

201/23024A

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 23 年度 総括研究報告書

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 24 (2012) 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 23 年度 総括研究報告書

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 24 (2012) 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 荻和宏明 | 3 |
| II. 分担研究報告 | 25 |
| ダニ媒介性脳炎の疫学 好井健太郎 | 27 |
| ハンタウイルス感染症に関する研究 有川二郎 | 35 |
| B ウイルスの薬剤感受性を解析するためのシステム開発に関する研究： 単純ヘルペスウイルス 2 型をモデルとしたシステム開発 西條政幸 | 40 |
| 狂犬病の疫学に関する研究 井上智 | 46 |
| 狂犬病の発症機序の解析と診断法開発 伊藤直人 | 60 |
| 輸入回帰熱症例の実験室診断について 川端寛樹 | 66 |
| バルトネラ感染症の疫学 丸山総一 | 72 |
| ベトナム・メコンデルタに生息する野生ヤモリならびにげっ歯類の <i>Salmonella</i> ならびに <i>Yersinia</i> 保菌に関する疫学的研究 林谷秀樹 | 76 |
| 野生鳥獣類媒介性感染症の病理学的検索 永田典代 | 82 |
| ダニ媒介性脳炎の発症機構の解析および迅速診断法の確立 早坂大輔 | 85 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 91 |
| IV. 研究成果の刊行物・印刷 | 93 |

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 |
| | 川端寛樹 | 国立感染症研究所 | 室長 |
| | 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 |
| | 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 |

研究要旨

2008年北斗市のアカネズミより分離したダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV) Oshima 08-AS 株と1995年分離の Oshima 5-10 株のマウスにおける病原性を比較したところ、Oshima 08-AS 株は発症率及び死亡率が Oshima 5-10 株よりも高く、病原性が高いことが示された。マウスモデルを用いたダニ媒介性脳炎(TBE)発症機序の解析を行った。IL-10 KO B6 マウスの TBE ウイルス(TBEV) Oshima 株感染では B6 マウスにくらべて重症化の亢進がみられたが、中枢神経組織内のウイルス量は IL-10 KO B6 マウスと B6 マウスに顕著な違いがみられなかったことから、重症化には感染個体の免疫応答(免疫病原性)が関わっている可能性が示唆された。また、迅速で簡便な TBE 診断法の確立を目指し、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による TBEV 遺伝子検出法の開発を行った。本 LAMP 法は 10^1 コピー以上の TBEV 遺伝子の検出が可能であった。ハンタウイルス肺症候群(HPS)関連ウイルスに対して、生きたウイルスを使用せずに中和試験の代替となる血清学的鑑別診断法の開発を行った。ハンタウイルス感染症の動物モデル開発を目的として、Hantaan ウイルス AA57 株実験的感染マウスの病理学的検討を行った。これらの動物の半数では胸水の貯留、肺血管周囲の中等度の水腫、好中球、単核系細胞浸潤を認めた。また、病変部の血管内皮細胞にウイルス抗原陽性細胞が存在した。臨床症状と病理所見から、本感染実験系はハンタウイルス肺症候群の動物モデルとして有用であると考えられた。単純ヘルペスウイルス 2 型(HSV-2)をモデルとして、同じヘルペスウイルスの仲間である B ウイルスのアシクロビル(ACV)等の α ヘルペスウイルスの発現するウイルス性チミジン

リン酸化酵素(vTK、UL23 遺伝子)関連薬剤の感受性を調べるためのシステムを開発した。コウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために必要な検査法の開発を行った。狂犬病ウイルス西ヶ原株と、本株の鶏胚馴化株である Ni-CE 株の各種キメラウイルスの末梢感染性を検討した結果、皮下投与における西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いに、P、M および L 遺伝子が関連することが明らかとなった。回帰熱の実験室診断法の開発を進めるとともに、臨床現場との協力により海外輸入例の診断に成功した。日本に棲息する野生イヌ亜目 1,205 頭の血液から *Bartonella* 属菌の分離を試みたところ、ニホンアナグマおよびテンのそれぞれ 1 頭が *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。ベトナム・メコンデルタの野生のヤモリを捕獲し、糞便中への *Salmonella* 排菌量ならびに環境中に排泄された糞便中での *Salmonella* の生残性を検討した。その結果、ヤモリの糞便には *Salmonella* が 10^2 – 10^5 /g の菌量で排菌されていること、ならびに *Salmonella* は糞便中で 6 週間生残することが明らかになった。また、ベトナム・メコンデルタに生息する代表的野生げっ歯類であるコメクマネズミの 276 匹中 11 匹(4.0%)から *Salmonella* が分離された。

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。これらの人獣共通感染症は病原体の分布域や宿主動物などが不明な場合が多く、発生予防が難しい。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。

ダニ媒介性脳炎はマダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症として知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。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腎症候性出血熱とハンタウイルス肺症候群の 2 つの病型が知られ、いずれもげっ歯類によって媒介される。これまで中国、ロシア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸などで多く報告され、年間の患者発生数が 5 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。また、狂犬病は一旦発症すれば 100%の致死率を示す致命的な脳炎で、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 B ウイルス感染症、回帰熱、バルトネラ感染症、およびサルモネラ感染症などの患者が報告されている。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。

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 B ウイルス感染症、回帰熱、バルトネラ感染症、およびサルモネラ感染症などの患者が報告されている。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) 使用ウイルス

2008 年に捕獲した北斗市のアカネズミの脾臓より分離された TBEV Oshima 08-AS 株、及び 1995 年に犬の血液より分離された Oshima 5-10 株、および Sojin 株を実験に使用した。

2) マウス感染実験

5週令の C57BL/6J マウスに各 TBEV を $10^2 \sim 10^6$ PFU 皮下接種し、体重変化や臨床症状を観察した。また TBEV を 10^3 PFU 接種したマウスから、ウイルス接種後 3、6、9、12 日に血清、脾臓及び脳を採取し、各臓器のウイルス力価を測定した。さらにウイルス接種後 10-11 日に臓器を採取し、HE 染色による病理組織像の観察及び免疫組織化学染色による組織中のウイルス抗原の検出を行った。

3) LAMP 法による TBEV 検出法の開発

LAMP プライマー作製は PrimerExplorerV3(栄研化学)を用いて設計した。TBEV Oshima 5-10 株全長 cDNA を組み込んだプラスミドをテンプレートとし、反応液 25ul 中に cDNA が $10^{-1} \sim 10^{-5}$ コピー数含まれるように希釈し、Loopamp[®] DNA 増幅試薬キット(栄研化学株式会社)を用いて 62.5°C、1 時間の反応を行った。反応の確認はリアルタイム濁度測定装置 LA320C(栄研化学株式会社)を用いて行い、最終反応後にアガロースゲル電気泳動にてラダーの確認および Loopamp[®] 蛍光・目視検出試薬(栄研化学株式会社)の添加により目視で確認した。

ハンタウイルス感染症:

1) ハンタウイルス (HPS) 関連ウイルスの鑑別診断法の開発

HPSの原因ウイルスである北米由来の各種ハンタウイルスについて、核蛋白(N)のN末端99アミノ酸を欠失させた組換えN抗原をバキュロウイルスベクターを用いて発現させた。対照として全長の核タンパクを大腸菌ベクター-pET43.1システム(Novagen)を用いてNusタンパクとの融合タンパクとして発現させ、ヒスチジンタグを利用して精製したものを、全長N抗原とした。また、抗原性の比較にはそれぞれの自然宿主である野生げっ歯類 (*Peromyscus maniculatus*, *Reithrodontomys sumichrasti*, *R. megaloti*) の血清を用いた。また、SNVによるHPS患者血清を用いた。

2) トッタパラヤンウイルス(TPMV)に対するモノ

クローナル抗体作成および抗原性の解析

TPMVの組換えN抗原をBALB/cマウスに免疫し、常法に従ってモノクローナル抗体を作製した。

3) ハンタウイルス感染症の動物モデルの開発

極東ロシアのセスジアカネズミ (*Apodemus agrarius*) から分離された Hantaan ウイルス AA57 株が2週齢のICRマウスに肺疾患を引き起こすことが判明した。そこで、2週齢のICRマウスに AA57 株を 30,000 FFU 量皮下接種したところ、接種 7-10 日目に体重が減少し、呼吸困難となった。これらの発症動物を接種 7-11 日目に解剖し、病理学的検索対象とした。常法どおりパラフィン包埋切片を作製し、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、一次抗体としてハンタウイルスのヌクレオキャプシド蛋白質に特異的な E5/G6 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。

Bウイルス感染症:

1) 使用ウイルス

単純ヘルペスウイルス 2 型(HSV-2) UW268 株、および、その ν TK 欠損 HSV-2 UWTK 株を、それぞれ ACV 感受性株、ACV 耐性株として用いた。また、 ν TK 蛋白に一アミノ酸変異で耐性を獲得した HSV-2 CL06 を用いた。さらに ν TK 欠損 HSV-1 TAR 株も用いた。尚、HSV-2 CL06 の ν TK 遺伝子には、塩基配列に変異が生じ、376 個のアミノ酸配からなる ν TK に R217H の一アミノ酸変異が認められる。また、UWTK 株の ν TK 遺伝子には、1 塩基欠損が認められ ν TK 活性が認められない。

2) 細胞

HSV-2 UW268 および HSV-2 UWTK の薬剤感受性や増殖した HSV-1 TAR の感染価は、Vero 細胞を用いたプラーク減少法で測定した。また、組換え ν TK の発現には、293T 細胞を用いた。

3) 新規薬剤感受性試験システム

各 HSV-2 株の vTK 遺伝子全長を適切なプライマーセットを用いて PCR 法により増幅し、pcDNA3.1(-)哺乳細胞発現ベクター(Invitrogen 社)のクローニングサイトに挿入した。この哺乳細胞組換え蛋白発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして一過性に発現させた。その細胞に vTK 欠損高度 ACV 耐性 HSV-1 TAR を MOI が約 1/細胞になるように感染させ、PBS で 1 回洗浄後各濃度の ACV 含有 MEM 培地で 12 時間培養した。その細胞および培養液に含まれる TAR 株の感染価を、Vero 細胞を用いたプラーク法で測定し、各薬剤の組換え HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における TAR 株増殖に対する抑制効果を評価した。

狂犬病:

1) コウモリ血清

ベトナム(Bac Giang 地区)で捕獲された 108 匹のコウモリ から採取した血清を利用して中和抗体の測定法を開発した。採取した血清は 56 °C、30 分で非動化を行い、中和抗体の検出試験には培養液で 10 倍希釈したものを使用した。

2) リッサウイルス株

リッサウイルスに対する中和抗体の検出法を、Rabies virus(CVS-11 株)、Lagos Bat virus (USCDC/NIID 株)、Mokola virus (USCDEC/NIID 株)、Duvnhage virus (USCDC/NIID 株)、EBLV1(USCDC/NIID 株)を用いて検討した(表1)。いずれの株も、米国 CDC・狂犬病ユニット長である、Dr.Rupprecht からの分与株である。なお、CVS-11 株は MNA 細胞に順化させた株であるが、他のリッサウイルス株はマウス脳で継代されたウイルス株を MNA 細胞で4-6代の継代を行った株を使用した。

3) 中和試験

中和反応を行ったウイルスと血清の混合液を、96 穴プレートに単層培養した MNA 細胞に接種して培養後、80%冷アセトンで細胞を固定

して FITC- 標識抗狂犬病ウイルス抗体 (Fujirebio)を用いて感染細胞を染色した。

4) 狂犬病ウイルスの病原性発現機序の解析
マウスへの皮下投与によって西ヶ原株及び Ni-CE 株の末梢感染性を検討するため、ddY マウス(4 週齢・雌、5 匹/群)の左下腹部の皮下に 10⁶ フォーカス形成単位(FFU)の各株を接種した。接種後 14 日まで各マウスの症状を観察し、「正常」、「後躯の麻痺」、「全身性麻痺・昏睡」、「死亡」に分類した。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皮下投与した。さらに、西ヶ原株の P 及び M 遺伝子を保有するキメラウイルス CE(NiPM)株を遺伝子操作系により確立し、その末梢感染性を同様に検討した。西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 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 Ni(CEN)株、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株、Ni(CEG)株及び Ni(CEL)株]についても同様に皮下投与した。接種 14 日後における各感染マウスの発症率を算出した。

回帰熱:

1) 患者材料

2010 年 9 月 1 日から 8 日までの 1 週間ウズベキスタンのリシタンでボランティア活動をして帰国し、回帰性の発熱が見られた 20 歳の女性患者から血液を採取した。血液塗末標本を作製するとともに、患者血液から DNeasy tissue kit (Qiagen)を用い DNA を抽出した。また、血液を材料としてボレリアの培養を行い、培養液から Promega Wizard Genomic DNA purification kit を用いて DNA の抽出と精製を行った。

2) PCR

患者血液もしくは患者血液の培養液からの DNA を検体とし、鞭毛構成遺伝子(flxB)を標的

として、以下の条件で 1st-PCR および 2nd-PCR (Nested-PCR) を行った。

1st-PCR: 95°C,10sec; 50°C,30sec; 72°C,30sec; (ここまでを 35 サイクル); さらに 72°C2min.

2nd-PCR: 95°C,10sec; 50°C,30sec; 72°C,30sec; (ここまでを 30 サイクル); さらに 72°C2min.

3) 増幅 DNA 断片の塩基配列決定

陽性バンドが見出された検体については塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに回帰熱ボレリア、ライム病ボレリアの代表的な種との比較を行い、感染種の推定を行った。

バルトネラ感染症:

1) 日本の野性イヌ亜目からの採血

2008年6月～2011年5月にかけて、日本の野生イヌ亜目 1,205 頭 (アライグマ 1,008 頭、タヌキ 171 頭、ニホンアナグマ 15 頭、テン 8 頭、ニホンイタチ 2 頭、チョウセンイタチ 1 頭) から血液を採取した。血液は EDTA 管に入れ凝固防止した後、検査まで -80°C で保存した。解凍後、溶血した血液の約 100µl を、5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar に塗抹し、35°C、5%CO₂ 下で 4 週間培養した。

2) PCR と塩基配列の決定

Bartonella 属菌を疑うコロニーから DNA を抽出し、*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域を標的とした PCR 法により *Bartonella* 属菌と同定した。さらに 16S rRNA、*ftsZ*、*groEL*、*ribC* 遺伝子領域を加えた 6 遺伝子領域を連結した塩基配列による系統解析を行った。また、試料の血液から抽出した DNA を用いて、*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域を標的とした PCR 法による *Bartonella* DNA 保有状況についても検討した。

サルモネラ感染症:

1. ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌量

1) 供試検体

供試検体として、ベトナム・メコンデルタで捕獲したヤモリ 100 匹から採取した腸内内容物を用いた。

2) 菌数の測定

供試検体を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で適当な濃度に希釈後、DHL 寒天平板培地 (日水) ならびに MLCB 寒天平板培地 (日水) に接種し、37°C で 24 時間培養後、培地上に発育してきた *Salmonella* と思われるコロニーの数をカウントするとともに、1 平板当たり 4 つのコロニーを釣菌し、生化学的検査ならびに抗血清を用いて *Salmonella* であることを確認した。

3) 糞便中での *Salmonella* の生残性の測定

ベトナム・メコンデルタで捕獲したヤモリ 100 匹から採取した腸内内容物を混合したものを検体とし、滅菌した三角フラスコ (300ml) に入れ、綿栓でふたをして、室温で保存した。供試検体は、保存開始時ならびにその後は 1 週間ごとに 10 週目まで取りだし、PBS で希釈後、適当な濃度のものを DHL 寒天平板培地ならびに MLCB 寒天培地に接種し、37°C で 24 時間培養後、発育してきた *Salmonella* が疑われるコロニーをカウントするとともに、4 つのコロニーを釣菌し、生化学的検査ならびに抗血清を用いてサルモネラと同定した。また、増菌培地としてハーナーテトラチオン酸塩培地 (日水) も併用し、菌の有無を調べた。なお、実験は 2 回行った。

4) コメクマネズミにおける *Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況

供試検体として、2011 年 8-12 月にベトナム・メコンデルタの Angiang および Dongtap 省と Cantho 市の 2 省 1 市で捕獲したコメクマネズミ (*Rattus argentiventer*) 276 匹から採取した腸内内容物を用い、選択培地にて *Salmonella* と *Yersinia* の分離を行い、コロニーを増菌して、生化学性状ならびに血清学的性状から菌の同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

患者からの検体は番号によって管理され、個人が特定できないような配慮がされている。また、動物実験は研究代表者および研究分担者の研究機関における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

題ない。本研究で使用された日本固有の犬科動物は、全て狩猟あるいは交通事故死した個体である。また、アライグマは特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律により捕獲し、獣医師が適切な麻酔下のもと、不動化し、血液等を採取した後、安楽殺を行った。

C. 研究結果

ダニ媒介性脳炎

1) 2008年に北斗市で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)の病原性解析

TBEV Oshima 08-AS 接種マウスでは、いずれのウイルス接種量においても全マウスが発症し、死亡率は 60~100%となった。発症個体において 20%以上の体重減少や、後肢麻痺や平衡感覚消失といった神経症状を示したものが多く見受けられた。一方 Oshima 5-10 では 10^2 pfu 接種では発症せず、 10^3 ~ 10^6 pfu 接種では 40~100%の発症率および 0~60%の死亡率となった。発症個体は神経症状を示した場合もあるが、重篤な症状を示さないまま回復する個体も多く見られた。ほとんどのウイルス接種量において Oshima 08-AS の方が Oshima 5-10 より発症率および死亡率が高くなった。病理解析において、髄膜と脳血管周囲への炎症性細胞浸潤は、Oshima 08-AS 接種群では全てのマウスにおいて認められたのに対し、Oshima 5-10 接種群では 1 匹で認められたのみであった。これら脳病変の認められた個体の脳からは神経細胞を中心にウイルス抗原が検出された。

2) IL-10 ノックアウト(KO)マウスにおける TBEV の病原性解析

TBEV Oshima 5-10 株感染後の致死率は B6 マウスで 38.1% (n=21)に対して IL-10 KO B6 マウスでは 63.6%(n=22)となった(P=0.0169)。また、致死個体の生存日数は B6 マウスで 14.1 ± 2.3 日に対して IL-10 KO B6 マウスでは 11.5 ± 1.2 日と 3 日程度短くなった。しかし、接種 9 日目の B6 マウスと IL-10 KO マウスの脳内に

おけるウイルス量に有意差はみられなかった。一方、Sofjin 株感染では B6 マウス、IL-10 KO マウスともに致死率は 100%、致死個体の生存日数は B6 マウスで 9.0 ± 0.3 日、IL-10 KO マウスで 9.4 ± 0.4 日となり両マウス間で差が見られなかった。

3) LAMP 法による TBEV 遺伝子検出系の確立

TBEV の cDNA を鋳型にして LAMP 法による TBEV 遺伝子の検出を試みた。 62.5°C 、1 時間の反応後に E 蛋白領域、NS1 蛋白領域ともに 10^1 コピー数以上の TBEV 遺伝子があれば LAMP 法で検出可能であることが判明した。

ハンタウイルス感染症

1) ハンタウイルス (HPS) 関連ウイルスの鑑別診断法の開発

HPSの原因ウイルスである北米由来の3種類のハンタウイルス、シンノンブレ、ブラッククリークカナル、エルモロキヤニオンウイルスの鑑別ができるかどうか、抗血清を用いて検討した。自然宿主である野生げっ歯類血清を用いたが、N蛋白のN末端の共通抗原領域を持つ全長抗原では強い交差反応のためにすべての抗体が強く結合し、罹患ウイルスを鑑別することは不可能であった。しかしながら、N末端を欠くバリアブル領域の抗原性を保ったN抗原を使用してELISAを行った場合、鑑別することが可能であった。

2) 食虫目由来ハンタウイルスの抗原性解析

確立した4種類のモノクローナル抗体のうち、ED5, 1A3の2種類がリニアエピトープを認識する抗体であった。これらの抗体はN抗原のN末端の80アミノ酸以内に結合し、競合阻害試験で部分的に競合することが分かった。これらの結果から、この二つの抗体はN末端を認識する抗体であることが分かった。EB5およびB5H9の二つの抗体はリニアエピトープを認識しなかったため、この方法では抗原部位を明らかにすることができなかった。これらの抗体はすべてげっ歯類由来のハンタウイルス抗原とは反応しなかった。また、ASAV、MJNVのN抗原と

も反応しなかった。

3) ハンタウイルス感染症の動物モデルの開発

Hantaan ウイルス AA57 株を 2 週齢の ICR に接種し、経過を観察したところ、約 50%の動物が体重減少や呼吸器症状などの症状を示した。発症した動物のさらに約半数が死亡した。発症動物の解剖を行ったところ、いずれの個体も 300-400 μ l の胸水を貯留しており、これが呼吸困難の原因であることが明らかとなった。病理組織検索の結果、中小の肺血管周囲に軽度の好中球、単核系細胞浸潤を伴う中等度の水腫が認められた。病変部の血管内皮細胞は変性し、好中球の接着が見られた。さらにこの病変に一致してウイルス抗原陽性細胞が存在した。また、肺胞壁には好中球等の細胞浸潤が見られ、軽度の炎症所見が得られた。肺胞内には変化は見られなかった。

Bウイルス感染症

HSV-2 vTK 発現 293T 細胞における ACV の HSV-1 TAR 株増殖抑制効果の評価

ACV 感受性株 HSV-2 UW268 の vTK を発現する 293T細胞では TAR 株は効率よく ACV によりその増殖が抑制されたのに対し、2 つの耐性株の組換え vTK が発現されている細胞では、TAR 株の増殖は ACV によって抑制されなかった。

狂犬病

1) リッサウイルスに対する中和抗体測定法の確立とベトナムのコウモリにおける中和抗体の検出

リッサウイルス属の5つの遺伝子型(GT1、GT2、GT3、GT4、GT5)について中和抗体検出系の確立を試みた。MNA 細胞に感染させたいずれのリッサウイルス株も市販の診断用抗体((Fujirebio 社製)によって検出可能であった。狂犬病ワクチンを接種して得られた高度免疫血清を被検血清として、各リッサウイルス株に対する MNA 細胞への感染阻止を蛍光顕微鏡

下で観察した。高度免疫血清(国際単位 0.5IU/ml の中和活性を持つ)を段階希釈して各リッサウイルス株に対する中和能を調べたところ、リッサウイルス株間で中和活性が異なることが示された。この違いは、系統樹における各リッサウイルス株の遺伝学的な距離を反映しているものと考えられた。ベトナム(Bac Giang 地区)で捕獲された 108 匹のコウモリ血清(10 倍希釈)について、各リッサウイルス株の感染阻止像を蛍光顕微鏡下で観察したところ、CVS-11 株と EBLV-1 株に対して 31.6% および Mokola virus 株に対して 3.7%の被検血清が 90%以上の感染阻止を示した。

2) 狂犬病ウイルスの病原性発現機序の解析

西ヶ原株を皮下投与した場合、マウスは平均 4.4 日の潜伏期を経て、全個体(5/5 匹)が発症・死亡した。一方、Ni-CE 株を皮下投与したマウス群では、いずれの個体も発症せず、全個体(5/5 匹)が生存した。以上より、皮下投与を用いた場合でも、西ヶ原株と Ni-CE 株の間に明瞭な末梢感染性の違いが確認された。両株の末梢感染性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各遺伝子を単独で組換えたキメラウイルス[CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株及び CE(NiL)株]をマウスに皮下投与し、症状の観察を行った。その結果、これらのキメラウイルス感染マウスに発症するものは確認できなかった。このことは、皮下投与による西ヶ原株と Ni-CE 株の末梢感染性の違いには複数の遺伝子が関連することを示している。反対に、西ヶ原株のゲノムに Ni-CE 株の各遺伝子を組換えたキメラウイルス[Ni(CE)株、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株、Ni(CEG)株及び Ni(CEL)株]についても同様の実験を行った。その結果、Ni(CE)株及び Ni(CEG)株を皮下投与したマウスが 100%発症した一方で、Ni(CEP)株、Ni(CEM)株及び Ni(CEL)株を皮下投与したマウスの発症率は、それぞれ 60%(3/5 匹)、60%(3/5 匹)及び 80%(4/5 匹)であった。これらの発症マウスは、いずれも神経症状を示した

後に死亡した。以上より、皮下投与による西ヶ原株とNi-CE株の末梢感染性の違いには、P、M及びL遺伝子が主要に関連することが明らかとなった。次に、これらの3遺伝子のうち、特に強い関連が示唆されたP及びM遺伝子に着目し、Ni-CE株のゲノムに西ヶ原株のP及びM遺伝子を保有するキメラウイルス CE(NiPM)株を作出した。本株を皮下投与した場合のマウスの発症率を調べた結果、40%(2/5匹)のマウスの発症が確認された。以上のことから、皮下投与による西ヶ原株の末梢感染性にP及びM遺伝子が重要であることが確認された。

回帰熱

1)回帰熱疑似患者の臨床経過

【症例概略】患者は20歳女性で、主訴は周期性の発熱と下肢痛であった。2010年9月1日から8日までの1週間ウズベキスタンのリンタンでボランティア活動をしていた。ウズベキスタン滞在中、寝ている間に右大腿を虫に噛まれたという。帰国後の9月12日に39°Cの発熱と下肢痛を認め近医を受診し、感冒と診断され抗菌薬フロモックス(CFPN-PI)とロキソプロフェンを処方された(1度目の発熱)。発熱は3日程度で解熱したが、その後9月24日と10月4日にも同様の発熱と下肢痛が出現した(2度目、3度目の発熱)。この際、病院は受診せず残っていたCFPN-PIを内服し1日で解熱したという。その後、周期性の発熱の原因精査のため10月8日に市立奈良病院を受診した。初診時には解熱しており、自覚症状はなかった。身体所見では圧痛を伴う右頸部リンパ節腫大と右大腿内側に痂皮を認めた以外に異常所見はなかった。下肢に関節の腫脹や筋把握痛は認められなかった。血液検査でも特に異常なく、血液培養を採取し経過観察とした。10月15日午後から再度発熱があり市立奈良病院を再受診した(4度目の発熱)。この際、発熱・全身倦怠感に加え軽度の頭痛と「両足がちぎれそう」という強い下肢痛の訴えがあった。身体所見は前回受診時と特に変わりなく、発熱時の皮疹

や関節腫脹もみられなかった。周期性の発熱と海外渡航歴からマラリアを疑い血液塗末標本のギムザ染色を行ったがマラリア原虫は認めず、マラリア迅速検査キットを用いた迅速検査も陰性であった。またウズベキスタンで乳製品を食べていたことからブルセラ症を疑いブルセラ凝集反応検査も行ったが陰性であった。周期性の発熱の原因は依然不明であったが全身状態は良く、患者本人・家族も入院はせず外来でのフォローアップを希望されたため外来で経過観察を行うこととした。10月26日午後から発熱があり市立奈良病院を受診した(5度目の発熱)。発熱・全身倦怠感・下肢痛の訴えは変わらず、バイタルサインは血圧112/70mmHg、脈拍数90bpm、呼吸数14/min、体温39.8°Cと比較的徐脈であった。CRP19.45mg/dl(当院初診時の無熱時は2mg/dl程度)WBC5,450(Neut55.7%、Lym35.8%、Eos4.4%、Mono3.7%、異型リンパ球なし)AST26IU/l、ALT69IU/l、その他BUN/Cre、電解質、CKなど正常。身体所見では前回診られなかった所見として腹部触診上脾臓を触れ、腹部エコー検査上も脾腫(64mm×39mm)を認めた。4度目の発熱時同様、血液塗末標本のギムザ染色を施行しマラリア原虫は認められなかったがスピロヘータ様の菌体を認めたため回帰熱を疑い、入院の上ミノマイシン(MINO)100mg×2/日の点滴投与を開始した。確定診断のため、PCR法によるボレリアDNAの検出を行い、発熱期採血(10月15日、10月27日)の好気および嫌気血液培養液、および無熱期採血(10月8日)の好気血液培養液よりボレリアDNAが検出された。検出されたDNAの塩基配列決定により、感染ボレリア種は*Borrelia persica*と同定された。治療開始後にJarisch-Herxheimer反応は見られなかった。治療開始後、周期性の発熱は出現せずMINOは10日間で投与終了とした。

2)回帰熱疑似患者からのボレリア遺伝子の検出と感染ボレリア種の同定

患者血液の培養液および血清からボレリア

DNA が検出された。発熱期患者血液の培養液からは全ての検体よりボレリア DNA が検出された。また無熱期血液の培養液の一部からもボレリア DNA が検出された。検出されたすべての検体で塩基配列は 100%一致し、系統解析の結果、感染種は *B. persica* と同定された。

バルトネラ感染症

ニホンアナグマの 1 頭 (1/15) およびテンの 1 頭 (1/8) からそれぞれ *Bartonella* 属菌が初めて分離された。一方、アライグマ、タヌキ、ニホンイタチ、チョウセンイタチからは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域の相同性解析では、ニホンアナグマ分離株は *B. clarridgeiae* と最も高い相同性を示し、それぞれ 96.5%、95.6%であった。テン分離株は *B. washoensis* と最も高い相同性を示し、両遺伝子領域の相同性はそれぞれ 97.1%、93.8%であった。また、6 遺伝子領域の連結配列から作成した系統樹では、両分離株は既存種とは異なるクラスターを形成し、各クラスターは高いブートストラップ値 (100%) で支持された。各動物の血液から抽出した DNA を用いた PCR 法では、アライグマの 1 頭 (0.1%; 1/1、008)、タヌキの 14 頭 (8.2%; 14/171)、ニホンアナグマの 1 頭 (6.7%; 1/15)、テンの 1 頭 (12.5%; 1/8)、から *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。系統解析の結果、検出された DNA は、既存の病原性 *Bartonella* と近縁種であった。

サルモネラ感染症

1) ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌量の測定

供試したヤモリの糞便 100 検体中 11 検体から *Salmonella* が検出された。これら *Salmonella* 陽性のヤモリの糞便 11 検体中の *Salmonella* の菌量は、最も少ないもので 7.1×10^2 /g、最も多いもので 2.8×10^5 /g であった。

2) ヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性
ヤモリの糞便中でのサルモネラの生残性を実

験的に調べた結果、室温 (25-30°C) に保存した場合、*Salmonella* はヤモリの糞便から保存 6 週間後まで検出されたが、その後は検出されなくなった。

3) コメクマネズミからの *Salmonella* と *Yersinia* の分離

ベトナム・メコンデルタ 3 省で捕獲したコメクマネズミにおける *Salmonella* の保菌状況を検討した。*Salmonella* はコメクマネズミ 276 検体中 11 検体 (4.0%) から分離された。*Salmonella* は 11 検体から 12 株が分離され、うち 9 株は生物群 I に、3 株は生物群 IV に型別された。また、生物群 I に型別された 9 株のうち、8 株が血清型別され、*Bovismorbificans* に 3 株が、*Weltevreden*、*Infantis*、*Thompson*、*Oxford* および *Paratyphi B* にそれぞれ各 1 株が型別された。*Yersinia* はコメクマネズミ 276 匹中 3 匹 (1.1%) から分離された。しかし、分離された *Yersinia* はいずれも非病原性 *Yersinia* であった。

D. 考察

ダニ媒介性脳炎

マウスモデルにおいて Oshima 08-AS 株は Oshima 5-10 株より高い病原性を示すことが明らかになった。マウス体内でのウイルス動態を比較したところ、末梢でのウイルス増殖性に両株で差は認められなかった。しかしながら、脳においては Oshima 08-AS の方が比較的高いウイルス力価を示した。また病理組織像では、Oshima 08-AS 感染マウスの脳でウイルス抗原が検出される時期では、Oshima 5-10 感染マウスではまだウイルス抗原が検出されていない個体が多く認められた。従って脳内でのウイルス増殖量の差によって、両株の病原性に差が生じていると考えられる。Oshima 08-AS 株と Oshima 5-10 株との間のアミノ酸の相異はわずか 12 個であることから、両者の病原性をはじめとする生物性状の差は、自然界で生じた数個のアミノ酸の変異によってもたらされていると考えられる。よって今後はこの要因を明

らかにしていくとともに、本地域で流行している TBE ウイルスについて、その危険度を予測していくためにもアミノ酸の変化を含めたモニタリングを継続して行っていく必要がある。

Oshima5-10 株は IL-10 KO マウスへの感染で重症化の亢進がみられたことから、IL-10 応答は重症化を抑える働きがあることが示唆された。しかしながら、B6 マウスと 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、IL-10 KO マウスにおける重症化亢進はウイルスの神経感染の程度のみが要因ではないことが考えられた。IL-10 は免疫応答を抑制するサイトカインであることから、免疫応答すなわち免疫病原性が重症化に関与していることが示唆された。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 応答の重症化への関与は小さいものと考えられた。

本研究で開発した LAMP 法では 10^1 コピー数以上の TBEV 遺伝子を検出できることが確認された。今後、人血清中やマダニ中の TBEV 遺伝子 RNA の検出を試み LAMP 法による迅速簡便診断法の確立を目指す。

ハンタウイルス感染症

北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症の ELISA による鑑別診断法を開発した。HPS 患者の輸入例に対し、迅速に罹患ウイルスを特定し、罹患地域を推定することが可能となった。また、患者のみならず、病原巣動物のラットやその他のげっ歯類においても、複数のウイルスの混在する地域での疫学的研究への応用が期待される。

食虫類由来ハンタウイルスの抗原性をモノクローナル抗体を用いて解析した。その結果、核蛋白に結合する6種類の抗体を用いて解析したところ、その抗原性はげっ歯類由来ハンタウイルスと大きく異なることが分かった。トツタパラヤンウイルスに対するモノクローナル抗体のほとんどが核蛋白のN末端に結合したことから、

この領域が免疫原性が高いことが示された。また、日本産食虫目由来ウイルスであるアサマウイルスの核蛋白を発現させて交差反応性を確認したが、交差反応は見られず、食虫類由来ハンタウイルスの中でも抗原性が多様であることが示された。

Hantaan ウイルス AA57 株感染マウスの病理変化は、全体に炎症性細胞浸潤は軽微で、肺水腫と胸水貯留を引き起こす血管透過性亢進が病変の主体であると考えられた。中小の血管内皮の所見から、血管内皮細胞へのウイルス感染と増殖の結果、細胞が傷害されることにより肺水腫と胸水貯留が起こったと考えられた。AA57 株感染後の ICR マウスにおける病変形成は気道系ではなく血管系の肺傷害であることが明らかとなった。発症機序と病態の進行について、今後さらに検討する必要がある。

Bウイルス感染症

マカク属霊長類が保有する B ウイルス(BV)は、霊長類の輸入によって我が国においても患者が発生する可能性がある。また、日本ザルも BV を保有していると報告されている。BV は ACV や GCV により増殖が抑えられることから、BV 感染症には ACV や GCV が投与される。しかし、BV は BSL-4 病原体(感染研では少量培養に限り BSL-3 病原体)に指定されている。そのため BSL-4 研究施設が稼働していない我が国では、BV を用いた薬剤感受性試験を実施することが困難な状況にある。そこで、本研究では、感染性 BV の ACV 等の vTK 関連薬剤に対する感受性を、感染性 BV を用いることなく解析するためのモデルシステムを開発した。被検 BV の vTK 遺伝子を増幅して、その組換え vTK を 293T 細胞に発現させ、その細胞における ACV の TAR 株の増殖抑制効果を評価することで、感受性を評価できる可能性がある。現在、BV の vTK を用いて、さらに詳細に検討している。

狂犬病

自然界におけるリッサウイルスの分布については不明な点が多く、感染したコウモリにおける潜伏期間も明らかでない。狂犬病を除くリッサウイルスは、主にヨーロッパ、オーストラリア、アフリカに分布しており、これまでに報告されている事例から、そのほとんどがコウモリを自然宿主にしていると考えられている。現在、リッサウイルスは遺伝学的に大きく2系統に分類され、狂犬病を含めて7種類の遺伝子型(genotype)が報告されている。近年、中央アジア(Kyrgyzstan, Tajikistan, Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリからもリッサウイルスが分類されているがまだ未分類である。東南アジアではリッサウイルスの分離報告はまだないが、リッサウイルスに対する中和抗体がフィリピン、タイ、カンボジアに生息するコウモリの血清にみられるといった報告がある。本研究では、抗-リッサウイルス中和抗体検出法を確立して、ベトナムに生息するコウモリについて中和抗体の保有率を調べた。本中和抗体検出系の課題として、使用した狂犬病ウイルス(CVS-11株)以外のリッサウイルス株は、MNA細胞でのウイルス増殖性が悪く、安定した検査系の確立にはMNA細胞への順化が必要であると考えられた。また、狂犬病ウイルスの中和抗体が、他のリッサウイルスに対してもある程度交差することを明らかにした。ユーロアジアに生息するコウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を行うためには、中央アジア(Kyrgyzstan, Tajikistan, Krasnodar region)、シベリア(Irkutsk)のコウモリから分離された、新種のリッサウイルスに対する中和抗体の検出系について検討が必要であり、今回確立した検査系の検証とともに、場合によってはウイルス株の入手や人工的に当該ウイルスの抗原性を持たせたVSV シュードウイルス等を利用した中和抗体の検出系を確立する必要があると考えられた。

今回、シベリア地域の狂犬病流行状況(患者と野生動物)に詳しい Elana Poleshchuk 博士

(Omsk, Institute for Natural Foci Infection)から、「ロシア連邦における狂犬病の情報分析誌(2009年度版)」を入手して、極東地区における狂犬病の発生状況等について情報共有および意見交換を行った。

ロシア連邦では、タヌキ、オオカミ、ホッキョクギツネ、ジャッカル、アカギツネ、コサックギツネの野生動物で狂犬病の発生が報告されているが、野生動物等を介したシベリア地区とモンゴル・中国間での流行移動が課題となっている。特に、北海道に近いハバロフスク地区について狂犬病の感染リスクが高くなっているため、わが国への野生鳥獣等を介した狂犬病の侵入リスクについて調査・研究を進めていく必要性があると考えられた。

狂犬病ウイルス西ヶ原株は、筋肉内投与と同様に皮下投与によっても末梢感染性があることが確認された。西ヶ原株を筋肉内投与されたマウスの潜伏期が平均で3.0日であったのに対し、皮下投与では4.4日と1日以上潜伏期の延長が認められた。筋肉には多数の神経繊維が密に分布しているため、筋肉内投与では皮下投与よりもウイルスが神経に侵入しやすいと考えられる。このことが皮下投与時の潜伏期の延長に関与していると考えられた。筋肉内投与によってCE(NiP)株およびCE(NiN)株を接種した場合、各々80%及び20%のマウスに発症が確認される(昨年度報告書)。一方、今回、CE(NiN)株、CE(NiP)株、CE(NiM)株、CE(NiG)株あるいはCE(NiL)株を皮下投与されたマウスに、いずれも発症個体は認められなかった。これらの成績も、上述のように、皮下投与では、筋肉内投与に比べて狂犬病ウイルスの末梢感染が成立しにくいことを示している。また、皮下投与による末梢感染の機序が筋肉内投与によるものと異なることも示唆された。西ヶ原株のゲノムにNi-CE株の各遺伝子を組換えた各種キメラウイルスの末梢感染性の解析により、皮下投与による西ヶ原株とNi-CE株の末梢感染性の違いにP、M及びL遺伝子が関連していることが明らかとなった。

回帰熱

回帰熱はスピロヘータの一種、ボレリア属細菌による感染症で、マダニ媒介性の *B. turicatae*、*B. duttonii* などや、シラミ媒介性の *B. recurrentis* が病原体として知られている。第二次世界大戦中にはアフリカと欧州を併せて 50,000 名の死者を出したと推計されている。世界的にみて、アフリカ諸国での感染例が最も多く、北米や中近東などでも感染例が報告されている。また欧州等からアフリカへの海外渡航者でも感染例がしばしば報告されている。*B. persica* は北アフリカ、中近東、中央アジア、インドに分布し、近年流行が続いているイランでは *Ornithodoros tholozani* が媒介マダニと考えられている。回帰熱は、高いレベルでの菌血症による発熱期、および感染は持続しているものの菌血症を起こしていない、もしくは低レベルでの菌血症状態（無熱期）を交互に数回繰り返す、いわゆる周期性の熱発を主訴とする。本研究では、無熱期での血液培養ボトルを用いた DNA 検出により病原体が検出されたが、検出感度は発熱期のほうが高いことが示唆された。今回、血液塗末標本からもスピロヘータ様構造物が検出されたが、他スピロヘータとの鑑別が難しいこと等から DNA 検出法による検査がより有効であると考えられた。

バルトネラ感染症

本研究により、わが国に生息する野生イヌ亜目のうち、ニホンアナグマおよびテンが *Bartonella* 属菌を保菌していることが初めて明らかとなった。6 遺伝子領域を用いた系統解析により、ニホンアナグマおよびテン分離株は、各動物に固有の新種である可能性が示唆された。アライグマとタヌキからは *Bartonella* 属菌は分離されなかったものの、病原種に近縁な DNA が検出された。米国のアライグマは、人に対して病原性を示す *B. rochalimae* を高率に保有していることから、今後、わが国のアライグマ、タヌキならびに他の野生イヌ亜目について

も継続して *Bartonella* 属菌の分布を調査していく必要があると考えられた。

サルモネラ感染症およびエルシニア感染症

昨年度の調査で、ベトナム・メコンデルタにおいてヤモリは *Salmonella* の重要な保菌動物であり、人のサルモネラ症の感染源となっている可能性が高いことが明らかになった。そこで、ヤモリの糞便中への *Salmonella* の排菌数ならびにヤモリの糞便中での *Salmonella* の生残性について検討した。その結果、ヤモリの糞便中に *Salmonella* は 10^2 – 10^5 /g と比較的高い菌量が排菌されていること、ならびに環境中に排泄されたヤモリ糞便中では *Salmonella* は 6 週間に渡り生残することが明らかになった。本地域ではヤモリは高密度に人の生活環境に生息し、夜間のみならず昼間も住居の壁や天井を徘徊し、糞便をとことろ構わず排泄している。本研究で、*Salmonella* はヤモリの糞便中に高い菌量排菌され、しかも高い気温のもとでも糞便中に長期間生残することから、ヤモリは本地域で *Salmonella* の保菌動物ならびに感染源として、公衆衛生的・疫学的に重要な役割を果たしている可能性が高いことが判明した。

ベトナム・メコンデルタの田園地帯には、コメクマネズミが広く分布している。今回、本地域のコメクマネズミを捕獲し、*Salmonella* と *Yersinia* の保菌状況を検討した。その結果、*Salmonella* は 4.0% と比較的高率に分離されたが、病原性 *Yersinia* は全く分離されなかった。コメクマネズミはメコンデルタの田園地帯に広く分布し、自然界において *Salmonella* の生態に重要な役割を果たしているものと考えられる。またその一部は食用にもなっていることから、公衆衛生的な見地からも、今後も継続的な調査が望まれる。

E. 結論

前年度及び今年度の研究結果より、北海道北斗市の流行巣に存続している TBEV は、数個のアミノ酸の違いによりウイルスの生物性状が

異なり、病原性が相違する場合があることが示唆された。また、TBEの重症化には感染個体の免疫応答が関わっていること、IL-10応答は重症化を抑えていることが示唆された。今回確立したLAMP法によるTBEV遺伝子検出系は、TBE患者の迅速簡便診断法の確立、さらにTBEV陽性地区特定の有効な検出法の確立へと応用が期待される。

北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症の鑑別診断法を開発した。食虫類由来ハンタウイルスの抗原性はげっ歯類由来ハンタウイルスと全く異なるばかりでなく、食虫類由来ウイルスの中でも多様性が大きいと考えられた。HantaanウイルスAA57接種マウスの臨床症状と病理所見から、本実験感染系は、ハンタウイルス肺炎候群の動物モデルとしての有用性が期待される。

コウモリ類を宿主とするリッサウイルスの血清疫学を明らかにするために必要な検査法として、ウイルスの感染阻止を指標にした中和抗体の検出系を確立した。皮下投与による狂犬病ウイルス西ヶ原株とNi-CE株の末梢感染性の違いに、P、M及びL遺伝子が関連することを明らかにした。

我が国への回帰熱輸入症例を報告した。周期性の発熱を示した患者の内、海外渡航歴があった場合にはマラリアの鑑別が第一に行われるが、マラリアの実験室診断が陰性の場合には回帰熱を鑑別対象として調べる重要性であるとと考えられた。

わが国の野生犬亜目の動物、特にニホンアナグマおよびテンは固有の*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*菌種が米国の野生犬亜目から高率に見つかっているため、これら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。

ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリは、高い菌量の*Salmonella*を糞便に排泄し、また、排泄された*Salmonella*は糞便中でも長期間に渡り生存できることから、本地域の*Salmonella*

の保菌動物ならびに人への感染源として、公衆衛生的・疫学的に重要な役割を果たしているものと推察された。また、コメクマネズミは比較的高率に*Salmonella*を保菌していたが、病原性*Yersinia*は保菌していなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kariwa, H., Yoshida, H., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, M.D., Almazan-Catalan, J.A., Ramos, C., Miyashita, D., Seto, T., Takano, A., Totani, M., Murata, R., Saasa, N., Ishizuka, M., Sanada, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res.* epub ahead of print, 2011
- 2) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Ozaki, Y., Kon, Y., Yoshii, K., Takashima, I. and Kariwa, H.: Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. epub ahead of print, 2011
- 3) Omori-Urabe, Y., Yoshii, K., Ikawa-Yoshida, A., Kariwa, H. and Takashima, I.: Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the Far-Eastern subtype of Tick-borne encephalitis virus induced protective immunity in mice. *Microbiol. Immunol.* epub ahead of print, 2011
- 4) Totani, M., Yoshii, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Glycosylation of the Envelope Protein of West Nile Virus Affects Its Replication in Chicks. *Avian Diseases.* 55: 561-568, 2011

- 5) Takano, A., Yoshii, K., Omori-Urabe, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H. and Takashima, I.: Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch. Virol.* 156: 1931-1941, 2011
- 6) Sanada, T., Kariwa, H., Nagata, N., Tanikawa, Y., Seto, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K. and Takashima, I.: Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res.* 160: 108-119, 2011
- 7) Murata, R., Hashiguchi, K., Yoshii, K., Kariwa, H., Nakajima, K., Ivanov, L.I., Leonova, G.N. and Takashima, I.: Seroprevalence of West Nile Virus in Wild Birds in Far Eastern Russia Using a Focus Reduction Neutralization Test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 461-465, 2011
- 8) Ikawa-Yoshida, A., Yoshii, K., Kuwahara, K., Obara, M., Kariwa, H. and Takashima, I.: Development of ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiol. Immunol.* 55: 100-107, 2011
- 9) Seto, T., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Tanikawa, Y., Kolominov, S.I., Belov, S.N., Nakamura, I., Hashimoto, N., Kon, Y., Balakiev, A.E., Dzagurnova, T.K., Medvedkina, O.A., Nakauchi, M., Ishizuka, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Ivanov, L.V., Arikawa, J., Takashima, I. and Kariwa, H.: An Efficient in vivo Method for THE Isolation OF PUUMALA VIRUS IN SYRIAN Hamsters and the Characterization of the isolates from russia. *J. Virol. Methods.* 173: 17-23, 2011
- 10) 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.* 73: 409-412, 2011
- 11) 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.* 155: 61-68, 2011
- 12) 好井健太郎、持館景太、苺和弘明、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、*獣医畜産新報*、64: 801-803, 2011
- 13) 苺和弘明、好井健太郎、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎、*公衆衛生*、75: 36-38, 2011
- 14) Yasuda SP., Yoshimatsu K., Koma T., Shimizu K., Endo R., Isozumi R., Arikawa J. Application of truncated nucleocapsid protein (N) for serotyping ELISA of Murinae-associated hantavirus infection in rats. *J Vet Med Sci* 2012;74:215-19.
- 15) Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J.S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H., Ishii, Y., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S.: Reston ebolavirus antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 17:1559-1560, 2011
- 16) Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G., Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., Nguyen T.H. Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006-2009", *Journal of Preventive Medicine, Vietnam.* 2010. Volume XX, 6:164 - 170.
- 17) Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S. Inhibition of rabies virus

- propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. *Antiviral Res.* 2011. 91:64-71.
- 18) Nguyen A.K.T., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). *Jpn.J.Infect.Dis.* 2011. 64:391-396.
- 19) Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A. Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice. *Jpn.J.Infect.Dis.* 2011. 64:463-472.
- 20) 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:高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢。法研、p2542-2543、2010
- 21) 井上 智、二宮 清。5 狂犬病、第3章 中枢神経症候群。第I部 臨床編。2 ウイルス感染症の検査・診断 スタンダード。編集:田代真人、牛島廣治。羊土社、p80-86、2011
- 22) 井上 智。狂犬病の現状とその課題。特集ズーノーシス - 各論編 -。獣医畜産新報(JVM)、64:551-555、2011
- 23) 井上 智。18. ラブドウイルスと感染症。第3章 II. ウイルス学各論。獣医微生物学(第3版)。監修:見上 彪。編集:関崎 勉、高井伸二、堀本泰介、望月雅美。文永堂出版、p231-238、2011
- 24) 井上 智。狂犬病(シリーズ8)。日本の警戒すべき感染症(感染症から身を守るために)。月刊「クリネンス」、11月号、p8-9、2011
- 25) 井上 智。狂犬病の対策を考える(学術)。宮城県獣医師会会報(Miyagi Veterinarian)。第64巻、第4号、10月号、p162-166、2011
- 26) 井上 智。事例3:狂犬病の発生様式、5:感染症の疫学事例、16章:感染症の疫学。獣医疫学・第2版(Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣医疫学会編。近代出版。p131、2011
- 27) Ito N, Mita T, Shimizu K, Ito Y, Masatani T, Nakagawa K, Yamaoka S, Abe M, Okadera K, Minamoto N, Sugiyama M. Amino Acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein affects viral pathogenicity. *J Vet Med Sci.* 2011. 73:1363-1366.
- 28) Kabeya H, Inoue K, Izumi Y, Morita T, Imai S, Maruyama S. *Bartonella* species in wild rodents and the infested fleas in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2011. 73(2): 1561-1567.
- 29) Pangjai D, Maruyama S, Boonmar S, Petkanchanapong W, Wootta W, Sawanpanyalert P. Seroprevalence of antibodies against *Bartonella hensalae* infection in cats and dogs along the northern borders of Thailand. *Thai J Vet Med.* 2011. 41(1): 95-98.
- 30) 壁谷英則, 丸山総一:鹿が保有する腸管出血性大腸菌。日本鹿研究 2011. 第2号:15-19.
- 31) Lee K, Iwata T, Nakadai A, Kato T, Hayama S, Taniguchi T, Hayashidani H.
- 32) Prevalence of Salmonella, Yersinia and Campylobacter spp. in feral raccoons
- 33) (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. *Zoonoses Public Health.* 2011 Sep;58(6):424-31.
- 35) Hayasaka D. The Development of encephalitis following Tick-borne encephalitis virus infection in a mouse

model. *Flavivirus Encephalitis*. 2011, Chapter 8, 157-166.

- 36) Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. High Clonality of Virus-Specific T Lymphocytes Defined by TCR Usage in the Brains of mice infected with west nile virus. *J Immunol*. 2011, 187, 3919-3930.
- 37) Fujii Y, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. T-cell clones expressing different T-cell receptors accumulate in the brains of dying and surviving mice after peripheral infection with far eastern strain of tick-borne encephalitis virus. *Viral Immunol*. 2011, 24, 291-302.

2. 学会発表

- 1) 瀬戸隆弘、吉川佳佑、真田崇弘、Ngonda Saasa、尾崎由佳、市居修、好井健太郎、昆 泰寛、苺和宏明:腎症候性出血熱の致死感染モデルの開発とその病態解析: 第 151 回の本獣医学会、東京(2011, 3)
- 2) 好井健太郎、寸田祐嗣、横澤香菜、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を用いた病態発現機序の解析: 第 15 回日本神経ウイルス研究会、金沢(2011, 5)
- 3) 好井健太郎、森藤可南子、永田典代、浅野淳、佐々木宣哉、苺和宏明、安居院高志、高島郁夫:野生マウス由来 *Oas* 遺伝子座導入コンジェニックマウスの作製とフラビウイルス抵抗性の解析: 第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢(2011, 5)
- 4) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R. and Takashima, I.: CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC VIRUS BETWEEN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AND OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 5) Yamazaki, S., Yoshii, K., Mottate, K., Murata, R., Sanada, T., Kariwa, H. and Takashima, I.: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN HOKKAIDO, JAPAN IN 2008: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 6) Yanagihara, N., Yoshii, K., Goto, A., Ikawa, A., Ishizuka, M., Kariwa, H. and Takashima I.: ROLE OF THE N-LINKED GLYCAN OF ENVELOPE PROTEIN OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN THE VIRUS REPLICATION AND PATHOGENICITY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 7) Seto, T., Nagata, N., Yoshikawa, K., Ichii, O., Sanada, T., Saasa, N., Kon, Y., Yoshii, K., and Kariwa, H.: DEVELOPMENT OF THE LETHAL ANIMAL MODEL OF HUMAN HANTAVIRUS INFECTION: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 8) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: HIGH SUSCEPTIBILITY OF CULTURED CELLS DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRAY RED-BACKED VOLE (*MYODES RUFOCANUS*) TO PUUMALA VIRUS AND OTHER HANTAVIRUSES: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo (2011, 9)
- 9) Ozaki, Y., Sanada, T., Seto, T., Taylor, K., Saasa, N., Ivanov, L.I., Yoshii, K., Tubota,