と病原体分離の成績をもとに、リスクアナリシスを行い、検査体制を整える。また海外においても調査を実施し、疫学情報の収集と病原体分離を行う。新規ワクチン（ダニ媒介性脳炎）を開発するため、ウイルスの病原性の分子基盤を解明する。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎ウイルスの RNA レプリコンと感染性 cDNA クローンを作製し、マウスにおける病原性の分子基盤を解析する。ハンタウイルスの遺伝子組み換え技術により作出した抗原を用いた迅速で特異性の高い血清診断法を開発する。こ

れを用いたハンタウイルス感染症の国内および国外での疫学調査を実施し、ウイルスを分離して遺伝子性状と抗原性を調べる。Coxsackievirus を培養細胞に接種し、診断用抗原として蛍光抗体法を開発する。猫ひっかき病患者から *Bartonella henselae* を分離し、遺伝子性状を調べる。エルシニア感染症の迅速な遺伝子診断法および免疫学的診断法を開発する。バベシア症の疫学調査を日本国内およびユーラシア大陸各地で行い病原体の型別を行う。回帰熱ボレリアの菌体表層蛋白の一種 VmpP 遺伝子をクローニングし発現タンパクにおいてエピトープを特定する。

(倫理面への配慮)

ヒトの血清と剖検材料の採取はインフォームドコンセントに基づき行い、成績の公表は氏名を伏せて実施する。本研究における動物実験は各研究機関に属する動物委員会に計画を申請し、承認を得た後に実施する。ウイルスを用いた実験は P-3 実験室において行う。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎(TBE)：北海道で分離された TBE ウイルス Oshima 株の感染性 cDNA と RNA リプリコン感染細胞の作出に成功した。これを用いて E タンパクと Ns5 タンパクのアミノ酸変異が神経毒力に相乗的に影響していることを明らかにした。さらに以前に作出したウイ

ルス様粒子(VLPs)の細胞外分泌に影響するprMタンパク上のアミノ酸を同定した。

ハンタウイルス感染症：極東ロシアで疫学調査を実施し、ハンタウイルス属のアムールウイルスが一つの独立した血清型であることを解明した。マウスモデルを用いたハンタウイルスの持続感染機構の解明を行い、持続感染の成立には、細胞性免疫の抑制が役割を果たしていることが示された。

Q 熱：Coxiella 感染細胞を抗原とし間接蛍光抗体法を開発し、非特異反応がほとんどない抗体検出法として確立した。日本では分離した *Coxiella burnetii* 株の遺伝子型および抗原性が海外の株と異なることを見出した。

猫ひっかき病：わが国で初めて猫ひっかき病患者から *Bartonella henselae* の分離に成功した。分離株の遺伝子解析で、分離株の 16srRNA 遺伝子型はわが国の猫に主流の type I であり、さらに本症例にノミがベクターとして関与していることを明らかにした。

エルシニア感染症：LAMP 法による *Yersinia pseudotuberculosis* および病原性 *Yersinia enterocolitica* の迅速診断法を開発した。*Yersinia pseudotuberculosis* および病原性 *Yersinia enterocolitica* の産生する菌体外タンパクである YadA に対する抗体を用いた免疫磁気ビーズによる両菌の迅速診断法を開発した。

バベシア症：北東ユーラシア大陸（韓

国、中国新疆ウイグル自治区、極東ロシア）においては、日本にはほとんど存在しない北米型の *Babesia microti* が広く分布していることを明らかにした。日本には神戸型と穂別型の *Babesia microti* しか確認されていなかったが、北海道の根室地方に局限して北米型の *Babesia microti* が分布していることを示した。

回帰熱：回帰熱ボレリア菌体表層抗原蛋白(VlpP)のエピトープを 35Kda 蛋白の 5 ヶ所にそれぞれ 15 アミノ酸残基までに限定して同定した。

1) 考察

1993 年北海道上磯町で日本で初めてのダニ媒介性脳炎(TBE)の患者が発見された。その後の我々の疫学調査で原因の TBE ウイルス Oshima 株が患者発生地区のおとりの犬から分離された。TBE ウイルス Oshima 株の病原性の分子基盤を明らかにすることは、脳炎発症機序の解明と生ワクチンの開発に有用な情報を提供する。今回感染性 cDNA を用いた解析により、TBE ウイルスの E-タンパクと Ns5 タンパクの各々 1 個のアミノ酸の変異が相乗的に神経毒力の低下に関与していることが判明した。今回開発に成功した TBE ウイルスの RNA レプリコンとすでに開発済みのウイルス様粒子(VLPs)を組み合わせることで、ウイルスのバッ

ケーシングと組立ての詳細な情報を得ることが可能となった。

極東ロシアに流行するハンタウイルス属のアムールウイルスの抗原性について交差中和試験で調査したところ、新しい血清型であることが判明した。このことから今後血清疫学調査を実施して感染状況を調査する必要がある。ハンタウイルスのマウスにおける持続感染には、細胞性免疫が重要なことが示唆された。今後、野外において野生げっ歯の間で同様なことが起こっているか検討する必要がある。

Q 熱の病原体である *Coxiella burnetii* の国内分離株の遺伝子性状を調べた。72 株の内 49 株は慢性疾患型の遺伝子性状であった。各株の間には特異的な配列が存在したことから、日本の *C. burnetii* 株の多様性が示唆された。

多数のノミの寄生を受けた猫ひっかき病患者のリンパ節から *Bartonella henselae* を本邦で初めて分離した。また、猫ノミからも本菌の DNA が検出されたことから、本症例はノミを介した感染の可能性が示唆された。

エルシニア感染症で LAMP 法と免疫磁気ビーズ法による迅速診断法を開発したので、今後これらの診断法を用いた的確な診断と疫学調査が実施できる。

これまでわが国の *Babesia microti* は穂別型と神戸型しか分布しないと考えられていたが、今回根室地区に局限して北米型が分布していることが判明したので、今後北海道の北米型 *Babesia microti* の

由来と起源について検討する必要がある。

回帰熱ポレリアの菌体表層タンパクの 35Kda タンパクの抗原エピトープを 5 ヶ所各々 15 アミノ酸まで限定できたので、今後さらにエピトープを担うアミノ酸の最小単位まで同定する必要がある。

2) 結論

感染性 cDNA クローンを用いた TBE ウイルスの神経毒力の解析が可能となった。ハンタウイルスの新種の血清型アムールウイルスが確立されるとともに、マウスにおける本ウイルスの持続感染の成立に細胞性免疫の重要性が示唆された。*Coxiella burnetii* の国内における遺伝的多様性が明らかになった。国内の猫ひっかき病から初めて、*Bartonella henselae* が分離された。エルシニア感染症の LAMP 法と免疫磁気ビーズ法による迅速診断法が確立された。本邦にこれまで分布の報告のない北米型 *Babesia microti* が北海道根室地方に限定して分布していることが示された。回帰熱ポレリアの菌体表層タンパクの 35Kda タンパクのエピトープを 5 ヶ所のアミノ酸上に存在することを示した。

3) 健康危険情報

1) 都市近郊にも日本紅斑熱やツツガムシ病の病原体が分布している可能性がある。

2) ノミが猫ひっかき病のベクターとなる可能性がある。

3) 回帰熱ボレリアが国内に持ち込まれ、流行する素地があるため、流行地からの帰国者やげっ歯類とダニを介した侵入を防止する必要がある。

4) 研究発表

1) 論文発表

- 1) Yoshii, K., Konno, A., Goto, A., Nio, J., Obara, M., Ueki, T., Hayasaka, D., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I. : Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. J. Gen. Virol. 85, 3049-3058, 2004
- 2) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B-H, Okumura, M., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J. : Age-dependent hantavirus-specific CD8⁺ T-cell responses in mice infected with Hantaan virus. Arch. Virol. 149, 1373-1382, 2004
- 3) Hayasaka, D., Gritsun, T. S., Yoshii, K., Ueki, T., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., Iwasaki, T., Gould, E. A., Takashima, I. : Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. J. Gen. Virol. 85, 1007-1018, 2004
- 4) Hayasaka, D., Yoshii, K., Ueki, T., Iwasaki, T., Takashima, I. : Sub-genomic replicons of Tick-borne

encephalitis virus. Arch. Virol. 149, 1245-1256, 2004

- 5) Araki K, Yoshimatsu K, Lee B-H, Okumura M, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J : A new model of Hantaan virus persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8⁺ T-cell responses. Virology 322, 318-327, 2004
- 6) Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Akaki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. : Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome. Virus Research 101, 127-134, 2004
- 7) Iwasa, M. A., Kariwa, H., Cui, B. Z., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Hagiya, T., Mizutani, T., Takashima, I. : Modes of hantavirus transmission in a population of *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. Arch. Virol. 149, 929-941, 2004
- 8) Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Akaki, 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, 3-4,

- 2004
- 9) Lokugamage, N., Kariwa, H., Lokugamage, K., Iwasa, M. A., Hagiya, T., Yoshii, K., Tachi, A., Ando, A., Fukushima, H., Tuchiya, K., Iwasaki, T., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Tetsuya, T., Osawa, K. Sato, H. Takashima, I. : Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan. *Microbiol. Immunol.* 48, 843-851, 2004
- 10) Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B. H., Okumura, M., Arikawa, J. : Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 78(19),10776-10782, 2004
- 11) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B. H., Asano, A., Agui, T., Arikawa, J.: Epitope analysis of monoclonal antibody E5/G6, which binds to a linear epitope in the nucleocapsid protein of hantaviruses. *Arch. Virol*, 149, 2427-2434, 2004
- 12) Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., and Hirai, K.: Comparison of Japanese Isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and Sequence Analysis. *Microbiol. Immunol.* 48, 971-975, 2004
- 13) Hotta, A., Zhang, G. Q., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K.: Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 66,1289-1291, 2004
- 14) Andoh M, Naganawa T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: In vitro susceptibility to tetracycline and fluoroquinolones of Japanese isolates of *Coxiella burnetii*. *Microbiol. Immunol.* 48, 661-664, 2004
- 15) Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M., Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi, H., Sasaki, E., Yoshida, H., Izumikawa, K.: First isolation of Bartonella henselae type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol. Immunol.* 48, 103-109, 2004
- 16) 丸山総一 : 猫ひっかき病、モダンメデア、50, 203-211, 2004
- 17) Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakadai, A., Okatani, A. T., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y., Hayashidani, H.: Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5349-5352, 2004
- 18) Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakadai, A. T., Horikita, T., Hayashidani, H.: Sensitive and specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*(in submitted).
- 19) Zamoto, A., Tsuji, M., Kawabuchi, T., Wei, Q., Asakawa, M., Ishihara, C.: U.S.-type Babesia microti isolated from small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 919-926 2004
- 20) Zamoto, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, S.-H., Shin, E.-H., Kim, T.-S., Leonova, G. N, Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima,

- I., Ishihara, C. : Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. *J. Vet. Med. Sci* 66, 785-792, 2004
- 21) Watanabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., Inokuma, H.: Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Vet. Parasitol.* 124, 101-107, 2004
- 22) Shao, R. Aoki, Y. Mitani, H. Tabuchi, N. Barker, S.C., Fukunaga, M.: The mitochondrial genomes of soft ticks have an arrangement of genes that has remained unchanged for over 400 million years. *Insect Mol Biol* 13, 219-224, 2004
- 23) Mitani, H., Talbert, A., Fukunaga, M.: New World relapsing fever *Borrelia* found in *Ornithodoros porcinus* ticks in central Tanzania. *Microbiol. Immunol.* 48, 501-505, 2004
- 24) Shao, R., Barker, S. C., Mitani, H., Aoki, Y, Fukunaga, M.: Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian *Ixodes* ticks. *Mol. Biol. Evol.* 22(3), 620-629, 2004

2. 学会発表

- 1) 三好洋嗣、白戸憲也、苺和宏明、高島郁夫：共通プローブを用いたリアルタイム PCR 法によるウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの検出：第 137 回日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 2) 白戸憲也、三好洋嗣、後藤明子、赤穂芳彦、植木智隆、苺和宏明、高島郁夫：West Nile ウイルスのエンベロープ蛋白における糖鎖付加領域がマウスへの神経侵襲性に与える影響：第 137 回日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 3) 川上和江、好井健太郎、後藤明子、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み替え蛋白を用いた ELISA による野ネズミ血清スクリーニング法の開発：第 137 回日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 4) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、苺和宏明、高島郁夫：replicon を利用したフラビウイルス様粒子の作成：第 137 回日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 5) 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 E 蛋白の糖鎖修飾がウイルス粒子分布に与える影響：第 137

- 回 日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 6) 苜和宏明、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの不活化条件の検討：第 137 回 日本獣医学会 藤沢 (2004. 4)
- 7) 好井健太郎、後藤明子、川上和江、苜和宏明、高島郁夫：フラビウイルスのウイルス様粒子分泌におけるユビキチン-プロテアソーム系の関与：第 138 回日本獣医学会 札幌 (2004. 9)
- 8) Nandadeva Lokugamage、苜和宏明、Kumari Lokugamage、岩佐真宏、萩谷友洋、好井健太郎、舘敦史、安藤秀二、福島博、土屋公幸、岩崎琢也、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan: 第 138 回 日本獣医学会 札幌 (2004. 9)
- 9) 谷川洋一、苜和宏明、Nandadeva Lokugamage、萩谷友洋、Kumari Lokugamage、舘敦史、好井健太郎、岩佐真宏、高島郁夫：タイリクヤチネズミから分離された Puumala 型近縁ハンタウイルスの遺伝子解析：第 138 回 日本獣医学会 札幌 (2004. 9)
- 10) 舘敦史、苜和宏明、Kumari Lokugam age、Nandadeva Lokugamage、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：Amur 型ハンタウイルス糖蛋白の哺乳類細胞での発現と抗原性解析：第 138 回日本獣医学会 札幌 (2004. 9)
- 11) 高島郁夫：日本と極東ロシアのダニ媒介性脳炎ウイルスの系統解析と病原性：第 52 回 日本ウイルス学会 横浜 (2004. 11)
- 12) 苜和宏明、ロクガマゲ ナンダデバ、谷川洋一、ロクガマゲ クマリ、舘敦史、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：タイリクヤチネズミからの新型ハンタウイルスの分離および宿主とウイルスの共進化の解析：第 52 回 日本ウイルス学会 横浜 (2004. 11)
- 13) 岡林環樹、横田伸一、伊木繁雄、横沢紀子、苜和宏明、高島郁夫、堤裕幸、藤井暢弘：重症急性呼吸器症候群コロナウイルスのサイトカイン誘導性：第 52 回 日本ウイルス学会 横浜 (2004. 11)
- 14) 白戸憲也、三好洋嗣、後藤明子、赤穂芳彦、植木智隆、苜和宏明、高島郁夫：ウエストウイルスのエンベロープ蛋白における糖鎖付加領域がマウスへの神経侵襲にあたる影響：第 52 回 日本ウイルス学会 横浜 (2004. 11)
- 15) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、苜和宏明、小西英二、高島郁夫：

- レプリコンを利用したフラビウイ
 ルスのキメラ様粒子の作成:第 52
 回 日本ウイルス学会 横浜
 (2004. 11)
- 16) 舘敦史、苅和宏明、Lokugamage
 Kumari、Lokugamage
 Nandadeva、谷川洋一、好井健
 太郎、吉松組子、有川二郎、高島
 郁夫: Amur 型ハンタウイルス糖
 蛋白の哺乳類細胞での発現と抗原
 性解析: 第 52 回日本ウイルス学
 会 横浜 (2004. 11)
- 17) 谷川洋一、苅和宏明、Lokuga-
 mage Nandadeva、Lokugamage
 Kumari、舘敦史、好井健太郎、
 吉松組子、有川二郎、高島郁夫:
 タイリクヤチネズミ
Clethrionomys rufocanus から
 分離された Puumala 型近縁ハン
 タウイルスの遺伝子解析: 第 52
 回 日本ウイルス学会 横浜
 (2004. 11)
- 18) 三好洋嗣、白戸憲也、苅和宏明、
 高島郁夫: Real-Time PCR による
 ウエストナイルウイルスと日本脳
 炎ウイルスの検出: 第 52 回 日
 本ウイルス学会 横浜 (2004.
 11)
- 19) Yoshimatsu, K., Ogino, M., Lee,
 B. H., Araki, K., Okumura, M.,
 Konno, A., Kariwa, H., Arikawa,
 J.: Studies on secretion of
 soluble recombinant envelope
 glycoproteins of Hantaan virus.
 The 6th International
 Conference on Hemorrhagic
 Fever with Renal Syndrome
 (HFRS), Hantavirus Pulmonary
 Syndrome (HPS) and
 Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 20) Araki, K., Yoshimatsu, K., Lee, B.
 H., Kariwa, H., Takashima, I.,
 Arikawa, J.: A new model of
 Hantaan virus (HTNV)
 persistence in mice: the
 balance between HTNV
 infection and CD8+ T-cell
 responses. The 6th
 International Conference on
 Hemorrhagic Fever with Renal
 Syndrome (HFRS), Hantavirus
 Pulmonary Syndrome (HPS) and
 Hantaviruses, Korea (2004.
 6) Okumura, M., Yoshimatsu, K.,
 Lee, B. H., Araki, K., Arikawa, J.:
 Cell tropism of vesicular
 stomatitis virus(VSV)
 pseudotypes bearing Hantaan
 or Seoul Virus envelope
 proteins. The 6th International
 Conference on Hemorrhagic
 Fever with Renal Syndrome
 (HFRS), Hantavirus Pulmonary
 Syndrome (HPS) and
 Hantaviruses, Korea (2004. 6)
- 21) Lee, B. H., Yoshimatsu, K., Araki,

- K., Okumura, M., Arikawa, J.: Antibody response of Mice Immunized with Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus incorporated Hantaan virus Envelope Glycoproteins. The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 22) Pattamadilok, S., Kumperasart, S., Yoshimatsu, K., Lee, B. H., Arikawa, J., Dangsupa, P. Panla, P.: Serological observation of Thailand virus infection in human and rodent in Thailand." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 23) Kariwa, H., Hagiya, T., Miyamoto, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Tachi, A., Tanigawa, Y., Iwasa, M., Araki, K., Ivanov. L. I., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I : "Diversity of hantaviruses circulating in Far East Russia. The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 24) Lokugamage, K., Kariwa, H., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Iwasa, M., Hagiya, T., Araki, K., Tachi, A., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Genetic and antigenic characterization of Chinese hantavirus isolates related to Amur and Far East genotypes." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 25) Thang, T. T., Ninh, T. U., Yoshimatsu, K., Lee, B. H., Araki, K., Arikawa, J.: Serology hantavirus in human and rodent at Vietnam in 2003. The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 26) Schmidt, J., Jandrig, B., Khoprasert, Y., Klempa, B., Yoshimatsu, K., Arikawa, J.,

- Meisel, H., Niedrig, M., Kruger, D. H., Jakel, T., Ulrich, R.: Detection of hantavirus-reactive sera in wild-trapped rodents from Thailand by newly developed immunological assays based on yeast-expressed Seoul virus nucleocapsid proteina." The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrom (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses, Korea (2004.6)
- 27) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Wang, H., Kariwa, H., Lokugmage, K., Lokugamage, N., Lee, B. H., PattaMadilok, S., Kumperasart, S., Takashima, I.: " Global distribution of hantavirus in Eurasian Continent - Relation between Asian and European hantaviruses." 4th Croatian Congress on Infectious Diseases with international participation, Opatija, Croatia (2004.10)
- 28) 吉松組子、荒木幸一、奥村恵、中村一郎、有川二郎：ハンタウイルス感染マウスにおける CD8+T 細胞エピトープの解析、第 52 回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 29) 中村一郎、LEE Byoung-Hee、吉松組子、奥村恵、荒木幸一、苅和宏明、有川二郎：タイにおける Thailand 型ハンタウイルス感染症の血清学的解析およびウイルス遺伝子の解析、第 52 回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 30) 奥村恵、吉松組子、LEE Byoung-Hee、荒木幸一、中村一郎、有川二郎：シュードタイプウイルスによるハンタウイルスの細胞トロピズムの解析、第 52 回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 31) 辻 正義. わが国におけるヒトのバベシア症. 第 52 回日本輸血学会、札幌 (2004.6)
- 32) 辻 正義. 動物由来感染症；東アジアにおけるヒトのバベシア症. 台湾との合同シンポジウム；動物の感染症と検疫、札幌 (2004.10)
- 33) 辻 正義、岡 秀樹、高橋弥生、石原智明. *Babesia rodhaini* のヒト赤血球順化と弱毒化の関性. 第 138 回日本獣医学会 札幌 (2004. 9)
- 34) 中嶋留衣、辻 正義、石原智明. *B. microti* およびゲノム解析の進んだ真核生物の CCT-etha 遺伝子の構造比較、第 138 回日本獣医学会 札幌 (200. 9)

- 35) 川淵貴子、辻 正義、石原智明。
Babesia microti/Ho6 リピート配列の分離株別マーカーとしての有用性。第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004. 9)
- 36) 新井 智、田原研司、板垣朝男、松田裕朋、辻 正義、石原智明、岡部信彦。ダニ媒介性疾患の流行している島根県で確認された *Anaplasma ataceae* の遺伝子、第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004. 9)
- 37) 萩原喜久美、久保正法、納谷裕子、児玉正義、大橋和彦、小沼 操、萩原克郎、辻 正義、石原智明、岸川正剛。In vitro 系におけるウシ血液由来接着培養細胞内で培養された *Theileria orientalis* の超微形態学的観察。第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004. 9)
- 38) 辻 正義、桑原さと子、西田あつみ、石原智明。 *Babesia rodhaini* のヒト赤血球への順化とそれに伴う毒力変化。第 137 回日本獣医学会、藤沢 (2004. 4)
- 39) 座本 綾、辻 正義、石原智明。ヤマトマダニからの穂別型 *B. microti* 様原虫の分離。第 137 回日本獣医学会、藤沢 (2004. 4)
- 40) Malaika Watanabe、猪熊 壽、奥田 優、辻 正義、Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi Prefecture and surrounding areas。第 137 回日本獣医学会、藤沢 (2004. 4)

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

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

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 苺和 宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。我々は極東ロシアにおいて様々なハンタウイルスが分布しており、少なくとも Amur(AMR)型と Far East(FE)型という2種類の異なったウイルスが重症型 HFRS の原因ウイルスとなっていることを明らかにした。これらのウイルスについての遺伝子解析と抗原解析を実施したところ、AMR 型はこれまで知られていた Hantaan(HTN)型とは明らかに異なることが判明した。一方、FE 型は HTN 型の中の一つのサブタイプに位置づけられると考えられた。わが国に生息する野生げっ歯類の捕獲調査を全国規模で実施し、本州ではアカネズミとドブネズミがハンタウイルス抗体を保有すること、北海道ではドブネズミ、クマネズミ、およびタイリクヤチネズミがウイルスを保有することが明らかになった。

A. 研究目的

腎症候性出血熱 (HFRS) は、ハンタウイルスによって引き起こされるウイルス性人獣共通感染症である。本症は世界中に分布しており、臨床的には高熱、出血症候と腎機能障害を主徴とする重篤な疾患である。本ウイルスの病原巣動物は野生げっ歯類であり、現在有効なワクチンがわが国に存在しないことから、疫学的情報を得ることが本症の予防対策や公衆衛生の向上のために重要となる。我々は重症型 HFRS の流行地である極東ロシアで本研究では、Amur(AMR)型と Far East(FE)型という異

なったハンタウイルスが HFRS の原因となっていることを明らかにした。本研究では、AMR 型と FE 型のウイルスについて詳細な遺伝子解析と抗原解析を実施し、既知のウイルスと比較を行った。また、日本各地においてもげっ歯類の疫学調査を行って、わが国におけるハンタウイルスの流行地と病原巣動物の特定を試みた。

B. 研究方法

1. ハンタウイルス株

中国で HFRS 患者から分離された AMR

型の H5 株と B78 株、ならびに中国のセスジネズミから分離された FE 型の Bao14 株を Minimum essential medium (MEM) 培地を用いて Vero E6 細胞で増殖させ、遺伝子解析、ならびに抗原解析に用いた。

2. 遺伝子増幅法(PCR)によるウイルス遺伝子の増幅

ウイルス感染 Vero E6 細胞を Isogen (Nippon Gene)により乳化し、全 RNA を抽出した。ウイルスの糖蛋白をコードする M 遺伝子、および核蛋白をコードする S 遺伝子を標的として逆転写反応後、PCR を実施した。

3. ウイルス遺伝子の塩基配列の決定

PCR 産物を直接鋳型として用い、PRISM Dye Sequencing Kit (Applied Biosystems)により塩基配列の決定を行った。

4. 蛍光抗体法 (IFA)

ハンタウイルス感染 VeroE6 細胞を抗原として用い、血清を反応させた後、FITC 標識 protein G で染色してハンタウイルスの細胞質内抗原が検出される血清の最高希釈倍数の逆数を IFA 抗体価とした。

5. 中和試験

ウイルスと抗血清を等量混合し、37℃ で 1 時間保温し、Vero E6 細胞に接種した。1 時間の吸着後、接種液を捨てて Calboxy methyl cellulose 可 MEM を重層し、CO₂ インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、重層液を捨て、感染細胞を固定後、IFA にて細胞を染色してウイルスのフォーカスを計数した。フォーカス形成を 80%以上抑制する血清希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

6. 小型野生哺乳類の捕獲とハンタウイルス抗体の検出

北海道、本州、四国、および九州の様々な地区でげっ歯類および食虫類 1,221 匹を捕獲した。その内訳は、アカネズミ 482 匹、ドブネズミ 364 匹、クマネズミ 45 匹、およびタイリクヤチネズミ 197 匹、ヒメネズミ 59 匹、ミカドネズミ 22 匹、その他のげっ歯 31 匹、および食虫類 21 匹であった。これらの動物の血清について IFA によってハンタウイルス抗体の検出を行った。

7. 自衛隊員におけるハンタウイルスの抗体調査

北海道の陸上自衛隊員 207 例の血清を採集し、IFA、Western blot および ELISA によりハンタウイルス抗体の有無について検査を行った。

C. 研究結果および考察

AMR 型の H5 株と B78 株、ならびに FE 型の Bao14 株について、S と M 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定し、他のハンタウイルスとの比較を行った。その結果、AMR は HTN と S 遺伝子と M 遺伝子の一致率がそれぞれ 96.7%と 92.0%であり、遺伝子性状の上からある程度異なったウイルスと考えられた。一方、FE は HTN と S 遺伝子と M 遺伝子の一致率がそれぞれ 99.1%と 97.1%と非常に近縁であることが判明した。また、これらのウイルス株感染 Vero E6 細胞を IFA によって各種モノクローナル抗体との反応パターンを検討した。一つのモノクローナル抗体が AMR で完全に反応性が消失していた以外は、HTN、AMR および FE の反応性は非常に類似していた。

交差中和試験によってさらに詳細な抗原性解析を行ったところ、AMR 感染ハントウアカネズミ血清は AMR に対して HTN および FE よりも 8 倍以上高い中和抗体価を示した。一方、抗 FE および抗 HTN マウス血清は FE と HTN に対してほぼ同等の高い中和抗体価を示したのに対し、AMR には 4 倍以下の抗体価を示した。以上の交差中和試験の結果から、AMR は HTN および FE とは抗原性が明らかに異なることが判明した。また、FE は HTN 型に抗原性状が非常に類似することも明らかになった。これらのウイルス株の遺伝子解析と抗原解析から AMR 型は HTN 型とは異なるウイルスに属するが、FE 型は HTN 型のサブタイプであることが強く示唆された。

北海道、本州、四国、および九州において合計 1,221 匹のげっ歯類と食虫類の捕獲を行い、ハンタウイルス抗体の保有状況について調査を行った。その結果、アカネズミ(5/482, 1.0%)、ドブネズミ(4/364, 1.1%)、クマネズミ(3/45, 6.7%)、およびタイリクヤチネズミ(7/197, 1.1%)に抗体陽性例が見られた。函館港で捕獲されたクマネズミからハンタウイルスの S 遺伝子の一部が PCR によって検出され、塩基配列を決定したところ、Seoul(SEO)型ウイルスの SR-11 株との一致率は 98.7%であった。本州では鳥根県と富山県でアカネズミの陽性例が検出された。今後、アカネズミの保有するウイルスについて詳細な解析が必要と思われる。また、本州と北海道の複数の地点でドブネズミとクマネズミが SEO 型ハンタウイルスに感染していることが明らかになったことから、全国的なドブネズミやクマネズミの抗体調査が必要と考

えられる。

自衛隊で演習に従事する自衛隊員はげっ歯類との接触の機会が一般人よりも高いと考えられる。そこで、207 例の北海道の陸上自衛隊員の血清について ELISA によりハンタウイルス抗体の保有状況を調べたところ、1 例の抗体陽性例が検出された。本血清を感染型鑑別用の ELISA に供したところ、本例は SEO 型ハンタウイルスの感染であることが判明した。したがって、日本においてヒトの SEO 型ハンタウイルス感染症の危険性が存在することが明確になった。

D. 結論

今回得られた成績から、極東ロシアで流行中の AMR 型と FE 型の遺伝子性状と抗原性状が明らかになった。これらの情報は将来的なワクチン開発などに有用であると考えられる。一方、わが国では AMR 型と FE 型の病原巣動物であるハントウアカネズミの生息域と生息数が著しく限られているため、重症型の HFRS は存在しない。しかし、今回の全国的な疫学調査の結果からドブネズミやクマネズミが人に病原性を有する SEO 型のハンタウイルスを保有していることが明らかになり、本ウイルスに対する人の抗体保有例のあることが判明した。ドブネズミやクマネズミは人の居住域と近接した環境に生息することから、人におけるハンタウイルスの感染状況についてさらに大規模な疫学調査が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kariwa H, Fujii N, Takashima I. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions, and chemical reagents. *Jpn J Vet Res.* 2004 52(3): 105-112.
- 2) Lokugamage N, Kariwa H, Lokugamage K, Iwasa MA, Hagiya T, Yoshii K, Tachi A, Ando S, Fukushima H, Tsuchiya K, Iwasaki T, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Mizutani T, Osawa K, Sato H, Takashima I. Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan. *Microbiol Immunol.* 2004 48(11): 843-851.
- 3) Shirato K, Miyoshi H, Goto A, Ako Y, Ueki T, Kariwa H, Takashima I. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J Gen Virol.* 2004 85(12): 3637-3645.
- 4) Yoshii K, Konno A, Goto A, Nio J, Obara M, Ueki T, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. *J Gen Virol.* 2004 85(10): 3049-3058.
- 5) Shirato K, Kimura T, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Different chemokine expression in lethal and non-lethal murine West Nile virus infection. *J Med Virol.* 2004 74(3): 507-513.
- 6) 苅和宏明 ハンタウイルス感染症 モデルメディア 2004 50(11): 252-258
- 7) Zamoto A, Tsuji M, Wei Q, Cho SH, Shin EH, Kim TS, Leonova GN, Hagiwara K, Asakawa M, Kariwa H, Takashima I, Ishihara C. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. *J Vet Med Sci.* 2004 66(7): 785-792.
- 8) Araki K, Yoshimatsu K, Lee BH, Okumura M, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J. Age-dependent hantavirus-specific CD8(+) T-cell responses in mice infected with Hantaan virus. *Arch Virol.* 2004 149(7): 1373-1382.
- 9) 苅和宏明 SARS ウイルスに対する消毒薬の抗ウイルス活性 メディカルコーナ - 2004 115(1): 1-3.
- 10) Araki K, Yoshimatsu K, Lee BH, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J. A new model of Hantaan virus persistence in mice: the balance between HTNV infection and CD8(+) T-cell responses. *Virology.* 2004 322(2): 318-327.
- 11) Iwasa MA, Kariwa H, Cui BZ, Lokugamage K, Lokugamage N, Hagiya T, Mizutani T, Takashima I. Modes of hantavirus transmission in a population of *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* inferred from mitochondrial and microsatellite DNA

analyses.

Arch Virol. 2004 149(5):929-941.

12) 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.

13) Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa M, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome. Virus Res. 2004 101(2): 127-134.

14) Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. J Gen Virol. 2004 85(4): 1007-1018.

2. 学会発表

1) 三好洋嗣、白戸憲也、苺和宏明、高島郁夫：共通プローブを用いたリアルタイム PCR 法によるウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの検出：第

137 回 日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

2) 白戸憲也、三好洋嗣、後藤明子、赤穂芳彦、植木智隆、苺和宏明、高島郁夫：West Nile ウイルスのエンベロープ蛋白における糖鎖付加領域がマウスへの神経侵襲性に与える影響：第 137 回 日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

3) 川上和江、好井健太郎、後藤明子、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み替え蛋白を用いた ELISA による野ネズミ血清スクリーニング法の開発：第 137 回 日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

4) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、苺和宏明、高島郁夫：replicon を利用したフラビウイルスのキメラウイルス様粒子の作成：第 137 回 日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

5) 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 E 蛋白の糖鎖修飾がウイルス粒子分泌に与える影響：第 137 回日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

6) 苺和宏明、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの不活化条件の検討：第 137 回日本獣医学会、藤沢(2004, 4)

7) 好井健太郎、後藤明子、川上和江、苺和宏明、高島郁夫：フラビウイルスのウイルス粒子分泌におけるユビキチン-プロテアソーム系の関与：第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004, 9)

8) Nandadeva Lokugamage, 苺和宏明, Kumari Lokugamage, 岩佐真宏、

- 萩谷友洋、好井健太郎、館敦史、安藤秀二、福島博、土屋公幸、岩崎琢也、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：
Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan：第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004, 9)
- 9) 谷川洋一、苺和宏明、Nandadeva Lokugamage、萩谷友洋、Kumari Lokugamage、館敦史、好井健太郎、岩佐真宏、高島郁夫：タイリクヤチネズミから分離された Puumala 型近縁ハンタウイルスの遺伝子解析：第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004, 9)
- 10) 館敦史、苺和宏明、Kumari Lokugamage、Nandadeva Lokugamage、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：Amur 型ハンタウイルス糖蛋白の哺乳類細胞での発現と抗原解析：第 138 回日本獣医学会、札幌 (2004, 9)
- 11) 苺和宏明、ロクガマゲ ナンダデバ、谷川洋一、ロクガマゲ クマリ、館敦史、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：タイリクヤチネズミからの新型ハンタウイルスの分離および宿主とウイルスの共進化の解析：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 12) 岡林珠樹、横田伸一、伊木繁雄、横沢紀子、苺和宏明、高島郁夫、堤裕幸、藤井暢弘：重症急性呼吸器症候群コロナウイルスのサイトカイン誘導性：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 13) 白戸憲也、三好洋嗣、後藤明子、赤穂芳彦、植木智隆、苺和宏明、高島郁夫：
ウエストナイルウイルスのエンベロップ蛋白における糖鎖付加領域がマウスへの神経侵襲性にあたえる影響：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 14) 好井健太郎、早坂大輔、後藤明子、苺和宏明、小西英二、高島郁夫：レプリコンを利用したフラビウイルスのキメラ様粒子の作成：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 15) 館敦史、苺和宏明、Kumari Lokugamage、Nandadeva Lokugamage、谷川洋一、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：Amur 型ハンタウイルス糖蛋白の哺乳類細胞での発現と抗原解析：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 16) 谷川洋一、苺和宏明、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、館敦史、萩谷友洋、館敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：タイリクヤチネズミ *Clethrionomys rufocanus* から分離された Puumala 型近縁ハンタウイルスの遺伝子解析：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜 (2004, 11)
- 17) 三好洋嗣、白戸憲也、苺和宏明、高島郁夫：Real-Time PCR によるウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの検出：第 52 回 日本ウイルス学会、横浜(2004, 11)
- 18) 中村一郎、Lee Byoung-Hee、吉松組子、奥村恵、荒木幸一、苺和宏明、有川二郎：タイにおける Thailand 型ハンタウイルス感染症の血清学的解析およびウイルス遺伝子の解析：第 52 回