

- macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Veterinary Medicine* 8(1):189, 2012
- 18) Sayama, Y., Demetria, C., Saito, M., Azul, R.R., Taniguchi, S., Fukushi, S., Yoshikawa, T., Iizuka, I., Mizutani, T., Kurane, I., Malbas, F.F. Jr, Lupisan, S., Catbagan, D.P., Animas, S.B., Morales, R.G., Lopez, E.L., Dazo, K.R., Cruz, M.S., Olveda, R., Saijo, M., Oshitani, H., Morikawa, S.: A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Veterinary Medicine* 18;8:82, 2012
- 19) Takano A, Sugimori C, Fujita H, Kadosaka T, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Tajima T, Sato K, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. A novel Relapsing fever *Borrelia* sp. infects the salivary glands of the molted hard-bodied tick, *Amblyomma geoemydae*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 3: 259-261, 2012.
- 20) Sato, S., Kabeya, H., Miura, T., Suzuki, K., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S. 2012. Isolation and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from wild carnivores of the suborder *Caniformia* in Japan. *Vet. Microbiol.* 161: 130-136.
- 21) Tsunesumi, N., Sato, G., Iwasa, M., Kabeya, H., Maruyama, S., and Tohya, Y. 2012. Novel murine norovirus-like genes in wild rodents in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 74(9): 1221-1224.
- 22) Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takeno, S., Suzuki, K., Kobayashi, S., Souma, K., Masuko, T., Chomel, B. B., and Maruyama, S. 2012. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species in sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 575-581.
- 23) 林谷秀樹, Ly, T.L.K., Nguyen N. T., Nguyen, T.D., 奥村水門, Nguyen N. T. ベトナム・メコンデルタに生息するヤモリにおけるサルモネラの疫学. 2012. 獣畜新報 65, 372-373.
- 24) 林谷秀樹: エルシニア症. 小児科臨床(増刊号)2012. 65, 1337-1341.
- 25) 林谷秀樹: サルモネラ感染症、小児科 2013. 54, 27-36.
- 26) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su IJ, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Vallet S, Cardoso MJ, Desai A, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012. 38:443-453
2. 学会発表
- 1) 境瑞紀、好井健太郎、高野絢子、大森優紀、横澤香菜、苅和宏明、高島郁夫: リバースジェネティクスを用いた極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性決定因子の解析: 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇(2012, 5)
- 2) 好井健太郎、山崎翔子、持館景太、苅和宏明、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47回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇(2012, 5)
- 3) 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太郎、高島郁夫、三浦智行、小林剛、五十嵐樹彦: ダニ媒介性脳炎ウイルス Capsid 欠損レプリコンの構築及び Single-round infectious system の開発: 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇(2012, 5)
- 4) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R., and Takashima, I.:

- Critical Determinant of Neurologic Disease of Tick-borne Flaviviruses: 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program. Beppu (2012, 6)
- 5) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Tanikawa, Y., Sanada, T., Saasa, N., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Epidemiology of Hantavirus Infection in Russia and the Establishment of Animal Model for Hantavirus Infection.: Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia. Beppu (2012, 6)
  - 6) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Tanikawa, Y., Sanada, T., Saasa, N., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Isolation and characterization of hantaviruses from wild rodents and epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia: THE 9th JAPAN-CHINA INTERNATIONAL CONFERENCE OF VIROLOGY. Sapporo (2012, 6)
  - 7) 好井健太郎、寸田祐嗣、境瑞紀、苺和宏明、Holbrook Michael、高島郁夫:ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系障害に関わるウイルス因子の同定:第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
  - 8) 境瑞紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明:極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定:第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
  - 9) 鶴田征太郎、好井健太郎、境瑞紀、苺和宏明:ダニ媒介性フラビウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析:第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
  - 10) 中尾桃子、真田崇弘、佐々木宣哉、Saasa Ngonda、好井健太郎、亀山武志、高岡晃教、苺和宏明:エゾヤチネズミの腎臓由来細胞株(MRK101 細胞)におけるインターフェロン応答の解析:第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
  - 11) 真田崇弘、尾崎由佳、瀬戸隆弘、中尾桃子、Saasa Ngonda、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、苺和宏明:新たに分離された Hokkaido ウイルスの性状解析:第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
  - 12) Ngulube, C.N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Evaluation of antigenic cross-reactivity of tick-borne encephalitis virus and Omsk hemorrhagic fever virus: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
  - 13) Sakai, M., Yoshii, K., Yokozawa, K., and Kariwa, H.: Identification of virulence factors in far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
  - 14) Saasa, N., Yoshida, H., Shimizu, K., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, Mde, L., Koma, T., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
  - 15) Sanada, T., Ozaki, Y., Seto, T., Nakao, M., Saasa, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Characterization of Hokkaido virus, genus hantavirus: The

- 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
- 16) 好井健太郎:ダニ媒介性フラビウウイルスの病態発現機序:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 17) 境瑞紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明:極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 18) 鶴田征太郎、好井健太郎、境瑞紀、苺和宏明:ダニ媒介性フラビウウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 19) Chidumayo Nozyechi, 好井 健太郎、苺和宏明:Evaluation of antigenic cross-reactivity of tick-borne encephalitis virus and Omsk hemorrhagic fever virus:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 20) 中尾桃子、真田崇弘、佐々木宣哉、Saasa Ngonda、好井健太郎、亀山武志、高岡晃教、苺和宏明:エゾヤチネズミの腎臓由来細胞株(MRK101細胞)におけるインターフェロン応答の解析:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 21) 真田崇弘、尾崎由佳、瀬戸隆弘、中尾桃子、Saasa Ngonda、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、苺和宏明:新たに分離されたHokkaidoウイルスの性状解析:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 22) Saasa Ngonda、吉田 喜香、清水 健太、Sanchez-Hernandez Corneli、Romero-Almaraz Maria de Lourde、駒 貴明、真田 崇弘、瀬戸 隆弘、好井 健太郎、Ramos Celso、吉松 組子、有川 二郎、高島 郁夫、苺和 宏明:The N-terminus of the Montano hantavirus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes:第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 23) 有川二郎、天田貴子、林元展人、吉松組子、安田俊平、清水健太、駒貴明、五十棲理恵、高倉彰:イムノクロマト法によるラットとヒト血清のハンタウイルス抗体迅速検出法の開発. 日本実験動物科学・技術九州 2012、別府国際コンベンションセンター、別府市、2012.5.24-26(口頭)
- 24) Takako Amada, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Takaaki Koma, Kenta Shimizu, Rie Isozumi, Nobuhito Hayashimoto, Akira Takakura, Jiro Arikawa : Development of immunochromatographic test strips for the detection of HFRS and HPS hantavirus antibody in the human and rodent serum. The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 12-13, 2012 (Oral)
- 25) Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Kenta Shimizu, Takaaki Koma, Takako Amada, Tetsu Yamashiro, Futoshi Hasebe, Nguyen Thuy Hoa, Le Thi Quynh Mai, Jiro Arikawa : Persistence of Seoul virus in natural host (*Rattus norvegicus*). The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, Japan, June 12-13, 2012 (Oral)
- 26) Takaaki Koma, Kumiko Yoshimatsu, Kenta Shimizu, Shumpei P. Yasuda, Rie Isozumi, Takako Amada, Jiro Arikawa :The role of neutrophils in the induction of pulmonary edema during hantavirus infection in C.B-17 Scid mice, 31st Annual Meeting of American Society of Virology, Madison, USA, July 21-25, 2012
- 27) Takako Amada, Nobuhito Hayashimoto, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei Yasuda,

- Kenta Shimizu, Takaaki Koma, Rie Isozumi, Akira Takakura, Jiro Arikawa :  
Development of Immunochromatographic Rapid Test for the Detection of IgG Antibodies Specific to HFRS and HPS Hantaviruses in Human and Rodent Serum. Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia, 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Beppu, Japan, June 19-20, 2012 (Oral)
- 28) Amada T, Hayashimoto N, Yoshimatsu K, Yasuda S, Shimizu K, Koma T, Isozumi R, Takakura A, Arikawa J : Development of immunochromatographic test for the detection of HFRS and HPS Hantavirus antibody in the human and rodent serum. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012 (poster)
- 29) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, Nishio S, Hayashimoto N, Takakura A, Arikawa J : Rapid and whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in human and rodent. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress, Bangkok, Thailand, October 10 - 12, 2012 (oral)
- 30) 駒 貴明、永田 典代、吉松 組子、佐藤 由子、清水 健太、天田 貴子、西尾 佐奈恵、長谷川 秀樹、有川 二郎 : 肺水腫を呈すハンタウイルス感染SCIDマウスに於ける好中球の役割. 第60回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、大阪市、2012.11.13~15(一般演題・口頭)
- 31) Saijo, M.: Crimean-Congo hemorrhagic fever in three locations: Xinjiang-China, Turkey, and Nigeria. Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia, 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-US Cooperative Medical Science Program, Beppu, Oita, Japan June 19-20, 2012
- 32) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa S.: Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 11-14, 2012
- 33) Yamamoto, K., Iha, K., Bruce, C., Stuart, D., Taniguchi, S., Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Hewson, R., Saijo, M., Morikawa, S.: Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.
- 34) Tani, H., Iha, K., Fukushi, S., Taniguchi, S., Yoshikawa, T., Saijo, M., Morikawa, S.: Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012
- 35) 谷英樹, 伊波興一朗, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂 : シュードタイプ VSV を用いたルジウウイルスの細胞侵入機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月
- 36) 谷口怜, 佐山勇輔, 永田典代, 飯塚愛恵, 谷英樹, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸, 久和茂, 森川茂 : レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月
- 37) 福士秀悦, 新倉綾, 谷英樹, 吉河智城, 伊

- 波興一朗, 谷口怜, 緒方もも子, 西條政幸, 森川茂: 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月
- 38) Manalo D.L., Tuason L., Jarilla B., Avenido E., Demetria C., Quiambao BP., Acosta L.P., Noguchi A., Bazartseren B., Sugaira N., Kaku Y. and Inoue S. Optimization Procedures of the Production of Rabies Polyclonal Antibodies as Reagent for Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT). Conference for Laboratory Animal Sciences and Technologies 2012. 24-26 May, 2012. . Beppu international convention center, Japan.
- 39) Inoue S., Shigematsu, M., Sato M., Muranaka S., Masukawa H., Sugiyama K., Kobayashi M., Imabayashi A., Watanabe T., Suzuki A., Minami, H. Surveillance: Encompassing public health to your animal companion! 15th International Congress on Infectious Diseases. Organized by the International Society for Infectious Diseases. 13-16 June, 2012. Bangkok, Thailand.
- 40) Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of central nervous system in CVS-11 infected mice showing signs of paralysis. 46<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japna-US Cooperative Medical Science Program. 19-20 June, 2012. Beppu, Japan.
- 41) Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of CNS in mice showing signs of paralysis after the intramuscular inoculation of RV (CVS-11 strain). The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Neurovirology. Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in The Asia-Pacific Region". 30-31 Aug, 2012. NIID, Tokyo, Japan.
- 42) Petsophonsakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul C., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. 15-18 Feb, 2012. IMED 2013, Vienna, Austria.
- 43) Inoue, S. Zoonosis: Rabies. Conference and workshop on "From zoonosis to the Chiang Mai model towards rabies free zone", 26-27 April 2012, Chiang Mai University, Thailand.
- 44) Inoue, S. "The prevention of rabies in Japan". A Contingency Plan of Rabies in Japan. 2012 Rabies Conference in China, 17-18 May 2012, Beijing, China.
- 45) Inoue, S. Clinical signs and symptoms of rabies in animals (Theory and vide on dog rabies, the notes of clinical diagnosis). Enhancement of quality of rabies control and prevention. National program for rabies control and prevention - NIHE and JICA project on enhancement of communicable disease control and prevention for PMS with NIID and WHO experts. 4-6 July 2012, Thai Nguyen Province, Vietnam.
- 46) 山岡理子、伊藤直人、中川敬介、岡寺康太、杉山誠: 狂犬病ウイルス P 遺伝子が関連する末梢感染性の解析: 第 154 回日本獣医学会、盛岡 (2012, 9)
- 47) 岡田和真、伊藤直人、中川敬介、山岡理子、岡寺康太、杉山誠: 狂犬病ウイルスの病原性における P 蛋白質アイソフォームの重要性: 第 154 回日本獣医学会、盛岡 (2012, 9)
- 48) 山岡理子、伊藤直人、中川敬介、岡寺康太、杉山誠: 狂犬病ウイルス P 遺伝子は

- 末梢感染性に関連する:第 60 回日本ウイルス学会、大阪(2012, 11)
- 49) Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M. Takeno, S., Miura, T., Suzuki, K., Kobayashi, S., Soma, K., Masuko, T., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S. Prevalence and genetic characterization of *Bartonella* in wildlife in Japan. 7<sup>th</sup> International conference on Bartonella as animal and human pathogens. (Raleigh, North Carolina, USA) April 25–28, 2012.
- 50) Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Diniz, P.P.V.P., and Breitschwerdt, E. B. *Bartonella* spp. infection in domestic dogs, jackals and red foxes in Iraq. 7<sup>th</sup> International conference on Bartonella as animal and human pathogens. (Raleigh, North Carolina, USA) April 25–28, 2012.
- 51) 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根由美, 南 正人, 村田浩一, 小倉 剛, 丸山総一. わが国のマンガースおよびハクビシンから分離された *Bartonella henselae* の遺伝子性状解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 岩手(2012, 9)
- 52) 立野守洋, 西尾拓真, 佐久間暢人, 伊澤雅子, 中西 希, 浅利裕美子, 岡村麻生, 丸山総一, 下川孝子, 瀬戸口明日香, 遠藤泰之. 日本産ヤマネコにおける節足動物媒介性疾患の分子疫学調査. 第 154 回日本獣医学会学術集会, 岩手(2012, 9)
- 53) 永田絵美, Vo Thi Minh Tam, 長谷川瑞貴, Huynh Tan Loc, Ly Thi Lien Khai, 林谷秀樹, ベトナム中部及びカンボジアに生息するヤモリにおけるサルモネラの疫学. 第 155 回日本獣医学会学術集会、東京(2013.3)
- 54) 長谷川瑞貴, 永田絵美, Nguyen Thu Tam, Vo Thi Minh Tam, 林谷秀樹, サルモネラの感染源としての野生ヤモリの重要性. 第 155 回日本獣医学会学術集会、東京(2013.3)
- 55) 永田 典代, 岩田 奈織子, 早坂 大輔, 佐藤 由子, 小島 朝人, 佐多 徹太郎, 長谷川 秀樹: BALB/c マウスを用いた脳炎関連フラビウウイルスの病原性の比較. 第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月
- 56) 小谷 治, 鈴木 忠樹, Naeem Asif, 岩田 奈織子, 中島 典子, 片野 晴隆, 田口 文広, 長谷川 秀樹, 清水 博之, 永田 典代: 新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)の神経病原性の解析. 第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月
- 57) 早坂 大輔, 青木 康太郎, 北浦 一孝, 白井 顕治, Dash Sima Simanti, 永田 典代, 高松 由基, 鈴木 隆二, 森田 公一: 日本脳炎ウイルス感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 60 回日本ウイルス学会(大阪)2012 年 11 月
- 58) 早坂大輔, 北浦一孝, 青木康太郎, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く: 第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇 (2012, 4)
- 59) 高松 由基, デイン ティアン デュク, 早坂大輔, 森田公一: 病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み: 第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇 (2012, 4)
- 60) Daisuke Hayasaka, Kazuki Kitaura, Kotaro Aoki, Kenji Shirai, Dash Sima Simanti, Noriyo Nagata, Yuki Takamatsu, Ryuji Suzuki and Kouichi Morita: The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection: US-Japan 46<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases, Beppu (2012, 6)
- 61) 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松

由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 49 回ウイルス学会九州支部総会、那覇（2012, 8）

- 62) 早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井 顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松 由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 63) 早坂大輔、青木康太郎、森田公一：LAMP 法によるダニ媒介性能炎ウイルス(TBEV) 遺伝子検出法の確立：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 64) 高松 由基、デイン ティアン デュク、早坂 大輔、森田公一：病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み：第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広（2012, 9）
- 65) 早坂大輔、北浦一孝、青木康太郎、白井 顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松 由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス(JEV)感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 154 回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012,9)
- 66) 早坂大輔、青木康太郎、森田公一：RT-LAMP 法によるダニ媒介性能炎ウイルス遺伝子検出法の確立：第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、大阪（2012, 11）
- 67) 早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井 顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松 由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF $\alpha$  は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪（2012, 11）
- 68) 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤 T 細胞の解析：白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪（2012, 11）

#### 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



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

ダニ媒介性脳炎の疫学

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

研究要旨:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす、人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では北海道南部において患者が発生し、またロシアでは年間数千人の患者発生が報告されているが、流行巣の調査は限られた地域でしか実施されていない。そこで本研究では、北海道と山形県、及びロシアのサマラでの TBE ウイルスの分布状況を調査することを目的とし、野鼠における血清疫学調査を行った。今回の調査により、北海道の斜里町のエゾヤチネズミ 1 検体とサマラのキクビアカネズミ 1 検体が抗体陽性であることが判明し、両地域において初めて野鼠検体血清から TBEV の流行巣の存在が示唆された。今後も抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行いウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し新たに TBE ウイルスの流行巣が存在する地域を特定することで、TBE ウイルス流行地域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。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis: TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、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の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

日本では 1993 年北海道上磯町(現北斗市)において初めて TBE 患者が発生し、その後の疫学調査により患者発生地域に TBE ウイルスの流行巣が存在することを明らかにしてきた。

これまでの所、新たな TBE 患者は発生していない。しかし我々は北海道を中心に継続的な血清疫学調査を行うことによって、道南地域には現在まで 10 年以上にわたってウイルスの流行巣が

存続している事を明らかにしてきた。しかし北海道をはじめ、日本国内で流行巣の調査が行われていない地域も多い。TBE ウイルスは人獣共通感染症としてヒトに重篤な症状をもたらすため、その分布状況を把握することは予防対策を立案する上で極めて重要である。

また、現在ロシアでは年間 5 千人から 7 千人程度の患者発生が報告されており、詳細な流行地域の確定や感染環を形成している野鼠種の判明は、より効果的な TBE 予防対策を立案する上で必要となる。

そこで、本年度においては本研究では、北海道と山形県、及びロシアのサマラでの TBE ウイルスの分布状況を調査することを目的とし、野鼠にお

ける血清疫学調査を行った。

## B. 研究方法

### 1) 被験検体

北海道、山形県各地、及びロシアのサマラにおいて捕獲された野鼠より採集された血清は、56°Cで30分加熱し非働化した後、使用まで-40°Cで保存した。捕獲された野鼠の内訳は表1、表2に示す。

### 2) TBEV 特異的抗体の検出

#### (a) ウイルス用粒子 (SPs) を用いた ELISA 法

293T 細胞に TBEV の prM/E 蛋白領域を発現するように設計したプラスミドをトランスフェクトし、蛋白を発現させることで、培養上清中に SPs を分泌させ回収し、ELISA 用抗原として使用した。

96 穴 ELISA プレートに抗 TBEV-E 蛋白ウサギ抗体を吸着し、SPs を捕捉させた後、被験血清を反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体により検出した。基質として p-nitrophenyl phosphate を反応させた後、405nm の吸光度を測定し、陰性抗原(無処置 293T 細胞上清)との吸光度の差が 0.045 を越える検体を中和試験による確定診断に使用した。

#### (b) 中和試験

最終濃度 50pfu/ml となるように調整した TBEV Oshima 5-10 株のウイルス溶液と、適宜希釈した被験血清を 37°C で 1 時間反応させた後、BHK 細胞に感染させて 1.5%カルボキシメチルセルロース含有培地で 4 日間培養した。0.1%クリスタルバイオレット加 10%ホルマリン溶液で固定・染色を行い、プラーク数の測定を行い、50%以上のプラーク現象を示した最高血清希釈倍率の逆数を中和抗体価として算出した。

## C. 研究結果

北海道道東地域の斜里と道央地域の富良野および山形県において計 307 検体の野鼠検体が集められ、SP-ELISA 法によりそれら全ての野鼠血清中の抗 TBE ウイルス抗体を検査した。その結果、SP-ELISA では 35 検体が陽性と判定された。これら血清について中和試験により確定診断を行った結果、35 検体中 1 検体(斜里の 2010 年のエゾヤチネズミ)で中和抗体価が 80 を示し、抗 TBEV 抗体陽性と判定された(図 1A)。

ロシアのサマラでは、これまで TBEV 感染者の発生の報告はあるが、野鼠検体を用いた血清疫学調査などの流行巢の調査は行われていない。計 151 検体が集められ、の野鼠検体が集められ、SP-ELISA 法によりそれら全ての野鼠血清中の抗 TBE ウイルス抗体を検査した。17 検体が陽性と判定された。それら検体について中和試験により確定診断を行ったところ、17 検体中 1 検体が抗体陽性と判定された。抗体陽性検体はキクビアカネズミで、中和抗体価は 320 であった(図 1B)。

## D. 考察

道東地域において初めて抗 TBE ウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。道東地域では TBE ウイルス極東型の本来の媒介マダニであるシュルツェマダニが優占種であること及び、今回斜里において捕獲された主な野鼠種が道南地方の TBE ウイルスの感染環の一翼を担っていると考えられるアカネズミ、エゾヤチネズミ、ヒメネズミであることから、今回の結果は道東地域において TBE ウイルスの流行巢が存在する可能性を示唆するものである。

また、ロシアのサマラにおいて初めて抗 TBE ウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。ロシアのサマラでは、TBE 患者の発生が報告されており、TBE ウイルスの流行巣の存在が示唆される。中和抗体陽性検体の野鼠種はキクビアカネズミであったが、これは日本における TBE ウイルスの宿主動物と考えられているアカネズミと同じ *Apodemus* 属に属しており、サマラ周辺における主な TBE ウイルスの宿主小型げっ歯類の一つと考えられる。

#### E. 結論

今回、血清疫学調査により、北海道の斜里において初めて TBE ウイルスの流行巣が存在すること示唆され、ロシアのサマラにおいて初めて野鼠検体の血清調査から TBE ウイルスの流行巣が存在することが確認された。今後も、抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行い、ウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し、新たに TBE ウイルスの流行巣が存在する地域を特定することで、TBE ウイルス流行地域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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1) Yoshii, K., Yamazaki, S., Mottate, K., Nagata, N., Seto, T., Sannada, T., Sakai, M., Kariwa, H., and Takashima, I.: Genetic and biological

characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from wild rodents in southern Hokkaido, Japan in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *in press*.

2) Yoshii, K., Moritoh, K., Nagata, N., Yokozawa, K., Sakai, M., Sasaki, N., Kariwa, H., Agui, T., and Takashima, I.: Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol*, *in press*.

3) 好井健太郎, 山崎翔子, 持館景太, 荻和宏明, 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. *獣医畜産新報*, 65:377-378, 2012

4) Sanada, T., Seto, T., Ozaki, Y., Saasa, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*). *J Gen Virol*, 93, 2237-2246, 2012

5) Sanada, T., Kariwa, H., Saasa, N., Yoshikawa, K., Seto, T., Morozov, V.G., Tkachenko, E.A., Ivanov, L.I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents. *J Vet Med Sci*, 74: 1237-1242, 2012

6) Saasa, N., Sanchez-Hernandez, C., de Lourdes, Romero-Almaraz, M., Guerrero-Ibarra, E., Almazan-Catalan, A., Yoshida, H., Miyashita, D., Ishizuka, M., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K.,

- Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: Ecology of hantaviruses in Mexico: Genetic identification of rodent host species and spillover infection. *Virus Res*, 168:88–96, 2012
- 7) Saasa, N., Yoshida, H., Shimizu, K., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz, Mde, L., Koma, T., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses. *Virology*, 428:48–57, 2012
- 8) Yoshii, K., Igarashi, M., Ichii, O., Yokozawa, K., Ito, K., Kariwa, H., and Takashima, I.: The Conserved Region in the PrM Protein Is a Critical Determinant in the Assembly of Flavivirus Particles. *J Gen Virol*, 93:27–38, 2012
- 9) Kariwa, H., Yoshikawa, K., Tanikawa, Y., Seto, T., Sanada, T., Saasa, N., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Isolation and characterization of hantaviruses in far East Russia and etiology of hemorrhagic Fever with renal syndrome in the region. *Am J Trop Med Hyg*, 86:545–553, 2012
- 10) 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*. 163: 486–494, 2012
- 11) 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. *Virus Res*. 163: 284–290, 2012

## 2.学会発表

- 1) 境瑞紀、好井健太朗、高野絢子、大森優紀、横澤香菜、苺和宏明、高島郁夫：リバーシージェネティクスを用いた極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの病原性決定因子の解析：第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇（2012, 5）
- 2) 好井健太朗、山崎翔子、持館景太、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 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇（2012, 5）
- 3) 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太朗、高島郁夫、三浦智行、小林剛、五十嵐樹彦：ダニ媒介性脳炎ウイルス Capsid 欠損レプリコンの構築及び Single-round infectious system の開発：第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇（2012, 5）
- 4) Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Kariwa,

- H., Holbrook, M.R., and Takashima, I.: Critical Determinant of Neurologic Disease of Tick-borne Flaviviruses: 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program. Beppu (2012, 6)
- 5) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Tanikawa, Y., Sanada, T., Saasa, N., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Epidemiology of Hantavirus Infection in Russia and the Establishment of Animal Model for Hantavirus Infection.: Mini-symposium on Emerging and Re-emerging Viral Diseases in Asia. Beppu (2012, 6)
- 6) Kariwa, H., Seto, T., Yoshikawa, K., Tkachenko, E.A., Morozov, V.G., Ivanov, L.I., Slonova, R., Zakharycheva, T.A., Tanikawa, Y., Sanada, T., Saasa, N., Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Takashima, I.: Isolation and characterization of hantaviruses from wild rodents and epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia: THE 9th JAPAN-CHINA INTERNATIONAL CONFERENCE OF VIROLOGY. Sapporo (2012, 6)
- 7) 好井健太郎、寸田祐嗣、境瑞紀、苺和宏明、Holbrook Michael、高島郁夫:ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系障害に関わるウイルス因子の同定:第154回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
- 8) 境瑞紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明:極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定:第154回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
- 9) 鶴田征太郎、好井健太郎、境瑞紀、苺和宏明:ダニ媒介性フラビウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析:第154回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
- 10) 中尾桃子、真田崇弘、佐々木宣哉、Saasa Ngonda、好井健太郎、亀山武志、高岡晃教、苺和宏明:エゾヤチネズミの腎臓由来細胞株(MRK101細胞)におけるインターフェロン応答の解析:第154回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
- 11) 真田崇弘、尾崎由佳、瀬戸隆弘、中尾桃子、Saasa Ngonda、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、苺和宏明:新たに分離されたHokkaidoウイルスの性状解析:第154回日本獣医学会学術集会、盛岡(2012, 9)
- 12) Ngulube, C.N., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Evaluation of antigenic cross-reactivity of tick-borne encephalitis virus and Omsk hemorrhagic fever virus: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
- 13) Sakai, M., Yoshii, K., Yokozawa, K., and Kariwa, H.: Identification of virulence factors in far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
- 14) Saasa, N., Yoshida, H., Shimizu, K., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz,

- Mde, L., Koma, T., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., and Kariwa, H.: The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
- 15) Sanada, T., Ozaki, Y., Seto, T., Nakao, M., Saasa, N., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., and Kariwa, H.: Characterization of Hokkaido virus, genus hantavirus: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, Sapporo (2012, 9)
- 16) 好井健太郎: ダニ媒介性フラビウウイルスの病態発現機序: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 17) 境瑞紀、好井健太郎、横澤香菜、苺和宏明: 極東型ダニ媒介性脳炎ウイルスの強毒化に関わるウイルス側因子の特定: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 18) 鶴田征太郎、好井健太郎、境瑞紀、苺和宏明: ダニ媒介性フラビウウイルスのインターフェロンアンタゴニスト作用の解析: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 19) Chidumayo Nozyechi, 好井 健太郎、苺和宏明: Evaluation of antigenic cross-reactivity of tick-borne encephalitis virus and Omsk hemorrhagic fever virus: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 20) 中尾桃子、真田崇弘、佐々木宣哉、Saasa Ngonda、好井健太郎、亀山武志、高岡晃教、苺和宏明: エゾヤチネズミの腎臓由来細胞株 (MRK101 細胞)におけるインターフェロン応答の解析: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 21) 真田崇弘、尾崎由佳、瀬戸隆弘、中尾桃子、Saasa Ngonda、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、苺和宏明: 新たに分離された Hokkaido ウイルスの性状解析: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- 22) Saasa Ngonda、吉田 喜香、清水 健太、Sanchez-Hernandez Corneli、Romero-Almaraz Maria de Lourde、駒 貴明、真田 崇弘、瀬戸 隆弘、好井 健太郎、Ramos Celso、吉松 組子、有川 二郎、高島 郁夫、苺和 宏明: The N-terminus of the Montano hantavirus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪(2012, 11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

表1 日本における捕獲野鼠の内訳

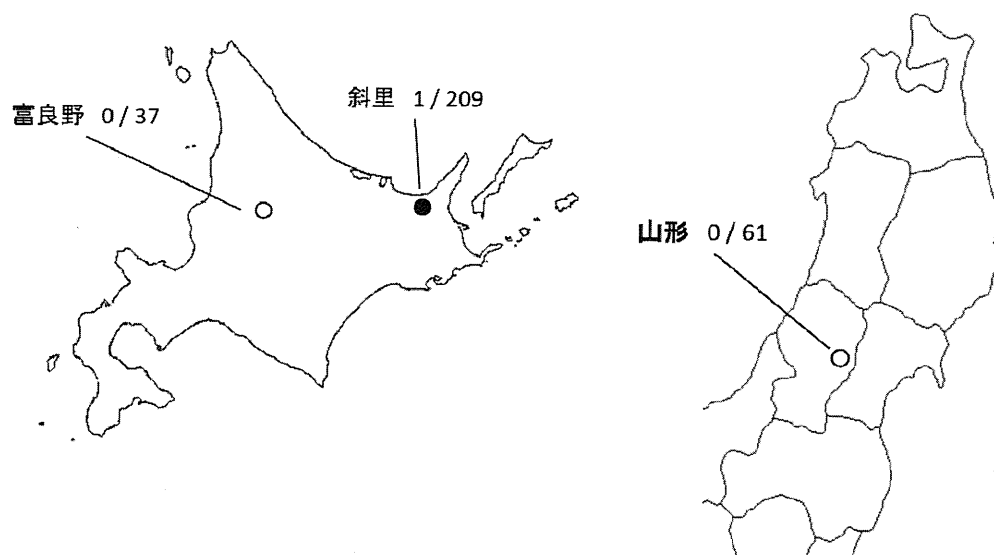
捕獲地	斜里		富良野		山形		計
	2010年	2010年	2008年	2009年	2010年		
アカネズミ	115	23	22	33	4	197	
ヒメネズミ	45					45	
エゾヤチネズミ	27	12				39	
ヒメヤチネズミ	9	1				10	
トガリネズミ類	4	1				5	
ハタネズミ			1	1		2	
不明	9					9	
計	209	37	23	34	4	307	

表2 ロシア サマラにおける捕獲野鼠の内訳

捕獲年	2010年
キクビアカネズミ	54
ウラルアカネズミ	28
セスジネズミ	1
ヨーロッパヤチネズミ	67
ユーラシアハタネズミ	1
計	151

図1 野生げっ歯類における疫学調査実施地域と抗体調査成績

A) 日本における成績



B) ロシアにおける成績





厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

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  
ハンタウイルス感染症に関する研究

分担研究者 有川二郎 北海道大学大学院医学研究科・教授

研究要旨 ハンタウイルス肺症候群(HPS)関連の北米および南米由来ウイルスについて、ハンタウイルス感染症の中和試験の代替となりうる、血清学的鑑別診断法を開発した。また、腎症候性出血熱(HFRS)関連ハンタウイルスのラット血清に応用した。さらに、近年続々と発見される食虫目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する体制を確立した。これらの診断法の開発によって、今後、海外から侵入の可能性のある全てのハンタウイルス感染症を安全かつ簡便に診断出来と考えられる。

A. 研究目的

腎症候性出血熱（HFRS）とハンタウイルス肺症候（HPS）はブニヤウイルス科ハンタウイルス属に分類されるハンタウイルスを原因とする急性の熱性疾患で、両疾患を合わせ、ハンタウイルス感染症と総称することがある。ハンタウイルスの自然宿主は一般にげっ歯類で、げっ歯類は不顕性に持続感染して、糞尿中にウイルスを排泄する。ヒトはそれらの飛沫を吸引することにより感染する。このためハンタウイルスは代表的な齧歯類媒介性ウイルス性人獣共通感染症の原因ウイルスであり、公衆衛生上重要なウイルスである。HFRSはユーラシア大陸全域で、また、HPSは南北アメリカ諸国で発生が報告されている。ハンタウイルスは、多様なげっ歯類が自然宿主となり、それら宿主は、異なった血清型や遺伝子型のハンタウイルスの自然宿主となる。このため

一種類の抗原ではそれら全てのハンタウイルス感染症を検出することはできない。一方では類似の抗原性を持ち、血清型の鑑別に中和試験を必要とするウイルスもある。わが国では、HFRSやHPSの発生は報告されていないが、輸入感染症として注意を払うべき感染症であり、そのため、ハンタウイルス感染症診断と血清型鑑別診断法の開発が必要とされている。本研究では、ハンタウイルス感染症全般を検出および鑑別する診断システムの構築を最終的な目的とする。さらに近年、続々と新規の食虫目由来ハンタウイルスが発見されている。しかしながら、遺伝子断片のみが回収される例も多く、ヒトへの病原性、抗原性の多様性、血清型などについてはほとんど報告がない。本研究では食虫目由来ハンタウイルスの抗原性を明らかにすることを目的とし、代表株であるトッタパラヤンウイルスに対する

モノクローナル抗体を作成し、抗原性の解析を行った。

## B. 研究方法

### (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(SNV)、ブラッククリークカナル(BCCV)、エルモロキャニオン様ウイルスで新規にメキシコから検出されたカリザールウイルス(CARV)の核蛋白(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. megalotis*)の血清を用いた。BCCVの自然宿主はコットンラット(*Sigmodon hispidus*)であるが、これの陽性血清のみ入手することができなかった。また、SNVによるHPS患者血清を用いた。HFRS関連ウイルスであるハンターウイルス(HTNV)、ソウルウイルス(SEOV)、タイランドウイルス(THAIV)、ドブラバウイルス(DOBV)の同様の抗原はすでに報告したものをを用いた(Araki K, et al J. Clin. Microbiol. 2001;39:2397-404, Nakamura I, et al Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. Arch Virol 2008;153:153

7-42)。HTNV, SEOV, THAIV, DOBVはそれぞれラット(WKAH/hkm, 5W メス)に接種し、その後経時的に採血を行い、全長抗原および鑑別用抗原に対する免疫応答を比較した。実験感染ラットに加え、ベトナムのすでにSEOVの感染が確認されたコロニーから捕獲された野生のラットの血清も鑑別系の評価に用いた。

(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抗原の作製についてはすでに報告した(Okumura M, and others. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne Hantavirus. Clin Vaccine Immunol 2007;14:173-81)。報告した方法で発現/精製した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。またドイツのグループとの共同研究により、ドイツでイースト菌ベクターシステムで発現させたTPMVのN蛋白を抗原として作製したクローンを加えて解析を進めた。その結果、昨年度作製したIgMクラスのEB5, ED5およびIgGクラスのB5H9, 1A3の4クローンに加え、IgGクラスの2H6, 1F1の合計6クローンで解析をすすめた。これらの抗体のエピトープを解析するために、N抗原の全長(1-433アミノ酸)の他に1-80, 1-177, 1-331アミノ酸をそれぞれNusタンパクとの融合タンパクとして発現させた組換え蛋白、ならびに、日本産食虫類由来ハンタウイルスであるアサマウイルス(ASAV)のN抗原の全長抗原を用い、Western blott法によって

、結合性を解析した。

#### (倫理面への配慮)

患者血清は米国ニューメキシコ大学のBrian Helle博士より分与された。血清は番号で提供され、個人の特定はできない。各種げっ歯類血清の採血は、何れも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものである。マウスモノクローナル抗体の作製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。また、マウスモノクローナル抗体についての共同研究と抗体の譲渡は大学の承認をうけて同意書を交わして実施した。

### C. 研究結果

#### (1) ハンタウイルス 感染症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2種類のハンタウイルス、SNVおよびBCCV、ならびに、ヒトへの感染は不明であるがメキシコでげっ歯類の間に存在しているCARVとの鑑別が、この組換N抗原を用いて可能であるか抗血清を用いて検討した。自然感染した、自然宿主野生げっ歯類血清を用いた場合、罹患ウイルスを鑑別することは不可能であった。これは、N抗原のN末端の共通抗原領域を持つ全長抗原では、その強い交差反応のためにすべての抗体が強く結合したためと考えられる。しかし、N末端領域を除いたN抗原を用いてELISAを行った場合、それらのウイルスに対する血清型を鑑別することが可能であった。これは、N末端領域の共通抗原領域が除かれたため、

残された部位に存在するウイルス特異的なリアブル領域に対する反応性が相対的に高まったためと考えられる。

HFRS関連ウイルスである、HTNV, SEOV, TH AIV, およびDOBVについても、N末端を除いたN抗原がげっ歯類血清においても、血清型鑑別診断が可能であるかを解析した。すなわち、それぞれのウイルスに対する実験感染ラット血清ならびにSEOV自然感染ドブネズミ血清を用いて、ELISA法で反応性の相違について比較・検討した。その結果、ラットの血清診断においても同様に、HFRS関連ウイルスのN末端を欠くN抗原は、それぞれの罹患ウイルスを血清学的に鑑別可能であることが明らかとなった。

(2) 食虫目由来ハンタウイルスの抗原性解析  
確立した6種類のモノクローナル抗体のうち、ED5, 1A3, 2H6の3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3種の抗体はN末端近傍に位置するエピトープを認識する抗体であることが分かった。一方、EB5, B5H9および1F1の3種の抗体は、げっ歯類由来ハンタウイルス抗原および日本産食虫類由来ハンタウイルスであるASAVのN抗原のいずれとも反応せず、TPMVに特異的なエピトープを認識すると考えられた。ASAVとも反応しなかったことから、食虫類由来ハンタウイルスにも抗原性に相違があることも判明した。しかし、これらの抗体はリニアエピトープを認識しなかつ

たため、Western blott法によって、この特異エピトープの存在領域について明らかにすることができなかった。

#### D. 考察

(1) 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。この診断法を用いることにより、HPS患者の輸入症例に対し、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、ユーラシア大陸全域で流行している、HFRSについても、患者と病原巣動物のラットやその他のげっ歯類血清について鑑別が可能であった。これによって、HFRS輸入症例に対しても迅速な鑑別診断が可能と考えられる。さらに、東アジア諸国では、*Rattus*属のネズミを中心に、複数のハンタウイルスが混在していると考えられる。このため、本法は、それら地域での疫学的研究への応用に有効と考えられた。本法は組換え抗原を用いたELISAであるため、標準法である中和試験と異なり生きたウイルスやBSL4の施設を必要としない安全・迅速・簡便な代替法である。

(2) 食虫類由来ハンタウイルスの抗原性をN蛋白に結合する6種類の抗体を用いて解析した。その結果、それらウイルスのN蛋白の抗原性は、げっ歯類由来ハンタウイルスとは大きく異なることが分かった。TPMV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、この領域がイムノドミナントであることが示された。このことから、げっ歯類由来ハンタウイルスと同様にN抗原

のN末端にリニアエピトープを有する類似した抗原構造をもつことが示唆された。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。今後、分離されたウイルスについて、これらのモノクローナル抗体を用いた抗原性のパネルアッセイを行うことが可能となると考えられる。

#### E. 結論

組換えN蛋白抗原を用いて、北アメリカ大陸由来ハンタウイルス感染症とラット由来ハンタウイルス感染症の鑑別診断法を開発した。これにより、今後、海外から侵入の可能性のある全てのハンタウイルス感染症を安全かつ簡便に診断出来と考えられる。また、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。

#### F. 健康危険情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Koma T, Yoshimatsu K, Taruishi M, Miyashita D, Endo R, Shimizu K, Yasuda PS, Amada T, Seto T, Murata R, Yoshida H, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J, 2012. Development of a serotyping enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant truncated hantavirus