

virus (LNV)/ カリザールウイルス (El Moro Canyon (ELMC) 様 virus/Seoul virus (SEOV)/ Puumala virus (PUUV) に感染した HPS または HFRS 患者血清および、宿主げっ歯類血清を用いた。

(倫理面からの配慮について)

用いた感染血清 (患者血清、陽性コントロールとして) は何れも、韓国、中国、フィンランド、スウェーデン、ドイツ、アメリカ、カナダ、およびアルゼンチン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。各種げっ歯類血清の採血は、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無いと判断された。

(倫理面からの配慮について)

不明熱患者血清は匿名で提供され、提供の同意および個別データは現地の研究協力者が管理している。

C. 研究結果

1. HPS 患者血清の鑑別診断

3種類の HPS 患者血清を中和試験なしに鑑別する方法を確立した。3種類の患者血清、すなわち SNV、ANDV、LANV の感染による患者血清をアルゼンチンおよび米国より分与された。これを用いて ELISA を行ったところ、全長の NP 抗原を使った場合、強い交差反応をお互いに示して区別することはできなかった。これは大腸菌ベクターを用いた場合でも、バキュロウイルスベクターを用いた場合でも同様であった。一方、バキュロウイル

スベクターを用いて発現させた N 末端トランケートの NP 抗原は ELISA において3種類の感染をお互いに区別することが可能であった。

2. HPS 関連ウイルス保有げっ歯類の鑑別診断

1. で確立した代替中和法の適用をげっ歯類に拡大した。南北アメリカ大陸で病原巣動物となっているげっ歯類は、*Sigmodontinae* 亜科 (主に北米)、*Neotominae* 亜科 (主に南米) に属する。これらのげっ歯類に対して有効な2次抗体はほとんど商品化されていない。唯一 SNV に近縁な New York virus の宿主である *Peromyscus leucopus* に対する2次抗体が入手可能である。この2次抗体の有効性を確認したところ、SNV の宿主である *P. maniculatus* への反応は良好、メキシコ由来カリザールウイルスの宿主である *Reithrodontomys spp* への反応は若干弱いものの、高濃度では使用可能であった。一方、南米由来の ANDV の宿主である *Oligoryzomys* 類への反応は不十分であった。そこで *Sigmodontinae* のげっ歯類の中でも比較的 *Neotominae* 亜科に近縁な Cotton rat (*Sigmodon hispidus*) に対する2次抗体をマウスを用いて作成したところ、ELISA を構築することが可能であった。これらの2次抗体を用いて鑑別診断を行ったところ、①北米で同所的に棲息する SNV 保有げっ歯類とカリザールウイルス保有げっ歯類の鑑別を行うことが可能であった。②南米で同所的に棲息する ANDV 保有げっ歯類と LANV 保有げっ歯類の鑑別を行うことが可能であった。

D. 考察

北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発: 北米で同所的に存在する SNV とカリザールウイルス (ELMC 様ウイルス) との血清診断を中和

試験なしに区別する ELISA をヒトおよびげっ歯類の両方で開発した。また、その他の病原性が不明あるいは患者数の少ない HPS 関連ウイルスについても鑑別抗原の準備を行った。さらに南米でも同所的に存在する ANDV と LANV のについて同様の系を構築した。LANV は一般に若干軽症であると考えられており、一方、ANDV では時としてヒト-ヒト感染を起こすことが知られており、輸入感染症としてこの二つを区別することは重要である。これらの ELISA により、日本での保有が難しく中和試験を行うことができない、HPS 関連ウイルスの鑑別診断が可能となった。

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、その病原性も HFRS, HPS および無症候性とその多様性から診断法はそれぞれについて必要である。さらに、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。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda PS, Kariwa H, Arikawa J, and Ishihara C. Studies on the susceptibility of the Japanese grass

vole, *Microtus montebelli*, to Tula virus and Puumala virus of the hantaviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010. in press.

- 2) Schmidt-Chanasit J, Essbauer SS, Petraityte R, Yoshimatsu K, Tackman K, Contraths FJ, Sasnauskas K, Arikawa J, Thomas A, Pfeffer M, Scharninghausen JJ, Splettstoesser W, Wenk M, Heckel G, and Ulrich RG. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J Virol* 2010. in press.
- 3) Huong VT, Yoshimatsu K, Luan VT, Tuan LV, Nhi L, Arikawa J, and Nguyen TMN. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Vietnam: Description of Disease and Implication of Virus and Potential Rodent Hosts. *Emer Infect Dis* 2010. in press
- 4) Truong T-T, Yoshimatsu K, Araki K, Lee B-H, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong U-N, and Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1357-1363.
- 5) Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Daud NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, and Takashima I. Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. *J Vet Med Sci* 2009. 71:1569-1578.
- 6) Chandy S, Yoshimatsu K, Boorugu HK, Chrispal A, Thomas K, Peedicyil A, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Acute febrile illness caused by hantavirus: serological and molecular evidence from India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009. 103:407-412.

7) Chandy S, Okumura M, Yoshimatsu K, Ulrich RG, John GT, Abraham P, Arikawa J, and Sridharan G. Hantavirus species in India: A retrospective study. Indian J Med Res 2009. 27:348-350.

2.学会発表

1) Yasuda Shumpei P., Endo Rika, Shimizu Kenta, Koma Takaaki, Tegshduuren Erdenesaikhan, Luan Vu Dinh, Yoshimatsu Kumiko, Huong Vu Thi Que and Arikawa Jiro: Hantavirus genome quantification in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats (*Rattus norvegicus*) 10th International Mammalogical Congress, Mendoza, Argentina, August, 2009

2) Kariwa, H., Sanada, T., Seto, T., Tanikawa, Y., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I. Development of diagnostic methods applicable to various serotypes of hantavirus infections 43rd Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative medical Science Program, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2009.7)

3) 真田崇弘、苺和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫:複数のハンタウイルス血清型に対応可能な診断法の開発. 第43回日本ウイルス学夏季シンポジウム、十勝温泉「かんぽの宿」(2009.7)

4) 駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルデネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez, Maria L. R. Almaraz, Celso Ramos, 宮下大輔、瀬戸隆弘、苺和宏明、高島郁夫、Delia Enria, 有川二郎:新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別ELISA法の確立. 第43回日本ウイルス学夏季シンポジウム、十勝温泉「かんぽの宿」

(2009.7)

5) 新井 智、田原研司、Oh Hong-Shik、高田伸弘、Song Jin-Won, Kang hae Ji, N. Bennett Shannon, 多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、Yanagihara Richard: Genetically distinct hantavirus in the Asian lesser white-toothed shrew on Jeju island, Korea. 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

6) 吉川佳佑、苺和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫、極東ロシアの野鼠からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

7) 吉田喜香、苺和宏明、Ramos Celso, Hernandez Cornelio S. Almaraz Maria L.R. 高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫:メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの遺伝子解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

8) エルテネサイハンテグシドーレン、清水健太、吉松組子、遠藤理香、駒 貴明、安田俊平、有川二郎、石原智明:トガリネズミ目(旧食虫目)由来ハンタウイルスThottapalayamウイルス(TPMV) 核蛋白の単クローン抗体を用いた抗原領域の解析 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

9) 安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒貴明、Erdenesaikhan Tegshduuren, 垂石みどり、有川二郎:ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

- 10) 駒 貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S.Hernandez, Maria L. R. Almaraz, Celso Ramos, 宮下大輔、瀬戸隆弘、苺和、宏明、高島夫、Delia Enria, 有川二郎: 新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別ELISA法の確立 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 11) 遠藤理香、吉松組子、駒 貴明、清水健太、安田俊平、Erdenesaihan Tegshduuren, 垂石みどり、海老原秀喜、宮下大輔、瀬戸隆弘、Cornelio S.Hernandez, Maria L.R.Almaz, Celso Ramos, 苺和宏明、高島郁夫、有川二郎: 汎用PCRプライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の確立 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 12) 清水健太、イブラハムイマヌリサ、吉松組子、遠藤理香、安田俊平、駒 貴明、エルテネサイハンテグシドーレン、有川二郎: インドネシアのげっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学 第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)
- 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

分担者研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

Q 熱の診断と疫学

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部 教授

共同研究者 大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部 准教授

研究要旨: *Coxiella burnetii* 感染症(Q 熱)の血清診断法開発と野生齧歯類における保有状況調査を目的として研究を行っている。今年度は、これまでに開発した外膜蛋白質 Com-1 を抗原とする酵素抗体法(ELISA; Com-1-ELISA)に加え、新たな診断用抗原の探索を目的として *C. burnetii* ライブラリー構築を試みたが、十分なライブラリーを得ることができなかった。北海道の 5 牧場において飼育されているウシの血清 431 検体を、*C. burnetii* 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)に供したところ、1 牧場(109 検体)において陽性率 28.3%と非常に高値を示した(他牧場 322 検体では 4.3%)。昨年度までに、Com1-ELISA は感度の点で IFA に劣る傾向が認められ、さらに、IFA で陽性を示した野外齧歯類においては抗体を検出出来ていない。これまでは、陽性検体数の不足により、Com-1-ELISA の十分な評価ができなかった。今年度得られた陽性血清を用いて、Com-1-ELISA の実用化に向けた検出系の十分な検討が可能になると考えられる。

A. 研究目的

Q 熱は *Coxiella burnetii* を病原体とし、家畜、野
外の齧歯類などを感染源とするダニ媒介性の人
獣共通感染症である。感染症法では第4類に指
定され、年間約6例程度の届け出がある。しかし
ながら、病原学のおよび血清学的診断法は確立
されておらず、実態は明らかではない。これまで
の研究から我が国のダニが *C. burnetii* を保有し
ていることが明らかになっているが、自然界にお
ける保有宿主についてはわかっていない。そこで
本研究では血清学的診断法を確立するとともに、
野外の齧歯類における *C. burnetii* 感染の実態を
明らかにすることを目的とした。昨年度までに、外

膜蛋白質 Com-1 を抗原とした酵素抗体法
(ELISA)の系を樹立し、マウス・ヒトにおける抗体
応答を検出することができ、血清診断用抗原とし
ての有用性を示唆するデータを得ている(投稿準
備中)。しかしながら、野生齧歯類血清において
は、感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)
との相関が認められなかった。本年度は、新たな
診断用抗原候補を探索すべく、*C. burnetii* ライブ
ラリーの構築を試みた。併せて、牧場で飼育され
るウシ血清中における抗 *C. burnetii* 抗体保有状
況を調査した。

B. 研究方法

C. burnetii 日本分離株 406 株の精製菌体よりゲノム DNA 5 µg を調製し、DNA 断片化装置を用いてランダムに断片化した。断片化した DNA は、T4 DNA polymerase により末端を平滑化した。平滑化した *C. burnetii* DNA 断片は、同じく平滑化処理した lambda ZAP II vector(ストラタジーン)とライゲーションし、定法に従いライブラリー構築を試みた。

抗体保有状況調査には、北海道の 5 牧場で飼育されるウシ血清 431 検体を用いた。IFA の抗原として、*C. burnetii* 感染 BGM 細胞を用いた。ウシ血清はリン酸緩衝液(PBS)にて 128 倍希釈した。二次抗体として FITC 標識抗ウシ IgG(cappel)を用いて、蛍光顕微鏡にて観察した。封入体と細胞質内粒子の染色像が認められたものを陽性とした。

(倫理面からの配慮について)

組換え DNA 実験は、本学組換え DNA 実験委員会による承認をうけた。

C. 研究結果

C. burnetii 406 株ゲノム DNA 5 µg より、平滑末端化した DNA 断片(2.0-5.0 kb)をおよそ 2 µg 得ることができた。定法に従い、lambda ZAP II vector を用いて、ライブラリー構築を試みたが、スクリーニングに耐えうる力価のライブラリーを得ることができなかった。

IFA に供した 4 牧場で飼育されるウシ 322 検体における陽性率は 4.3%であった。しかしながら、1 牧場 109 検体においては、陽性率が 28.4%と他の牧場に比べ非常に高い値を示した。

D. 考察

昨年度までの研究で、外膜抗原 Com-1 を抗原とした ELISA(Com-1-ELISA)は、感度の点で IFA 法に劣ることが分かっている。更に、Com-1 に対する抗体応答は、実験動物であるマウスにおいては認められるものの、野生齧歯類においては検出出来ていない。そこで今年度は、Com-1 以外の新たな診断用抗原の探索のため、*C. burnetii* ライブラリーの構築を試みたが、スクリーニングに耐えうるライブラリーを得ることができなかった。技術的な原因が第一と考えられるが、*C. burnetii* ゲノム DNA の十分な確保にも難航し、結果を出すことができなかったのは反省点である。

しかしながら、IFA における抗体調査で、多くの陽性血清を確保することができた。Q 熱に関しては、十分な数の陽性検体が確保できず、現行の Com-1-ELISA の評価がしにくい状況であった。今後、IFA 陽性を示したウシ血清が Bartonella 属等との交差反応ではないことを確認し、感度向上を含めた、Com-1-ELISA 評価に用いることができるのではないかと期待している。

E. 結論

H19-21 年度までの 3 年間で以下の 2 つに大別される結果を得ることができた。

- ・ 野外の齧歯類が *C. burnetii* に感染していることが IFA で再確認され、野生齧歯類がコクシエラ症の伝播に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

- ・ *C. burnetii* ライブラリースクリーニングの結果得られた外膜蛋白質 Com-1 を抗原とした ELISA の系を樹立し、重篤な感染を示した動物より抗体を検出することができた。今後は、IFA 陽性を示した野外の齧歯類やウシ血清を用いて、実用化に向

けた検討を行う。

constituents. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 62 :
481-484, 2009

J. 健康危険情報

なし

2.学会発表

- 1) 奥田秀子、大屋賢司、安藤匡子、小宮智義、野村彩朱、矢野竹男、平井克哉、福士秀人：
Coxiella burnetii 外膜蛋白質 Com1 の診断用抗原としての有用性：第 147 回日本獣医学会，宇都宮(2009.4)

K. 研究発表

1.論文発表

- I. Russell-Lodrigue, KE., Andoh, M., Poels, MW., Shive, HR., Weeks, BR., Zhang, GQ., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, DN., Samuel, JE.: *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect. Immun. 77 : 5640-5650, 2009
- II. Fukushi, H., Inoue, K., Saito, L., Ohya, K., Sashihara, N., Yamaguchi, T., Hirai, K.: Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and

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

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担者研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

バルトネラ感染症の疫学

研究分担者 丸山 総一 日本大学 教授

研究要旨:本研究では、北米(カナダ, アメリカ), アジア(日本, 韓国, 中国), およびヨーロッパ(イギリス, スウェーデン, ロシア)の8カ国で分離された*Bartonella grahamii*について遺伝子系統解析を行い、本菌種の地理的起源および拡散経路の解明を試みた。分離株は、日本, 韓国, および中国分離株からなるAsia系統と、カナダ, アメリカ, ロシア, スウェーデン, およびイギリス分離株からなるAmerica/Europe系統に分類された。また、各国分離株の*gltA*遺伝子を用いて系統解析を行ったところ、わが国に分布する*B. grahamii*は極東ロシア型, および韓国・中国型の2つの系統に分類されたことから、わが国に分布する*B. grahamii*には、異なる地域から移入したと思われる2つの遺伝子系統が存在することが明らかとなった。また、北米とヨーロッパ諸国との地理的距離が遠くなるにしたがい、その相同性が低くなる傾向があること、北米に分布する*B. grahamii*は、America/Europe系統の中でも祖先的系統に位置していたこと、さらに北米に分布する*B. grahamii*の宿主域は限局されているものの、ヨーロッパ大陸の*B. grahamii*の宿主域は広いことから、本菌は宿主に対する適応進化にともない、北米からヨーロッパへ拡散していったものと考えられた。

A. 研究目的

*Bartonella grahamii*は、人の視神経網膜炎の起
因菌となる *Bartonella* 属菌で、わが国の野鼠に高
率に分布していることが明らかとなっている。また、
本菌は、わが国以外にも北米、アジア、およびヨ
ーロッパ等の世界各国の小型哺乳類から分離さ
れているものの、それらの株の遺伝的多様性と
地理的分布との関連性は明らかにされていない。
そこで本研究では、北米、アジア、およびヨーロ
ッパの8カ国で分離された *B. grahamii* を用い、本菌
種の遺伝的多様性と地理的分布との関連性を明
らかにし、本菌種の進化系統、地理的起源、およ

び拡散経路について検討した。

B. 研究方法

日本(15株)、韓国(2株)、中国(4株)、イギリ
ス(1株)、ロシア(2株)、スウェーデン(5株)、カナ
ダ(6株)、およびアメリカ(3株)で分離された合計
38株の *B. grahamii* について(表1)、本属菌のハ
ウスキーピング遺伝子6領域(16S rRNA, *ftsZ*,
groEL, *gltA*, *ribC*, および *rpoB*)を用いた Multi
Locus Sequence Analysis (MLSA)を行った。また、
各国分離株の *gltA* 遺伝子に、GenBank から、3株
の極東ロシア・ハバロフスク市の分離株(Far East

I~III), および 1 株のアメリカ・カリフォルニア州分離株(MM5136CA)の同領域を加え, 遺伝子系統解析を行った。

(倫理面からの配慮について)
なし

C. 研究結果

MLSAの結果, 分離株は日本, 韓国および中国由来分離株からなるAsia系統と, カナダ, アメリカ, ロシア, スウェーデンおよびイギリス分離株からなるAmerica/Europe系統に分類された(図1)。

Asia系統に属する分離株に, 極東ロシアのハバロフスク市で分離された3株の*B. grahamii*を加え, *gltA*領域に基づく系統解析を行ったところ, わが国の分離株は, 極東ロシア分離株と同一の遺伝子系統を形成するものと, 韓国と中国分離株と同一の遺伝子系統を形成するものの2系統に分類された(図2)。

America/Europe系統に属する分離株の6遺伝子領域の連結配列の塩基相同性を比較したところ, 北米とヨーロッパ諸国との地理的距離が遠くなるにしたがい, その相同性が低くなる傾向があることが明らかとなった。また, カリフォルニア州で分離された*B. grahamii*(MM5136CA株)を加え, *gltA*領域に基づく系統解析を行ったところ, MM5136CA株はAmerica/Europe系統の祖先的系統に位置することが明らかとなった(図2)。さらに, 北米に分布する*B. grahamii*の宿主域は限局されているのに対し, ヨーロッパ大陸に分布する*B. grahamii*は広い宿主域を有することが明らかとなった。

D. 考察

わが国に分布する*B. grahamii*は極東ロシア型, および韓国・中国型の2つの遺伝子系統に分類されたことから, わが国の*B. grahamii*には, 異なる地域から移入したと思われる2つの系統が存在することが明らかとなった。

America/Europe系統に属する*B. grahamii*を用いたMLSAの結果, 北米とヨーロッパ諸国との地理的距離が遠くなるにしたがい, その塩基相同性が低くなる傾向があること, カリフォルニア州で分離された*B. grahamii*(MM5136CA株)は, America/Europe系統の中でも祖先的系統に位置していたこと, さらに北米に分布する*B. grahamii*の宿主域は限局されているのに対し, ヨーロッパ大陸に分布する*B. grahamii*の宿主域は広いことから, America/Europe系統の*B. grahamii*の地理的起源は北米であり, 北米大陸とユーラシア大陸がベーリング陸橋を形成していた氷河期に, 宿主動物への適応進化を伴いながら, 北米からヨーロッパの方向へ拡散していった可能性が示唆された。

E. 結論

本研究から, わが国に分布する*B. grahamii*には, 異なる地域から移入したと思われる2つの系統が存在すること, America/Europe系統の*B. grahamii*の地理的起源は北米であり, ベーリング海峡を経由してヨーロッパ大陸に, 宿主への適応進化を伴いながら拡散した可能性があることが明らかとなった。

L. 健康危険情報

わが国の齧歯類は, 人の視神経網膜炎の原因となる*Bartonella grahamii*を高率に保菌している。

M. 研究発表

1. 論文発表

III. Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and Maruyama S.: Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microb. Ecol.* 57: 534-541, 2009

IV. Bouchoucha, R., Durand, B., Monteil, M., Chomel, B. B., Berrich, M., Arvand, M., Birtles, R., J., Breitschwerdt, E. B., Koehler, J. E., Maggi, R., Maruyama, S., Kasten, R., Petit, E., Boulouis, H-J., and Haddad, N. 2009. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. *Emer. Infect. Dis.* 15(5):813-816.

2. 学会発表

2) 井上 快, 壁谷英則, Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., 丸山総一: 野鼠由来 *Bartonella grahamii* の遺伝的多様性と地理的分布の関係: 第 144 回日本獣医学会, 北海道 (2007, 9)

3) 井上 快, 壁谷英則, Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., 丸山総

一: 野鼠由来 *Bartonella grahamii* の進化系統と地理的起源: 第 40 回日仏獣医学会, 東京 (2009, 2)

4) 井上 快, 壁谷英則, 川端寛樹, 宇根有美, 吉川泰弘, 丸山総一: 小型哺乳類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌の生態に関する研究: 第 147 回日本獣医学会プレナリーセッション, 栃木 (2009, 4)

5) Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M.Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and Maruyama S.: Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis: 6th International Conference on *Bartonella* as Medical and Veterinary Pathogens, Liverpool, UK (2009, 6)

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

表 1. 本研究で用いた *B. grahamii* が分離された国、地域、宿主動物、および株名

国	地域	宿主動物 (学名)	株名
日本	北海道	アカネズミ (<i>Apodemus speciosus</i>)	Hokkaido 4-1
	北海道	ヒメネズミ (<i>A. argenteus</i>)	Hokkaido 48-1
	青森	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Aomori 23-1
	青森	ヒメネズミ (<i>A. argenteus</i>)	Aomori 40-1
	神奈川	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Fujisawa 5-1
	神奈川	ヒメネズミ (<i>A. argenteus</i>)	Fujisawa 1-1
	静岡	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Fuji 4-1
	静岡	ヒメネズミ (<i>A. argenteus</i>)	Fuji 6-1
	長野	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Nagano 3-1
	長野	ヒメネズミ (<i>A. argenteus</i>)	Nagano 32-1
	石川	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Ishikawa 4-1
	徳島	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Tokushima 4-1
	愛媛	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Ehime 1-1
	鹿児島	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Nakanoshima 7-1
	鹿児島	アカネズミ (<i>A. speciosus</i>)	Nakanoshima 10-1
韓国	済州島	セスジアカネズミ (<i>A. agrarius</i>)	Korea 4-1
	済州島	セスジアカネズミ (<i>A. agrarius</i>)	Korea 8-1
中国	雲南省	スーチョワンセスジネズミ (<i>A. chevrieri</i>)	Ac1692yn
	雲南省	タツアカネズミ (<i>A. draco</i>)	Ad1734yn
	雲南省	オオミミモリアカネズミ (<i>A. latronum</i>)	AL1707yn
	雲南省	オオミミモリアカネズミ (<i>A. latronum</i>)	AL1714yn
アメリカ	サウスダコタ州	プレーリーハタネズミ (<i>Microtus ochrogaster</i>)	B12509
	サウスダコタ州	プレーリーハタネズミ (<i>Mi. ochrogaster</i>)	B12511
	サウスダコタ州	プレーリーハタネズミ (<i>Mi. ochrogaster</i>)	B12512
カナダ	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>Myodes gapperi</i>)	Cg4224alb
	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>My. gapperi</i>)	Cg4226alb
	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>My. gapperi</i>)	Cg4227alb
	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>My. gapperi</i>)	Cg4228alb
	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>My. gapperi</i>)	Cg4263alb
	アルバータ州	アメリカヤチネズミ (<i>My. gapperi</i>)	Cg4285alb
ロシア	モスクワ市	ウラルアカネズミ (<i>A. uralensis</i>)	PTZB 29/18
	モスクワ市	キクビアカネズミ (<i>A. flavicollis</i>)	PTZA 30/3
スウェーデン	ウプサラ市	モリアカネズミ (<i>A. sylvaticus</i>)	as4Aup
	ウプサラ市	モリアカネズミ (<i>A. sylvaticus</i>)	as211up
	ウプサラ市	キクビアカネズミ (<i>A. flavicollis</i>)	af140up
	ウプサラ市	ハツカネズミ (<i>Mus musculus</i>)	mm3up
	ウプサラ市	ヨーロッパヤチネズミ (<i>My. glareolus</i>)	cg147up
イギリス	シュロープシャー州	ヨーロッパヤチネズミ (<i>My. glareolus</i>)	V2T*

* T は標準株を示す。

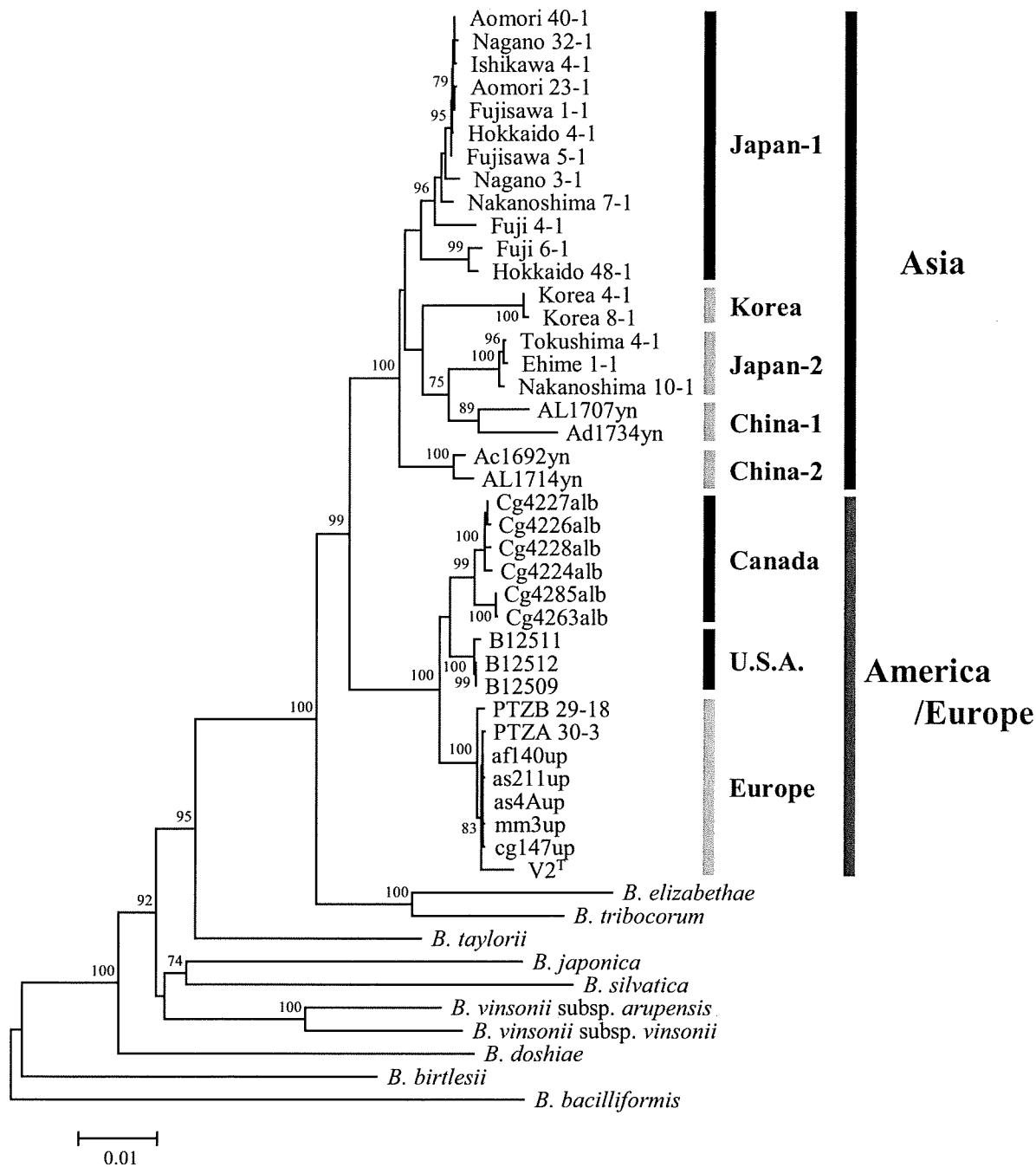


図1. 本研究で用いた *B. grahamii* 38 株および小型哺乳類由来 *Bartonella* 属菌の 6 遺伝子領域を連結した配列 (5,085bp) に基づく系統樹 (分離地域別)

※ブートストラップ値は 70%以上の値を示す内部枝のみ記載し、各遺伝子系統名は右に示した。

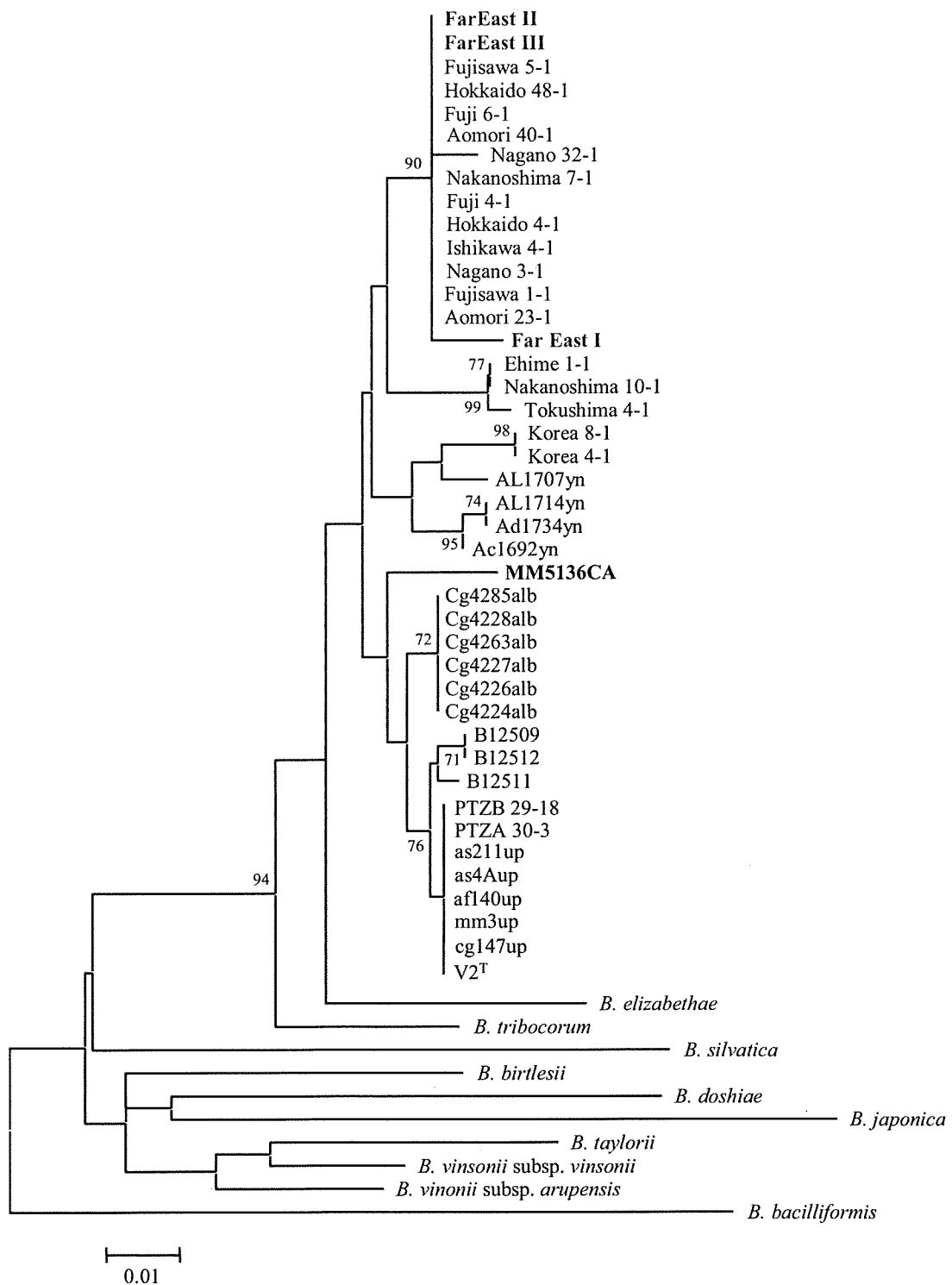


図 2. 本研究で用いた *B. grahamii* 38 株にハバロフスク市の 3 株、カリフォルニア州の 1 株、および小型哺乳類由来 *Bartonella* 属菌を加えた *gltA* 領域に基づく系統樹
 ※ブートストラップ値は 70%以上の値を示す内部枝のみ記載した。赤字は、ハバロフスク市で分離された Far East I 株、Far East II 株、および Far East III 株を示し、青字は、カリフォルニア州で分離された MM5136CA 株をそれぞれ示す。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

YOP と LPS を抗原にした ELISA 法によるヒトエルシニア症の血清学的診断と沖縄本島やんばる地域に生息するノネズミからの *Salmonella* と病原性 *Yersinia* の分離

研究分担者 林谷秀樹 東京農工大学大学院・准教授

研究要旨：平成 20 年度の研究で開発した YOP と LPS を抗原にした ELISA 法を、エルシニア症が疑われるヒト血清 57 検体の診断に応用したところ、57 検体中 29 検体（50.9%）がエルシニア症陽性と判定された。また、エルシニア症陽性患者はいずれも *Y. pseudotuberculosis* の感染によるもので、7 血清型が同定された。また、沖縄本島やんばる地域に生息するクマネズミ 219 検体から *Salmonella* と病原性 *Yersinia* の分離を行ったところ、*Salmonella* は 11 検体（5.0%）から分離された。また、平成 19 年度の研究で開発した Multiplex PCR による *Salmonella* の生物型別法により、分離された *Salmonella* 11 株は 7 株が生物群 1 に、5 株が生物型 3 群に同定された。また、病原性 *Y. enterocolitica* が 1 検体から分離された。これらのことから、平成 19 年度に開発した Multiplex PCR による *Salmonella* の生物型別法ならびに平成 20 年度の研究で開発した YOP と LPS を抗原にしたエルシニア症の血清診断のための ELISA 法はいずれも実用的かつ有用な手法であると思われた。

A. 研究目的

Yersinia 属菌は、腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌で、現在 14 菌種に分類されている。そのうち、食中毒起因菌である *Yersinia enterocolitica* および仮性結核菌である *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種は、人獣共通感染症の原因菌として知られており、両者による感染症は総称してエルシニア症と呼ばれている。*Y. enterocolitica* は通常 O 抗原により型別され、現在 51 の O 血清群に分けられており、

このうち O:3, O:4, 32, O:5, 27, O:8, O:9, O:13a, 13b, O:18, O:20 および O:21 の 9 血清群が人に病原性を示すことが知られ、特に O:3, O:5, 27, O:8 および O:9 は、人や動物からの分離頻度が高い代表的な病原性血清群とされている。また、*Y. pseudotuberculosis* は、1~15 群の血清群に群別され、そのうち 1, 2, 4 および 5 群はさらに数亜群に分けられており、現在までのところ、21 の血清群が知られている。

このうち 1~6, 10 および 15 群が病原性を有している。

人がエルシニア症に感染すると、一般的には発熱、下痢および腹痛などの胃腸炎症状を示すが、病原性 *Y. enterocolitica* のうち最も強毒な血清群 0:8 や *Y. pseudotuberculosis* による感染では、胃腸炎に留まらず、敗血症のような全身症状を示すことも珍しくない。特に我が国では *Y. pseudotuberculosis* による感染の場合、幼児などでは下痢や腹痛などの胃腸炎症状を示さずいきなり敗血症などの重篤な臨床症状を呈することが多い。その場合、臨床医は病原体の分離・同定ができないまま抗生物質を投与して治療を行うため、症状が改善されてからでは病原体が検出できず、結果として抗体値を測定するなどの血清学的診断を行わなければならない場合が多々みられる。

平成 20 年度の研究で、病原性 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* が共通して産生し、マクロファージの食作用の阻害と食細胞内での殺菌作用に対する抵抗性などに関与すると考えられている菌体外タンパクである *Yersinia* outer membrane protein (Yop) と両菌種の菌体から抽出した LPS を抗原とした菌種同定と血清型別が迅速にできる ELISA 法を開発し、その有効性を検討した。本年度は、この開発した ELISA 法を応用してエルシニア症の感染の疑いのあるヒト患者血清に対して血清学的診断を行ない、原因菌種と血清群の同定を行なった。

また、東南アジアには広く分布するが、日本本土ではほとんど検出されない *Salmonella* Weltevreden が沖縄県では人や家畜から高頻度に検出される。これらは地球温暖化に伴い、東南アジアから北上し、侵入してきた可能性が考えられる、また、病原性 *Y. enterocolitica* の中で最も病原性の強い血清型 0:8 は、これまでの研究では東日本で感染患者が多発し、これらの地域に生息するアカネズミやヒメネズミなどの野生げっ歯類が保菌動物となっていることが明らかになっているが、2007 年に沖縄本島のやんばる地域で感染患者が確認されたことから、本県の野生げっ歯類にも 0:8 菌が侵入・定着している可能性が考えられる。そこで、沖縄本島のやんばる地域で捕獲したクマネズミから病原性エルシニアやサルモネラの検出や同定を行ない、この地域への上記病原体の侵淫状況を検討するとともに、分離された *Salmonella* については、平成 19 年度に開発した Multi-plex PCR による *Salmonella* の生物型別法を応用し、生物型別を行った。

B. 材料と方法

1. YOP および LPS を抗原とした ELISA 法によるエルシニア症が疑われるヒト血清の抗体価の測定

1) 供試菌株

病原性 *Y. enterocolitica* 03, 05, 27, 08, 09 ならびに *Y. pseudotuberculosis* の 21 血清型を供試菌株とした。

2) 供試血清

2005年2月～2009年10月の間に全国の病院から、エルシニア症の疑いがあり血清学的診断のために東京農工大学農学部獣医学科獣医衛生学研究室に送付された57名分の血清を供試検体とした。供試血清の年齢は11ヵ月～50歳の間に分布しており、平均年齢は9.92歳であった。

3) ELISAによる抗体価の測定

(1) 抗原

ELISAのための抗原として、病原性 *Yersinia* の産生する菌体外膜タンパク (YOP) ならびにLPSを用いた。YOPは以下のように作成した。供試菌株として *Y. pseudotuberculosis* 血清型4bを用い、菌株をBrain Heart Infusion (BHI) 液体培地(BBL)に接種し、25°Cで24時間培養後、20倍量のBHI液体培地に接種した。BHI液体培地は37°Cで90分振盪培養後、0.45μmメンブレンフィルターで濾過滅菌したEthylene glycol-bis (β-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) を10mMになるように添加し、さらに37°Cで90分間振盪培養後、2,000 rpmで30分遠心分離し、その上清を0.45μmフィルターで濾過した。濾過上清は ammonium sulphate を40mg/mlになるように添加してよく混合した後、2,000 rpmで30分遠心分離し、上清を捨てて沈殿物を得た。沈殿物は蒸留水に溶解し、透析膜で透析後、凍結乾燥した。また、LPSはすべての供試菌株から市販のキットを用いて抽出した。

(2) ELISAの測定

抗原としてYopは250μg/mlに調整したものを、LPSはキットで精製したものを50倍に希釈したものをELISA用96穴マイクロプレートの各ウエルに50μlずつ分注し、4°Cで24時間静置した。次に、各ウエルの抗原液を除去し、被検血清中の蛋白質が非特異的にプレートに結合するのを阻止するため、ウシ血清アルブミン加PBSを10倍希釈して各ウエルに300μlずつ分注し、室温で15分間反応させた後、反応液をウエルより除去した。そして、このウエルに80倍に希釈したヒトの血清を50μlずつ入れ、室温で1時間反応させた。その後反応液を捨て、Wash solutionで3回洗浄した。2次抗体として、1,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識Protein G (Invitrogen) または300倍希釈したペルオキシダーゼ標識山羊抗ヒトIgG(cappel) を50μlずつ加え、室温で1時間反応させた後、反応液を捨て、Wash solutionで洗浄した。その後、ABTS (2,2'-azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 溶液を50μlずつ分注し、20分間室温で静置後、マイクロプレートリーダーを用いて、波長405nmでの吸光度をOptical Density (OD) 値として測定した。

4) ゲル内沈降反応による血清型別

病原性 *Y. enterocolitica* ならびに *Y. pseudotuberculosis* の血清型別には、ゲル内沈降反応も平行して行った。ゲルとしては0.1MTris-HCl (pH7.2) にアガロースME(和光)を0.7%の濃度となるように加え、加温溶解したものをスライドガラス上にまいて固めた。抗原のLPSはすべての供試菌

株からキットで精製したものを 0.1MTris-HCl (pH7.2) で適切な濃度に希釈したものをを用いた。ゲルにゲルパンチャーで穴を開け、中央のウェルに供試検体を、周囲のウェルには病原性 *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の各血清群の LPS 液を 20 μ l ずつ加えた後、保湿箱に入れ 25°C で一晩静置した。菌種ならびに血清型は形成された免疫沈降線を確認することで行った。

2. 沖縄県やんばる地域で捕獲したクマネズミからの *Salmonella* と *Yersinia* の分離

1) 供試検体

2009 年 4 月～11 月の間に沖縄本島北部のやんばる地域の山間部で捕獲したクマネズミ 219 頭を供試検体とした。

2) *Salmonella* と *Yersinia* の分離

供試検体から採取した直腸内容物約 1g を 5ml の滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, pH7.2, 以下, PBS) に浮遊させ、培養液とした。

Salmonella の分離は、培養液の 1ml を 10ml の Buffered Peptone Water (Becton, Dickinson and Company:BD) に接種した後、37°C で 24 時間増菌培養した。その培養液 1ml を 10ml のハーナ・テトラチオン酸塩培地 (栄研) に接種し、37°C で 24 時間増菌培養後、その 1 白金耳を DHL 寒天培地 (日水) ならびに MLCB 寒天培地 (日水) に画線塗抹し、37°C で 24 時間培養した。各分離培地上に発育してきた *Salmonella* 属菌を疑う典型的なコロニーから 1～3 個を釣菌し、それ

ぞれを trypticase soy agar (BD, 以下, TSA) を用いて純培養後、TSI 寒天培地 (日水), LIM 培地 (日水) および VP 半流動培地 (栄研) を用いて生化学性状試験を行った。*Salmonella* 属菌と同定された菌株については、平成 19 年度の研究で開発した Multiplex PCR 法により生物群の群別を行い、さらに市販のサルモネラ免疫血清 (デンカ生研株式会社, 東京) を用い、血清型を決定した。

Yersinia の分離・同定は以下のように行った。培養液を 4°C で 3-4 週間、低温培養した。その後、0.4%KOH を用いてアルカリ処理後、IN 培地に塗抹し、25°C で 24-48 時間培養後、培地上に発育してきた *Yersinia* 属菌を疑う典型的なコロニーから 1～3 個を釣菌し、それぞれを TSA 平板培地 (BD) を用いて純培養後、TSI 寒天培地 (日水), LIM 培地 (日水) および尿素培地 (栄研) を用いて生化学性状試験を行った。*Yersinia* 属菌と同定された菌株については、その菌種まで同定するとともに、病原性 *Yersinia* については血清型別を行った。

C. 研究結果

1. YOP および LPS を抗原とした ELISA 法によるヒト血清の抗体価の測定結果

二次抗体として ProteinG を用いた場合、供試検体の OD 値は 0.024～0.748 の範囲に分布し、また、抗ヒト IgG 抗体を用いた場合は、OD 値は 0.009～0.468 の範囲に分布していた。過去の我々の調査で YOP を抗原とした同様の ELISA 法でエルシニア症に感

染していないヒト血清を測定し算出されたエルシニア症感染陽性と陰性を分けるためのカットオフ値は、二次抗体として ProteinG を用いた場合は、0.106、抗ヒト IgG 抗体を用いた場合は 0.030 であった。このカットオフ値から二次抗体として ProteinG を用いた場合と抗ヒト IgG 抗体を用いた場合のいずれも供試 57 検体中 29 検体 (50.9%) がエルシニア感染陽性と判定された。また、エルシニア感染陽性と判定された検体は、二次抗体として ProteinG と抗ヒト IgG 抗体を用いた場合のいずれも一致していた。二次抗体に ProteinG と抗ヒト IgG 抗体を用いた場合の OD 値の相関係数を算出すると 0.94 で、有意 ($P < 0.05$) な相関関係が認められた。

YOP を抗原とする ELISA でエルシニア感染陽性と判断された 29 検体では、LPS に対する ELISA で反応が認められ、血清型別が可能であった。エルシニア感染陽性と判定された 29 検体のいずれも *Y. pseudotuberculosis* による感染で、血清型は 1b が 8 検体 (27.6%)、3 型が 6 検体 (20.7%)、6 型が 5 検体 (18.5%)、2a, 2b および 4b がそれぞれ 3 検体 (10.3%)、ならびに 2c が 1 検体 (3.5%) であった。LPS に対する ELISA で同定された血清型は、ゲル内沈降反応による血清型別の成績とすべて一致していた。

2. 沖縄県やんばる地域で捕獲したクマネズミからの *Salmonella* と *Yersinia* の分離成績

Salmonella は、供試したクマネズミ 219 検体 11 検体 (5.0%) から分離された。分離された

Salmonella 11 株は、開発した Multiplex PCR 法により、7 株が生物群 I に、5 株が生物型 III に同定された。

Yersinia は低温増菌培養が終わった 169 検体中 11 検体 (6.5%) から分離された。分離された *Yersinia* 11 株のうち、1 株が *Y. enterocolitica* 血清型 03 の病原株であった。

D. 考察

臨床症状などからエルシニア症が疑われたヒト患者血清 57 検体について、平成 20 年度に開発した YOP と LPS を抗原とした ELISA 法でエルシニア症の血清学的診断を行なった結果、YOP に対する二次抗体として、ヒト抗 IgG 抗体を用いた場合と ProteinG を用いたいずれの場合も供試 57 検体中 29 検体 (50.9%) がエルシニア症陽性と診断された。今回、供試した検体は臨床症状からエルシニア症が疑われながらも、糞便などから菌分離ができなかったため確定診断できなかった患者の血清であるが、本研究によりエルシニア症が疑われた検体のうち、約半数がエルシニア症であり、そのすべてが *Y. pseudotuberculosis* の感染であることがわかった。本研究により、平成 20 年度に開発した YOP と LPS を抗原とした ELISA 法はエルシニア症の迅速な血清学的診断法として有用であると思われた。特に、ゲル内沈降反応は病原性 *Y.*

enterocolitica または *Y. pseudotuberculosis* に感染したヒト又は動物の血清から原因菌の血清型を知る方法としては最も簡便であるが、すべての血清型と当てるためには、多量の血清検体がないと実施が難しい。LPS を抗原とした ELISA は比較的微量の血清があれば血清型が判別できるので、そのような観点からも有益な方法と思われる。

エルシニア症のうち、*Y. enterocolitica* 感染症は食品衛生法において感染型食中毒として届出義務があるが、*Y. pseudotuberculosis* 感染症については、食品衛生法でも感染症法でも定義されていないので、届け出義務がなく、その実態は明らかではない。また我が国には、*Y. pseudotuberculosis* 感染症の血清学的診断を行なえる公的施設や民間検査機関は現在ないので、患者から菌分離ができなかった場合、*Y. pseudotuberculosis* 感染症と診断することはできないのが現状である。今回の調査により、我が国において *Y. pseudotuberculosis* 感染症が、潜在的に比較的多数発生していることが判明した。また、本研究で二次抗体として、抗ヒト IgG 抗体と ProteinG を用いて比較検討したが、いずれを用いた場合もエルシニア症陽性と診断された検体は一致しており、かつ両者間の抗体価 (OD 値) は相関係数が 0.94 と高かったことから、その特異性と感度はほぼ同じと考えられた。ProteinG のほうが抗ヒト IgG 抗体より、安価で取り扱いも容易であり、かつサルなどの動物のエルシニア

症の血清学的診断でも共通で使用できることから、今後は二次抗体として Protein G を用いることが可能であると考えられた。

沖縄本島北部のやんばる地域の山間部で捕獲したクマネズミからは 5.0% の割合で *Salmonella* が分離された。また、分離された *Salmonella* の生物型別には平成 19 年度の研究で開発した Multiplex PCR は有効であった。本研究により沖縄本島やんばる地域のクマネズミには、広く *Salmonella* が分布していることが明らかになった。また、分離菌株についてすべての血清型別は終了していないが、今後 S. Weltevreden をはじめ、どのような血清型が分布しているか、また、薬剤耐性の状況などがなどについて検討していきたい。また、クマネズミから 1 検体ではあるが、血清型 03 の病原株が分離された。東北地方のアカネズミやヒメネズミからの *Y. enterocolitica* 血清型 08 の分離例は報告されているが、野生のげっ歯類、特にイエネズミであるクマネズミやドブネズミからの病原性 *Y. enterocolitica* の分離例は極めて少ない。本研究により沖縄本島のやんばる地方のクマネズミから病原性 *Y. enterocolitica* が分離されたことから、今後さらに例数を増やして、特に本地域でヒト感染患者が確認されている *Y. enterocolitica* 血清型 08 の保有状況について、精査していきたい。

E. 結論

平成 20 年度の研究で開発した YOP と LPS を抗原にした ELISA 法を、エルシニア症が

疑われるヒト血清の診断に応用したところ、迅速かつ有用な方法であることが確認された。また、沖縄本島やんばる地域に生息するクマネズミから *Salmonella* と病原性 *Yersinia* が分離され、平成 19 年度に開発した Multiplex PCR による *Salmonella* の生物型別法は *Salmonella* の生物型別に有用であることと思われた。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee, K., Iwata, T., Shimizu, M., Taniguchi, T., Nakadai, A., Hirota, Y., and Hayashidani, H. A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. J. Appl. Microbiol. , 107: 805-811, 2009.
- 2) Ly, T. L. K., Tran, T. P., Nguyen, T. T., Iwata, T., Kobayashi, H., Okatani, A. T., Taniguchi, T., Ha, T. T. and Hayashidani, H. Prevalence of *Escherichia coli* O157 from cattle and foods in the Mekong Delta, Vietnam. J. Vet. Epidemiol. 13: 107-113, 2009.
- 3) Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Takada, T., Une, Y.: Spontaneous yersiniosis due to *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 7 in a squirrel monkey. J. Vet. Med. Sci.. 71, 1657-1659, 2009.

4) Ly, T. L. K., Tran, T. T. D., Nguyen, V. H., Tran, T. P., Iwata, T., Taniguchi, T., Ha, T. T. and Hayashidani, H. Isolation of *Salmonella* from flies in the Mekong Delta, Vietnam. J. Vet. Epidemiol. (in press)

5) Nakamura, S., Hayashidani, H., Iwata, T., Namai, S. and Une, Y. Pathological findings of spontaneous yersiniosis due to *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 in captive monkeys. J. Comp. Pathol. (in press)

6) Iwata, T., Une, Y., Nakamura, S., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Seroepidemiological survey of pathogenic *Yersinia* in breeding squirrel monkeys in Japan. J. Vet. Med. Sci. (in press)

7) Iwata, T. and Hayashidani H.: Yersiniosis in Breeding Monkeys in Japan, JARQ, (in press)

8) 林谷秀樹: エルシニア エンテロコリチカ, p132-135, 食品安全の辞典, 食品衛生学会編, 朝倉書店、2009.

9) 林谷秀樹: 仮性結核菌, p425-426, 食品安全の辞典, 食品衛生学会編, 朝倉書店、2009 .

2. 学会発表

- 1) 吉村遥子、岩田剛敏、中村進一、林谷秀樹、宇根有美、マーラ (*Dolichotis patagonum*) の致死性 *Salmonella* Enteritidis 感染症の集団発生、第 148