

(倫理面からの配慮について)

特に無し

### C. 研究結果

2005年8月と2006年8月に極東ロシアにおいて捕獲された野鳥98羽のうち91羽の血液から血清を回収し、少容量中和試験により WNV および JEV 抗体の検出を行った。野生動物から得た血清には様々な微生物に対する抗体が含まれ、非特異反応も少なくないと考えられることから、中和抗体価が80倍以上となった血清を中和抗体陽性とする事とした。

その結果、91例のうち15例の血清がWNV中和抗体陽性だった。WNV中和抗体陽性を示した15例のうち14例はWNVに対してのみ中和抗体が検出され、1例ではWNVとJEVのいずれに対しても中和抗体価が160倍であった。15例のうち5例はWNVに対して640倍以上の高い中和抗体価を示し、WNVに対して1280倍の抗体価を示す血清も1例見られた。その他の76羽の血清はWNVとJEVの両方の中和試験で陰性だった。

これらの結果から、極東ロシアの野鳥間においてWNVが侵淫していることが示唆された。

### E. 結論

本研究で構築された少容量中和試験によって、血清の得られた91例中15例でWNVに対する中和抗体が検出され、これらの地域に生息する野鳥間においてWNVが侵淫していることが強く示唆された。今後、極東ロシアのみならず、その周辺地域でもさらなる感染状況の把握を目的とした疫学調査の実施が求められる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1.論文発表

なし

#### 2.学会発表

- 1) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太郎、苅和宏明、高島郁夫:ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子およびその組換え発現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討:第144回日本獣医学会、江別(2007,9)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

補体媒介性細胞傷害を利用した新規日本脳炎ウイルスNS1抗体測定法（CDC法）：  
IgMクラスの自然抗体に対する非特異的反応におけるELISA法との比較

分担研究者 小西 英二 神戸大学医学部医療基礎学講座 准教授

### 研究要旨

日本脳炎ウイルス（JEV）の非構造蛋白の1つであるNS1を標的とした抗体測定は、JEVの自然感染率を求めるための信頼性高い方法である。昨年度の本研究事業では、補体媒介性細胞傷害を利用した新しい測定法（CDC法）を確立した。この方法は、NS1発現細胞を被検血清と反応後、ウサギ補体を加え、放出された乳酸脱水素酵素活性により細胞傷害率を測定する。本年度は、IgM抗体測定において通常障害となる自然抗体に対する反応性をELISA法と比較した。マウスモデルを用い、JEV感染後4日目の血清中の特異IgM抗体を対照として非感染マウスの血清を調べた結果、ELISA法では非特異反応が示されたが、CDC法ではまったく認められなかった。また、モノクローナルな自然抗体を測定した結果、ELISA法では極めて高い値を示したが、このような非特異反応はCDC法で認められなかった。

### A. 研究目的

わが国の日本脳炎は過去に年間千例以上の患者を生じたが、ワクチン接種や蚊個体数の減少により、現在の患者発生数は年間10例未満である。しかし、2005年の「積極的勧奨接種の差し控え」勧告の後、ワクチン接種率は低下したため、日本脳炎の再興が懸念される。厚生労働省及び国立感染症研究所は、日本脳炎感染源調査として、ブタにおけるJEV感染を監視してきた。この調査により、現在でもJEVが活動していることが示されている。

一方、ヒトを対象とした自然感染状況調査は、あまり行われなかった。わが国では多くのヒトが日本脳炎ワクチンを接種しており、従来の抗体測定法である中和試験や赤血球凝集抑制試験では、ワクチンが誘導した抗体と、自然感染が誘導した抗体を区別することができなかったためである。そこで本研究室では、感染によってのみ誘導される非構造蛋白に対する抗体測定法を開発してきた。

不顕性感染により誘導される抗体レベルは低いため、感度の高い抗体測定法が要求される。これまでに確立した免疫染色に基づく方法は、顕微鏡の1視野の中に抗原発現細胞コロニーと非発現細胞コロニーの両方が見えるため、陽性反応を感度高く判定することが可能であった。しかし、結果を肉眼で判定することに基づく欠点、すなわち検査者によって結果が異なる可能性が否定できなかった。

昨年度の本研究事業で、補体媒介性細胞傷害を利用した新しい抗体測定法（CDC法）を確立した。ウマ血清を用いた検討で、免疫染色法と相関した。方法は簡単であり、NS1発現細胞を被検血清と反応後、ウサギ補体を加え、放出された乳酸脱水素酵素活性により細胞傷害率を測定する。客観的な数値がELISAリーダーにより得られるため免疫染色法に見られる欠点をカバーできると考えられる。

本年度は、CDC法の抗体測定領域への更なる適用性を調べるために、IgM抗体を対

象とした。すなわち、感染早期の抗体測定は感染症の場合には特に重要な意味を持つ。しかし、検査室でよく用いられるELISA法などのバイディングアッセイでは非特異反応が障害となることが多い。本研究の目的は、CDC法におけるIgM抗体の非特異反応のレベルを調べることである。

## B. 研究方法

**血清：**ICR マウスに JEV 中山株の 10% 脳乳剤を腹腔内投与することにより感染させ、4 日目の血清を用いた。また、正常 ICR マウスから採取した血清を、正常血清として用いた。

**モノクローナル抗体：**IgM クラスの自然抗体を産生するハイブリドーマ、1D12、5A5 あるいは 6A11 (Konishi, Parasitology, 115, 387-393, 1997) を、プリスタン処理 Balb/c マウスの腹腔に接種して、腹水を得た。

**CDC法：**詳細は、昨年度の本事業総括研究報告書「新規日本脳炎ウイルスNS1抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用」に記載した通りである。JEV中山株のNS1遺伝子発現CHO細胞に非働化被検血清、次いでウサギ補体を加えた。遠心後、上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量をロシュ社の Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) を用いて測定した。細胞傷害率 (% cytolysis) は、 $100 \times (A-C)/(B-C)$  により計算した。ただし、Aは被検血清を用いて得られた吸光度、Bは1% Triton X-100で細胞を全て壊したときの吸光度、またCは血清を加えないで細胞から自然に放出されるLDHを反映した吸光度である。

**ELISA法：**抗原を直接固相面に感作するELISA法によりNS1に対するIgM抗体値を測定した。プレートにウエルあたり20 ngのNS1抗原を感作させ、被検血清、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgM、パラニトロフェニルリン酸と順次反応させた。正常血清を用いた実験では、各プレートに設けた陽性対照 (JEV感染後4日目のマウス血清：2匹のプール血清) の吸光度が1.0になるように各検体の吸光度を補正してELISA値とした。モノクローナル抗体を用いた実験では、パラニトロフェニルリン酸との反応を15分に固定して、吸光度で表し

た。

## (倫理面からの配慮について)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された後に実施した。

## C. 研究結果

**正常マウスにおけるELISA-IgMレベル：**通常のELISAに用いられる血清希釈度である1:100に希釈した正常マウス血清を10検体用いて、ELISA法におけるIgMクラスNS1抗体値を測定した (図1)。また、同じ血清の1:10希釈液を用いてCDC法により細胞傷害率を測定した。ELISA法においては、感染後4日目の血清で得られた吸光度を1.0とした時に0.07から0.29の値が示されたが、CDC法では細胞傷害率がまったく認められなかった (0.0%)。この結果は、ELISA法における高い非特異反応を示す。

**自然抗体に対するCDC法の反応性：**上記の非特異反応の原因として最も可能性が高いのはIgMクラス自然抗体である。そこで、モノクローナル自然抗体を用いて、CDC法とELISA法を比較した (図2)。抗原感作プレートで得られた吸光度 (図2A) においては、モノクローナル抗体は感染後4日目の血清の約4~13倍の吸光度を1:10の希釈度で示した。また、抗原を感作していないプレートで得られた吸光度を減じて (図2B)、感染後4日目の血清と同等のあるいはそれ以上の値を示した。一方CDC法においては (図2C)、1:10の希釈度で感染後4日目の血清が約80%の細胞傷害率を示したのに対して、モノクローナル抗体では0.0%であった。なお、P3U1細胞で得られたマウス腹水を陰性対照に用いたが、ELISA法及びCDC法共に反応は示されなかった。これらの結果は、ELISA法では高い非特異反応を示す自然IgM抗体は、CDC法ではまったく非特異反応の原因にはならないことを示す。

## D. 考察

血清中に自然IgM抗体が含まれていてもCDC法では結果に影響されないことが証明できた。ELISA法では比較的高い値が示されるため、それを改良するために、抗原感作プレートで得られた吸光度から同じ濃度の血清を用いて抗原非感作プレートで得ら

れた吸光度を減じることがよく行われる。しかし、ELISA法においては変動係数が10～15%程度の実験誤差が生じるため、抗原感作と抗原非感作の両プレートの差をとっても、ある程度の値が陰性血清に生じる結果となる。

低いレベルの特異抗体を正確に測定するためには、陰性血清で得られる非特異抗体に基づく値をできるだけ低くする必要がある。通常、陽性検体を陰性検体と区別するカットオフ値は、多数の陰性検体で得られた平均値と標準偏差で計算される。したがって、ELISA法における非特異抗体は、低いレベルの特異抗体を正確に測定する障害となる。

バインディングアッセイの基本原理は、ある分子に結合した分子を捉えることである。この原理により、簡便で迅速な測定法を実現したが、欠点は生物学的に無意味な結合をした分子をも捉えてしまうことである。一方CDC法は、補体が真の抗原抗体反応を識別する能力に基づいているため、非特異反応を生じにくい。このため、低いレベルの特異抗体を正確に測定するために適した方法と考えられる。

本研究では、CDC法が感染早期の抗体測定に適用できることを示した。昨年度に示したように、IgG抗体を対象として疫学研究にも有用であると考えられ、今後高感度測定法としてさらに改良する予定である。

## E. 結論

CDC法によりマウス血清中のIgM抗体を、非特異反応を生じることなく測定できた。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa, T., Takasaki, T., Kurane, I., Nukuzuma, S., Kondo, T. and Konishi, E.: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes and Infection* 9, 1089-1095, 2007
- 2) Kitai, Y., Shoda, M., Kondo T. and

Konishi, E.: Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1024-1031, 2007.

- 3) Yamanaka, A., Kosugi, S. and Konishi, E.: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of Virology* 82, 927-937, 2008.
- 4) Konishi, E., Kitai, Y. and Kondo, T.: Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 88-94, 2008.

### 2. 学会発表

- 1) Ishikawa, T., Kitai, Y., Kondo, T., Mason, P. W., and Konishi, E.: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Baltimore, 2007年7月
- 2) 糸田川優、小西英二: 中和活性または感染増強活性を示す抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月
- 3) 井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二: プタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月
- 4) 北井陽子、近藤高志、小西英二: 新し

- い日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月
- 5) 山中 敦史、小西 英二：ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立：デング 2 型ウイルスを用いた予備的検討。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月
- 6) 井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：ブタにおける日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合針無投与法の有用性評価。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月
- 7) 桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いたデング蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月
- 8) 北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月
- 9) 山中敦史、小西英二：デングワクチンの防御効力を評価するマウスモデル。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月
- 10) 酒井陽平、小西英二：インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月
- 11) 糸田川優、小西英二：抗デング 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び感染増強活性の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

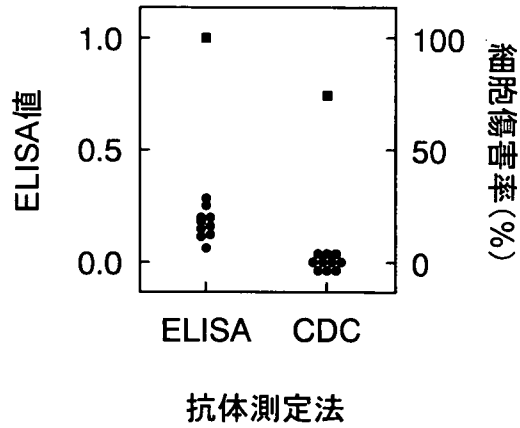


図 1. 正常マウス血清を用いた ELISA 法と CDC 法の比較。10 検体の正常マウス血清 (黒丸) と JEV 感染後 4 日目のマウス血清 (プール血清: 黒四角) を用いた。

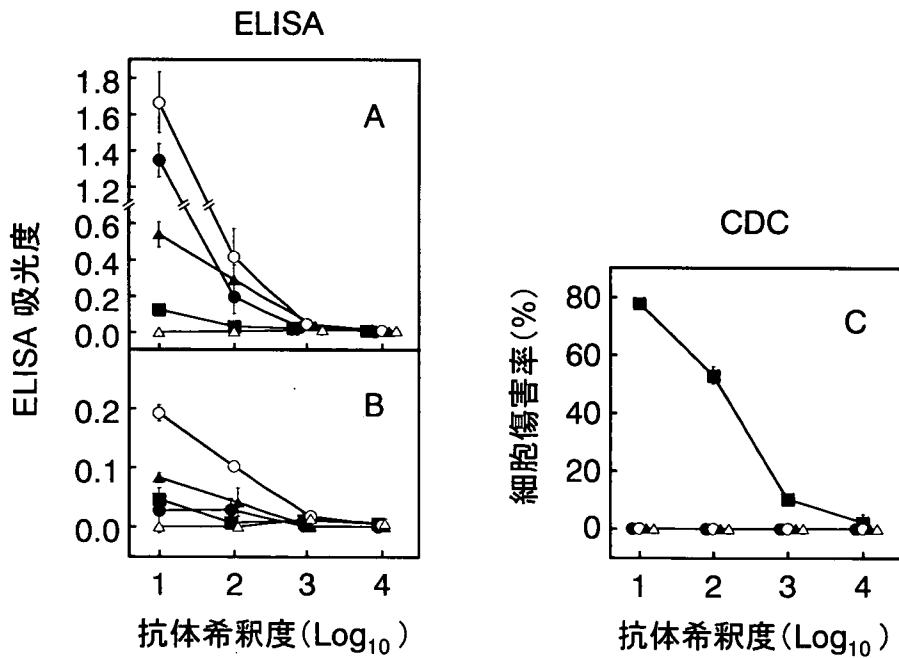


図 2. モノクローナル抗体を用いた ELISA 法と CDC 法の比較。モノクローナル抗体は、1D12 (黒丸)、5A5 (白丸) 及び 6A11 (黒三角) を用いた。対照として、JEV 感染後 4 日目のマウス血清 (プール血清: 黒四角) 及び P3U1 細胞由来の腹水 (白三角) を用いた。(A 及び B) ELISA 法の結果。(C) CDC 法の結果。

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究：  
日本脳炎ウイルスの疫学

分担研究者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

研究要旨： 最近の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 名前後の数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。我々は石川県における野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を継続して行い、また JEV の病原性についての解析を行っている。2005 年に 1,759 匹、2006 年に 1,458 匹、2007 年には 885 匹の野外蚊を採取し、RT-PCR 法及び培養 Vero 細胞を用いてウイルス分離を行っている。2007 年の調査では 5 サンプルが PCR 陽性であった。これまでに分離されたウイルス(Ishikawa-05)は 2005 年サンプル分であり、その遺伝子解析から、遺伝子タイプ 1 型のウイルスであった。調査結果は JEV が北陸地域に分布していることを明確に示している。他方で、JEV による病原性の解析を目的としてウイルス感染時における宿主遺伝子の発現動態を DNA マイクロアレイを用いて調べているが、ニューロブラストマ細胞株 IMR32 と肝臓由来細胞株 KN73 の比較ではインターフェロン(IFN)経路遺伝子発現量が大きく異なり、IMR32 における IFN 経路遺伝子発現の低さがウイルス増殖速度、量の高さに関わることが明らかになった。

A. 研究目的

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、国外における流行拡大をみるまでもなく、日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。2005 年のインドでの大流行はよく知られているが、世界的には日本脳炎感染者は年間数万人になる。日本における JEV のウイルス分布状況を把握すること、さらにウイルス病原性発現の解明は、国内での日本脳炎発症に対する警戒を怠らず、脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題といえる。我々は 1998 年以来、石川県における野外蚊から JEV の分離を試みている。本研究は定点、定時期での JEV 分布状況を調べ、また新分離ウイルス株の生物学的特性を遺伝子レベルから解析することを目的とする。またウイルス病原性を調べるために宿主遺伝子発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイ法を試みた。

B. 研究方法

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによる CO<sub>2</sub> 採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い福田で行っている。

蚊の破碎液: 蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎した。破碎液は遠心(10,000 x g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊破碎液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では JEV 特異的プライマーのエンペロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域のプライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。24 穴プレートを用い、5%牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いてウ

イルス力価を計測した。

**遺伝子解析法:** ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

**遺伝子発現解析:** 感染細胞から抽出された RNA を増幅・標識し、DNA マイクロアレイシステム(Affymetrix)を用いて宿主遺伝子の発現量を調べた。

**マウス実験:** ウイルスの病原性を調べるためにマウス ICR にウイルスを接種(ip)し、生死を観察した。

(倫理面からの配慮について)

組換え DNA 実験については金沢医大組換え DNA 安全委員会への申請許可の基に行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

### C. 研究結果

採集蚊数は 2005 年に 1,759 匹、2006 年には 1,458 匹、2007 年には 885 匹であったが、蚊破砕液を用いて RT-PCR 法およびヌクレオチド解析によってそれぞれ複数の陽性サンプルを得た。2007 年では PCR 陽性は 5 サンプルであった。陽性サンプルは Vero 細胞利用のウイルス分離を行ったが、2007 年サンプルからのウイルス分離はできなかった。2005 年サンプルからの分離ウイルス(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ 1 型)については、マウスでの病原性が JaGAR01 株の 1/100 ~ 1/1000 であることは既に報告しているが、引き続き、遺伝子解析を含め生物活性を調べている。他方、ウイルス(JaGAR01 株)感染細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて調べたところ、ウイルス複製が高い細胞系のニューロブラストーマ IMR32 では IFN 経路遺伝子発現量(OASL、GIP2、IFI44、IFIT1 等)が低いことが分かった。逆にウイルス増殖性が低い細胞系(肝臓由来細胞株 KN73)では IFN 経路遺伝子発現量は高いことが示された。

### C. 考察

2007 年採集野外蚊からの RNA サンプルでは RT-PCR、ヌクレオチド解析の陽性が 5 プール認められた。ウイルス分離には至らなかったが、JEV が北陸地域に分布していることは他のデータ

も含めてみると明らかと言える。2005 年に我々の分離したウイルス株(Ishikawa-K05)については引き続き生物活性等を調査しているが、比較として用いている JaGAR01 株に比べ、病原性は低い。Ishikawa-K05 株の 3' UTRヌクレオチド欠失あるいは E 蛋白の変異が関連している可能性はある。ウイルス感染に伴う宿主細胞における遺伝子発現の解析はこれまで断片的に行われてきたが、ここでは全ての遺伝子発現を網羅的に解析する手法を取り入れ行い、改めて IFN 経路遺伝子発現の差異が大きくウイルス増殖性に影響することを明らかにすることができた。こうした手法はウイルス病原性について新たな視点から解析することを可能にするものであり、今後の展開が期待されている。

ここに示した結果は、国内において分布しているウイルスが全て毒性が低下していることを必ずしも意味しない。現に 2007 年には日本脳炎患者が石川県において発生している。引き続き分布ウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。ワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少に注意し、また近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要がある。

### E. 結論

石川県下の 2007 年採集野外蚊においてウイルス保有が示された。2005 年野外蚊から分離された JEV 株(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ 1 型)の病原性は以前の JEV 株よりも低いものであったが、今後のウイルス病原性変動に注目すべきである。DNA マイクロアレイによる解析で、JEV 増殖性に IFN 経路遺伝子発現量の差異が大きく影響することが再認識された。

### F. 健康危険情報

北陸においても、病原性のある日本脳炎ウイルスを野外蚊が保有し、病原ウイルス存在の事実には注意が必要であろう。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表



- 1) Ota T, Maeda M, Murakami M, Takegami T, Suto S, Tatsuka M: Activation of Rac1 by Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor- $\beta$  with defective isoprenyl-binding pocket. *Cell Biology International*, 31: 92-96 (2007)
- 2) Dong L, Masaki Y, Takegami T, Kawanami T, Itoh K, Jin Z, Sakai T, Huang C, Fukushima T, Tong X, Sawaki T, Sugai S, Hirose Y, Umehara H: Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen. *Int Immunol* 19: 331-336, (2007)
- 3) Dong L, Masaki Y, Takegami T, Jin Z, Huang C., Fukushima T, Sawaki T, Kawanami T, Saeki T, Kitagawa K, Sugai S, Okazaki T, Hirose Y, Umehara H: Clonality analysis of lymphoproliferative disorders in patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol* 150: 279-284, (2007)
- 4) Sun W, Dong L, Kaneyama K, Takegami T, Segami N: Bacterial diversity in synovial fluids of patients with RMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2007) (in press)
- 5) Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T: Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2008) (in press)

## 2.学会発表

- 1) 村上 学、太田隆英、竹上 勉: siRNA 発現および JEV 感染細胞におけるインターフェロン誘導、第 42 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、石川 (2007. 5)
- 2) 村上 学、太田隆英、竹上 勉: 日本脳炎ウイルス感染に対する RNAi による防御およびインターフェロン誘導、第 11 回神経ウイルス研究会、草津 (2007, 7)
- 3) 竹上 勉、村上 学、太田隆英、石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染における宿主遺伝子発現変動 DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析、第 14 回トガ・フラビ・ベステチウイルス研究会、札幌 (2007, 10)
- 4) 村上 学、竹上 勉: 日本脳炎ウイルス感染細胞およびマウスにおける抗ウイルス剤(shRNA)導入後のインターフェロン誘導、第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 5) 竹上 勉、村上 学、太田隆英、石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染に伴う宿主遺伝子発現とウイルス病原性、第 30 回日本分子生物学会、横浜、(2007, 12)

## 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

富山県における日本脳炎ウイルス野外株の浸淫状況

分担研究者 倉田 毅 (富山県衛生研究所 所長)

協力研究者 小原真弓, 山内健生, 長谷川澄代, 渡辺 護, 滝澤剛則 (富山県衛生研究所)

研究要旨: 日本脳炎ウイルスの浸淫状況を把握するため、蚊および豚のウイルス保有状況を調査した。畜舎の蚊 10 プール、豚血清 6 検体から日本脳炎ウイルスが分離された。富山県では、I 型日本脳炎ウイルスが 9~10 月頃に流行しており、コガタアカイエカと豚(増幅動物)の関係が保たれていることが示唆された。コガタアカイエカと増幅動物の少ない地点では日本脳炎ウイルスはみられなかった。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスの媒介動物である蚊と、増幅動物である豚のウイルス保有状況を調査し、日本脳炎流行予防に役立てる。

B. 研究方法

蚊: 富山県内のカラスのねぐら近く(公園など) 3 地点、富山空港、畜舎 6 地点の計 10 地点(13ヶ所)にトラップを設置し、5 月から 10 月にかけて蚊を捕集した。捕集蚊 514 プール 14,146 個体を地点・捕集日・種類・雌雄別に分け、原則として最大 50 個体までを 1 プールとして細胞維持培地で磨砕し、遠心上清をヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞に接種して培養した。同時にアフリカミドリザル由来の Vero9013 細胞にも接種し、いずれも 7±1 日間観察して細胞変性の有無を確認後、培養上清を新しい細胞に接種して培養と観察を繰り返した。さらに C6/36 細胞に継代して観察を続けた。細胞変性が現れた検体の培養

上清からウイルス RNA の抽出を行い、フラビウイルス NS3 領域を対象としたプライマーセットを用いて RT-PCR を実施した。陽性であった検体については、日本脳炎ウイルスエンベロープ領域を対象とした RT-PCR、nested PCR を行った。豚: 7 月~10 月に採取された豚血清(6 ヶ月齢、小矢部市、南砺市、上市町の 3 農場にて育成) 428 検体についてウイルス分離を行った。Vero9013、C6/36 細胞に接種し 3 代継代したのち細胞変性が現れたものについて RNA を抽出した。さらに、日本脳炎エンベロープ領域を対象とした RT-PCR、nested PCR を行った。

蚊と豚から得られた、日本脳炎ウイルスエンベロープ領域の PCR 産物について、ダイレクトシークエンス法を用いて遺伝子配列の解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

該当なし

### C. 研究結果

ウイルス分離に用いた蚊について表 1-1、1-2 に示す。これらの蚊のうち、10 プール(500 個体)より日本脳炎ウイルスが分離された(表 2)。これらは全て畜舎(牛舎および豚舎)で捕集されたコガタアカイエカであった。豚血清については、6 検体より日本脳炎ウイルスが分離され(表 3)、3 つの育成場所全てでウイルスが分離された。分離された時期は 9 月 5 日～10 月 9 日であった。これらの分離ウイルスは、エンベロープ領域 346bp を比較した系統樹解析により、いずれも I 型であると考えられた。

### D. 考察

今回の調査により、富山県内の蚊と豚から日本脳炎ウイルスが分離された。蚊は、畜舎で捕集したコガタアカイエカからのみ分離された。以上のことから、畜舎近くのコガタアカイエカが濃厚に日本脳炎ウイルスを保有しており、コガタアカイエカ(媒介者)と豚(増幅動物)の間で現在もウイルスの循環が保たれていると考えられる。カラスのねぐら、空港のような、コガタアカイエカと増幅動物の少ない地点では日本脳炎ウイルスは分離されなかった。遺伝子解析により、分離された日本脳炎ウイルスは、いずれも I 型であると考えられた。すなわち、富山県では I 型日本脳炎ウイルスが広く分布していることが示唆された。ウイルスの分離された時期は 9～10 月を中心としており、8 月中旬頃のコガタアカイエカ発生ピークに、豚と蚊の間を行き来することで増幅されたウイルスが、9～10 月頃に検出されるようになると考えられる。

以上のことから、日本脳炎ウイルスは依然と

して濃厚に存在していることが判明した。近年、日本脳炎患者の報告は 10 人前後と少ないが、この要因として、ウイルス自体が検出されなくなったのではなく、ワクチンの効果や環境の変化などが考えられる。しかしながら、現在、日本脳炎ワクチンの勧奨が中止されており、接種を受け人数が減っている。このような状況では、再び患者が増加する可能性がある。よって、本研究のように、実際のウイルス浸淫状況を把握し、今後の流行予測に役立てることは公衆衛生上重要である。

### E. 結論

蚊 514 プール 14,146 個体のうち、10 プールより日本脳炎ウイルスが分離された。豚血清 428 検体中 6 検体より日本脳炎ウイルスが分離された。富山県では I 型日本脳炎ウイルスが 9～10 月頃に流行しており、コガタアカイエカと豚(増幅動物)の関係が保たれていることが示唆された。コガタアカイエカと増幅動物の少ない地点では日本脳炎ウイルスはみられなかった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1.論文発表

なし

#### 2.学会発表

- 1) 小原真弓、渡辺 護、長谷川澄代: 富山県における感染症媒介蚊、ウイルスの検出: 第 23 回北陸病害動物研究会、金沢(2005, 7)
- 2) 小原真弓、長谷川澄代、滝澤剛則、堀元栄

詞、岩井雅恵:富山県内の蚊媒介性ウイルス調査(2005年):第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋(2006, 11)

- 3) 小原真弓、渡辺 護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則:富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況:平成18年度日本獣医師会、さいたま(2007, 2)
- 4) 小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅:富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況(2004年~2006年):第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、白山(2007, 5)

#### 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

#### I. 謝辞

蚊の採集にご協力くださったボランティアの方々、施設関係者、検疫所、厚生センターの関係各位に厚く御礼申し上げます。ウイルス分離法をご教授くださった国立感染症研究所ウイルス第一部、昆虫医科学部の方々に心より感謝いたします。

表 1-1. 検査に用いた検体(蚊, 種類別)

種名	プール数	個体数
アカイエカ	125 (4)	685 (4)
コガタアカイエカ	337	13370
ヒトスジシマカ	33 (6)	64 (8)
ハマダライエカ	7	13
ヤマトヤブカ	3	3
ヤマダシマカ	2	2
キンバラナガハシカ	2	3
フタクロホシチビカ	1	1
オオクロヤブカ	1	1
カラツイエカ	1	2
シロカタヤブカ	1	1
トラフカクイカ	1	1
計	514 (10)	14146 (12)

カッコ内は♂

表 1-2. 検査に用いた検体(蚊, 地点別)

住宅区分	設置場所	プール数	個体数	
カラスの ねぐら	高岡古城公園	地上 8m	23	196
		地上 1m	42 (1)	188 (1)
	富山城址公園	地上 1m	29 (5)	41 (5)
		射水市鷄杉林	地上 6.5m	21
	地上 1m		41 (3)	82 (5)
空港	富山空港	北	6	9
		南	15	19
畜舎	豚舎	南砺市	136	6284
		上市町	63 (1)	1991 (1)
		黒部市	11	274
	牛舎	富山市	104	4391
		小矢部市	1	17
	厩舎	富山市	22	602
合計		514 (10)	14146 (12)	

カッコ内は♂

表 2. 日本脳炎ウイルスが分離された検体(蚊)

番号	種名	雌雄	数	定点名	捕集日	細胞変性	
						Vero9013	C6/36
2347	コガタアカイエカ	♀	50	富山市 牛舎	2007/9/5	—	+
2441	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/9/18	—	+
2462	コガタアカイエカ	♀	50	富山市 牛舎	2007/9/19	—	+
2506	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/9/25	—	+
2507	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/9/25	—	+
2513	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/9/25	+	+
2554	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/10/1	+	+
2556	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/10/1	+	+
2567	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/10/1	—	+
2569	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市 豚舎	2007/10/1	+	+

表 3. 日本脳炎ウイルスが分離された検体(豚)

番号	採血日	飼育場所	細胞変性	
			Vero9013	C6/36
232	2007/9/11	上市町	—	+
234	2007/9/11	上市町	—	+
240	2007/9/11	上市町	—	+
292	2007/10/1	小矢部市	+	+
296	2007/10/1	小矢部市	—	+
326	2007/10/9	南砺市	—	+

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨： ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRSの流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、またHPSは南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、迅速にハンタウイルス感染を検出するための血清診断法の開発、広い範囲のハンタウイルスをカバーするPCR法の開発、およびアジアにおけるいわゆる不明熱にハンタウイルスが関与しているかどうかについて検討を行う。

A. 研究目的

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類され、腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに持続感染したげっ歯類を自然宿主とする人獣共通感染症である。HFRSの流行は中国、極東ロシアや欧州を中心に広くユーラシア大陸全域で、またHPSは南北アメリカ大陸で報告され、公衆衛生上の大きな問題となっている。また、東南アジア諸国では、不明熱患者の発生が多く報告され、その中にハンタウイルスを原因とする流行の存在が危惧されてきた。これまで、タイをはじめベトナム、インドネシア、台湾などで人やげっ歯類にハンタウイルス抗

体陽性例が報告され、東南アジア諸国においても流行の存在が示唆されてきたが、感染の状況についての情報は極めて不足している。

ハンタウイルスのうち、Hantaan virus (HTNV)、Seoul virus (SEOV)、Dobrava virus (DOBV)およびPuumala virus (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 (SNV)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つのグループ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3種類の抗原が必要であると考えられる。

げっ歯類は南アジア地区を起源に発生したと考えられており、このためアジアには特にネズミ亜科のげっ歯類の種類が豊富である。このため、未同定のハンタウイルスが存在し、不明熱に関連している可能性も考えられている。タイではネズミ亜科齧歯類である *Bandicota indica* から分離された Thailand virus (タイランドウイルス: THAIV) が報告され、我々はこの THAIV がヒトへの疾患を引き起こす可能性を報告してきた。また、インドにおいて食虫目のスルクスより分離されたハンタウイルス Thottapalayam virus (TPMV) は他のハンタウイルスとは抗原的にも遺伝子配列の比較においても最もへだたったハンタウイルスである。我々はこの TPMV 抗原を作成し、これを用いて血清疫学的調査を行った結果、タイで見つかったラオス人の不明熱患者が TPMV に対する抗体を保有していることを報告した。さらに近年、食虫類由来ハンタウイルスがアフリカ、スイス、ベトナム、韓国で検出され、非常に大きな多様性を持つことが明らかとなってきた。また、アジア全域にはハタネズミ亜科の齧歯類も多く棲息し、極東地区では病原性は明らかではないものの少なくとも3種類の PUUV 関連ウイルスも報告されている。本研究では、これらのウイルスに罹患した患者あるいは齧歯類・食虫類を検出することを目的として、スクリーニングシステムを確立してきた。さらに、

病原巣動物対策を実施するためには、これらの感染を鑑別する系を準備しておくことが、公衆衛生上必要があると考えられる。

## B. 研究方法

「抗原」:ハンタウイルスを 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。また、感染細胞は SDS で処理し、Western blotting 抗原とした。各ハンタウイルス組換え核蛋白(NP)の全長(アミノ酸:全長抗原)を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。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。また、超音波処理後 ELISA 抗原とした。

「ELISA、Western blotting, 中和試験」: Western blotting と中和試験は既報の方法に従った(Araki et al J. Clin Microbiol. 2001)。

「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、タイおよびインドの不明熱患者血清、ベトナムで捕獲されたスルクス血清を用いた。陽性コントロールとして、TPMV を接種したマウス血清・スルクス血清を用いた。

(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、タイ、インド、フィンランド、スウェーデン、ドイツ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な



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) THAIV 感染鑑別診断法の開発

THAIV は抗原性が SEOV に近く、どちらもクマネズミからの検出が報告されている。そのため、この THAIV/SEOV 感染の簡易鑑別診断法をヒトおよびラット類で開発した。組換え NP 抗原の N 末端を 50 アミノ酸欠いたトランケート抗原をバキュロウイルスベクターで発現させ抗原とした。また、THAIV および SEOV 感染ラット血清を準備し、ラット鑑別診断系の評価に用いた。また野生 *B. indica* 血清も使用した。THAIV 感染ヒト血清は同一患者から一年間隔で二度の採血の二検体を抗 THAIV 血清として用いた。SEOV 感染は実験動物に関連した患者血清を用いた。THAIV 抗原のための鑑別診断抗原も既報の HTNV, SEOV, DOBV 抗原と同様に型特異的の反応を示し、今後の調査に有効であることが明らかとなった。

(2) ベトナム齧歯類およびスunks の調査  
ベトナム南部のホーチミン市周辺およびサイゴン港湾地区のおよそ 100 頭の小型小動物の血清疫学調査を行った。その結果サイゴン湾地区のドブネズミから陽性が検出された。また、同時に検出された *R. exulance* から抗体陽性例が見つかった。これらはソウルウイルスに関連したハンタウイルスの感染であると考えられた。また、ゴム農園において 9 頭のスunks が捕獲され、そのうち二頭が抗 TPMV 抗体陽

性であった。この血清は IFA や WB のみではなく TPMV に対して高い中和活性を示した。

#### (3) ハタネズミ亜科由来ハンタウイルスの鑑別抗原の作成と評価

PUUV 感染患者血清は TULV 抗原に強い交差反応を示すため、簡便に鑑別するためには、鑑別抗原を用意する必要があることが明らかとなった。N 末端を 50, 75, 100 アミノ酸削除した鑑別抗原を作成中し、診断抗原の候補とした。ネズミ亜科のウイルスについては 50 アミノ酸削除抗原を使用しているが、PUUV 関連ウイルスについては改めて最適な領域を検討することとした。同時に N 末端の主要抗原領域 103 アミノ酸をそれぞれ大腸菌ベクターで発現させ診断抗原としての有用性を検討した。また、これらの鑑別系を評価するために、TULV 感染血清が必要である。そのため、日本で系統化された日本産ホンドハタネズミに PUUV と TULV を接種し、陽性血清を準備した。大腸菌抗原による ELISA および IFA においてそれぞれのウイルスに対する抗体の上昇が確認され、その交差反応は著しく低かった。一方、PUUV 感染ヒト患者血清の交差反応は高く、実験感染げっ歯類血清とは異なる交差反応性を示した。バキュロウイルス抗原およびそのトランケート抗原については評価は終了していない。

### D. 考察

(1) THAIV 鑑別診断抗原の開発：鑑別抗原の ELISA プレートへの捕捉はマウスモノクローナル抗体でのキャプチャーによって行われて

いる。しかし、げっ歯類抗体のうち、ラット IgG は Protein A/G への反応性を欠くため、酵素標識 Protein A/G を二次抗体として使用できない。また、キャプチャー抗体であるマウスモノクローナル抗体に交差する二次抗体の使用にも制限があるため、ラット血清への鑑別診断系の確立には困難な点が多く残されていた。しかしながら、二次抗体をマウス抗ラット IgG を選択することによりラット血清への応用が可能となった。実験感染ラット血清、THAIV 自然感染 *B. indica* 血清は明らかに鑑別することが可能であったことから、今後も野生げっ歯類の血清疫学に有用なツールとなると考えられる。また、SEOV 感染と考えられたヒトの中に THAIV 感染を効率よく検出できることから、より正確な疫学的情報を得ることができるようになると考えられる。

(2) ベトナム齧歯類およびスunksの調査: ベトナム南部のゴム農園において2頭の抗TPMV抗体陽性スunksがみつかった。この血清はTPMVに対して強い中和を示し、インド由来TPMVとの関連が示された。我々はすでにインドネシアで捕獲されたスunksにおける抗TPMV抗体陽性例を報告しているが、これは中和を示さず、TPMV関連ウイルスの間での多様性を示すものと考えられた。

(3) ハタネズミ亜科由来ハンタウイルスの鑑別抗原の作成と評価: TULAVとPUUVの診断抗原のシリーズを作成した。その評価のために用いた患者血清と実験感染ハタネズミ血清が異なる交差反応性を示した。ヒト患者血清については交差反応が高いため、鑑別抗原が必要で

あると考えられたが、どのトランケート抗原が最適であるかの検討はまだ終了していない。一方、ハタネズミ血清はほとんど交差反応を示さず、鑑別抗原は必要ないと考えられた。しかしながら本診断法を疫学調査に応用するためには野生ハタネズミの自然感染例がどのような交差反応性を示すのか、明らかにする必要があると考えられる。

## E. 結論

ハンタウイルスはその宿主によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、および食虫類由来ウイルスの4つのグループに分けられ、その多様性から診断法はそれぞれについて必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められてゆく可能性がある。それらについて情報を収集し、迅速に診断法を準備してゆくことが公衆衛生上必要であると考えられる。

## 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T. and Takashima, I.: A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East

- Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54(4): 145-161, 2007
- 2) Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus Nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375-1381, 2007
- 3) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. *Virology* sep1: 365(2) 292-301, 2007
- 4) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U.T., Truong, U.N.: Hantavirus infection-typical rodent-borne viral zoonosis. *Tropical Medicine and health* 35(2) 55-59, 2007
- 5) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R.G., Mertens, M., Okumura, M., George, R.P., John, T., Balraj, V., Muliylil, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seroepidemiological study on hantavirus infections in India: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*
- 6) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa J.: Hantavirus infection in East Asia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30, 341-356, 2007
- 7) Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51(11): 1081-1090, 2007
- 8) 有川二郎: ハンタウイルス肺症候群, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 126-130, 2007
- 9) 有川二郎: 腎症候性出血熱, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 112-116, 2007
- 2.学会発表
- 1) 有川二郎: 腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS) –げっ歯類媒介性の人獣共通感染症: 第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 2) 山本博、李天成、伊藤薫、越本知大、宮下信和泉、有川二郎、八神健一、他: 国動協および公私動協傘下の動物実験施設において動物実験に用いられたサルおよびブタの HEV 感染調査: 第54回日本実験動物学会総会(2007.5)
- 3) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Kariwa H.: Epidemiology and Epizootiology of Hantavirus Infection in East Asian Countries. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)

- 4) Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Kariwa, H., Arikawa, J.: Studies on Structure and Function of N and GP of Hantaan Virus. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 5) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud, N.H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., Takashima, I.: Animals Models for Puumaka Virus Infection Using Several Rodent Species of Laboratory Animal. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 6) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Pathological and immunological analysis of the experimental model mice of the Hantaan virus infection. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 7) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R., Arikawa, J.: Studies of Thottapalayam Virus: a Hantavirus Isolated from Shrew. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina (2007.6)
- 8) Kariwa, H., Seto, T., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Hashimoto, N., Abu Daud, N.H., Nakauchi, M., Miyashita, D., Evgeniy A. Tkachenko, Leonid I. Ivanov, Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.: Epidemiological Study of Hantavirus Infections in Volga-Side Federal Region, Russia. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program: Virology Panel Meeting. Baltimore, MD (2007. July 24-25)
- 9) 吉松組子、垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルスエンベロープ糖タンパク G2 の細胞外ドメインに関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 10) 垂石みどり、吉松組子、エルデネサイハン テグシドーレン、有川二郎：ハンタウイルス持続感染モデルマウスにおけるウイルス特異的 T 細胞の解析、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 11) エルデネサイハン テグシドーレン、吉松組子、垂石みどり、有川二郎、石原智明：ホンドネズミ (*Microtus montebelli*) の Puumala 型ハンタウイルスおよび Tula 型ハンタウイルスに対する感受性に関する研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10)
- 12) 瀬戸隆弘、荻和宏明、谷川洋一、吉松組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、