

200901012B

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成 19 年度～平成 21 年度 総合研究報告書

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成 19 年度～平成 21 年度 総合研究報告書

研究代表者 荻和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

| | |
|--|----|
| I. 総合研究報告 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 | 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 31 |
| III. 研究成果の刊行物・印刷 | 35 |

I. 総合研究報告

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

苅和宏明

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等振興・再興感染症研究事業)

総合研究報告書

国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断等の研究

研究代表者 苺和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

げっ歯類をベクターまたは病原巣動物とする人獣共通感染症には危険度の高いものが多数含まれる。ダニ媒介性脳炎、ハンタウイルス感染症、Q熱、バルトネラ感染症、エルシニア感染症、サルモネラ感染症、およびサル痘は、いずれもげっ歯類媒介性の重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報は不足している。さらに、輸入げっ歯類を対象とした検査体制も未整備である。そこで本研究ではこれらの感染症について、まず簡便で信頼性の高い診断法の開発を試みた。上記感染症に対して新規に診断法が開発されたことによって、調査や診断が容易になり、様々な疫学的情報が得られた。まず、北海道において10年以上にわたりダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が維持されていることが判明した。また、新たに島根県にもダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が存在することが明らかになった。ハンタウイルス感染症では各種のハンタウイルス型の感染に対する血清学的な鑑別診断法が開発されたばかりでなく、げっ歯類集団でのハンタウイルスの感染様式の一端が明らかになった。Q熱の病原体である *Coxiella burnetii* はわが国の野生げっ歯類に高率に感染していた。バルトネラ属菌はわが国の野生げっ歯類やニホンジカなどの野生動物に高率に感染していた。サルモネラ感染症とエルシニア感染症に対して Multiplex PCR による簡便な菌の同定法が確立された。エルシニア感染症が疑われながら細菌学的にエルシニア感染症と診断のできなかった患者の血清を、新規に開発された ELISA に供したところ、これらの患者の約半数が血清学的にエルシニア感染症と診断された。サル痘に対する LAMP 法が開発され、本症の簡便な遺伝子診断が可能になった。サル痘、ダニ媒介性脳炎、およびハンタウイルス感染症で、それぞれカニクイザル、マウス、シリアンハムスターを用いた感染モデルが確立され、体内でのウイルスの増殖様式や、病態が明らかになった。

研究分担者

高島郁夫・北海道大学・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・教授
林谷秀樹・東京農工大学・准教授
西條政幸・国立感染症研究所・室長
永田典代・国立感染症研究所・室長
早坂大輔・長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究協力者

桑崎俊昭・小樽検疫所・所長
松本泰治・小樽検疫所・室長
小原真弓・富山県衛生研究所・研究員

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎はロシア、東欧各国を中心に年間 8,000 名以上の患者が報告されている。ハンタウイルス感染症はこれまで中国、ロシア、ヨーロッパなどで多く報告され、年間の患者発生数が約 10 万人ほどとされているが、世界的に調査が不十分な地域が多く存在する。その他にも、国内外において Q 熱、バルトネラ感染症、エルシニア感染症、サルモネラ感染症、およびサル痘の患者が多数報告されているにもかかわらず、げっ歯類や野生動物における感染状況は不明な点が多い。本研究で取り上げる上記の感染症はいずれもげっ歯類媒介性の重篤な人獣共通感染症であり、国内外における汚染地やヒトにおける感染状況に関する情報は不足している。さらに、わが国には年間 70 万匹のげっ歯類が輸入され、愛玩動物として一般家庭で飼育されているにも関わらず、輸入げっ歯類を対象とした検査体制も未整備である。そこで本研究ではこれらの感染症について、まず簡便で信頼性の高い

診断法を開発する。続いて開発された診断法を用いて国内外の人獣共通感染症の感染状況を明らかにするとともに、輸入げっ歯類の検査への応用を検討する。また、上記の感染症について人もしくは宿主動物での感染動態を解析するための動物モデルの確立を目指す。

B. 研究方法

ダニ媒介性脳炎：

1) 被検サンプル

北海道、及び全国各地から集められた野生げっ歯類の血清は、56℃で30分加熱し非働化した後、使用まで-40℃で保存した。北海道の北松山町、北斗町上磯地区にて2008年の10月に疫学調査を行い、捕獲された122匹の野鼠を麻酔下での心採血により安楽殺して解剖し、脾臓、腎臓、肺を採取し、使用まで-80℃で保存した。

2) TBEウイルスの中空ウイルス様粒子(SPs)の産生と回収

TBEウイルスのprM蛋白とE蛋白領域をpCAGGSプラスミドにクローニングしたpTBEprMEを、293T細胞にトランスフェクションし、組み換え蛋白を発現させ、SPsを産生させ、ELISAの抗原に用いた。

3) 抗TBEウイルス抗体陽性の野鼠血清のスクリーニング用SP-ELISA法

抗E蛋白ウサギIgG抗体を捕捉抗体とし、陽性抗原としてSPs溶液、陰性抗原としてポリエチレングリコール沈殿した正常293T細胞培養上清を用い、捕捉抗体と反応させた。その後被検血清、ALP標識抗マウスIgG抗体、基質としてp-nitrophenyl phosphate (pNPP)(Sigma)を反応させ、吸光度を求め、本ELISAのOD値とした。

4) フォーカス減少法による中和試験

BHK細胞と96ウェル平底マイクロプレートを用

いた、50%フォーカス減少法により実施した。中和抗体価が40倍以上となった血清を中和試験陽性とした。

5) 臓器乳剤の哺乳マウス脳内接種

哺乳マウスへの脳内接種を行う検体は、野生げっ歯類の脾臓1~6匹分を1プールとして合計16プールを用意し、乳剤を調整した。これらの脾臓乳剤を1~2日齢のBALB/c哺乳マウスの脳内に25 μ l接種し、接種後14日目まで観察を行った。

6) 分離株の塩基配列決定

得られたPCR産物を用い、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られたデータは ATGC ver.6 (GENETYX CORPORATION) によって解析し、塩基配列を決定した。

7) 分離株の系統樹解析

E蛋白質の1,488塩基対を元に、近隣接合法 (NJ法) を用いて多重解析を行い、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0プログラムパッケージを使用して系統樹を作成した。

8) マウスモデルを用いたTBEVの致死性に関わる病原性発現機序の解析

TBEV Oshima株を高接種量 (10^7 PFU) および低接種量 (10^3 PFU) で雌5週齢C57BL/6jマウスに皮下接種し、症状、生死を経日観察した。また、中枢神経組織の部位ごとのウイルス量、脳での炎症反応、血清中のホルモンおよびサイトカイン発現量を測定した。

ハンタウイルス感染症:

1) 抗原

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 で処理して Western blotting 抗原を調整し、これをさらに超音波処理したものを ELISA 抗原とした。また、NP の N 末端を削除したトランケート抗原を同様に発現させ、血清型鑑別のための ELISA 抗原とした。また、全長の NP はさらに pET43.1 ベクターを用いて大腸菌に発現させ、精製して ELISA 抗原として用いた。

2) 患者血清および野生動物血清

Sin Nombre virus (SNV)/ Andes virus (ANDV)/ Laguna Negra 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ない。

3) 北海道の野生げっ歯類における疫学調査

北海道の中川町と当別町の森林において合計199匹のエゾヤチネズミを捕獲し、血清や各種臓器を採材した。抗体検出用 ELISA(Ab-ELISA)によって血清中の抗ハンタウイルス抗体の検出を行うとともに、抗原検出用 ELISA(Ag-ELISA)によりエゾヤチネズミの肺中のハンタウイルス NP の検出を試みた。

4) Puumala ウイルスのシリアンハムスターへの感染

4週齢および8週齢のシリアンハムスターに Puumala virus の標準株である Sotkamo 株を 3,300ffu 皮下接種し、7, 14, あるいは 28 日目に臓器を採取した(一群1匹あるいは2匹)。対照群

には細胞培養液(MEM)を皮下接種し材料を採取した。これら採取した組織材料(肺、腎、肝、脾、脳、心、直腸、4週齢のみ副腎)は10%ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。このホルマリン固定組織材料とウイルス特異的抗体を用いて病理学のおよび免疫組織学的検索を行い、病理学的変化とウイルス抗原の検出を行った。なお、感染ハムスターの臓器中(肺、腎、脾、肝、心、および脳)におけるウイルスの定量(viral RNA copies/ng of GAPDH)はReal-time PCRによって実施した。

Q熱: 北海道で2004年から2005年に捕獲されたエゾヤチネズミ(*Myodes rufocanus*)の血清87検体とアカネズミ(*Apodemus speciosus*)の血清18検体、および北海道の5牧場で飼育されているウシの血清431検体を得た。これらの血清中の抗*C. burnetii*抗体を*C. burnetii*感染BGM細胞を用いたIFAで検出した。

バルトネラ感染症: 2005年8月に北海道札幌市で捕獲した野鼠53頭(アカネズミ31頭、ヒメネズミ5頭、エゾヤチネズミ17頭)の血液と野鼠の体表から採取したネズミノミ40匹(*Ctenophthalmus congener truncus* 32匹, *Hystrihopsylla microti* 3匹, *Neopsylla sasai* 5匹)について、バルトネラ属菌の検索を行った。

神奈川県丹沢山系のニホンジカ8頭、および寄生マダニ3種178匹、ヒメシカシラミバエ5匹について*Bartonella*属菌の分布状況を調査した。

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。

サルモネラ感染症: サルモネラの6つの遺伝子を同時に増幅することが可能な Multiplex PCR法の有用性を検討した。

エルシニア感染症: *Y.pseudotuberculosis* と病原性 *Y.enterocolitica*、さらに“American Strains”を迅速かつ簡便に検出できる multiplex PCR法の有用性を検討した。また、*Yersinia* 属菌の *inv* 遺伝子を標的遺伝子として Real-time PCR法による迅速な定量的検出法の開発を試みた。さらに、病原性 *Yersinia* の菌種と血清型の鑑別が可能な血清診断法として菌体外膜蛋白質(YOP)とLPSを抗原とするELISAの開発を試みた。

サル痘: サル痘ウイルス感染症の迅速診断法として Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発した。本LAMP法をサル痘感染カニクイザルからのサル痘ウイルスDNAの検出に応用した。サル痘感染カニクイザルについて病理検索を実施した。サル痘ウイルス感染症の病態を明らかにするため、カニクイザルにおけるサル痘ウイルス感染症(いわゆるサル痘)の内臓病変について解析した。サル痘ウイルス Zr-599/SC株と Liberia株を皮下接種と鼻腔内噴霧接種によりカニクイザルに接種し、3週間の症状観察と病理検索を実施した。3頭のカニクイザルにサル痘ウイルス Zr-599株または Liberia株を、それぞれ 10^6 PFUの感染価で皮下接種した。感染前、感染後第10日(または13日目)、21日目に末梢血液を採取した。血漿を分離し、熱非働化(56度30分)処理した後、プロテオミックス解析に供した。

(倫理面からの配慮について)

カニクイザルの感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

TBE ウイルスの疫学調査に用いる上で有用と考えられるげっ歯類の血清から、TBE ウイルス特異抗体を検出するためのサンドイッチ ELISA法を開発した。本法の抗原には、中空のウイルス様粒子(Subviral particles; SPs)を用いた。SPsは、組換え prM、E 蛋白を哺乳動物細胞で発現させることで作製され、本来のウイルスと同様の抗原性および免疫原性を示すことが明らかとなっている。中和試験を基準とした本法の検出精度を検討するため、中和試験陽性 35 検体、陰性 85 検体のげっ歯類に対し、本法を用いて抗体の検出を行った。その結果、Cut off 値 0.089 において感度 91.4%、特異度 100%とともに高い検出精度を示した。さらに、極東型 TBE ウイルス流行地区のロシアハバロフスク市で行った疫学調査で得たげっ歯類血清に対し、本法を応用した。疫学調査から得られたげっ歯類 29 検体のうち、3 検体が ELISA 陽性と判定され、中和試験においても高い中和抗体価を示した。また、本法で陰性と判定された 26 検体全てが中和試験でも陰性と判断された。全国各地のげっ歯類血清の抗体調査では鳥根県の 58 検体のうち 2 検体が TBEV 特異抗体陽性となった。このことから北海道以外に TBEV の汚染地が存在することが示唆された。

1990年代にTBEV抗体がげっ歯類で検出された北海道南部(道南)地域においてげっ歯類の抗体調査を行った。2001年、2008年を合わせて224のげっ歯類検体が集められ、まずSP-ELISA法によりそれら全てのげっ歯類血清中の抗TBEウイルス抗体を検査した。その結果、SP-ELISAでは17検体が陽性と判定された。これら血清について中和試験を行った結果、17検体全てで中和抗体価が40倍以上あり、抗体陽性と判定され

た。以上により、道南地域では10年以上にわたって、抗TBEウイルス抗体を保有するげっ歯類が存在していることが示された。

北海道のげっ歯類の脾臓乳剤を16プール作製し、哺乳マウスに脳内接種を行った。そのうち、2008年に上磯で捕獲されたアカネズミ由来の脾臓乳剤を接種した群で、接種後7日目において1匹の衰弱個体が現れた。この衰弱個体の脳乳剤を作製し、BHK細胞に接種したところ、接種細胞中からTBEVのウイルス抗原とウイルスRNAが検出された。したがって、2008年の上磯で捕獲されたアカネズミからTBEVが分離されたことが判明した。本分離株をKamiiso-2008-AS2w(AS2w)株と名づけた。AS2w株のウイルス遺伝子のうち、E蛋白領域の1,488塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。その結果、AS2w株は極東亜型に分類され、中でもOshima株と同じ集団を形成し、ロシアで分離されたSofjin株やKH98株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

TBEVの致死性に関わる病原性発現機序について、マウスモデルを用いた解析を行った。TBEVの大量接種(10^7 FFU/mouse)群では致死率は90%であり、中枢神経全体へのウイルス感染が直接の死因になっていると考えられた。一方、少量接種(10^3 FFU/mouse)群では死亡開始時期が遅れるとともに、致死率は40%にとどまった。本群における中枢神経へのウイルス感染の度合いは致死個体と回復個体で差は見られなかったが、致死個体では全身性のストレス応答とTNF α の発現が有意に上昇していた。

ハンタウイルス感染症

ネズミ亜科げっ歯類由来ハンタウイルスの遺伝子診断法の開発を試み、最終的に従来の汎用プライマーよりも良い検出効率を持つプライマー3種類を選定した。この3種類でヘミネステイド

PCR を行うことで、高感度かつ網羅的診断が可能となると考えられた。ハンタウイルスの核タンパク質(NP)の N 末端を 50 アミノ酸欠いたトランクート抗原をバキュロウイルスで発現させ、タイランドウイルス(THAIV)、シンノンブレウイルス(SNV)、アンデスウイルス(ANDV)、およびラグナネグラウイルス(LANV)について鑑別用抗原を作出した。これらの鑑別用抗原は患者およびげっ歯類の感染ウイルス型を血清学的に鑑別するのに有用であることが判明した。

北海道の中川町と当別町の森林において合計 199 匹のエゾヤチネズミを捕獲した。抗体検出用 ELISA(Ab-ELISA)によりエゾヤチネズミの血清中の抗ハンタウイルス抗体が検出できることが明らかになった。また、抗原検出用 ELISA(Ag-ELISA)によりエゾヤチネズミの肺中のハンタウイルス NP が検出された。したがって Ab-ELISA と Ag-ELISA は、感染げっ歯類のハンタウイルス感染を検出するのに有用であることが明らかになった。エゾヤチネズミ集団全体の抗体保有率は 5.0%(10/199)であり、オスとメスの抗体保有率を比較するとそれぞれ 11.5%(6/52)と 2.7%(4/147)であり、オスの抗体保有率が有意に高かった($P < 0.01$)。エゾヤチネズミの集団ではオスがハンタウイルスの感染伝播に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Puumala 型ハンタウイルスの病原性を明らかにするために、実験的に感染した 4 週齢と 8 週齢のシリアンハムスターの組織標本を用いて、病理学的検討を行った。皮下接種後のウイルス感染増殖の程度は感染時の週齢によって違いがみとめられることが病理組織学的に明らかとなった。すなわち、4 週齢のシリアンハムスターでは肺の上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、副腎実質細胞、小脳プルキンエ細胞において軽度の炎症性反応が観察された。一方、8 週齢動物では

明らかな組織学的変化は認められなかった。また、感染動物における Real-time PCR による肺、腎、脾、肝、心、脳におけるウイルスの定量(viral RNA copies/ng of GAPDH)の結果は以下の通りであった。すなわち、4 週齢でウイルスを接種したハムスター(以下、4 週齢群)から 14 日目で採取した肺ではウイルス RNA copy 量が 10^4 から 10^5 であったのに対し、8 週齢で接種して(以下、8 週齢群)同じく 14 日目に採取した肺では 10^3 量であった。ウイルス RNA 量が最も高いのは肺で、その他の臓器では 14 日目では 10^3 程度であった。

Q 熱

Coxiella burnetii 感染症(Q 熱)の血清診断法の開発を目的として、組み換え蛋白質を抗原とした酵素抗体法(ELISA)を開発した。北海道で捕獲された *M. rufocanus* の 79%(69/87)と *A. speciosus* の 56%(10/18)が抗体陽性であった。また、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。一方、他の 4 牧場 322 検体では 4.3%と明らかに陽性率が低かった。

バルトネラ感染症

北海道でげっ歯類の捕獲を行い、PCR にて *Bartonella* 属菌の DNA の検出を試みたところ、*Bartonella* 保菌率は 67.9%(36/53)であった。神奈川県で捕獲されたニホンジカ血液の 25.0%(2/8)、オトゲチマダニの 42.3%(69/163)、ヒゲナガチマダニの 50.0%(3/6)、フタゲチマダニの 66.7%(2/3)、チマダニ属の 33.3%(2/6)、およびヒメシカシラミバエの 80.0%(4/5)から、わが国で初めて *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。また、さらに、シカ血液、オトゲチマダニマダニ 2 匹およびヒメシカシラミバエ 2 匹から

得られた *Bartonella* 属菌の塩基配列は、分子系統解析により、既存の *Bartonella* 属菌とは異なるクレードを形成し、*B. melophagi* と高い相同性 (94.9–95.6%) を示した。

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ったところ、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。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。

サルモネラ感染症

供試したサルモネラ 53 株中 50 株(94.3%)について、今回開発した multiplex PCR 法による生物型別の成績と生化学性状試験による型別の成績が一致した。

エルシニア感染症

今回開発した Multiplex PCR 法により、*Y.pseudotuberculosis* と病原性 *Y.enterocolitica* および *Y.enterocolitica* の American strains について、バンドの大きさおよび増幅パターンの違いにより鑑別することが可能であった。*Yersinia pseudotuberculosis* の迅速な定量的検出法の開発を試み、*inv* 遺伝子を標的遺伝子として *Y.pseudotuberculosis* の 21 血清群すべてが検出できる Real-time PCR 法の開発に成功した。さらに、菌体外膜蛋白質(YOP)と LPS を抗原とする ELISA の開発によって、病原性 *Yersinia* の菌種と

血清型の鑑別が可能な血清診断法が開発された。エルシニア症が疑われるヒト血清 57 検体を YOP を抗原にした ELISA 法に供したところ、57 検体中 29 検体 (50.9%) がエルシニア症陽性と判定された。さらにこれらの 29 検体は、LPS に対する ELISA でも反応が認められ、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 検体の全例が *Y.pseudotuberculosis* による感染であり、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。

サル痘

今回開発した LAMP 法により、コンゴ盆地型と西アフリカ型のサル痘ウイルスを型特異的に診断することが可能となった。また、本法は定量的にウイルス血症レベルを測定することが可能であった。サル痘感染カニクイザルの痘疱部位は、中心部の痂皮あるいはびらん、潰瘍形成と真皮層への組織球、リンパ球、好中球の浸潤とその周囲の表皮層の増生からなっていた。増生した表皮の有棘層には配列が乱れ、大小不同となり淡明化、膨化した扁平上皮細胞が見られた。

サル痘ウイルス実験感染カニクイザルにおいて、感染経過、致死率、および内臓病変について解析した。強毒型のコンゴ盆地型サル痘ウイルス株の感染個体では皮膚病片のほかリンパ系組織、呼吸器、消化器、および泌尿生殖器等に肉眼病変とウイルス抗原が認められた。一方、弱毒型の西アフリカ株の感染個体では肺、皮膚およびリンパ系組織にのみ病変とウイルス抗原が認められた。

サル痘ウイルスに感染時の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオ

ミック解析により明らかにした。その結果、サル痘ウイルス感染時には、全身感染に重要な働きを有する EEV 関連抗体を含め、多くの蛋白に対する抗体が誘導されることが明らかにされた。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

今回開発した TBEV の SPs を用いた ELISA は、一度に多検体を短時間、かつ簡便に処理できることなどの利点から TBEV 汚染地域特定のためのスクリーニング法として有用であると考えられる。この ELISA と中和試験による野鼠の抗体調査で島根県に新たな TBEV の汚染地を発見した。

北海道の血清疫学調査と野鼠からのウイルス分離により、上磯では 10 年以上に渡って TBEV の流行巣が維持されていることを確認した。今後も、抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行い、ウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し、TBEV の流行地域を特定することで、TBE 患者発生の予防に役立てることが重要である。

TBEV の少量接種マウス群では中枢神経組織でのウイルス感染および炎症反応に加えて、全身性のストレス反応および TNF α の上昇が関与した反応が要因となって死亡時期が遅れるものと考えられた。

ハンタウイルス感染症

各種のハンタウイルスの核タンパク質 (NP) について、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で発現させて ELISA に用いたところ、これらの鑑別用抗原は患者およびげっ歯類の感染ウイルス型を血清学的に鑑別するのに有用であることが判明した。本 ELISA により HPS 関連ウイルスと THAIV の鑑別診断が可能となった。

大腸菌で発現させた組換え NP を用いて新規に開発した抗体検出用と抗原検出用の ELISA が、エゾヤチネズミにおけるハンタウイルスの感染状況を調査する上で有用であることが判明した。ウイルスの感染率はオスの方がメスよりも有意に高く、オスがウイルスの伝播や感染の維持により重要な役割を担っている可能性が示唆された。

また、Puumala 型ハンタウイルス感染のモデル動物としてシリアンハムスターが適していることが明らかになった。

Q 熱

Coxiella burnetii 感染症 (Q 熱) の血清診断法の開発を目的として、組み換え蛋白質を抗原とした酵素抗体法 (ELISA) を開発した。我が国の野生げっ歯類が高率に *C. burnetii* 抗体を保有している事が明らかになり、げっ歯類が Q 熱の伝播に関与している可能性が示唆された。

バルトネラ感染症

わが国の野生げっ歯類 *Bartonella* 属菌が高率に感染していることが判明し、ネズミノミが *Bartonella* 属菌のベクターである可能性が示唆された。

神奈川県丹沢山系に生息するニホンジカには、人に対し病原性を有する *B. melophagi* が分布していることが明らかとなった。さらに、マダニとシラミバエがわが国において、本菌のベクターとなっている可能性が示唆された。

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。

サルモネラ感染症

今回開発した multiplex PCR 法は、*Salmonella* を迅速に同定でき、同時に生物群の同定も可能

な有益な遺伝子診断法であると思われた。

エルシニア感染症

今回開発した multiplex PCR 法は、病原性を有する *Yersinia* 属菌の迅速かつ簡便な検出に有用な遺伝子診断法であると思われた。また、TaqMan Real-Time PCR 法は、*Y. pseudotuberculosis* のすべての血清型を増幅できる特異性の高いものであった。エルシニア症が疑われた患者の血清を今回開発された ELISA に供したところ、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明らかになった。本研究により、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ことが判明した。

サル痘

LAMP 法は、ヒトサル痘の病勢、予後、疫学的診断に有用な手法であると考えられた。

コンゴ盆地型サル痘ウイルスの病原性は、西アフリカ型サル痘ウイルスのそれよりも高いと考えられ、その差は臓器指向性の違いによるものと推測された。

サル痘ウイルス感染霊長類におけるオルソポックスウイルスの発現する各種抗原に対する抗体応答が明らかにされた。これらの成績は、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症の診断や治療、病態解析に有用な知見を提供するものと考えられる。

E. 結論

ダニ媒介性脳炎、ハンタウイルス感染症、Q 熱、バルトネラ感染症、エルシニア感染症、サルモネラ感染症、およびサル痘に対して、信頼性の高い診断法が多数開発された。新規に開発された診断法を用いることによって、北海道において

10 年以上にわたりダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が維持されていることが判明した。また、新たに島根県にもダニ媒介性脳炎ウイルスの流行巣が存在することが明らかになった。ハンタウイルス感染症では各種のハンタウイルス型の感染に対する鑑別診断法が開発されたばかりでなく、げっ歯類集団でのハンタウイルスの感染様式の一部が明らかになった。バルトネラ属菌はわが国の野生げっ歯類やニホンジカなどの野生動物に高率に感染していた。新規に開発された ELISA を用いることによって、細菌学的にエルシニア感染症と診断のできなかった患者が、血清学的にエルシニア感染症と診断された。サル痘、ダニ媒介性脳炎、およびハンタウイルス感染症で、それぞれカニクイザル、マウス、シリアンハムスターを用いた感染モデルが確立され、体内でのウイルスの増殖様式や、病態が明らかになった。

本研究で開発された診断法は、国内外での疫学調査や輸入げっ歯類の検査に十分応用可能である。今後、上記感染症の疫学調査や検査が継続されることで、人への感染予防に役立つ基礎的な情報が得られるものと期待される。

F. 健康危険情報

今回北海道渡島管内北斗町上磯地区でダニ媒介性脳炎ウイルスが分離されたことからウイルス汚染が 10 年以上にわたり持続しており、住民に対する感染予防のための対策が必要と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: 1081-1090, 2007
- 2) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J.: Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 341-356, 2007. Review.
- 3) 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: 145-161, 2007.
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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. 102(1) 70-74, 2008
- 8) 有川二郎: ハンタウイルス肺症候群, 日本臨床, 65 卷, 増刊号 3: 126-130, 2007
- 9) 有川二郎: 腎症候性出血熱, 日本臨床, 65 卷, 増刊号 3: 112-116, 2007
- 10) Terajima, M., Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA.: Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers? *Immunol. Lett.* 113 : 117-120, 2007
- 11) Hayasaka, D., Terajima, M. and Ennis, FA.: Pathogeneses of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. *Virol. J.* 27 : 4-22, 2007
- 12) Hayasaka, D., Maeda, K. and Ennis, FA. and Terajima, M.: Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res.* 123 : 120-127, 2007
- 13) 蔡燕, 野村彩朱, 矢野竹男, 中尾義喜, 福士秀人 Q 熱コクシエラ抗体スクリーニング検査法の改良. 獣医畜産新報, 60:374-375, 2007
- 14) Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K. W., Ying Bai, Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S. F., Peruski, L. F., Maloney, S. A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B. B., Kasten, R., Popov,

- V. Robinson, J., Kruglov, A., and Petersen, L. R. : *Bartonella tamiae* sp. nov., a Newly Recognized Pathogen Isolated from Three Human Patients from Thailand. J. Clin. Microbiol. 46:772-775, 2008.
- 15) 丸山総一:吸血昆虫と新興感染症, タニと新興再興感染症, 267-276, 2007(株)全国農村教育協会, 東京
- 16) Iwata,T., Une,U., Okatani,A.T., Kato,Y., Nakadai,A., Lee,K., Watanabe,M., Taniguchi,T., Elhelaly, A.E., Hirota,Y., Hayashidani,H.: Virulence characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from breeding monkeys in Japan. Vet.Microbiol. 2008 (印刷中)
- 17) 中臺文,塩谷亮, 加藤行男, 黒木俊郎, 岩田剛敏, 廣田好和,林谷秀樹:家庭で飼育されている爬虫類におけるサルモネラの保有状況, 獣畜新報 60, 386-387, 2007.
- 18) 岡谷友三アレシヤンドレ,加藤行男,林谷秀樹:豚丹毒 -古くて新しい人獣共通感染症-, モダンメディア 53:231-237,2007
- 19) Shirato K, Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). J. Virol. Methods 139:78-84, 2007
- 20) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. Comp. Med. 53:272-281, 2007
- 21) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Sata, T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. J. Virol. 81:1848-1857, 2007
- 22) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. Arch. Virol. 152:1763-1765, 2007
- 23) Morikawa S, Saijo M, Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis 30:391-398, 2007
- 24) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. Clin. Vac. Immunol. 14:1182-1189, 2007
- 25) Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo,

- M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831–10834, 2007
- 26) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375–389, 2007
- 27) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., Saijo, M., Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.: Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403–414, 2007
- 28) Yoshii K, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I: Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J Gen Virol.* 89: 200–211, 2008.
- 29) Kariwa H, Noda H, Nakauchi M, Ishizuka M, Hashiguchi K, Hashimoto S, Yoshii K, Asano A, Agui T, Kogaki H, Kurano Y, Uchida Y, Fujii N, Okada M, Takashima I: Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Jpn J Vet Res.* 55: 115–127, 2008.
- 30) Dutta NK, Mazumdar K, Lee BH, Baek MW, Kim DJ, Na YR, Park SH, Lee HK, Kariwa H, Mai le Q, Park JH.: Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine. *Immunol Lett.* 118: 65–71, 2008.
- 31) Nakamura I, Yoshimatsu K, Lee BH, Okumura M, Taruishi M, Araki K, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J.: Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. *Arch Virol.* 153: 1537–1542. 2008.
- 32) Lee HK, Lee BH, Dutta NK, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Kariwa H, Nakauchi M, Mai le Q, Heo SJ, Park JH.: Detection of antibodies against SARS-Coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA. *J Microbiol Biotechnol.* 18: 1717–1721, 2008.
- 33) Nakauchi M, Kariwa H, Kon Y, Yoshii K, Maeda A, Takashima I: Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiol Immunol.* 52: 625–630, 2008.
- 34) Abu Daud NH, Kariwa H, Tkachenko E, Dzagurnova T, Medvedkina O, Tkachenko P, Ishizuka M, Seto T, Miyashita D, Sanada T, Nakauchi M, Yoshii K, Maeda A, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I: Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain. *Jpn J Vet Res.* 56: 151–165, 2008.
- 35) Takashima, I, Kariwa, H, Shirato, K.: Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection. *Glo. Env. Res.* 12: 21–25, 2008.
- 36) 有川二郎:「ハンタウイルス肺症候群」新臨床内科学（第9版）2008.

- 37) 有川二郎:「ハンタウイルス」 ■ウイル
スハンドブック No. 10 2.呼吸器系ウイ
ルス P25-27, 2008.
- 38) Chandy S, Yoshimatsu K., Ulrich R.G,
Mertes M, Okumura M, John T, Balraj V,
Muliyl J, Mammen J, Abraham P, Arikawa
J, Sridharan G.: Seropidemiological study on
hantavirus infections in India. *Trans Royal
Soc Trop Med Hyg.* 102: 70-74, 2008.
- 39) 有川二郎:「ハンタウイルス肺症候群(HP
S)」特集 輸入感染の可能性のある希少
感染症. 化学療法領域. 24: ,2008.
- 40) Taruishi M, Yoshimatsu K, Hatsuse R,
Okumura M, Nakamura I, Arikawa J.: Lack of
vertical transmission of Hantaan virus
from persistently infected dam to progeny in
laboratory mice. *Arch Virol.* In press.
- 41) Yamamoto H, Li Tian-Cheng, Koshimoto C,
Ito K., Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami
K., Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa
T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H,
Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N.: Serological
Evidence for Hepatitis E Virus infection in
Laboratory Monkeys and Pigs in Animal
Facilities in Japan. *Exp Anim.* 57:
367-376, 2008.
- 42) Arai S, Ohdachi DS, Asakawa M, Kang HJ,
Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R.:
Molecular phylogeny of a newfound
hantavirus in the Japanese shrew mole
(*Urotrichus talpodeis*). *Proc Natl Acad Sci
U S A.* 105: 16296-16301, 2008.
- 43) 有川二郎:「10ハンタウイルス」バイオセ
ーフティの事典 病原微生物とハザ
ード対策の実際. P285-287, 2008.
- 44) 有川二郎:「腎症候性出血熱」小児疾患診
療のための病理生理 小児内科 40 増刊
号 第4版, P1222-1225, 2008.
- 45) Inoue K., Maruyama S, Kabeya H, Yamada N,
Ohashi N, Sato Y, Yukawa M, Masuzawa T,
Kawamori F, Kadosaka T, Takada N, Fujita H,
Kawabata H.: Prevalence and genetic
diversity of *Bartonella* species isolated from
wild rodents in Japan. *Appl Environ Microbiol.*
74: 5086-5092, 2008.
- 46) Jittapalapong S, Sangwaranond A,
Inpunkaew T, Phasuk C, Pinyopanuwat N,
Chimnoi W, Kengradomkij C, Arunwipat P,
Maruyama S.: Seroprevalence of
Toxoplasma gondii infection in dairy cows in
northeastern Thailand. *Southeast Asian J
Trop Med Public Health.* 39: 1-5, 2008.
- 47) Inoue K, Kabeya H, Kosoy M, Bai Y, Smirnov
G, McColl D, Artsob H, Maruyama S.:
Evolutional and geographical relationships of
Bartonella grahamii isolates from wild
rodents by multi-locus sequencing analysis.
Microb Ecol. in press, 2009.
- 48) Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Kawanami
K, Yanai K, Jitchum S, Jittaparapong S.:
Prevalence of *Bartonella* infection in cats
and dogs in the Bangkok metropolitan areas,
Thailand. *Epidemiol Infect. in press*, 2009.
- 49) Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T,
Nakadai A, Hirota Y, Hayashidani H.: A novel
multiplex PCR assay for *Salmonella*
subspecies identification. *J Appl Microbiol.*
in press, 2009.
- 50) Ogasawara N, Tran TP, Ly TLK., Nguyen TT,
Iwata T, Watanabe M, Taniguchi T, Hirota Y,
Hayashidani H.: Antimicrobial susceptibilities
of *Salmonella* from domestic animals, food

- and human in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci.* 70: 1159–1164, 2008.
- 51) 林谷秀樹、岩田剛敏、中臺文: 爬虫類とサルモネラ. 54: 165–170, 2008.
- 52) Saijo M, Suzutani ., Mizuta K., Kurane I, Morikawa S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch Virol.* 153: 303–314, 2008.
- 53) Saijo M., Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis.* 61: 140–142, 2008.
- 54) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T.: Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Am J Pathol.* 172: 1625–1637, 2008.
- 55) Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M Morikawa S, Taguchi F.: Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus incudes an exacerbated pneumonia in mice. *Infect Microbiol.* 52: 118–127, 2008.
- 56) 福士秀悦、平井明香、新倉綾、山田靖子、前田健、吉川泰弘、横山勝、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂: コウモリ由来 ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析. *獣医畜産新報.* 61:199–201, 2008.
- 57) 北本憲利、森川茂、西條政幸、加藤陽二、田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. *感染症学雑誌.* 82: 224–225, 2008.
- 58) Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H.: Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol* 43: 56–59, 2008.
- 59) Saijo M, Morikawa S, Kurane I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost.* 2: 1155–1171, 2008.
- 60) Yoshii, K., Ikawa, A., Chiba, Y., Omori, Y., Maeda, J., Murata, R., Kariwa, H., Takashima, I.: Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol. Methods.* 161: 173–176, 2009.
- 61) 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.

- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) 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.
- 65) 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
- 66) Fukushi, H., Inoue, K., Saito, L., Ohya, K., Sashihara, N., Yamaguchi, T., Hirai, K.: Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and constituents. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 62 : 481-484, 2009.
- 67) 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
- 68) Bouchouicha, 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
- 69) 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.
- 70) 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.
- 71) 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.
- 72) 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)
- 73) 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)
- 74) 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)
- 75) Iwata, T. and Hayashidani H.: Yersiniosis in Breeding Monkeys in Japan, *JARQ*, (in press)
- 76) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J. Gen. Virol.* 90:2266–2271, 2009
- 77) Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romonowski, V., Kurane, I., Morikawa S.: Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1132–1138, 2009
- 78) Saijo, M.: Emerging and re-emerging infection threats to society. *J. Disaster Res.* 4:291–297, 2009
- 79) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I. : Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *J. Disaster Res.* 4:315–321, 2009
- 80) Morimoto, K., Saijo, M.: Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4:346–357, 2009
- 81) Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogata, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., and Morikawa, S.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *J. Med. Virol.* 81:1102–1108, 2009.
- 82) Hayasaka, D., Nagata, N., Fujii, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E.A., Takashima, I., and Koike, S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390 : 139–150, 2009
- 83) Hayasaka, D., Nagata, N., Hasegawa, H., Sata, T., Takashima, I., and Koike, S. Early Mortality following Intracerebral Infection with the Oshima Strain of Tick-Borne Encephalitis Virus in a Mouse Model. *J. Vet. Med. Sci.* in press.
2. 学会発表
- 1) 瀬戸隆弘、苅和宏明、谷川洋一、Nur Hardy Bin Abu Daud、中村一郎、宮下大輔、好井健太郎、高島郁夫: ロシアのボルガ川流域に生息する野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査と遺伝子解析: 第 143 回日本獣医学会、つくば (2007, 4)
- 2) 宮下大輔、苅和宏明、村田亮、Nur Hardy Bin Abu Daud、瀬戸隆弘、好井健太郎、高島郁夫: メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の血清疫学調査: 144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 3) 村田亮、好井健太郎、原田祐里、苅和宏明、