

昨年度は、イヌ狂犬病流行対策に資するため、日本国内での狂犬病流行状況を記述した文献を収集し、これらをデジタル化したのち、CD-ROMに収録して関係部署に配布した。今年度は「狂犬病説」の現代語訳を進めている。

明治十二年八月

狂犬病説

陸軍文庫

京都府著『京都府狂犬病流行誌』（大正5年3月刊；京都府保健環境研究所蔵）
志賀潔校閲、田中丸治平著『狂犬病論』（大正6年4月刊；同上）

警視庁衛生部著『東京府下狂犬病流行誌』（昭和13年3月刊；同上）

近藤正一監修、原田曾松著『狂犬病予防読本』（昭和26年5月刊；厚生労働省結核感染症課蔵）

埼玉県公衆衛生課著『埼玉県狂犬病流行史』（昭和28年4月刊；佐藤克氏蔵）
中島寛著『神奈川県狂犬病予防概史』（昭和48年8月刊；唐仁原景昭氏蔵）

まとめ

- 1) 日本における動物由来感染症の実態を知るために国内で発表された主な動物由来感染症の症例報告を収集して、また感染症法に基づき届け出られた発生報告を分析して症例の分析を行った。
- 2) 診療現場における動物由来感染症の診断を容易にする目的で、医師会員有志の協力を得て、濾紙採血検体によるトキソカラ症、バルトネラ症、トキソプラズマ症、オウム病、E型肝炎、Q熱抗体検査を実施した。
- 3) 今後の狂犬病診断・治療の助けとするため、海外での狂犬病症例を収集・翻訳し、狂犬病症例集を発行した。また、海外での治療法を収集して紹介した。
- 4) 狂犬病ワクチンが不足する事態に備えて、ワグチン液を減量しても免疫効果が低下しない接種法を検討した。
- 5) イヌ狂犬病流行対策に資するため、旧日本陸軍が制作した狂犬病教本を現代語訳して関係部署に配布する準備を行っている。

平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：遺伝子増幅 RPA 法に基づいた媒介蚊における迅速簡便病原体検出法の開発課題番号：H19-新興-一般-011研究代表者：嘉糠 洋陸**I. 研究の意義**

- (1) マラリアや西ナイル熱等の蚊媒介性の再興感染症は世界的に大きな脅威となっている
- (2) 従来の PCR などの病原体検出法は高度な設備を必要とし、汎用性に問題がある
- (3) 本邦への蚊媒介性感染症の侵入防御のために、迅速かつ簡便な病原体検出法の開発が急務

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 単一温度反応系の遺伝子増幅による病原体検出技術の開発を目的とする
- (2) 媒介蚊の病原体保有状況を迅速・簡便に調査することが可能となる
- (3) 諸外国における蚊媒介感染症の流行状況の把握・日本への侵入防御への貢献が期待される

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ハマダラカ (*Anopheles gambiae*) -齧歯類マラリア原虫感染モデルの導入・改良
- (2) 単一温度反応系遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫検出に成功
- (3) 蛍光単一温度反応系遺伝子増幅法の確立に成功
- (4) モバイル型蛍光検出器を用いた感染流行地域における病原体保有ハマダラカの評価
- (5) 西アフリカ・ブルキナファソ国内の流行地域におけるハマダラカ試料の採集とその評価

・研究分担者(福本晋也)

- (1) ヤブカ (*Aedes aegypti*) -病原体 (ウイルス・蠕虫) 感染モデルの導入・改良
- (2) 単一温度反応系遺伝子増幅法によるヤブカからの病原体検出に成功
- (3) マルチプレックス単一温度反応系遺伝子増幅法の確立に成功
- (4) 沖縄地域の犬フィラリア流行地域におけるヤブカ試料の採集とその評価

・研究分担者(下島昌幸)

- (1) 各種蛍光タンパク質マーカー発現型ウイルスの作成

・研究分担者(油田正夫)

- (1) 各種蛍光タンパク質マーカー発現型寄生虫の作成

・研究分担者(平田晴之)

- (1) 増幅遺伝子の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) マルチプレックス単一温度系遺伝子増幅-イムノクロマト法の応用
 (2) 重要蚊媒介感染症の病原体に対する単一温度系遺伝子増幅キットの開発
 (3) 薬剤耐性(病原体)および殺虫剤耐性(蚊)の判別に向けた SNP 検出単一温度系遺伝子増幅法
 (4) 蛍光産物検出機器のダウンサイジングに向けた産学官共同開発
 (5) 単一温度系遺伝子増幅法の実用性評価と蚊媒介性感染症の流行状況調査(国内)
 (6) 単一温度系遺伝子増幅法の実用性評価と蚊媒介性感染症の流行状況調査(国外)

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 国内における媒介蚊の病原体保有状況把握による流行予測情報のオン・タイム提供
 (2) グローバル化による本邦への蚊媒介感染症流入に対するリスクマネジメントの必要性提起
 (3) 病原体媒介節足動物の輸出入および取扱いに対するガイドラインの作成

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

【嘉糠洋陸(研究代表者)】

Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Kanuka H, Fukumoto S. Rapid identification of Plasmodium-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 376(4): 671-676, 2008

Perera N, Aonuma H, Yoshimura A, Teramoto T, Iseki H, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Fukumoto S, Kanuka H. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 156(1-2): 32-36, 2008

Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit Vectors* 2(1): 15, 2009

【福本晋也(研究分担者)】

Shinzawa N, Nelson B, Aonuma H, Okado K, Fukumoto S, Miura M, Kanuka H. p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. *Cell Host Microbe* 6(3): 244-252, 2009

Okado K, Shinzawa N, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Fujisaki K, Kawazu S, Kanuka H. Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 379(1): 6-10, 2009

Fukumoto, S., Tamaki, Y., Okamura, S., Bannai, H., Yokoyama, N., Suzuki, T., Igarashi, I., Suzuki, H. & Xuan, X. Prime-boost immunization with DNA followed by a recombinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity against *Babesia gibsoni* infection in dogs, *Vaccine*. 25, 1334-1341, 2007

【油田正夫 (研究分担者)】

Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Mol Microbiol* 71(6) 1402-1414, 2009

Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. *Blood* 113(5) 1071-1074, 2009

Menard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig V. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol* 24(12) 564-569, 2008

Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, Prévost MC, Ishino T, Yuda M, Ménard R. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe* 3(2) 88-96, 2008

Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y, Shibata Y, Honma K, Yui K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection. *J Immunol*. 181(2):1420-8, 2008

【下島昌幸 (研究分担者)】

Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. Mitogen-activated protein kinase-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83(6): 2510-2517, 2009

Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* 82:10502-9, 2008

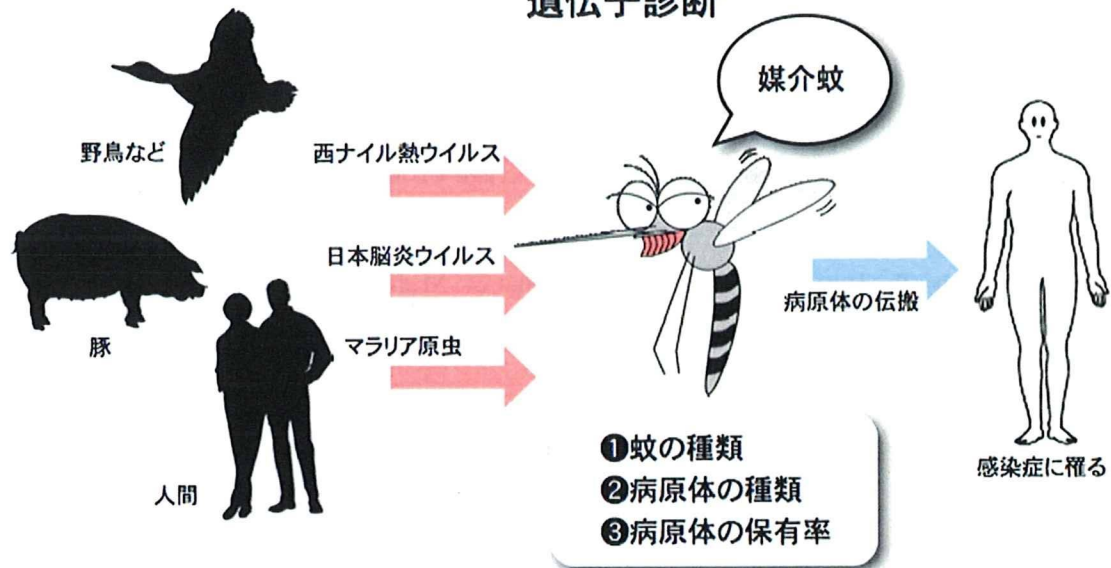
【平田晴之 (研究分担者)】

Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H. O., Hirata, H., Ikadai, H. & Oyamada, T. Molecular Survey of *Babesia canis* in Dog in Nigeria, *J Vet Med Sci* 69: 1191-1193, 2007.

Sasaki M, Omobowale O, Ohta K, Tozuka M, Matsuu A, Hirata H, Nottidge HO, Ikadai H, Oyamada T. A PCR-based epidemiological survey of *Hepatozoon canis* in dogs in Nigeria. *J Vet Med Sci* 70(7) 743-5, 2008

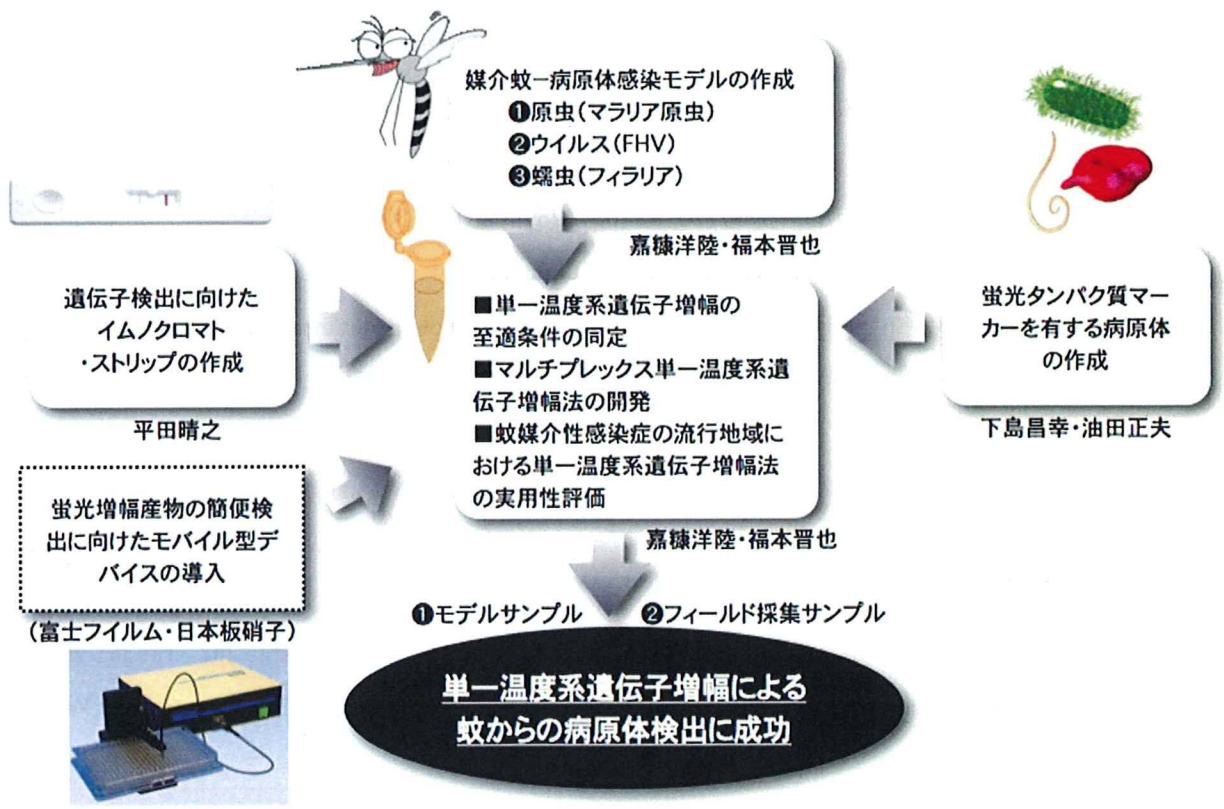
Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

病原体媒介蚊における単一温度系遺伝子増幅法による
”遺伝子診断”



これら的事柄について、正確・迅速・大量に調べる
遺伝子診断技術を開発・応用する

3年間の研究成果の概要



○研究代表者の研究歴等・過去に所属した研究機関の履歴

1994年～1997年	東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医生理学教室
1997年～2001年	大阪大学大学院医学系研究科 神経機能解剖学
2001年～2003年	理化学研究所 脳科学総合研究センター
2003年～2004年	米国スタンフォード大学医学部 微生物学免疫学
2004年～2005年	東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室
2005年～現在	帯広畜産大学原虫病研究センター 原虫進化生物学研究分野

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

高橋迪雄 (東京大学大学院農学生命科学研究科 教授・現 味の素(株) 顧問) 指導研究者
 岡野栄之 (大阪大学大学院医学系研究科 教授・現 慶應義塾大学医学部 教授) 指導研究者
 三浦正幸 (理化学研究所 チームリーダー・現 東京大学大学院薬学系研究科 教授) 指導研究者
 David Schneider (米国スタンフォード大学医学部 助教授)
 鎮西康雄 (三重大学大学院医学系研究科 教授・現 鈴鹿医療科学大学 教授)
 河岡義裕 (東京大学医科学研究所 教授)

・主な研究課題

神経細胞死の誘導機構に関する分子遺伝学的研究
 神経変性疾患モデルを用いた病態発症メカニズムに関する分子遺伝学的研究
 マラリア感染における宿主応答機構に関する遺伝学的研究
 細菌感染症に対する宿主側防御機構に関する細胞生物学的研究
 感染症媒介節足動物における病原体相互作用の分子遺伝学的研究
 感染症媒介節足動物における病原体の迅速・簡便検出法の開発研究

・これまでの研究実績 (主要なものを抜粋)

- Shinzawa N, Nelson B, Aonuma H, Okado K, Fukumoto S, Miura M, *Kanuka H. “p38 MAPK-Dependent Phagocytic Encapsulation Confers Infection Tolerance in *Drosophila*.”
Cell Host Microbe 6(3): 244-252 (2009)
- Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, *Kanuka H. “Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model.”
Parasit Vectors 2(1): 15 (2009)
- Okado K, Shinzawa N, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Fujisaki K, Kawazu S, *Kanuka H. “Rapid

recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*.”

Biochem Biophys Res Commun 379(1): 6–10 (2009)

4. Perera, N., Aonuma, H., Yoshimura, A., Teramoto, T., Iseki, H., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Fukumoto, S. and *Kanuka, H. “Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification.”

J Virol Methods 156(1–2): 32–36 (2009)

5. Aonuma, H., Suzuki, M., Iseki, H., Perera, N., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., *Kanuka, H. and Fukumoto, S. “Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification.”

Biochem Biophys Res Commun 376(4): 671–676 (2008)

6. Gong, H., Liao, M., Zhou, J., Hatta, T., Huang, P., Zhang, G., Kanuka, H., Nishikawa, Y., Xuan, X. and Fujisaki, K. “Gene silencing of ribosomal protein P0 is lethal to the tick *Haemaphysalis longicornis*.”

Vet Parasitol 151(2–4): 268–267 (2007)

7. Kuranaga E., Kanuka H., Tonoki A., Takemoto K., Tomioka T., Kobayashi M., Hayashi S., Miura M. “*Drosophila* IKK-related kinase controls caspase activity through IAP degradation.”

Cell 126: 583–596 (2006)

8. Kanuka H., Kuranaga E., Hiratou T., Okano H., and Miura M. “*Drosophila* Caspase Transduces Shaggy/GSK-3 Kinase Activity in Neural Precursor Development.”

EMBO J 24: 3793–3806 (2005)

9. Kanuka H., Hiratou T., Igaki T., Kanda H., Kuranaga E., Sawamoto K., Aigaki T., Okano H., and Miura M. “Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61alpha translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity.”

Biochim Biophys Acta 1726: 225–237 (2005)

10. Nelson B., Nishimura S., Kanuka H., Kuranaga E., Inoue M., Hori G., Nakahara H. and Miura M. “Isolation of gene sets affected specifically by polyglutamine expression: implication of the TOR signaling pathway in neurodegeneration.”

Cell Death Differ 12: 1115–1123 (2005)

11. Kanuka H., Kuranaga E., Hiratou T., Igaki T., Nelson B., Okano H., and Miura M. “Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in *Drosophila*.”

Proc Natl Acad Sci USA 100: 11723–11728 (2003)

12. Kuranaga E., Kanuka H., Igaki T., Sawamoto K., Ichijo H., Okano H., and Miura M. “Reaper-Mediated Inhibition of DIAP1-Induced *Drosophila* TRAF1 Degradation Leads to JNK

Activation”

Nature Cell Biol 4:705-710 (2002)

13. Igaki T., Kanda H., Goto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., and Miura M. “Eiger, a TNF Superfamily Ligand That Triggers the Drosophila JNK Pathway.”

EMBO J 21(12): 3009-3018 (2002)

14. Takeyama K., Ito S., Yamamoto A., Tanimoto H., Furutani T., Kanuka H., Miura M., Tabata T., and Kato K. “Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in Drosophila.”

Neuron 35: 855-864 (2002)

15. Kanda H., Igaki T., Kanuka K., Yagi T., and Miura M. “Wengen, a member of the Drosophila TNF receptor superfamily, is required for Eiger signaling.”

J Biol Chem 277(32): 28372-28375 (2002)

16. Igaki T., Kanuka H., Inohara N., Sawamoto K., Nunez G., Okano H., Miura M. “Drob-1, a Drosophila Member of the Bcl-2/CED-9 Family That Promotes Cell Death.”

Proc Natl Acad Sci USA 97(2): 662-667 (2000)

17. Kanuka H., Sawamoto K., Inohara N., Matsuno K., Okano H., Miura M. “Control of the Cell Death Pathway by Dapaf-1, a Drosophila Apaf-1/CED-4-Related Caspase Activator.”

Molecular Cell 4(5): 757-769 (1999)

18. Kanuka H., Hisahara S., Sawamoto K., Shoji S., Okano H., Miura M. “Proapoptotic Activity of C. elegans CED-4 Protein in Drosophila: Implicated Mechanisms for Caspase Activation.”

Proc Natl Acad Sci USA 96(1): 145-150 (1999)

19. Hisahara S., Kanuka H., Shoji S., Yoshikawa S., Okano H., Miura M. “Caenorhabditis elegans Anti-Apoptotic Gene *ced-9* Prevents *ced-3*-Induced Cell Death in *Drosophila* Cells.”

J Cell Sci 111(6): 667-673 (1998)

20. Horai R., Asano M., Sudo K., Kanuka H., Suzuki M., Nishihara M., Takahashi M., Iwakura Y. “Production of Mice Deficient in Genes for Interleukin (IL)-1 Alpha, IL-1 Beta, IL-1 Alpha/Beta, and IL-1 Receptor Antagonist Shows That IL-1 Beta is Crucial in Turpentine-Induced Fever Development and Glucocorticoid Secretion.”

J Exp Med 187 (9): 1463-1475 (1998)

・平成22年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

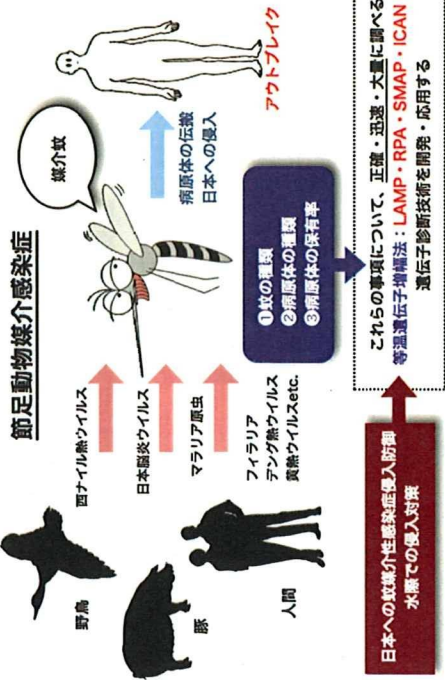
応募を検討中 (未定)

遺伝子増幅RPA法に基づいた 媒介蚊における迅速簡便病原体検出法の開発

研究代表者：嘉織洋陸
(帯広畜産大学病原虫研究センター 教授)



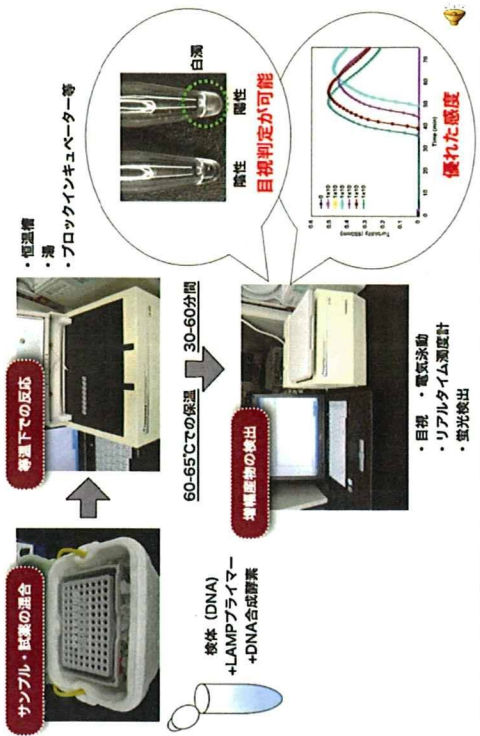
病原体媒介蚊における単一温度反応系遺伝子増幅 《等温遺伝子増幅法》による”遺伝子診断”



蚊媒介性病原体の検査法の種類と性質



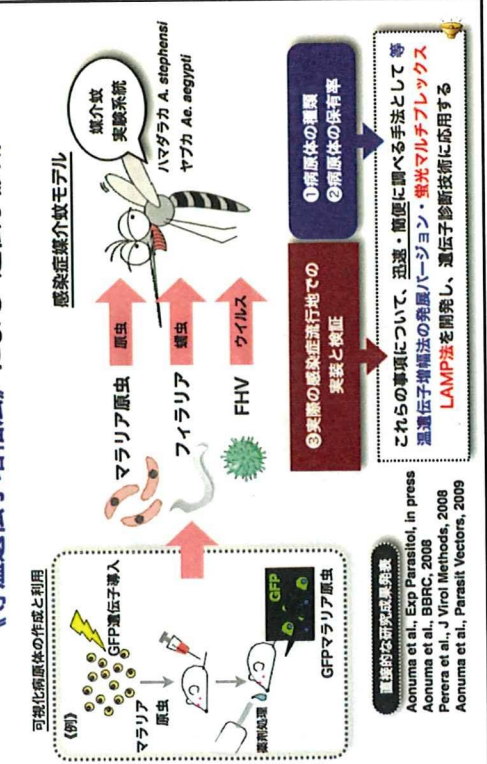
等温遺伝子増幅法 (例：LAMP法) ～簡便かつ信頼性の高い遺伝子検査法～



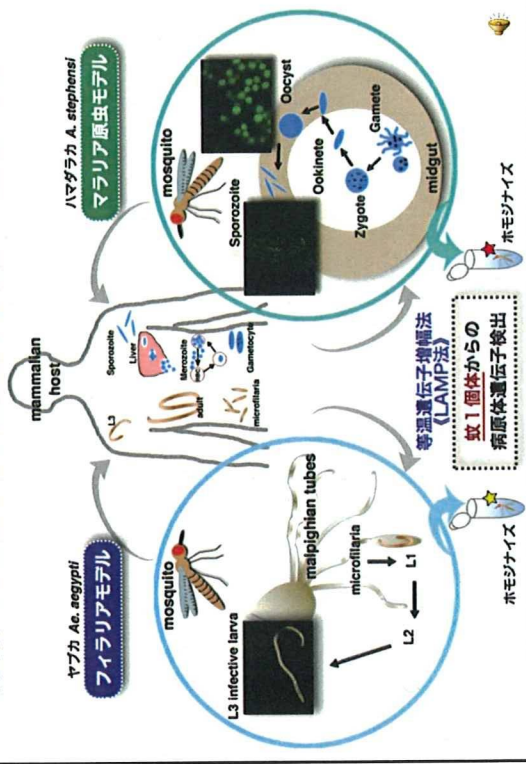
等温遺伝子増幅法の優れた簡便性 ～病原体媒介蚊サーベイランスへの応用可能性～



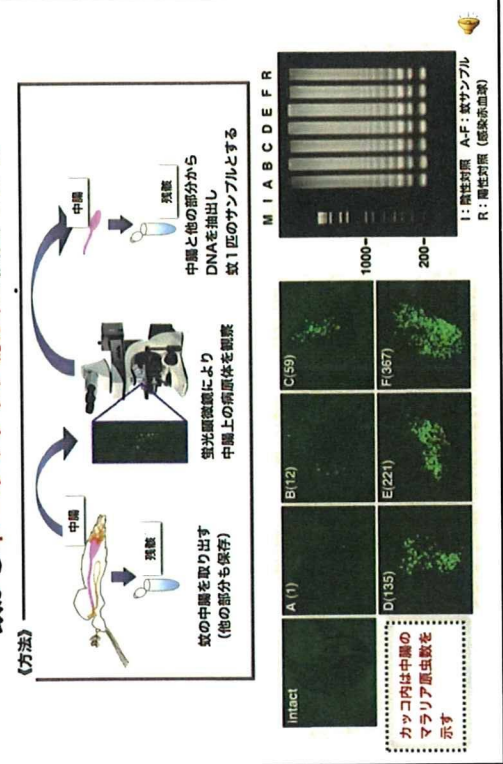
病原体媒介蚊における単一温度反応系遺伝子増幅 《等温遺伝子増幅法》による“遺伝子診断”



蚊媒介モデルによる等温遺伝子増幅法の有効性の検証



等温遺伝子増幅法により 蚊から単一のマラリア原虫を検出できる



等温遺伝子増幅法により 蚊から単一のフィラリア虫体を検出できる

(方法)

蚊のマルビーク管を
取り出す (他の部分も保存)

マルビーク管
顕微鏡によりマルビーク
管内の個虫体を観察

マルビーク管
顕微鏡

マルビーク管と
他の部分からDNAを抽出し
蚊1匹のサンプルとする

Intact (A)(1) (B)(3) (C)(6) (D)(10) (E)(15) (F)(18)

カココ内は
フィラリアの
虫体数を示す

I A B C D E F
1000
100
I: 陰性対照 A-F: 蚊サンプル

《フィールドへの応用の一例》

フィラリア汚染地帯における 媒介蚊を対象とした等温遺伝子増幅法の検証

対象個虫体

大フィラリア (*Dirofilaria immitis*)

沖縄県名護市で採集された蚊の種類

名護市サンプルからのフィラリアの検出

蚊の種類

蚊の種類	採集個体数
<i>Ar. subshibutus</i>	192 (1 containing blood included)
<i>Ae. albopictus</i>	129 (5 containing blood included)
<i>Cx. pipiens</i>	3
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	1
<i>Ae. japonicus</i>	1
<i>Ae. amurensis</i>	2
undetermined	2
計	240

1 検体は蚊10匹分のDNAを含む

日本への蚊媒媒介性感染症侵入防衛 (水際での侵入対策) への応用が期待される

蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発に成功 ～マラリア原虫とフィラリアの保有蚊を判別 (1)～

(プライマー)

マラリア原虫
P. berghei
FITC F2
B1C B2
F3 B3

フィラリア
D. immitis
Cy5 F1C
B1C B2
F3 B3

(濃度による増幅物の定量的)

1000
100
Marker
bp
1000
200
100

FITC Cy5.5
FITC Cy5.5
二重蛍光像 E1B1-染色 (DNA)

蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発に成功 ～マラリア原虫とフィラリアの保有蚊を判別 (2)～

マラリア原虫保有蚊
n1 a b c d n2 e f g h

フィラリア保有蚊
n1 a b c d n2 e f g h

マラリア原虫保有蚊
FITC
n1 a b c d n2 e f g h

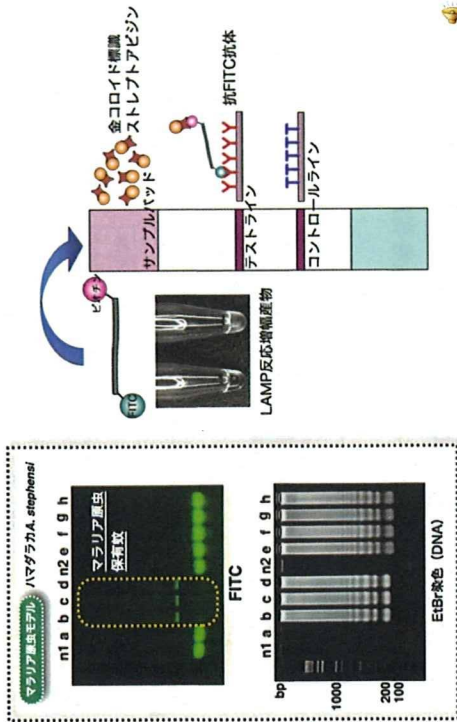
フィラリア保有蚊
Cy5.5
n1 a b c d n2 e f g h

二重蛍光像
E1B1-染色 (DNA)
1000
200
100

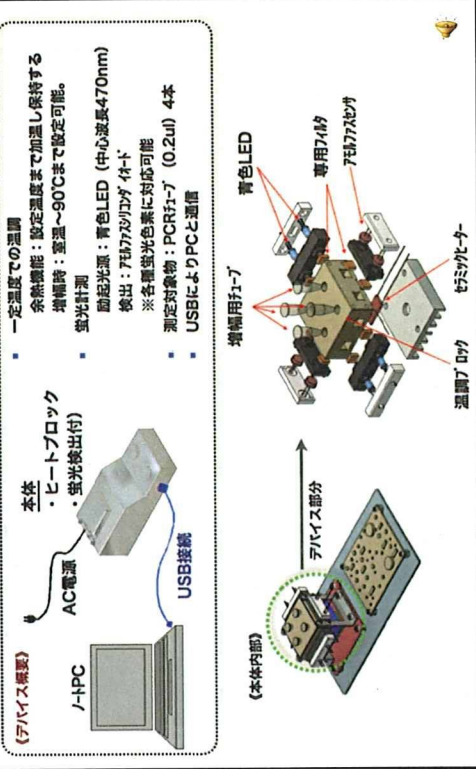
マラリア原虫保有蚊
A. stephensi
n1 (138) n1 (1) n1 (19) n1 (974)

フィラリア保有蚊
Ae. aegypti
n2 (17) n2 (17) n2 (17)

等温遺伝子増幅産物の簡易検出器開発 ～ハイムノクモマトストリップによる検出～



等温遺伝子増幅産物の簡易検出器開発 ～小型簡易式検出デバイスの開発～



《総括》 病原体媒介蚊における単一温度反応系遺伝子増幅



平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題： 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課題番号： H19-新興-一般-012研究代表者： 苅和 宏明**I. 研究の意義**

- (1) 輸入動物に由来する人獣共通感染症の検査体制の確立が強く望まれているが、簡便な検査法が存在しない。
- (2) 特に輸入動物の多くを占めるげっ歯類は様々な人獣共通感染症のベクターまたは病原巣動物となっており、これらの感染症に対する簡便で信頼性の高い診断法の開発は緊急の課題である。
- (3) げっ歯類媒介性人獣共通感染症は人に感染すると重篤化するものが多いことから、国内外における流行地や病原巣動物の特定を行うとともに、患者発生状況を明らかにすることが重要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) げっ歯類媒介性人獣共通感染症に対して輸入検疫時にも応用可能な診断法の開発を行う。
- (2) 本研究で開発された新規診断法を用いて、輸入げっ歯類の検査体制の整備を図る。
- (3) 様々なげっ歯類媒介性人獣共通感染症について、国内外の感染状況を明らかにすることが可能になる。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 診断法の開発：各種のハンタウイルス感染に対応可能なウイルス抗原検出法と抗体検出法を開発し、検疫所と衛生研究所で捕獲したげっ歯類の感染調査に応用した。
- (2) ロシアにおいて腎症候性出血熱の病原体となっている、3種類のハンタウイルス（プーマラウイルス、ハンターウイルス、およびアムールウイルス）を分離し、それらのウイルスのロシアにおける人とげっ歯類の流行状況を明らかにした。

・研究分担者(高島郁夫)

- (1) 北海道の北斗町(旧上磯町)でげっ歯類の疫学調査を行って、ダニ媒介性脳炎ウイルスを分離し、本ウイルスが10年以上にもわたって同じ病原巣で安定して維持されていることを明らかにした。

・研究分担者(有川二郎・福士秀人・丸山総一・林谷秀樹・西條政幸・永田典代・早坂大輔)

- (1) 各種ハンタウイルスの血清学的な感染型別法を開発し、インドネシア、ベトナム、およびスリランカにおける人とげっ歯類の疫学調査に応用した。
- (2) サル痘ウイルスのウイルスゲノムを高感度に検出するためのLAMP法を開発し、診断における有用性を評価した。
- (3) 北海道と神奈川県においてバルトネラの疫学調査を実施し、日本のネズミとシカがバルトネラに高率に感染していることを明らかにした。
- (4) コクシエラの外膜蛋白質 Com-1 を抗原としたQ熱の抗体検査法を開発した。
- (5) Multiplex PCR法によりサルモネラ属菌とエルシニア属菌について迅速診断法を開発した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 今回開発された様々な診断法を検疫所や衛生研究所などの公的な検査機関の日常的な検査に導入する。
- (2) 今回開発された様々な診断法を北方ユーラシア、東南アジアおよび北米での疫学調査に応用する。
- (3) 上記地域で得られた疫学調査の成績から、わが国に存在しない感染症の日本への侵入の危険性について評価を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) げっ歯類媒介性人獣共通感染症に対して輸入検疫時にも応用可能な診断法の開発を行った。
- (2) 検疫所や衛生研究所等でのげっ歯類におけるハンタウイルス感染の簡便な抗体検査が可能になった。
- (3) 国内外における様々なげっ歯類媒介性人獣共通感染症について、流行状況が解明されることにより、これらの感染症の危険度情報の発信が可能になった。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者

- (1) Kariwa H, Tkachenko EA, Morozov VG, Seto T, Tanikawa Y, Kolominov SI, Belov SN, Nakamura I, Hashimoto N, Balakiev AE, Dzagurnova TK, Abu Daud, NH, Miyashita D, Medvedkina OA, Nakauchi M, Ishizuka M, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. : Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. J Vet Med Sci. 2009. In press.
- (2) Maeda A, Murata R, Akiyama M, Takashima I, Kariwa H, Watanabe T, Kurane I, Maeda J. : A PCR-based protocol for the generation of a recombinant West Nile virus. Virus Res. 2009. 144, 35-43.

研究分担者

- (1) 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. 2009. 161, 173-6.
- (2) Schmidt-Chanasit J, Essbauer S, Petraityte R, Yoshimatsu K, Tackmann K, Conraths FJ, Sasnauskas K, Arikawa J, Thomas A, Pfeiffer M, Scharninghausen JJ, Splettstoesser W, Wenk M, Heckel G, Ulrich RG. : Extensive host sharing of Central European Tula virus. J Virol. 2009. In press.
- (3) Katoh H, Ohya K, Kubo M, Murata K, Yanai T, Fukushi H. : A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of Siadenovirus. Virus Res. 2009. 144, 294-7.
- (4) Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Hagiya K, Izumi Y, Une Y, Yoshikawa Y. : Exoticsmall mammals as potential reservoirs of zoonotic Bartonella spp. Emerg Infect Dis. 2009. 15, 526-32.
- (5) 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. 2009. 107, 805-11.
- (6) 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 non-human primates. J Gen Virol. 2009. 90, 2266-71.
- (7) Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, 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. 2009. 20, 139-50.

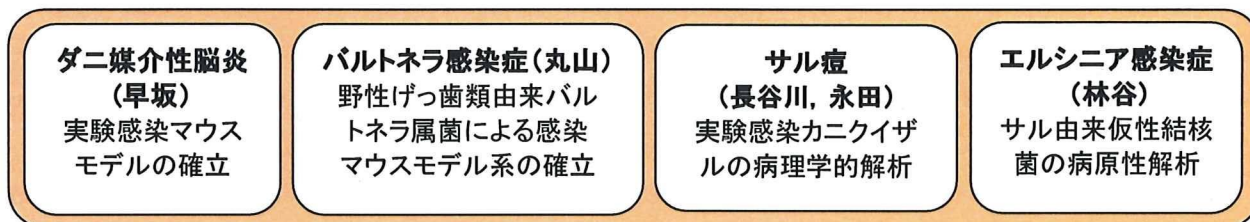
Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

げっ歯類媒介性人獣共通感染症の新規診断法の開発



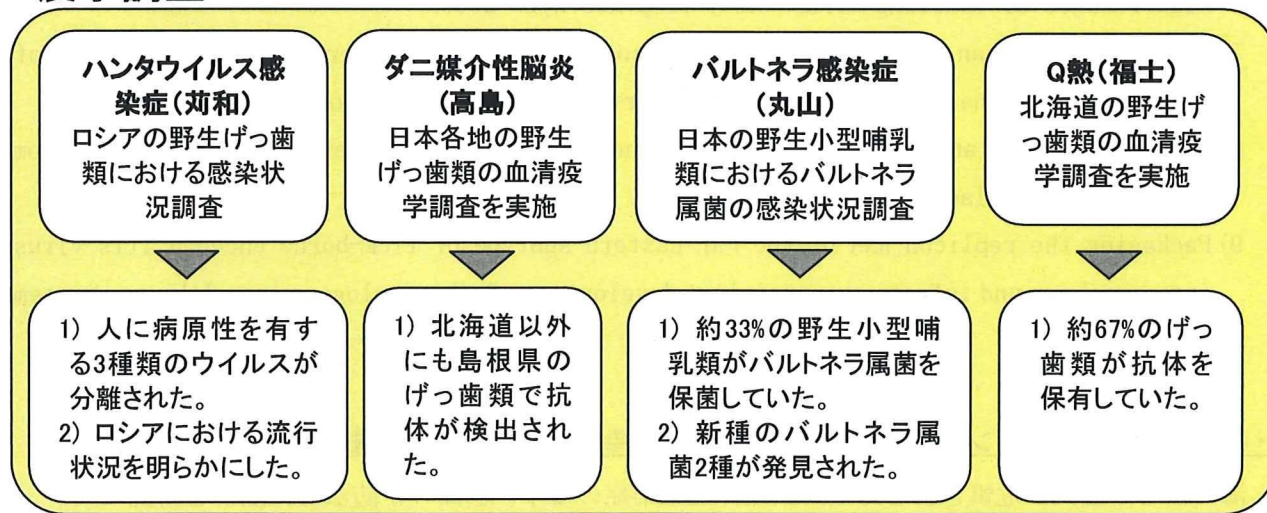
各種げっ歯類媒介性人獣共通感染症の精度の高い診断法が開発された。

実験感染モデルの確立および病理学的解析



各種げっ歯類媒介性人獣共通感染症の実験感染モデルが開発され、病原性解析が可能になった。

疫学調査



○研究代表者の研究歴等**・過去に所属した研究機関の履歴**

1986年4月～1990年3月 武田薬品工業(株) 中央研究所

1990年4月～現在 北海道大学大学院獣医学研究科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

橋本 信夫 (北海道大学名誉教授)

高島 郁夫 (北海道大学大学院獣医学研究科)

有川 二郎 (北海道大学大学院医学研究科)

・主な研究課題

ハンタウイルス感染症の疫学的研究と診断法開発

ダニ媒介性脳炎の診断法開発

ウエストナイル熱の診断法開発

SARS コロナウイルスの粒子形成機構の解析

・これまでの研究実績

- 1) Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Jpn J Vet Res.* 2008.
- 2) Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J Gen Virol.* 2008
- 3) Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus *Hantavirus*) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol.* 2007.
- 4) Hantavirus infection in East Asia (Review). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007.
- 5) A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia (Review). *Jpn J Vet Res.* 2007.
- 6) Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006.
- 7) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J Virol Methods.* 2006.
- 8) Soochong virus: an antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J Med Virol.* 2006.
- 9) Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. *Vaccine.* 2005.

・平成22年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

海外からの侵入が危惧される野生鳥獣媒介性感染症の疫学、診断・予防法等に関する研究

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

課題番号: H19-新興一般-012

北海道大学大学院獣医学研究科
苅和 宏明

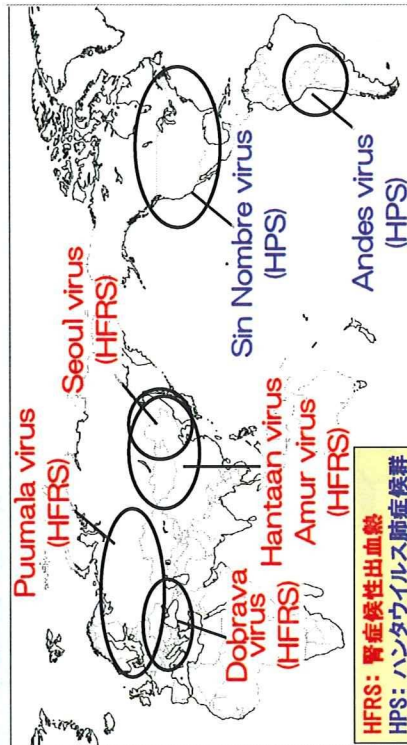
研究の目的

- げっ歯類媒介性人獣共通感染症に対して輸入検疫時にも応用可能な診断法の開発を行う。
- 開発された新規診断法を用いて、輸入げっ歯類の検査体制の整備を図る。
- 様々なげっ歯類媒介性人獣共通感染症について感染状況の把握が容易になる。

ハンタウイルス感染症の診断法開発と 疫学調査

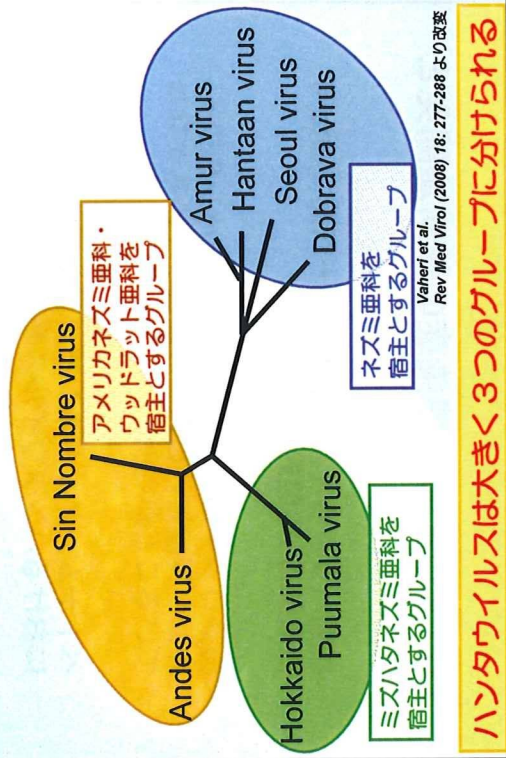
- 各種ハンタウイルス抗体を同一試薬で検出可能なELISAの開発
- 極東ロシアでは3種類の異なったハンタウイルスが腎症候性出血熱の原因ウイルスとなっていることが判明。
- ベトナム、インドネシア、およびシランカにおけるハンタウイルス感染症の疫学調査

主なハンタウイルスの分布



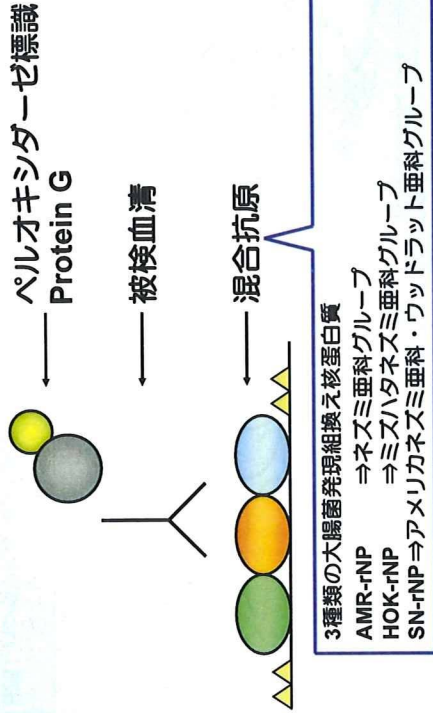
世界各地で様々な種類のげっ歯類が多様なハンタウイルスを保有している。

ハンタウイルスの系統樹

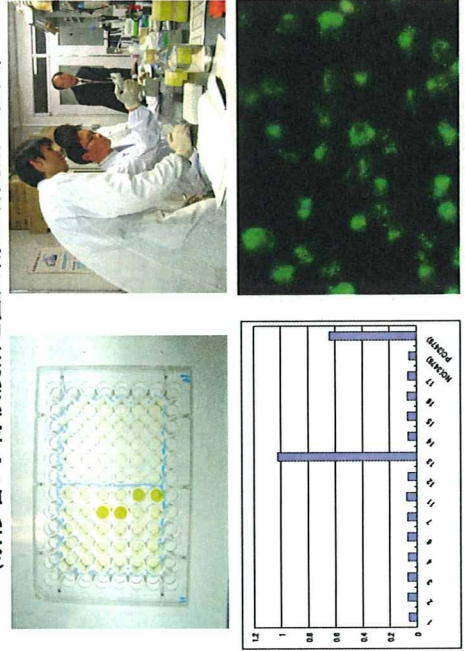


ハンタウイルスは大きく3つのグループに分けられる

3種類の組換え核蛋白質を用いた抗体検出ELISA



ハンタウイルス感染の血清診断法の研修 (研修者: 小樽検疫所と富山衛生研究所の職員)

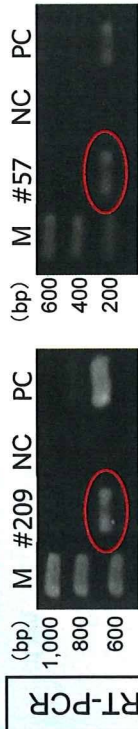


各種野生げっ歯類におけるELISAとIFAによる 抗ハンタウイルス抗体の検出

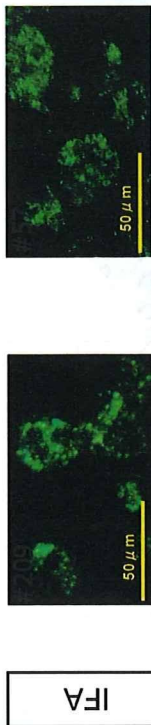
種	ウイルス	ELISA		IFA		ELISAの 敏感度 (%)	ELISAの 特異度 (%)
		+	-	+	-		
ドブネズミ	Seoul	28	11	17	11	90.9	94.1
エゾヤチネズミ	Hokkaido	47	5	42	5	100.0	100.0
セズジネズミ	Hantaan	46	5	41	5	100.0	100.0
ハントウアカネズミ	Amur	29	9	20	10	90.0	100.0

極東ロシアの野鼠からのウイルス分離

ハントウアカネズミ(#209) セスジネズミ(#57)



※M: marker NC: negative control PC: positive control



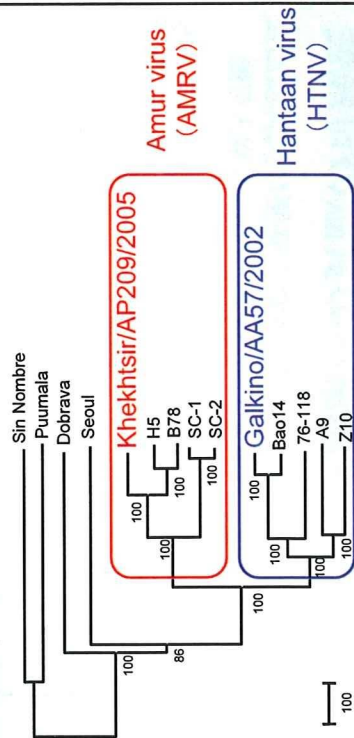
→ハントウウイルスに対するモノクローナル抗体でVero E6細胞を染色した。

ハントウアカネズミとセスジネズミからの
ハントウウイルスの分離を確認

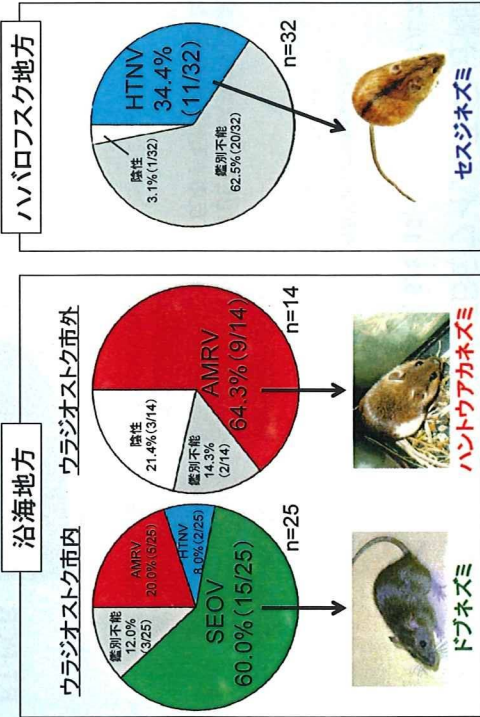
分離株の遺伝子解析

・ハントウアカネズミ#209由来株 → Khehtsir/AP209/2005
・セスジネズミ#57由来株 → Galkino/AA57/2002

M:遺伝子 (41~3,445nt)をもとに作成した系統樹



極東ロシアのHFRS患者の感染ウイルス型の割合



ダニ媒介性脳炎の疫学調査と ウイルス分離

日本の野生げっ歯類における疫学調査
↓
北海道と島根県が陽性地区 (平成20年度)
↓
(平成21年度)

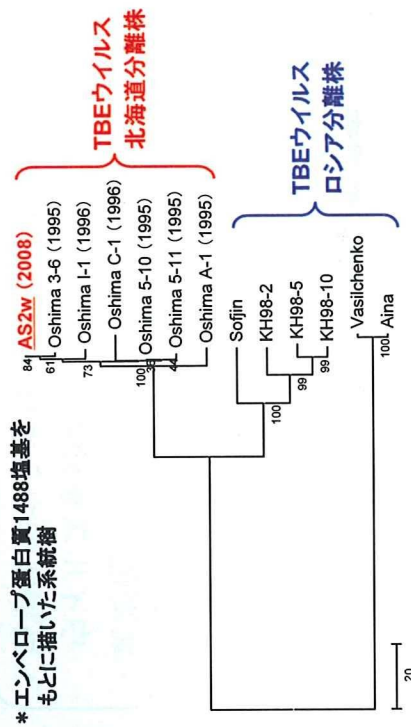
- ・北海道の上磯町でダニ媒介性脳炎ウイルスを分離
- ・島根県でさらにげっ歯類の調査を実施

道南地域の野鼠からのTBEウイルスの分離

- ・上磯のアカネズミの1プール(個体No. 3, 5, 8, 15, 23, 31)からウイルスの分離に成功した。
- ・分離されたウイルスをKamiiso-2008-AS2w(AS2w)と命名した。



分離株の系統樹解析



AS2wは北海道分離株であるOshima株と非常に近縁であった。

その他の研究成果

- ・ハンタウイルス感染症の疫学調査をベトナム、インドネシア、およびスリランカで実施した。
- ・わが国の野生小型哺乳類の32.6%とニホンジカの25%がハルトネラ属菌を保有していた。
- ・Multiplex PCR法を用いたサルモネラ感染症の迅速診断法を開発した。
- ・エルシニア感染症の遺伝子診断法と血清診断法を開発した。
- ・Q熱の新規血清診断法を開発した。
- ・LAMP法によるサル痘の迅速診断法を開発した。
- ・ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症機序を解析した。

本研究の行政施策への貢献の可能性

- ・多種類のハンタウイルスに対する簡便な抗体検出法が開発された。→輸入げっ歯類などの検査に導入可能
- ・ロシアでHFRSの原因となっている3種類のハンタウイルスを分離した。→輸入症例の確定診断に利用可能
- ・ダニ媒介性脳炎の安全で簡便な検査法が確立され、北海道と島根県にダニ媒介性脳炎ウイルスが分布していることが明らかになった。
→ダニ媒介性脳炎の大規模な疫学調査への応用が可能
- ・サルモネラ感染症、エルシニア感染症、およびサル痘の簡便な検査法が整備された。
→臨床的な検査にも応用可能