

201028041A

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

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

平成 22 年度 総括研究報告書

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 23 (2011) 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

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

平成 22 年度 総括研究報告書

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 23 (2011) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告	1
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	3
荻和宏明	
II. 分担者研究報告	19
1. ダニ媒介性脳炎の疫学	21
好井健太郎	
2. ハンタウイルス感染症に関する研究	26
有川二郎	
3. 中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの 詳細な分子疫学	30
西條政幸	
4. 狂犬病の疫学に関する研究	36
井上智	
5. 狂犬病ウイルスの末梢感染性に関するウイルス遺伝子の同定	45
伊藤直人	
6. バルトネラ感染症の疫学	49
丸山総一	
7. 野生ヤモリにおけるサルモネラ保菌に関する疫学的研究	52
林谷秀樹	
8. 欧州型ボレリア・ガリニの拡散に関する研究	57
川端寛樹	
9. 野生鳥獣類媒介性感染症の病理学的検索 -ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスモデルの病理学的検討-	61
永田典代	
10. ダニ媒介性脳炎の発症機構の解析	65
早坂大輔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
IV. 研究成果の刊行物・印刷	71

## I. 総括研究報告

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

研究代表者 苅和宏明

北海道大学大学院獣医学研究科

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)

総括研究報告書

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

研究代表者	苅和宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	准教授
研究分担者	好井健太郎	北海道大学大学院獣医学研究科	助教
	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科	教授
	西條政幸	国立感染症研究所	部長
	井上智	国立感染症研究所	室長
	伊藤直人	岐阜大学応用生物科学部	准教授
	丸山総一	日本大学生物資源科学部	教授
	林谷秀樹	東京農工大学農学研究院	准教授
	川端寛樹	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	Vischeslav G. Morovoz	Medical Company Hepatolog	所長
	Leonid I. Ivanov	ハバロフスク ペスト防疫研究所	所長

研究要旨

北海道の北斗市上磯地区のアカネズミから 2008 年に分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスについて塩基配列の解析を行ったところ、1995 年の上磯分離株である Oshima 株と遺伝子性状が非常に近縁であり、10 年以上にわたって同地区でウイルスが安定して維持されている事が示された。ダニ媒介性脳炎の重症化には IL-10 や TNF 応答に関連した感染個体の免疫応答が関わっていることが示唆された。また、本ウイルスの感染初期において I 型 IFN 応答が感染防御に重要であることが示された。BALB/c マウスにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの静脈内接種後の病態を病理学的に明らかにした。すなわち、ウイルス感染マウスはいずれも腹部膨満を示し、8 日目に瀕死となった。感染 5 日目からの腸管神経叢の神経細胞でのウイルス増殖が特徴的であったが、瀕死期には大脳、小脳、脳幹、脊髄を含む中枢神経系の神経細胞でもウイルス増殖が見られた。南米のげっ歯類におけるハンタウイルス感染を診断するための抗血清を作製した。狂犬病ウイルスの遺伝子解析により、モンゴル、ロシアおよび中国では、野生動物等の移動により、国境を越えて狂犬病ウイルスが往来している可能性が示唆された。狂犬病ウイルス西ヶ原株と Ni-CE 株の間で見られる末梢感染性の違いには、P 及び N 遺伝子が関連することが示唆された。わが国の野生鹿は高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌のレゼルボアであり、また、ベトナム・メコンデルタではヤモリは人の *Salmonella* 感染症の感染源となっている可能性が示された。ライム病病原体であるボレリア・ガリニについて分子疫学的解析を行ったところ、モスクワ近郊で浸潤しているボレリア・

ガリニ株は神経ボレリア症が報告されている国・地域で見出される欧州型ボレリア・ガリニ株と同じ ST 型が高頻度で見出された。

#### A. 研究目的

野生鳥獣類によって媒介される人獣共通感染症は人に感染すると重篤化するものが多く、世界各国で公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、日本において患者数は少なくとも、日本の周辺国では大きな問題となっている人獣共通感染症について、疫学的な解析、診断法や予防法などの開発を行うことを目的としている。

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。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。また、WHO の報告によれば、世界中で毎年 5 万人以上が狂犬病によって死亡している。その他にも、国内外においてクリミア・コンゴ出血熱、パルトネラ感染症、エルシニア感染症、サルモネラ感染症、およびライム病の患者が多数報告されている。上記の感染症はいずれも野生鳥獣によって媒介される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が不足している。そこで、本研究では野生鳥獣類を対象とした疫学調査を実施して、上記感染症の分布域や病原巣動物といった基礎的な疫学情報を得る。また、これらの感染症に対する有効な診断法を開発して調査に応用する。さらに、感染動物モデルを用いて、発症機序や重症化の機序を解析する。

#### B. 研究方法

##### ダニ媒介性脳炎：

##### 1) ウイルス分離

北海道北斗市で捕獲された 34 匹の野鼠から採取された脾臓を 10% 乳剤とした後、1 プール 3-5 匹として 9 プールの脾臓乳剤を作製した。これを 1-2 日齢の BALB/c 哺乳マウスの脳内に接種した。接種哺乳マウスから脳を採取し、10% 脳乳剤を作成し以降の実験に用いた。

##### 2) 蛍光抗体法によるダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 抗原の検出

BHK 細胞に脳乳剤を接種し、5 日間培養後細胞を固定した。マウス抗 TBEV 抗体と Alexa555 標識抗マウス IgG 抗体により TBEV 抗原を検出した。

##### 3) TBEV の RNA 検出と塩基配列の決定

脳乳剤を接種した BHK 細胞から ISOGEN を用いて RNA 抽出を行い、RT-PCR により TBEV の遺伝子増幅を試みた。

増幅された PCR 産物を精製後、塩基配列を決定した。

##### 4) 分離ウイルスの増殖性

BHK 細胞に MOI=0.01 でウイルスを感染させ、経時的に培養上清を回収した。培養上清中のウイルス力価は BHK 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した。

##### 5) TBE ウイルスのマウスにおける病原性発現機序の解析

極東型の TBE ウイルス株である Oshima 株 (北海道で分離) および Sofjin 株 (極東ロシアで分離) を、B6 マウス、IL-10 KO B6 マウスにおよび TNFR1 KO B6 マウスにそれぞれ  $10^4$  PFU 皮下感染させ、体重減少、症状、致死性を比較した。また、TBE ウイルスを感染させた B6 マウスと IFN alpha KO 129/SV マウスにおける血清中の I 型 IFN 量を測定した。

ウイルス感染実験は BSL3 実験室で行い、動物実験は長崎大学における動物実験指針に沿って行った。

##### 6) TBE ウイルス感染マウスの病理学および免疫組織学的検索

8 週齢の BALB/c マウスに TBEV の標準株である Sofjin 株を一匹あたり  $2.5 \times 10^3$  PFU/200  $\mu$ l (100 LD<sub>50</sub> に相当する) 静脈内接種した。接種 3, 5, 7 あるいは 8 日目にこれらの動物 (一群 3 匹) を過麻酔殺、心臓採血し心臓からの 10% ホルマリン緩衝液の灌流固定を行った。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。ホルマリン固定された TBEV 感染マウス組織材料 (脳、脊髄、胃、小腸、大腸、心、肺、腎、肝、脾、副腎、胸腺、リンパ節) は、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗 TBEV ウイルス E タンパクポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。

##### ハンタウイルス感染症：

##### 1) 抗原および ELISA

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。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。この ELISA において尿素を含む洗浄ステップを加えた結果との比較により、抗体の結合性の強さを見積もる、Avidity 解析を行った。

### 2)新世界げっ歯類に対する2次抗体の作成

Cotton rat の血清から Protein A カラムを用いて IgG 分子を精製し、これをウサギに免疫して抗血清を得た。ここから IgG 分子を精製し、さらにデオチンでラベルして2次抗体とした。

### 3)実験用ラット血清

実験用ラット WKAH/hkm 6 週齢に Hantaan virus (HTNV)/ Soul virus (SEOV)/ Thailand virus (THAIV)/ Dobrava virus (DOBV)を接種し、麻酔下で経時的に採血した。血清は 56°C で 30 分間非働化し、血清学的解析に使用した。

(倫理面からの配慮について)

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る。ウサギの採血は耳介静脈より行った。それぞれの実験については北海道大学の動物実験委員会の承認を受けたものであり、動物福祉の観点からも問題はないと判断された。

### クリミア・コンゴ出血熱(CCHF):

#### 1) CCHF ウイルス新疆株の S-遺伝子情報

2001 年および 2002 年の新疆ウイグル自治区における CCHF 流行時に、10 人の患者から増幅された S-遺伝子、および、6 匹のダニから増幅された S-遺伝子の塩基配列を決定した。また、2005 年以降に中国の研究者により増幅され、解析された S-遺伝子の塩基配列 29 株については、GenBank から情報を得た。系統樹解析に用いられた部分 S-遺伝子は、増幅された約 240 塩基である。

#### 2) 分子疫学的解析。

世界各国で分離されている CCHF ウイルス、中国新疆ウイグル自治区で分離された CCHF ウイルス、および、RT-PCR 等で増幅された CCHF ウイルスの遺伝子の塩基配列を用いて、NJ 法により系統樹解析を実施した。

### 狂犬病:

#### 1) 検査材料

モンゴルの国立中央獣医学研究所の専門家の協力により、狂犬病を発症した 7 種類の動物 (赤キツネ、イヌ、野生ネコ、ラクダ、ウシ、ヤギ、ヒツジ) から採取した 24 の脳材料について解析を行った。動物は、2005~2008 年に Zavkhan、Khuvs gul、Govi-Altai、Bayan-Ulgii、Tuv 地方で捕獲されたものである。これらの 24 例の脳材料は FITC 標識抗狂犬病ウイルス (RABV) モノクローナル抗体 (Fujirebio) を用いた抗原検出の結果、いずれも RABV 抗原が陽性であった。

#### 2) RABV 遺伝子の塩基配列の決定と系統樹解析

脳検体から RNA の抽出を QIAmp Viral RNA extraction kit (Qiagen) を用いて行った。抽出した RNA について、RT 反応 (avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Promega)) を行った後に、PCR を行った。増幅された RABV の N 蛋白質遺伝子の全領域についてシーケンシングを行った。系統樹の作成は、Clustal X version 2 で作成した RABV の N 遺伝子配列 (1,353nt) アラインメントを用いて neighbor-joining 法によって行った。

#### 3) RABV の病原性発現機序の解析

西ヶ原株及び Ni-CE 株の中枢神経侵襲性を検討するため、ddY マウス (4 週齢・雌、3 匹/群) の大腿筋に 10<sup>6</sup> FFU の各株を接種した。接種 5 日後に採脳し、作製した 10% 乳剤を用いて、脳における感染性ウイルスの存在をフォーカス・アッセイにより検証した。

西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性の違いに関連するウイルス遺伝子を同定する目的で、Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の N、P、M、G あるいは L 遺伝子を単独で保有するキメラウイルス [各々 CE(NiN) 株、CE(NiP) 株、CE(NiM) 株、CE(NiG) 株及び CE(NiL) 株] を 5 匹/群のマウスに上記の条件で筋肉内接種し、症状の推移を 14 日間観察した。

### バルトネラ感染症:

平成 20 年 11 月~平成 22 年 3 月に、北海道・奈良県・和歌山県で捕獲された野生鹿 (エゾシカ 19 頭とホンシュウシカ 26 頭)、宮城県・愛知県の飼養鹿 (ホンシュウシカ 27 頭) から血液を、奈良県の野生鹿からマダニ 33 匹とシラミバエ 10 匹を採取した。各試料から *Bartonella* 属菌を分離すると共に、*gltA* 領域 (312bp) の塩基配列から系統解析を行った。また、PCR 法により、マダニとシラミバエの体内における *Bartonella* 属菌の

DNAを確認した。

#### サルモネラ感染症:

##### 1) 供試材料

供試検体として、2008～2010年にベトナム南部に位置するメコンデルタの Can Tho 市、Kien Giang 県および Ca Mau 県で捕獲した野生のヤモリ 3 種 465 検体の腸管内容物を用いた。

##### 2) *Salmonella* 属菌の分離、同定および血清型別方法

供試検体は 3m/ 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、その 1m/ を 10m/ の EEM 培地 (栄研化学(株): 栄研) に接種した後、37°C で 24 時間前増菌培養した。その培養液 1m/ 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 (日水製薬(株): 日水)、brilliant green Agar (OXOID) 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) 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、市販のサルモネラ免疫血清 (デノンカ生研(株)) を用い、血清型を決定した。

#### ライム病:

欧州型ボレリア・ガリニの分布域を調べるために、極東ロシアから欧州東部に棲息するマダニ、野鼠よりボレリアを分離・検出し、高感度型別法である Multi-locus sequence typing (MLST) 法によりボレリアの型別を行った。今回研究に用いたボレリア・ガリニ 32 菌株は、リシナスダニ (*Ixodes ricinus*) 由来 25 株、シェルツエマダニ (*I. persulcatus*) 由来 3 株、野鼠 (*Apodemus uralensis*) 由来 4 株であり、これらは共同研究者である千葉科学大学・増澤俊幸博士、福井県衛生環境研究センター・石畝史博士他より分与頂いた。

これらボレリア株を BSK 培地にて 32°C 孵卵器にて静置培養後、常法に従って DNA 抽出した。一部の株については、複数の菌種が混合していたため、Norris らの方法にて clone 化を行った。これら培養株より抽出した DNA を鋳型とし、Margos らの方法に従って PCR を行い、増幅 DNA を得た。得られた増幅 DNA は精製後塩基配列を決定し、データベース上にある配列を含

めた上で MLST 解析に供した。

#### C. 研究結果

##### ダニ媒介性脳炎

##### 1) アカネズミからの TBE ウイルスの分離

脾臓乳剤を脳内接種した哺乳マウスの中で、衰弱個体が 1 匹現れた。このマウスより採取した脳乳剤を BHK 細胞に接種したところ、蛍光抗体法により細胞内において TBE ウイルス抗原が検出され、TBEV が分離された事が確認された。

このウイルスを Oshima 08-AS 株と命名し、以降の実験に使用した。

##### 2) Oshima 08-AS 株の遺伝子性状の解析

今回、分離された Oshima 08-AS についてウイルスゲノム RNA の全塩基配列を解読した。1995 年に分離された Oshima 5-10 株と比較した所、35ヶ所に塩基の相違が認められ、そのうち 13ヶ所がアミノ酸の相違を伴っていた。これらアミノ酸配列の相違は全て非構造蛋白領域に位置していた。

E 蛋白領域 (1,488 塩基) について既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、Oshima-08-AS は病原性の高い極東型型に分類され、中でも以前に北上市で分離された株達と同じクラスターを形成し、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。

##### 3) Oshima 08-AS 株の細胞における増殖性

Oshima 08-AS 株の BHK 細胞における増殖性を Oshima 5-10 株と比較した所、同様の増殖性を示した。しかし Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と比較して、細胞変性効果が弱く、またプラークアッセイにおいて大きなプラークを示し、生物性状に相違がある事が示唆された。

##### 4) TBEV の病原性発現機序の解析

Oshima 株を B6 マウスおよび IL-10 KO B6 マウスに皮下感染させたところ、致死率が B6 マウスでは 37% (致死個体の生存日数 16.5 ± 2.29 日)、IL-10 KO マウスでは 60% (致死個体の生存日数 11.6 ± 1.45 日) となり致死率は IL-10 KO マウスで有意 ( $p = 0.035$ ) に高かった。次に、感染 9 日目の中枢神経組織内のウイルス量を比較したところ、Oshima 株感染 B6 マウスでは小脳で最もウイルス感染価が高かったが、IL-10 KO マウスでは脊髄と大脳皮質で最も多くのウイルスが認められた。しかしながら、B6 マウスと IL-10 KO マウスのあいだには有意な差は認められなかった。一方、Sofjin 株感染では B6 マウス、IL-10 KO マウスともに致死率 100% (致死個体の生存日数、B6 マウス 10.5 ± 0.51、IL-10 KO マウス



10.2±0.36 日)となった。

Oshima 株  $10^4$  PFU を TNFR1 KO マウスに感染させたところ、B6 マウスでは致死率が 37%(致死個体の生存日数 16.5±2.29 日)だったのに対し、TNFR1 KO では 60%(致死個体の生存日数 14.3±2.54 日)となった。一方、Sofjin 株感染では B6 マウス、IL-10 KO マウスともに致死率 100%(致死個体の生存日数、B6 マウス 10.5±0.51、IL-10 KO マウス 9.64±0.47 日)となり生存率に有意な差は認められなかった。

Oshima 株感染 24 時間後の B6 マウス血清中の IFN 量はウイルス接種量に依存した IFN 産生量の起こっていることが判明した。次に、IFNAR KO マウスに Oshima 株を皮下感染させると、致死率は  $10^0$  PFU 感染で 20%、 $10^2$ ~ $10^6$  PFU 感染では 100%となった。Sofjin 株の IFNAR KO 皮下感染においては、致死率は  $10^0$  PFU 感染で 60%、 $10^2$ ~ $10^6$  PFU 感染では 100%となり、接種ウイルス量が多いほど早期に死亡した。

TBEV 感染マウスの 7 日目以降発症個体では胃、小腸の内容物(水、消化物)停滞による腸管膨隆がみられた。接種 3, 5, 7, 8 日目の病理学的検索の結果、接種 5, 7, 8 日目の腸管筋層内神経叢の神経細胞と 8 日目の大脳、小脳、脳幹、脊髄の神経細胞の細胞質にウイルス抗原が検出された。8 日目の動物において、一部の腸管内腔面には壊死物が貯留し腸管上皮の壊死もみられた。

## ハンタウイルス感染症

### 1) 抗コットンラット 2 次抗体の作成

昨年度の成果から、抗コットンラット IgG 抗体が *Oligoryzomys* 属げっ歯類の抗体検査に有用であることが明らかとなった。昨年度はマウスに免疫することによって少量の抗血清を得て、有用性を明らかにすることができたが、今年度は免疫動物をウサギとして、十分な量の 2 次抗体を得ることができた。

### 2) 旧世界 HTNV 関連ウイルス保有げっ歯類の血清型鑑別診断

NP の N 末端を削除したトランケート抗原を用いることにより、ハンタウイルス感染の血清型鑑別診断が可能であることが確認されている。今回、さらに血清型鑑別診断が可能となる感染後の時期について経時的に調べた。その結果、感染初期の IgG 抗体は鑑別しがたく、感染後 25 日前後より、鑑別が可能であることが明らかとなった。この鑑別は IgG 抗体の Avidity が十分に高くなる時期に一致して可能となることが示された。一方、IgM 抗体ではこのトランケート抗原を用いても血

清型鑑別を行うことが出来ず、代替中和法は IgM 抗体では使用できないことも明らかとなった。すなわち感染初期においては本代替中和法が適応外であることが示された。

## クリミア・コンゴ出血熱

部分 S-遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析により、新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスは、患者やダニから得られたウイルス全てが独立した一つのクラスターを形成していた。しかし、近年報告された新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスを加えた今回の解析により、中近東分離株のクラスターに分類されるものが、新疆ウイグル自治区に存在することが明らかにされた。

## 狂犬病

### 1) モンゴル由来の RABV の分子疫学的解析

モンゴル由来ウイルスの間で、塩基配列の一致率は 98.3% 以上であった。モンゴル由来 RABV 株について N 遺伝子配列(1,353nt)を利用した系統樹解析を行ったところ、モンゴルの RABV は A と B の 2 つのグループに分かれることが示された。グループ A は、主にモンゴル西部で分離されたウイルスが含まれ、ロシアやカザフスタンで分離された Steppe(草原)-type ウイルス株と分子遺伝学的に近縁であった。一方、モンゴル中央部由来の 1 株(MGL 22)はグループ B に属しており、Arctic-like ウイルスに分類されるロシア、グリーンランド、韓国由来のウイルスに近縁であった。

モンゴル由来ウイルスのアミノ酸配列を GenBank の他の株と比較すると、N 遺伝子の Ser389(リン酸化への関与が報告されている)は、モンゴル由来株だけでなく、他の株でも保存されていた。Antigenic site I(アミノ酸 359-366 番目)および site IV(アミノ酸 375-383 番目)も、同様にモンゴル由来株では保存されていた。N 蛋白質の全アミノ酸の配列では、MGL 22 と他のモンゴル由来株の間に 11 アミノ酸の違いが認められた。モンゴル由来株間のアミノ酸配列の一致率は 97.6% 以上であり、全ての株は direct immunofluorescent antibody (DFA) test で検出可能であった。

### 2) RABV の病原性発現機序の解析

西ヶ原株筋肉内接種群では、全ての個体の脳において、高い感染価のウイルス( $>10^8$  FFU/g)が検出された。一方、Ni-CE 株筋肉内接種群では、いずれの個体においても感染性ウイルスは検出されなかった( $<10^2$  FFU/g)。したがって、両

株の異なる末梢感染性には、中枢神経侵襲性の違いが関与していることが示唆された。

各キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株接種群では、Ni-CE 株接種群と同様にいずれの個体も発症しなかった。一方、CE(NiP)株及び CE(NiN)株接種群では、それぞれ 5 匹中 4 匹及び 1 匹が西ヶ原株接種マウスと同様の神経症状を示して死亡した。これらのことから、西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに P 遺伝子が関連すること、ならびに N 遺伝子が関連する可能性が示された。

#### バルトネラ感染症

野生鹿の 57.8% (26/45 検体)、マダニの 3% (1/33 検体)、シラミバエの 90% (9/10) から *Bartonella* 属菌が分離された。PCR 法による *Bartonella* DNA の保有率は、マダニで 0% (0/33)、シラミバエで 100% (10/10) であった。

*gltA* 領域に基づく系統解析の結果、分離株は *B. capreoli* と同一 (系統 II) または独立した 2 つのクレード (系統 II) を形成した。さらに、マダニ分離株の遺伝子型は寄生していた鹿の株と同一の遺伝子型であったが、シラミバエ分離株では異なっていた。

#### サルモネラ感染症

ベトナム・メコンデルタで捕獲した野生ヤモリ 465 検体中 95 検体 (14.5%) から *Salmonella* 属菌が分離された。分離状況を季節別にみると、雨季 (5~11 月) では 230 検体中 31 検体 (13.5%)、乾季 (12~4 月) では 186 検体中 32 検体 (17.2%) から *Salmonella* 属菌が分離されたが、季節間では有意差は認められなかった。また、種別にみると、ホオグロヤモリ (*Hemidactylus frenatus*) 358 検体中 58 検体 (16.2%)、ヒラオヤモリ (*Hemidactylus platyurus*) 250 検体中 33 検体 (13.2%) および オンナダケヤモリ (*Gehyra mutilata*) 38 検体中 4 検体 (10.5%) から分離されたが、種間では分離率に有意差は認められなかった。また、地域別に分離率をみると、Can Tho 市では 416 検体中 63 検体 (15.1%)、Kien Giang 県では 122 検体中 19 検体 (15.6%) および Ca Mau 県では 108 検体中 13 検体 (12.0%) から *Salmonella* 属菌が分離されたが、地域間で有意な差は認められなかった。

*Salmonella* 陽性のヤモリ 95 検体からは、*Salmonella* 95 株が分離された。95 株中 73 株は市販免疫血清で 10 種類の血清型に型別された。S. Weltevreden が 39 株で最も多く、次いで S.

Lexington が 11 株、S. Newport が 9 株、S. Brunei が 7 株、S. Vejle が 2 株、S. Dabou、S. Strathcona、S. Agona および S. Hindmarsh がそれぞれ 1 株であった。S. Weltevreden は調査した 3 地域いずれにおいても最も高頻度に分離された。

捕獲したヤモリのうち 92 検体はメスヤモリで卵を体内に保有していたので、1 検体当たり 2 個の卵を無菌的に採取し *Salmonella* の分離を行ったところ、母ヤモリからは 14 検体 (15.2%) から *Salmonella* 属菌が分離されたにも関わらず、体内の卵からは *Salmonella* 属菌はいずれの検体からも分離されなかった。

#### ライム病

分離されたボレリア 32 株について各々 8 loci の塩基配列、約 5kbp を決定し、国際 MLST データベースと照合した。この結果 32 株中 20 株が既報の ST と一致した。

1) モスクワ近郊で採取されたりシナスマダニ由来 24 株には、欧州型ボレリア・ガリニの ST である ST86 (5 株)、ST94 (1 株)、ST179 (1 株)、ST180 (2 株)、ST209 (4 株)、ST244 (4 株)、およびこれまで知られていない ST である Untypable STs (5 株) が含まれた。モスクワ近郊では欧州各国と同様に欧州型ボレリア・ガリニが優勢であると考えられた。また Untypable STs の 5 株 (Nr187-cl1, Nr215-cl1, Nr176-cl1, Nr309, Nr180-cl5) についてもその系統解析からは、欧州型ボレリア・ガリニであることが推定された。ドイツでリシナスマダニより分離された ZQ1 株も Untypable ST であったが、ST175 と近縁の欧州型ボレリア・ガリニと推定された。一方、ST82 (2 株) は欧州型ボレリア・ガリニとは異なるクラスターを形成したことから、欧州型かアジア型かは現在のところ不明である。

2) モスクワ近郊で採取されたシュルツェマダニ由来株 (Np189) は ST86 であり、欧州で見出される欧州型ボレリア・ガリニと一致した。同 Mp7 株はそれぞれのクラスターより独立していた。

3) 極東ロシアで分離されたシュルツェマダニ由来 1 株 (Ip90) はそれぞれのクラスターより独立していた。また、中国国内の野鼠より分離されたボレリア 4 株はこれまで登録された ST とは一致しなかったが、それぞれアジア型ボレリア・ガリニと近縁であると考えられた。

4) 欧州型ボレリア・ガリニの内、最も強毒型と考えられている ST84 および ST85 は今回の調査では見出されなかった。

#### D. 考察

## ダニ媒介性脳炎

現在北海道において流行している TBE ウイルスの性状を解析するため、北斗市の野鼠からのウイルス分離を試みた。その結果、アカネズミから TBE ウイルスが 1 株分離された。分離株の塩基配列を解析した結果、分離ウイルスは極東亜型に分類され、1990 年代に当教室で北斗市より分離された株達と非常に近縁である事が示された。TBE ウイルスの遺伝子は自然界では安定であることが報告されており、それを支持する結果だと考えられる。

培養細胞を用いた実験では、Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株と同様の増殖性を示したものの、細胞障害性やプラーク形成等において相違を示し、生物性状が異なる事が示唆された。今後は病原性の比較を行っていくことによって、分離地域における TBE ウイルスの疫学的な危険度を評価していく必要がある。

また我々はこれまでの研究で、北海道の他の地域や本州においても TBE ウイルスの流行巣が存在している可能性を指摘している。今後はこれらの地域における人への感染リスクを評価するため、住民を対象とした血清疫学調査も行うべきであると考えられる。さらに本研究と同様にウイルスの分離を試み病原性等を解析する事は今後の疫学的危険度を評価する上で重要な課題であると考えられる。

TBEV Oshima 株は IL-10 KO マウスへの感染で B6 マウスよりも高い致死率を示したことから、IL-10 応答が重症化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。しかしながら、IL-10 KO マウスにおいて中枢神経組織におけるウイルス量には有意な増加が認められなかったことから、単純にウイルスの神経感染が重症化の原因ではないことが示唆された。すなわち、感染個体の IL-10 応答が関連した免疫応答が重症化に関わっていることが考えられた。一方、Sofjin 株感染では IL-10 KO でも致死性に違いがみられなかったことから、Sofjin 株感染の場合は IL-10 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

TNFR1 KO マウスの感染実験により、TBEV Oshima 株感染では致死性の増加がみられたことから、TNF 応答が重症化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、Sofjin 株感染では TNFR1 KO マウスにおいても致死性に違いがみられなかったことから、Sofjin 株感染の場合は TNF 応答の重症化への影響は小さいものと考えられた。

Oshima 株感染後の血清中 I 型 IFN 量が接種量に応じて増加していたことから、接種量に応じて I

型 IFN 量の産生が起きていることが示唆された。また、IFNAR KO マウスの生存時間に明確な接種量依存性がみられたことから、I 型 IFN 応答がうまく働かない状態ではウイルス増殖の量の違いが致死性に直接反映されることが示された。

今回、TBEV の Sofjin 株を接種した BALB/c マウスはいずれも腹部膨満を示し 8 日目に瀕死となった。病理組織学的には感染 5 日目からの腸管神経叢の神経細胞でのウイルス増殖が特徴的であったが、瀕死期には大脳、小脳、脳幹、脊髄を含む中枢神経系の神経細胞でもウイルス増殖が見られた。これに伴う炎症性反応は無いあるいは非常に弱かった。ヒトにおいて WNV や TBEV の腸管神経叢への感染は不明であるが、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染患者には悪心、嘔吐、胃痛、食欲不振など胃腸症状を発症初期から訴えるものも報告されており、感染マウスにおける所見は興味深い。

## ハンタウイルス感染症

北米・南米由来ハンタウイルスの血清診断法の開発：昨年までの研究成果により、北米・南米に棲息するげっ歯類における罹患ウイルスを代替中和法により鑑別することができるようになった。一方、2次抗体として市販されているものは、シロアシマウス IgG に対するもののみであり、この2次抗体は、*Oligoryzomys* 属げっ歯類など他の属のげっ歯類の抗体への結合が不十分であるため、検出が困難であった。今回、ウサギを用いて、1ロットの2次抗体を準備した。今後、北米南米由来げっ歯類の抗体検出の敏感度が改善され、防疫体制に貢献することが期待される。

また、この代替中和法は感染初期の応用が難しいことが示された。しかしながら、その結果は抗体の Avidity との関連が考えられた。このことから、代替中和法陰性の場合、Avidity を測定して考察することが重要であると考えられる。すなわち、低 Avidity の場合には感染初期である可能性が示される。反対に高 Avidity であるにも関わらずどの血清型の代替中和抗原とも反応しない場合には、未知の型のウイルスの罹患が予想される。これらの情報は、ゲノムを検出する際の PCR プライマーの選定に重要な情報となる。

## クリミア・コンゴ出血熱

2001 年から 2002 年にかけて、中国新疆ウイグル自治区における CCHF の流行について西條らが詳細な研究を実施したが、近年の国際情勢により同地域における CCHF の流行に関する情報の入手は著しく困難になっている。しかし、近

年中国の研究者により新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの塩基配列に関する情報(特に部分 S-遺伝子に関する情報)が GenBank を通じて入手可能になった。

今回の解析で、これまでと同様に新疆ウイグル自治区の CCHF ウイルスの多くは独立した一つのクラスターを形成していることから、同地域で CCHF ウイルスは独自の進化を遂げていることが再確認された。S-遺伝子の塩基配列は、宿主となるダニの種に深い関連があると考えられている。つまり、新疆ウイグル自治区には、CCHF ウイルスの宿主となりうる特異的なダニが生息していることが示唆された。CCHF ウイルス遺伝子が増幅されたダニについて、16S-ribosomal DNA の部分配列を決定して分子系統樹解析でダニの種を同定した。それによると、*Hyalomma* 属と *Dermacentor* 属が CCHF ウイルスの宿主となっていることが明らかにされた。

今回の解析により中近東(特に UAE)に存在する CCHF ウイルスと同じクラスターに分類される CCHF ウイルスが新疆ウイグル自治区にも存在することが明らかにされた。隣国、パキスタンに存在する CCHF ウイルスは、系統樹解析上中近東の CCHF ウイルスに近縁である。以上の成績は、新疆ウイグル自治区における CCHF ウイルスは、同地域において進化をとげているものと、中近東から動物(特にヒツジなどの家畜)の移動、ダニを有する渡り鳥の移動により中近東の CCHF ウイルスが混在していることが示唆された。さらに、同地域に存在する CCHF ウイルスの宿主となり得るダニの種が多様であることをも示していると考えられる。

### 狂犬病

2005 年から 2008 年に西部・中央モンゴルに生息している狂犬病抗原陽性の 7 種類の家畜および野生動物について脳材料を採材し、検体中の狂犬病ウイルス N 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を利用して分子疫学系統樹を作成したところ、モンゴルで流行している RABV は 2 つの遺伝子グループに分けられ、ロシアで分離される Steppe 型と Arctic 型の RABV に近縁であることが明らかになった。

モンゴルは、ロシア・中国(ともに狂犬病流行国)と国境を接しており、国境を移動する野生動物等を介して狂犬病ウイルスが行き来する可能性が十分あり、伝搬経路等を理解することは国境を越えた狂犬病のコントロールのために重要である。

また、近年ではモンゴルとの国境に近いイルク

ーツクに生息するコウモリ(*Murina leucogaster*)から新種のリッサウイルス(Irkut virus)が分離されており、国境を越えて野生動物等を介した流行の拡大リスク等について関心がもたれている。

現在までモンゴルではコウモリに由来する狂犬病の報告はないが、新種のリッサウイルスが分離されたコウモリはシベリア南部、モンゴル西部、中国北東部でも生息が確認されており、モンゴルのコウモリ類がこれらリッサウイルスの感染宿主となりうる可能性は十分にある。

今後、モンゴルで流行しているリッサウイルスの野生動物等における流行形態を明らかにするとともに、隣国のロシアや中国等の患者発生状況や感染源動物における流行様式、分離 RABV 株の分子疫学等についての解析を進めることによって、ユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)の流行形態を明らかにしていく。

以前、ポリオウイルスや水疱性口炎ウイルスの末梢感染に対する生体防御に自然免疫が重要な役割を果たすことが報告されている(Lancaster et al., PLoS Pathog, 2010, Iannaccone et al., Nature, 2010)。これと関連して、最近、西ヶ原株が Ni-CE 株より効率的にインターフェロンの作用及び産生を阻害し、それぞれに P 及び N 蛋白質が関与することが明らかになってきた(Ito et al., J. Virol., 2010, Masatani et al., J. Virol., 2010)。以上より、西ヶ原株及び Ni-CE 株の異なる末梢感染性に、P 及び N 蛋白質の自然免疫回避能の違いが関与する可能性が考えられた。

### バルトネラ感染症

本研究により、わが国の野生鹿は少なくとも *B. capreoli* を含む 2 種の *Bartonella* 属菌を高率に保有していることが明らかとなった。また、*Bartonella* 属菌を保有していた野生鹿の多くに外部寄生虫が認められたのに対し、*Bartonella* 属菌が陰性の飼養鹿には認められなかったことから、鹿の *Bartonella* 属菌の水平伝播には外部寄生虫が関与していると考えられた。特に、マダニに比べ、シラミバエから *Bartonella* 属菌が高率に分離されると共にその DNA が検出されたこと、シラミバエから分離された株はそのシラミバエが寄生していなかった別の鹿の株と共通の遺伝子型を示したことから、シラミバエは鹿の *Bartonella* 属菌のベクターである可能性が強く示唆された。

### サルモネラ感染症

ベトナム・メコンデルタに生息する野生ヤモリ

から *Salmonella* 属菌が高率(14.7%)に分離された。*Salmonella* 属菌はヤモリの種類、捕獲地域および季節に関わらず分離されたことから、本地域ではヤモリは *Salmonella* 属菌の主要なレゼルポアになっているものと思われた。

ベトナム・メコンデルタのヤモリから分離された *Salmonella* 属菌の血清型のうち *S. Weltevreden*、*S. Newport*、*S. Bovismobificans* および *S. Agona* は、本地域の人の下痢患者からも分離されている血清型であり、分離された血清型は人とヤモリでは比較的共通していた。特に *S. Weltevreden* はベトナムを含む東南アジアでは人の *Salmonella* 感染患者から高頻度に検出される主要な血清型として知られており、家畜、食品、環境などから広く分離されるが、その自然界におけるレゼルポアは明らかになっていない。今回、*S. Weltevreden* はメコンデルタの 100km 以上離れた 3 地域において、ヤモリからいずれも高頻度に分離された。ヤモリはベトナムを含む東南アジアでは、人の生活環境周辺に高密度で生息しており、しばしば人の生活環境はヤモリの糞便に汚染されている。これらのことから、ヤモリは少なくともベトナム・メコンデルタにおいては、人の *Salmonella* 感染症、特に *S. Weltevreden* の主たる感染源になっている可能性が高いものと思われた。現在、ヤモリの糞便中の *Salmonella* 菌数や糞便中での *Salmonella* の生残性などについても検討中である。

ヤモリにおける *Salmonella* の感染経路を明らかにする目的で、妊娠した母ヤモリの体内の卵における *Salmonella* の汚染状況を検討したところ、母ヤモリが腸管内に *Salmonella* を保有していた場合でも、体内の卵からは *Salmonella* は全く検出されなかった。ヘビにおいても同様の現象が観察されており、母ヘビが *Salmonella* を保有していても体内の卵からは *Salmonella* は分離されないが、しかし産卵・孵化した子ヘビからは母ヘビが *Salmonella* を保菌していた場合は、*Salmonella* が分離されることから、ヘビでは母子間で in egg ではなく、on egg で感染が起こっているものと推察されている。ヤモリでもヘビと同様に母子間で on egg 感染が起こっているものと推察されるが、今後さらなる検討が必要である。

### ライム病

モスクワ近郊で浸潤しているボレリア・ガリニ株は神経ボレリア症が報告されている国・地域で見出される欧州型ボレリア・ガリニ株と同じ ST 型が高頻度で見出された。STs86、180、209 は既にフランス、イギリス、ドイツ、ラトビアなど広範な

地域でその存在が確認されている。この広域分布性は、リシナスマダニが鳥類に寄生すること、かつ欧州型ボレリアが鳥類によって保菌されることと密接に関連すると思われる。またこれら ST のうち、ST86 はモスクワ近郊で採取されたシュルツェマダニからも分離されている(Np189 株)。シュルツェマダニも鳥類に寄生することが知られていることから、本 ST がシュルツェマダニの棲息地域にも拡散する可能性を示唆している。一方で、モスクワ以東の国・地域における欧州型ボレリア・ガリニの浸潤域は不明であり、今後はこれら地域における調査研究が望まれる。

### E. 結論

2008 年に北海道北斗市で捕獲されたアカネズミ由来の TBEV 分離株は病原性の高い極東亜型に分類された。また、本株は 1990 年代に分離されたウイルス株と非常に近縁で、自然界で安定してウイルスが維持されている事が示された。今後は病原性を解析していくことにより、分離地域における住民への危険度を評価するとともに、TBE 患者発生の予防に役立てることが重要である。

TBE の重症化には IL-10 や TNF 応答に関連した感染個体の免疫応答が関わっていることが示唆された。今後はこれらの応答が具体的にどのような重症化に関連しているかについて詳細な機序を解析していく必要がある。また、TBEV の感染初期において感染量に応じた I 型 IFN 応答が感染防御に重要であることが示された。これらの研究成果は、将来的に TBE の重症化に対する有効な予防・治療法の確立に重要な知見となることが期待される。

BALB/c マウスにおける TBEV 静脈内接種後の病態を病理学的に明らかにした。さらに、これまでの JEV、WNV 感染モデルと病理学的に比較し相違点を明らかにした。

南米のハンタウイルス感染の診断のための抗血清を調整した。

モンゴルと国境を接しているロシア・中国(ともに狂犬病流行国)との間を野生動物等が移動して狂犬病ウイルスが往来している可能性が示唆された。狂犬病ウイルス西ヶ原株と Ni-CE 株の間で異なる末梢感染性には、P 及び N 遺伝子が関連することが示唆された。

わが国の野生鹿は高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。近年、人に対して病原性を示す *Bartonella* 菌種が反芻類である羊から見つかったため、これら鹿由来株の公衆衛生上の意義を検討する必要があると思われる。

本研究により、ヤモリは自然界における *Salmonella* 属菌のレゼルポアであり、また、ベトナム・メコンデルタではヤモリは人の *Salmonella* 感染症の感染源となっている可能性が示された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee, H.K., Lee, B.H., Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Kumar D.N., Kariwa, H., Nakauchi, M., Heo, S.J., and Park, J.H.: Production of specific antibodies against SARS-coronavirus nucleocapsid protein without cross reactivity with human coronaviruses 229E and OC43. *J. Vet. Sci.*, 11: 165-167. 2010
- 2) Yoshii, K., Mottate, K., Omori-Urabe, Y., Chiba, Y., Seto, T., Sanada, T., Maeda, J., Obara, M., Ando, S., Ito, N., Sugiyama, M., Sato, H., Fukushima, H., Kariwa, H. and Takashima, I.: Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* Epub ahead of print, 2010
- 3) Yoshii, K., Igarashi, M., Ito, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Res.* Epub ahead of print, 2010
- 4) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Akita, S., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T. and Takashima, I.: Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 696-704, 2010
- 5) Kariwa, H., Abu Daud, NH, Iwasa, MA, Tanikawa, Y., Sawabe, J., Hagiya, T., Seto, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Hashimoto, N., and Takashima, I.: Epidemiology of hantavirus infection: Hokkaido virus and its mode of infection among the gray red-backed vole, *Myodes rufocanus*. In *Animal Viruses* edited by A. Maeda, pp23-45, Transworld Research Network, Karela, India. 2010
- 6) Takashima, I., Kariwa, H., and Shirato, K.: West Nile fever. In *Animal Viruses* edited by A. Maeda., pp67-74, Transworld Research Network, Karela, India. 2010
- 7) Yoshii, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: Tick-borne encephalitis. In *Animal Viruses* edited by Maeda A. pp75-87, Transworld Research Network, Karela, India. 2010
- 8) 村田亮, 好井健太朗, 苺和宏明, 高島郁夫: ウエストナイルウイルスの鳥類における増殖性と極東ロシアでの抗体調査, *獣医畜産新報*, 63: 208-209, 2010
- 9) 好井健太朗, 苺和宏明, 高島郁夫: ダニ媒介性脳炎, *北海道獣医師会雑誌*, 54: 2-7, 2010
- 10) Tegshduuren, E., Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Yasuda, S. P., Kariwa, H., Arikawa, J., and Ishihara, C.: Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: e67-73, 2010
- 11) Schmidt-Chanasit, J., Essbauer, S. S., Petraityte, R., Yoshimatsu, K., Tackman, K., Contraths, F. J., Sasnauskas, K., Arikawa, J., Thomas, A., Pfeffer, M., Scharninghausen, J. J., Spletstoeser, W., Wenk, M., Heckel, G., and Ulrich, R. G.: Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J. Virol.* 84: 459-474, 2010
- 12) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S. P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., and Arikawa, J.: Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol* 48: 1635-1642, 2010
- 13) Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M.: Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 16: 363-365, 2010.
- 14) Gamage, D. C., Yasuda, P. S., Nishio, S., Kularatne, S. A., Weerakoon, K., Rajapakse, J., Nwafor-Okoli, C., Lee, R. B., Obayasi, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Tamashiro, H.: Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among

- leptospirosis suspected patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 72–75, 2010
- 15) Saijo, M., Morikawa, S., and Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean–Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5: 801–809, 2010
  - 16) Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., and Takada, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17: 1723–1728, 2010
  - 17) 西條政幸: アレナウイルス. 日本臨床 68 (増刊号): 431–434, 2010
  - 18) 西條政幸: 南米出血熱の診断法の概要. 日本医事新報 4495: 83–84, 2010
  - 19) Bazartseren, B., Inoue, S., Tuya, N., Dulam, P., Batchuluun, D., Sugiura, N., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Kotaki, A., and Yamada A. : Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005–2008. *Jpn.J.Infect.Dis.* 63: 358–363, 2010
  - 20) 2) 井上 智. 話題の感染症 狂犬病 (Rabies). モダンメディア別冊, 56: 25–31, 2010
  - 21) 3) 井上 智. リッサウイルス感染症. 感染症法改正 (2003) で追加された感染症. <新 4 類>. 25 感染症. 健康生活の基礎知識. 六訂版 家庭医学大全科. 総合監修: 高久史磨, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次矢. 法研, p2542–2543, 2010
  - 22) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., and Sugiyama, M.: Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res.* 155: 168–174, 2011
  - 23) Inoue, K., Kabeya, H., Fujita, H., Makino, T., Asano, M., Inoue, S., Inokuma, H., Nogami, S., and Maruyama, S. : Serological survey of five zoonoses, scrub typhus, Japanese spotted fever, tularemia, Lyme disease, and Q fever, in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. 2010. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11:15–19, 2010
  - 24) Berglund, E.C., Ellegaard, K., Granberg, F., Xie, Z., Maruyama, S., Kosoy, M.K., Birtles, and R.J., Anderson, S.G. : Rapid diversification by recombination in *Bartonella grahamii* from wild rodents in Asia contrasts with low levels of genomic divergence in Northern Europe and America. *Mol Ecol.* 19: 2241–2255, 2010
  - 25) Inoue, K., Kabeya, H., Shiratori, H., Ueda, K., Kosoy, M.Y., Chomel, B.B., Boulouis, H.J., and Maruyama, S. : *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from Apodemus mice in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 759 – 763, 2010
  - 26) Brinkerhoff R, Kabeya H, Inoue K, Bai Y, and Maruyama S. : Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and productive tissues of fleas collected from sympatric mammals. *ISME J.* 4: 955–958, 2010
  - 27) Kabeya H, Colborn JM, Bai Y, Lerdtusnee K, Richardson JH, Maruyama S. and Kosoy YM: Detection of *Bartonella tamiiae* DNA in ectoparasites from rodents in Thailand and their sequence similarity with bacterial cultures from Thai patients. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10: 429–434, 2010
  - 28) 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.* 14: 41–46, 2010
  - 29) Ly, T.L.K., Duong, T.T.T., Nguyen T.T., Tran, T.P., Tran, T.T.D., Nakadai, A., Iwata, T., Taniguchi, T., Ha, T.T., and Hayashidani, H. : Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 from acute diarrheic children in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Vet. Epidemiol.* 14: 55–61, 2010
  - 30) 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.* 72: 981–984, 2010
  - 31) Iwata, T., and Hayashidani H. : Yersiniosis in Breeding Monkeys in Japan. *JARQ* 45: 83–90, 2011
  - 32) Lee, K., Iwata, T., Nakadai, A., Kato, T., Hayama, S., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. : Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Campylobacter* spp. in feral raccoons

- (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. Zoonoses Public Health. (in press).
- 33) Ichinohe, T., Ainai, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzaki, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D.R., Carter, W.A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., and Hasegawa, H. : Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. J Med Virol. 82: 1754-1756, 2010
  - 34) Ohno, H., Ogata, Y., Suguro, H., Yokota, S., Watanabe, A., Kamei, K., Yamagoe, S., Ishida-Okawara, A., Kaneko, Y., Horino, A., Yamane, K., Tsuji, T., Nagata, N., Hasegawa, H., Arakawa, Y., Sata, and T., Miyazaki, Y.: An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Intern Med. 49: 491-495, 2010
  - 35) 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. 72: 391-396, 2010
2. 学会発表
- 1) Kariwa, H., Yoshikawa, K., Tanikawa, Y., Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Leonid I. Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I. : Isolation of Amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Far East Russia: VIII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. Athens (2010, 5)
  - 2) Sanada, T., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Seto, T., Miyashita, D., Saasa, N., Yoshikawa, K., Sánchez-Hernández, C., Loudres Romero-Almaraz, M., Ramos, C., Ivanov, L.I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Development of diagnostic methods applicable to various hantavirus infections: VIII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. Athens (2010, 5)
  - 3) Saasa, N., Kariwa, H., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshikawa, K., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I. : Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of hantavirus infection in Mexico: 第 149 回日本獣医学会、東京 (2010, 3)
  - 4) 好井健太郎、寸田祐嗣、苅和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎／オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析：第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京 (2010, 5)
  - 5) Kariwa, H., Yoshikawa, K., Tanikawa, Y., Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Ivanov, L. I., Slonova, R., Zakharycheva, T. A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima I. : Isolation of Amur and Hantaan viruses from wild rodents and the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Far East Russia: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. Sapporo (2010, 6)
  - 6) Sanada, T., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud, N. H. , Seto, T., Nagata, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima, I.: Persistent infection of Puumala virus in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural hosts: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010, 9)
  - 7) Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Takashima, I., Yoshii, K. and Kariwa, H.: Efficient Isolation Method for Puumala Hantavirus by Using Syrian Hamsters: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010, 9)
  - 8) Saasa, N., Kariwa, H., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. de L., Yoshida, H., Sanada, T., Seto, T., Yoshikawa, K., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of hantavirus infection in Mexico: The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010. Sapporo (2010, 9)
  - 9) 山崎翔子、好井健太郎、持舘景太、村田亮、



- 真田崇弘、苺和宏明、高島郁夫：2008年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分離と性状解析：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
- 10) 柳原なつみ、好井健太郎、後藤明子、伊川綾恵、石塚万里子、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのE蛋白の糖鎖付加がウイルス性状に与える影響：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 11) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 12) 好井健太郎、寸田祐嗣、苺和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎／オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 13) 吉田喜香、苺和宏明、真田崇弘、Ngonda Saasa、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 14) 戸谷理詩、好井健太郎、村田亮、秋田紗希、田中智久、苺和宏明、梅村孝司、高島郁夫：ウエストナイルウイルスのE蛋白糖鎖付加が鳥類における病態に与える影響の解析：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 15) 真田崇弘、苺和宏明、谷川洋一、Abu Daud Nur Hardy、瀬戸隆弘、永田典代、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析：第150回日本獣医学会、帯広（2010, 9）
  - 16) 好井健太郎、持館景太、大森優紀、千葉裕美子、真田崇弘、瀬戸隆弘、前田純子、小原真弓、安藤秀二、伊藤直人、杉山誠、佐藤浩、福島博、苺和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第10回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京（2010, 10）
  - 17) 真田崇弘、苺和宏明、永田典代、谷川洋一、Abu Daud Nur Hardy、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島（2010, 11）
  - 18) 吉田喜香、苺和宏明、真田崇弘、Saasa Ngonda、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、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抗原性解析：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島（2010, 11）
  - 19) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島（2010, 11）
  - 20) 好井健太郎、寸田祐嗣、苺和宏明、Michael R. Holbrook、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎／オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島（2010, 11）
  - 21) 戸谷理詩、好井健太郎、村田亮、秋田紗希、田中智久、苺和宏明、梅村孝司、高島郁夫：ウエストナイルウイルスのE蛋白糖鎖付加が鳥類における病原性に与える影響の解析：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島（2010, 11）
  - 22) Arikawa, J. : Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature: VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece (2010, 5)
  - 23) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S.P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., Arikawa, J. : Development of serotyping ELISAs for new world hantavirus infection: VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece (2010, 5)
  - 24) Yasuda, S.P., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Tegshduuren, E., Luan, V.D., Yoshimatsu, K., Huang, V.T.Q., Arikawa, J. : Comparison of the pathogenesis of Seoul virus infection in experimentally infected laboratory rats and naturally infected wild rats: VIII International conference on HFRS, HPS & HANTAVIRUSES. Divani Palace Acropolis Hotel, Athens, Greece (2010, 5)
  - 25) Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., Arikawa, J. : TRUNCATED HANTAVIRUS NUCLEOCAPSID PROTEINS

- FOR SEROTYPING ANTIGEN: XIV International conference on Negative Strand Viruses. Brugge-Belgium (2010, 6)
- 26) 安田俊平, 吉松組子, 遠藤理香, 清水健太, 駒貴明, 有川二郎: ハンタウイルス持続感染メカニズム解明のための実験感染ラットを用いた細胞性免疫測定系の確立: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 27) 駒貴明, 吉松組子, 永田典代, 清水健太, 安田俊平, 有川二郎: 免疫不全マウスを用いたハンタウイルス感染症病態モデルの検討: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 28) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸: リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 29) 伊波興一郎, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂: アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 30) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: 3分節RNAの塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 31) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes: 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo (2010, 6)
- 32) Saijo, M.: Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes: BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010, 7)
- 33) Sato G., Inoue S., Yamada A., Ito F.-H., Silva M. L.-C.-R., Itou T., Sakai T.: The rabies viral RNA genomes selectively shifted in quasispecies population after serial passages of street virus in mouse: 44<sup>th</sup> joint working conferece on viral diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 28-30 Sapporo, (June, 2010.).
- 34) 山岡理子, 清水健太, 正谷達膳, 中川敬介, 伊藤直人, 杉山誠: 狂犬病ウイルス Ni-CE 株の弱毒性状に関連するウイルス遺伝子の同定: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 35) 正谷達膳, 伊藤直人, 中川敬介, 山岡理子, 杉山誠: 狂犬病ウイルス N 蛋白質がマウス脳内におけるインターフェロン応答及びウイルス感染動態に及ぼす影響: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 36) 伊藤直人, 正谷達膳, 中川敬介, 山岡理子, 杉山誠: 狂犬病ウイルスのインターフェロン抵抗性及び病原性における P 蛋白質核外輸送シグナルの重要性: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 37) 上利尚大, 伊藤直人, 正谷達膳, 中川敬介, 山岡理子, 杉山誠: 狂犬病ウイルスの末梢感染性に関連する遺伝子の解析: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 38) 伊藤直人, 正谷達膳, 中川敬介, 山岡理子, 安部昌子, 杉山誠: 狂犬病ウイルス P 蛋白質核外輸送シグナルはインターフェロン抵抗性及び病原性に重要である: 第58回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 9)
- 39) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., Sugiyama, M.: A novel function of rabies virus nucleoprotein to evade activation of host antiviral response: U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sapporo (2010, 6)
- 40) 佐藤真伍, 壁谷英則, 山崎真梨, 武野侍那子, 鈴木和男, 相馬幸作, 増子孝義, 小林信一, 丸山総一: わが国の鹿における *Bartonella* 属菌の分布とそのベクターの検討: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 41) 佐藤真伍, 壁谷英則, 小林信一, 丸山総一: 奈良県の野生鹿が保有する *Bartonella* 属菌とそのベクターの検討: 第18回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー、佐渡 (2010, 6)
- 42) 藤長悠太, 井上快, 壁谷英則, 丸山総一: 愛玩用に輸入された小型哺乳類から分離された *Bartonella* 属菌の分類学的性状: 第150回日本獣医学会、帯広 (2010, 9)
- 43) 奥村水門, 中田勝士, 林谷秀樹: 沖縄・やんばる地域に生息するクマネズミにおける

- Salmonella* と *Yersinia* の保有状況: 第 10 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京 (2010, 10)
- 44) Hayashidani, H., Akiyama, T., Taniguchi, T., IWATA, T.: TaqMan-Based Real-Time PCR Method for Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*. 10th International Symposium *Yersinia*, Recife (2010, 10)
- 45) 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン テュアン デュク、田中香苗、岩田奈織子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス感染における重症化機序の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 46) 早坂大輔、上村将夫、田中香苗、森田公一: 日本脳炎ウイルスの準種(quasispecies)による病原性の検討: 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京 (2010, 4)
- 47) Hayasaka, D., Fujii, Y., Dihn Tuan Duc, Kinoshita, H., Kitaura, K., Nagata, N., Iwata, N., Tanaka, K., Sata, T., Suzuki, R., and Morita, K.: The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection: US-Japan 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases, Sapporo (2010, 6)
- 48) 早坂大輔、上村将夫、ディン テュアン デュク、田中香苗、永田典代、岩田奈緒子、佐多徹太郎、森田公一: 日本脳炎ウイルスの株および準種の違いによる重症化の検討: 第 47 回ウイルス学会九州支部総会、宮崎 (2010, 9)
- 49) 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン テュアン デュク、田中香苗、岩田奈緒子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス感染における重症化機序の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 50) 藤井克樹、早坂大輔、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎: ダニ媒介性脳炎ウイルス感染時におけるマウスの生死と脳内浸潤 T 細胞クローンの相違性: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島 (2010, 11)
- 51) 早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン テュアン デュク、田中香苗、岩田奈緒子、北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一: 日本脳炎ウイルス(JEV)感染における重症化機序の解析: 第 51 回日本熱帯医学会大会、仙台 (2010, 12)
- 52) 早坂大輔、ミヤ ミヤツ ヌグェ トン、青木康太郎、田中香苗、森田公一: 脳炎フラビウイルス感染でみられる dose-independent mortality は Type-I IFN 応答で説明できるか?: 第 17 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京 (2010, 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

## II. 研究分担者報告