

・ これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体文字**で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

受賞歴、表彰歴

1994年 二木賞 受賞
2002年 日本医真菌学会賞 受賞
2005年 上原記念生命科学財団研究助成 受賞

研究成果等

(1) 研究論文数 851編 (和文 [国内] 誌 192編、欧文 [国際] 659編)

(2) 著書 (ビュー) 数 557編

(3) ガイドライン

日本呼吸器学会「成人市中肺炎診療ガイドライン」(委員長): 2007年1月15日発行

深在性真菌症のガイドライン作成委員会編「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007」(委員長): 2007年2月1日発行

日本呼吸器学会「成人院内肺炎診療ガイドライン」(委員長): 2008年6月1日発行

日本化学療法学会「一般医療従事者のための深在性真菌症に対する抗真菌薬使用ガイドライン」(委員長): 2009年1月10日発行

日本呼吸器学会「医療・介護関連肺炎診療ガイドライン」(委員長): 2011年8月10日発行

日本呼吸器学会「咳嗽に関するガイドライン第2版」(委員長): 2012年5月30日発行

・ 平成25年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。

「真菌感染症の病態解明及び検査・治療法の確立とサーベイランスに関する研究」

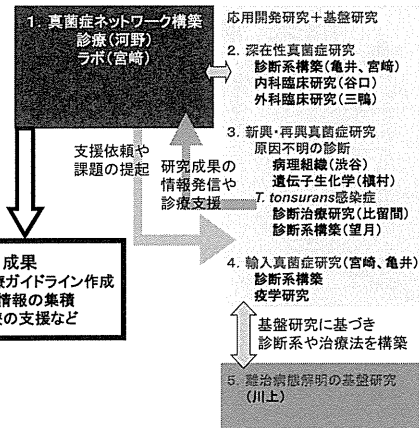
平成23年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と
国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究

研究代表者	長崎大学病院	河野 茂
研究分担者	順天堂大学 皮膚科・アレルギー科	比留間政太郎
	金沢医科大学 皮膚科	望月 隆
	千葉大学真菌医学研究センター	亀井克彦
	帝京大学真菌センター	横村浩一
	虎の門病院 血液科	谷口修一
	長崎大学 感染免疫学講座	掛屋 弘
	愛知医科大学 感染制御	三嶋廣繁
	東邦大学 病理学講座	渋谷和俊
	東北大学 感染分子病態解析学	川上和義
	国立感染症研究所 生物活性物質部	山越 智
	国立感染症研究所 生物活性物質部	宮崎義継

当初の目的

- わが国の真菌症レファレンスラボ・ネットワークの構築
 - 感染研、千葉大真菌医学研究センター、帝京大学医真菌研究センター等で実施している病原真菌レファレンス機能をネットワーク化し、情報共有と情報発信を行う。
 - 真菌症の情報発信と診療支援のためのネットワーク構築
全国に6つの拠点(1.北海道・東北、2.関東、3.中部、4.近畿、5.中・四国、6.九州)を形成する。
- わが国の真菌症に関する診療基盤の底上げ
 - エビデンスに基づく「真菌症診療ガイドライン」
米国では8種類の真菌に関して8編
我が国での診療ガイドラインは3菌種に限定した1編と
輸入真菌症1編が公表されているのみ。
- 病態解明と新規診断・治療法を目指した応用研究



成果と課題 1. ネットワーク構築

- 成果
- 渡航者真菌症(輸入真菌症)の疫学調査
 - 侵襲性真菌症の診断・治療支援ネットワーク
 - 呼吸器疾患
 - 造血幹細胞移植患者
 - 皮膚真菌症の診断・治療支援ネットワーク
 - T. tonsurans*中心に
- 課題
- 内科系ガイドラインへの反映
 - トングランス感染症ガイドラインの評価

千葉大学(臨床)+感染研(BSL3培養)をコアとするネットワーク

2012年の輸入真菌症症例

- コクシジオイデス症 2例(肺型) 計68例
- ヒストプラズマ症 1例 計74例
- パラコクシジオイデス症 なし 計21例
- マルネッフェイ型ベニシリウム症 1例(肺嚢胞内感染?) 計8例
- プラストミセス症 なし 計0例

侵襲性真菌症の診断・治療支援ネットワーク

呼吸器疾患

- 慢性肺アスペルギルス症に対する抗真菌薬効果に関するRCT(試験終了、解析中)
- 全国54施設131症例

感染研 ↔ (千葉大・帝京大・長崎大)

血液疾患 全国39施設 758症例

基礎疾患の種類	n	割合(%)
急性白血病	360	48.1
慢性骨髄性白血病(CML)	20	2.7
慢性リンパ性白血病(PLL)	4	0.5
ホジキン病	21	2.8
非ホジキンリンパ腫	210	28.1
再生不良性貧血	12	1.6
多発性骨髄腫	40	5.3
骨髄異形成症候群	59	7.9
その他	22	2.9
合計	748	100.0

感染研

皮膚真菌症の診断・治療支援ネットワーク

- *T. tonsurans* ガイドライン作成
- ホームページ作製



ガイドライン治療指針

1. プラン検査陽性：頭髪には触れません。体部白癬があれば、きちんと治療を受ける。
2. プラン検査陽性：原則として内服治療を受けてください。
 - 菌量が、プラン検査で2集団以下の人は抗真菌剤入りシャンプーで様子みてよい。
 - 菌量が、プラン検査で3集団以上の人は内服治療を受けてください。
 - itraconazole：400mg/日を1週間内服
 - terbinafine：125mg/日を6週間、(または4錠(500mg)/日を1週間)

(体重60~70kgあたりのおおよその目安)

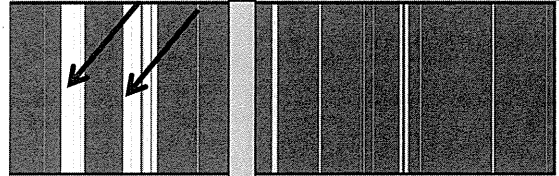
- 菌が消えたかどうか3か月後にプラン検査を受ける。

柔道部内では、全員で検査・治療しないと、意味がありません。

成果;新規の診断・治療法に向けた応用研究

Trichophyton tonsurans SuperContigに対するMegablast解析に基づいた種特異的配列の検索

これらの白い部分は、*T. tonsurans*にあって既知の*T. mentagrophytes*にない配列を示している

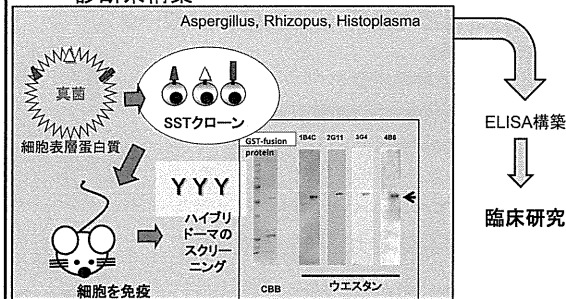


未知の*T. Tonsurans*特異的検出プライマー・プローブの候補配列

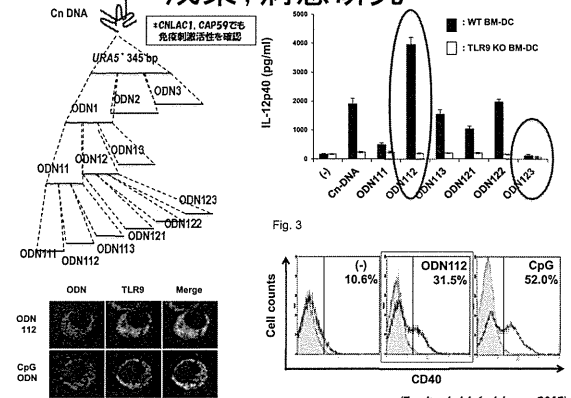
T. tonsurans ODN11215
 1. negative
 2. 1000 random
 3. 100 A 200
 4. 100 T 200
 5. 100 C 200
 6. 100 G 200
 7. 100 A 200
 8. 100 T 200
 9. 100 C 200
 10. 100 G 200
 11. 100 A 200
 12. 100 T 200

成果;新規の診断・治療法に向けた応用研究

- *Aspergillus sp.*, *Rhizopus oryzae*, *T. tonsurans*, *Histoplasma* の診断系構築



成果;病態研究



まとめ

1. 真菌症の診断・治療ネットワークを構築し臨床研究を実施
2. *T. tonsurans*ガイドラインを編集した
3. 新規の診断系を構築した
Aspergillus sp. 特異抗体(特許取得)
4. *T. tonsurans*、病理組織標本の確定診断
5. 真菌の自然免疫認識機構の一旦を解明し、アジュバント抗補をみいだした

課題

1. サーベイランスの継続と拡大
2. 疫学研究、治療法に関する成果を診療ガイドラインに反映
3. 基礎研究データの解析・まとめ
4. 構築した診断系の臨床研究

平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：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

課題番号： H22-新興-一般- 009
 予定期間： H22年度からH24年度まで
 研究代表者： 荻和 宏明
 所属研究機関： 北海道大学
 所属部局： 大学院獣医学研究科
 職名： 准教授
 年次別研究費(交付決定額)：

1年目 33,080,000 円 2年目 29,110,000 円 3年目 25,296,000 円 計 87,486,000 円

I. 研究の意義

- (1) 野生鳥獣によって媒介される人獣共通感染症は危険度が高く、国外で流行しているものが多い。これらの感染症の多くは患者発生状況や病原巣動物がほとんど明らかになっていない。
- (2) 我が国の検査機関で実施可能な人獣共通感染症に対する検査法がほとんど存在しない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 海外の流行地において疫学調査を実施して、上記感染症の患者発生状況や病原巣動物などの疫学情報を入手する。
- (2) 信頼性の高い簡便な診断法を開発することにより、野生鳥獣を対象とした疫学調査や輸入野生鳥獣の検査が容易になる。
- (3) 今まで困難であった各種野生鳥獣媒介性感染症のわが国への侵入の可能性や、国内での発生予測と被害予想などのリスク評価が可能となる。

III. 3年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

- ・研究代表者(荻和宏明)

- (1) ロシアで腎症候性出血熱の原因となっている3種類のハンタウイルスを分離した。
- (2) メキシコでのげっ歯類の疫学調査において3種類の新規ハンタウイルスを検出した。

- ・研究分担者(好井健太郎)

- (1) 北海道北斗市で2008年に捕獲されたアカネズミよりダニ媒介性脳炎ウイルス Oshima 08-AS 株を分離した。

- ・研究分担者(有川二郎)

- (1) ハンタウイルス組換え NP 抗原を用いて、北米、中米、および南米由来ハンタウイルス感染症の鑑別診断 ELISA 法を開発した。

- ・ 研究分担者(西條政幸)
 - (1) 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的解析を行った。
- ・ 研究分担者(井上智)
 - (1) モンゴルで流行している狂犬病ウイルスの生物学的多様性を遺伝子型別で明らかにした。
- ・ 研究分担者(伊藤直人)
 - (1) 狂犬病ウイルスの末梢感染性にP、MおよびL遺伝子が関連することを初めて明らかにした。
- ・ 研究分担者(丸山総一)
 - (1) ニホンアナグマとテンから、それぞれ新種の *Bartonella* と人に心筋炎などを起こす *Bartonella washoensis* を分離した。
- ・ 研究分担者(林谷秀樹)
 - (1) ベトナム中部、南部ならびにカンボジアでの疫学調査から、東南アジアにおいてヤモリがサルモネラ属菌の感染源として重要であることを明らかにした。
- ・ 研究分担者(川端寛樹)
 - (1) 輸入回帰熱の症例報告を行い、地方衛生研究所等で導入可能な回帰熱のリアルタイム PCR 法の開発を行った。
- ・ 研究分担者(永田典代)
 - (1) マウスにおいて脳炎関連フラビウイルスの神経病原性を明らかにした。
- ・ 研究分担者(早坂大輔)
 - (1) ダニ媒介性脳炎ウイルスの極東型、シベリア型、ヨーロッパ型を区別できる Loop-Mediated Isothermal Amplification 法を用いたウイルス遺伝子迅速検出法を確立した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 国内外で捕獲される野生動物について、様々な人獣共通感染症の病原体の感染状況を明らかにし、わが国への野生鳥獣媒介性感染症の侵入阻止に役立つ知見を蓄積する。
- (2) 新規に開発された人獣共通感染症の診断法について、国内の検査機関でも利用可能となるよう、さらに簡便化を試みる。
- (3) 流行国の研究者とより緊密なネットワークを構築し、海外の人獣共通感染症の発生状況について詳細な情報収集を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 国内外の様々な人獣共通感染症の疫学情報が収集される。
- (2) 信頼性の高い人獣共通感染症の診断法が確立される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者(苅和宏明)

- (1) Kariwa H, Yoshikawa K, Tanikawa Y, Seto T, Sanada T, Saasa N, Ivanov LI, Slonova R, Zakharycheva TA, Nakamura I, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, 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.* 2012.

- (2) Kariwa H, Yoshida H, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Mde L, Almazán-Catalán JA, Ramos C, Miyashita D, Seto T, Takano A, Totani M, Murata R, Saasa N, Ishizuka M, Sanada T, Yoshii K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res.* 2012.

研究分担者 (好井健太郎)

- (1) Yoshii K, Yamazaki S, Mottate K, Nagata N, Seto T, Sannada T, Sakai M, Kariwa H, 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, Takashima I. Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oasl1 affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol* in press.

研究分担者 (有川二郎)

- (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. Development of a serotyping enzyme-linked immunosorbent assay system based on recombinant truncated hantavirus nucleocapsid proteins for New World Hantavirus infection. *J. Virol. Methods.* 2012.

研究分担者 (西條政幸)

- (1) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 2012.

研究分担者 (井上智)

- (1) 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.

研究分担者 (伊藤直人)

- (1) Nakagawa K, Ito N, Masatani T, Abe M, Yamaoka S, Ito Y, Okadera K, Sugiyama M. Generation of a live rabies vaccine strain attenuated by multiple mutations and evaluation of its safety and efficacy. *Vaccine.* 2012.

研究分担者 (丸山総一)

- (1) Sato S, Kabeya H, Miura T, Suzuki K, Bai Y, Kosoy M, Sentsui H, Kariwa H, Maruyama S. Isolation and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from wild carnivores of the suborder Caniformia in Japan. *Vet. Microbiol.* 2012.

研究分担者 (林谷秀樹)

- (1) Ly TLK, Duong TTT, Nguyen TT, Tran TP, Tran TTD, Nakadai A, Iwata T, Taniguchi T, Ha TT, Hayashidani H. Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 from acute diarrheic children in the Mekong Delta, Vietnam. *J.Vet.Epidemiol.* 2010.

研究分担者 (川端寛樹)

- (1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011.

研究分担者 (永田典代)

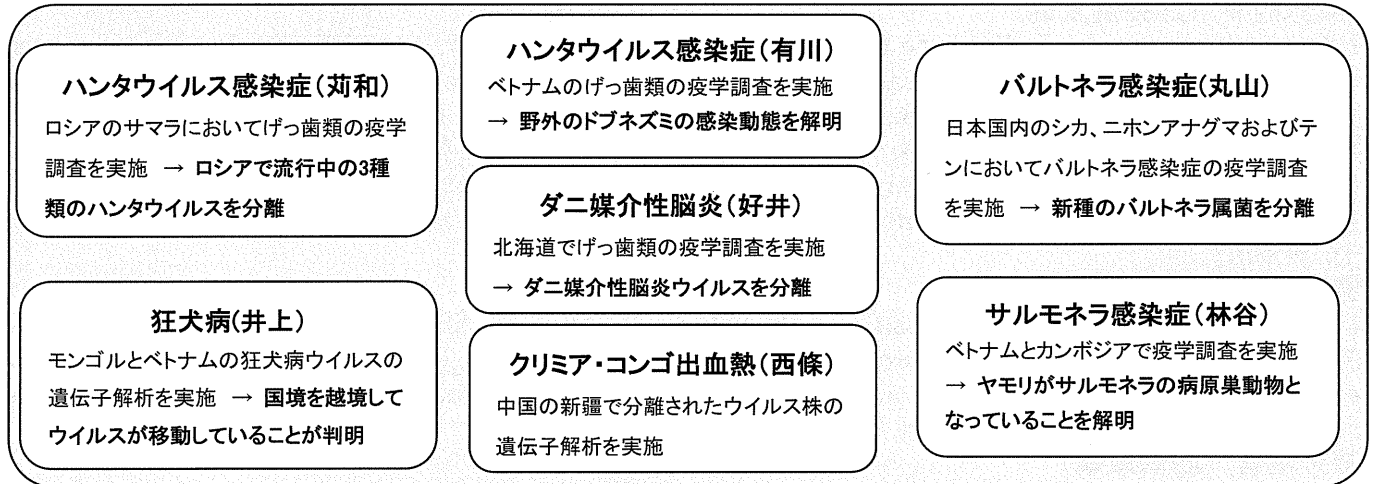
- (1) Seto T, Nagata N, Yoshikawa K, Ichii O, Sanada T, Saasa N, Ozaki Y, Kon Y, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H. Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. *Virus Res.* 2012.

研究分担者 (早坂大輔)

- (1) Hayasaka D, Nagata N, Hasegawa H, Sata T, Takashima I, Koike S. Early mortality following intracerebral infection with the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Vet Med Sci.* 2010.

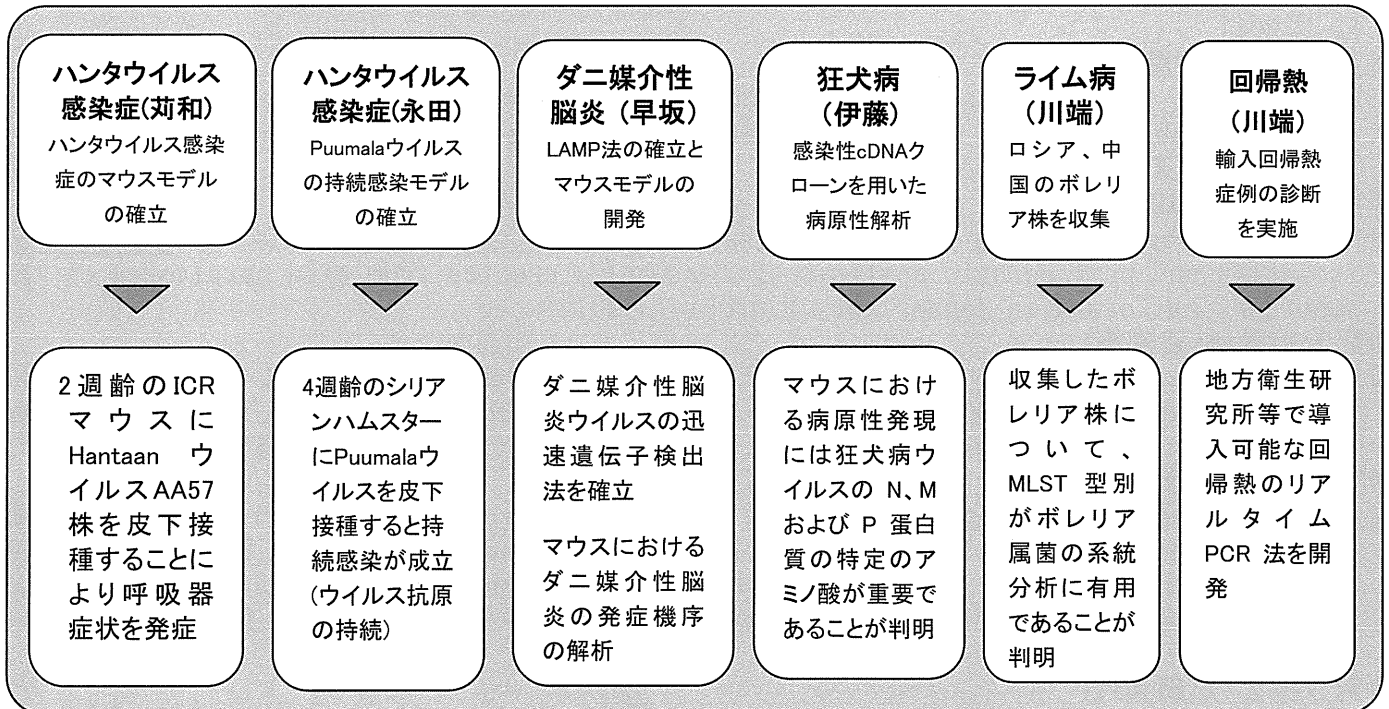
Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

野生鳥獣媒介性人獣共通感染症の疫学調査



各種野生鳥獣媒介性人獣共通感染症の様々な疫学情報が収集された。

実験感染モデルの確立および新規診断法の開発



様々な野生鳥獣媒介性人獣共通感染症について、新規遺伝子解析法や実験感染モデルが開発され、病原体の鋭敏で迅速な検出や病原性の解析が可能になった。

本研究により、野生鳥獣媒介性感染症の侵入や発生に対応するための具体的な手法の整備が進展した。

●研究代表者の研究歴等

研究代表者 (苅和宏明)

・過去に所属した研究機関の履歴

1986年4月～1990年3月 武田薬品工業(株) 中央研究所
1990年4月～現在 北海道大学大学院獣医学研究科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

橋本 信夫 (北海道大学名誉教授)

高島 郁夫 (北海道大学名誉教授)

有川 二郎 (北海道大学大学院医学研究科・教授)

Francis A. Ennis (University of Massachusetts, Professor)

・主な研究課題

ウイルス性人獣共通感染症の疫学、診断・予防法に関する研究

・これまでの研究実績

- 1) *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) *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) *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. 2012.*
- 4) *Ecology of hantaviruses in Mexico: Genetic identification of rodent host species and spillover infection. Virus Res. 2012.*
- 5) *Development of a Diagnostic Method Applicable to Various Serotypes of Hantavirus Infection in Rodents. J Vet Med Sci. 2012.*
- 6) *The N-terminus of the Montano virus nucleocapsid protein possesses broadly cross-reactive conformation-dependent epitopes conserved in rodent-borne hantaviruses. Virology. 2012.*
- 7) *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. 2012.*
- 8) *Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. Virus Res. 2012.*
- 9) *Infection of Hantaan virus strain AA57 leading to pulmonary disease in laboratory mice. Virus Res. 2011.*
- 10) *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. 2011.*
- 11) *The conserved region in the PrM protein is a critical determinant in the assembly of flavivirus particles. J Gen Virol. 2011.*

- 12) 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.* 2011.
- 13) Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Res.* 2011.
- 14) Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama Prefecture, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2011.
- 15) Seroprevalence of West Nile virus in wild birds in far eastern Russia using a focus reduction neutralization test. *Am J Trop Med Hyg.* 2011
- 16) Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiol Immunol.* 2011.
- 17) 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.* 2011.
- 18) Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 2011.
- 19) Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Res.* 2011.
- 20) Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. *Am J Trop Med Hyg.* 2010.
- 21) Epidemiological study of hantavirus infection in the Samara Region of European Russia. *J Vet Med Sci.* 2009.
- 22) Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, *Mx1* and *Oas1b*, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res.* 2009.
- 23) Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. *J Virol Methods.* 2009.
- 24) Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain. *Jpn J Vet Res.* 2008.
- 25) Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiol Immunol.* 2008.
- 26) Detection of antibodies against SARS-Coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA. *J Microbiol Biotechnol.* 2008.
- 27) Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection. *Arch Virol.* 2008.
- 28) Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine. *Immunol Lett.* 2008.
- 29) Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J Gen Virol.* 2008.
- 30) Mode of infection of Hokkaido virus (Genus *Hantavirus*) among grey red-backed voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol.* 2007.
- 31) Hantavirus infection in East Asia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007.
- 32) A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn J Vet Res.*

2007.

- 33) Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006.
- 34) The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope protein-glycosylated or non-glycosylated West Nile virus. *Virus Res.* 2006.
- 35) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J Virol Methods.* 2006.
- 36) Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. *Dermatology.* 2006.
- 37) Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J Med Virol.* 2006.
- 38) Soochong virus: an antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J Med Virol.* 2006.
- 39) Novel rapid immunochromatographic test based on an enzyme immunoassay for detecting nucleocapsid antigen in SARS-associated coronavirus. *J Clin Lab Anal.* 2005.
- 40) Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. *Vaccine.* 2005.
- 41) Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J Virol Methods.* 2005.
- 42) Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine.* 2005.
- 43) Epizootiological and epidemiological study of hantavirus infection in Japan. *Microbiol Immunol.* 2004.
- 44) Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. *J Gen Virol.* 2004.
- 45) Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J Gen Virol.* 2004.
- 46) Different chemokine expression in lethal and non-lethal murine West Nile virus infection. *J Med Virol.* 2004.
- 47) Modes of hantavirus transmission in a population of *Clethrionomys rufocanus bedfordiae* inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Arch Virol.* 2004.
- 48) Comparison of virulence of various hantaviruses related to hemorrhagic fever with renal syndrome in newborn mouse model. *Jpn J Vet Res.* 2004.
- 49) Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Virus Res.* 2004.
- 50) Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol.* 2003.
- 51) A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine.* 2003.

- 52) Discrimination of West Nile virus and Japanese encephalitis virus strains using RT-PCR RFLP analysis. *Microbiol Immunol.* 2003.
- 53) Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype. *Arch Virol.* 2003.
- 54) Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. *Emerg Infect Dis.* 2002.
- 55) Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and far-eastern Russia. *Jpn J Vet Res.* 2002.
- 56) Epizootiological survey of hantavirus among rodent species in Ningxia Hui Autonomous Province, China. *Jpn J Vet Res.* 2001.
- 57) Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2001. Review.
- 58) Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and far-eastern subtype strains. *Vaccine.* 2001.
- 59) Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J Vet Med Sci.* 2001.
- 60) Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. *J Clin Microbiol.* 2001.
- 61) Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J Gen Virol.* 2001.
- 62) Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) and phylogenetic analysis of TBE viruses in Japan and Far Eastern Russia. *Jpn J Infect Dis.* 2001. Review.
- 63) Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology.* 2000.
- 64) *In vitro* antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Arch Virol.* 2000.
- 65) Pathogenicity of Hantaan virus in newborn mice: genetic reassortant study demonstrating that a single amino acid change in glycoprotein G1 is related to virulence. *J Virol.* 2000.
- 66) The mechanism of actinomycin D-mediated increase of Borna disease virus (BDV) RNA in cells persistently infected by BDV. *Microbiol Immunol.* 2000.
- 67) Characterization of monoclonal antibodies against Hokkaido strain tick-borne encephalitis virus. *Microbiol Immunol.* 2000.
- 68) Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan. *Microbiol Immunol.* 2000.
- 69) High levels of viremia in patients with the Hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis.* 1999.
- 70) Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *J Gen Virol.* 1999.
- 71) Transcriptional control of Borna disease virus (BDV) in persistently BDV-infected cells. *Arch Virol.* 1999.
- 72) Enhancement of Borna disease virus transcription in persistently infected cells by serum starvation. *J*

Vet Med Sci. 1999.

- 73) Single-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Borna disease virus RNA *in vitro* and *in vivo*. Jpn J Vet Res. 1999.
- 74) Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. Vaccine. 1999.
- 75) A single-tube RT-PCR method for the detection of Borna disease viral genomic RNA. Jpn J Vet Res. 1998.
- 76) Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. Virus Res. 1999.
- 77) Urine-associated horizontal transmission of Seoul virus among rats. Arch Virol. 1998.
- 78) Evidence for the existence of Puumala-related virus among *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan. Am J Trop Med Hyg. 1995.

・平成25年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

申請課題名：近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

(25180801)

平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
研究発表会

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

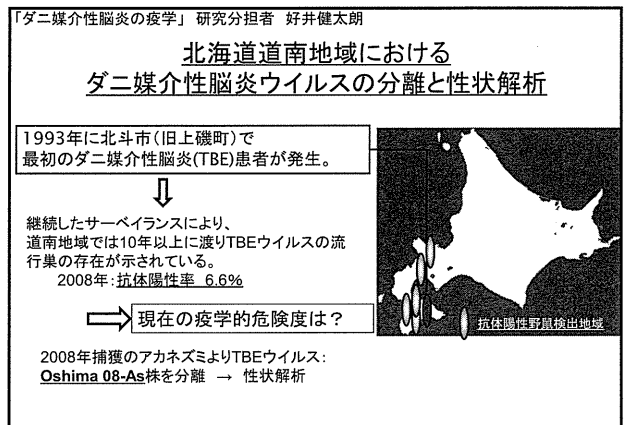
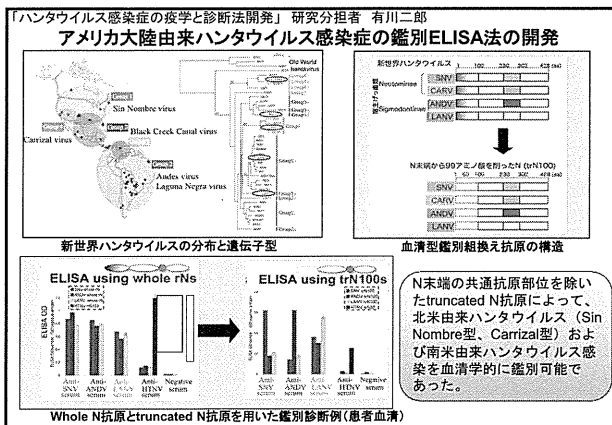
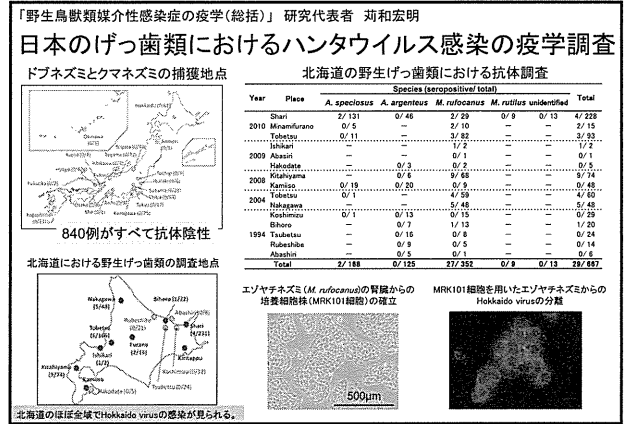
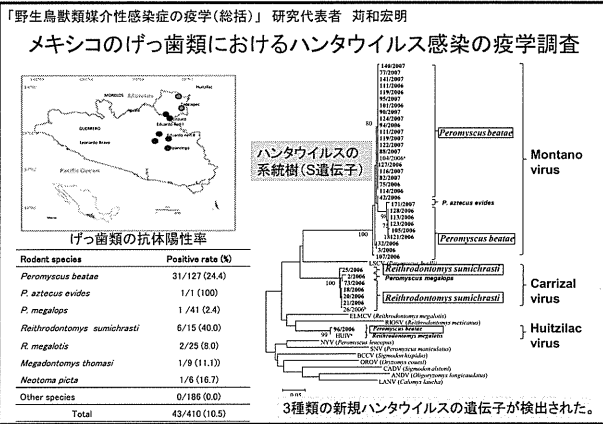
課題番号: H22-新興-一般-009

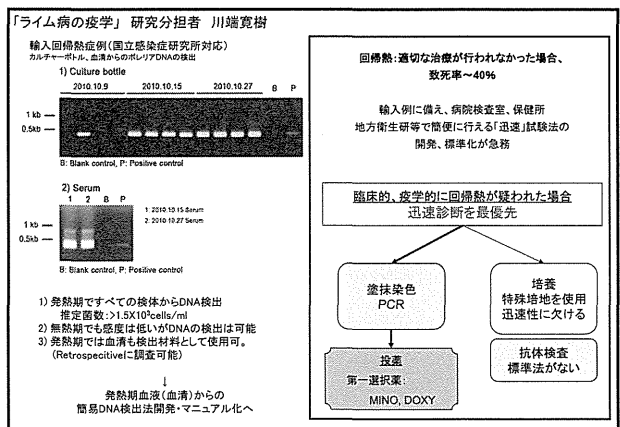
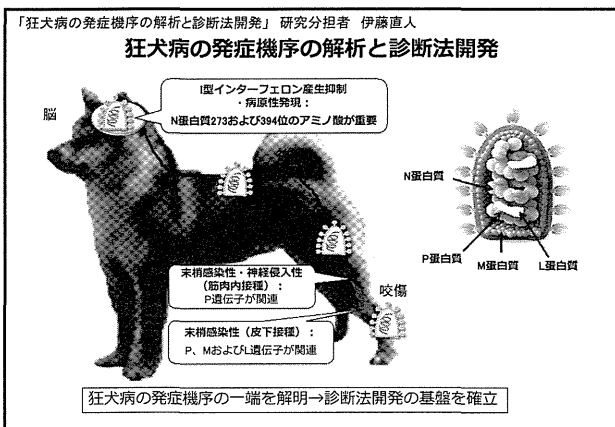
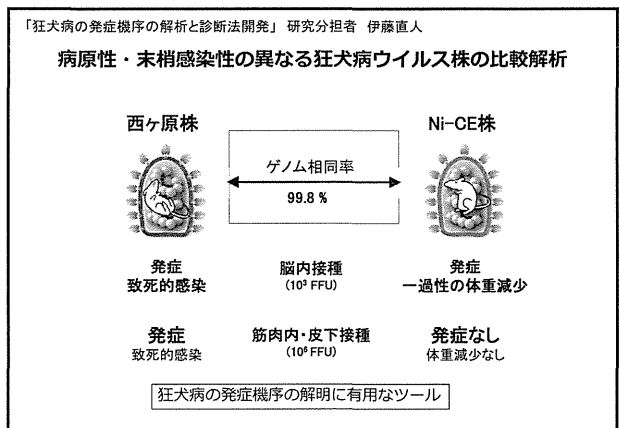
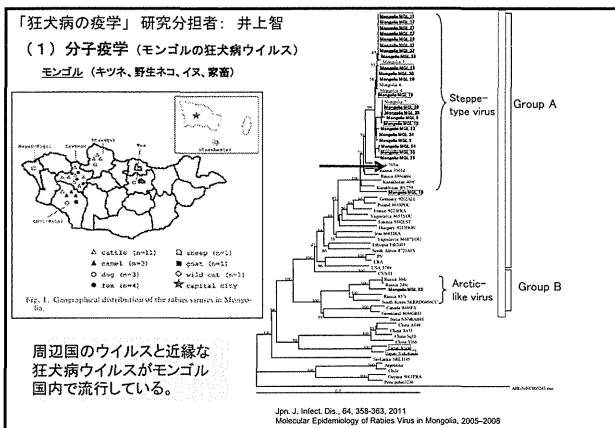
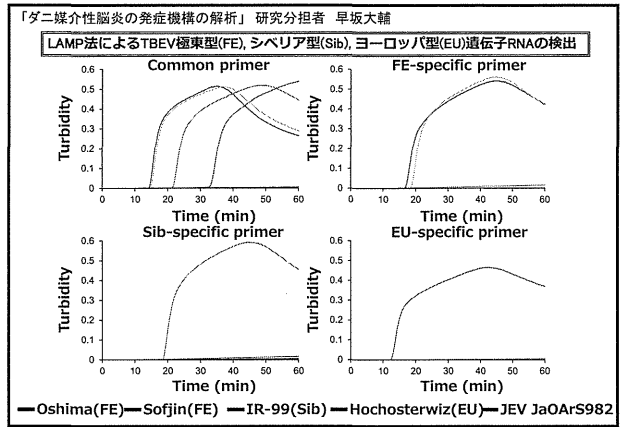
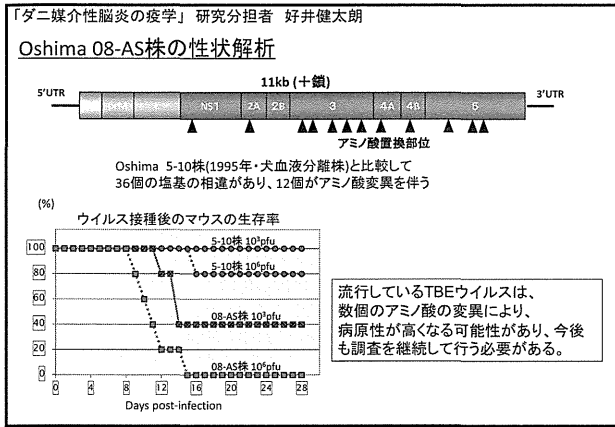
2013年1月24日(国立感染症研究所・第一共用会議室)

北海道大学大学院獣医学研究科
苅和 宏明

研究班の構成

研究者名	所属	担当
〈研究代表者〉		
苅和 宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	野生鳥獣媒介性感染症の疫学(総括)
〈研究分担者〉		
好井 健太郎	北海道大学大学院獣医学研究科	ダニ媒介性脳炎の疫学
有川 二郎	北海道大学大学院医学研究科	ハンタウイルス感染症の疫学と診断法開発
西條 政幸	国立感染症研究所	クリミア・コンゴ出血熱の疫学と診断法開発
井上 智	国立感染症研究所	狂犬病の疫学
伊藤 直人	岐阜大学応用生物科学部	狂犬病の発症機序の解析と診断法開発
丸山 総一	日本大学生物資源科学部獣医学科	ハルトネラ感染症の疫学
林谷 秀樹	東京農工大学大学院農学研究院	サルモネラ感染症の疫学
川端 寛樹	国立感染症研究所	ライム病の疫学
永田 典代	国立感染症研究所	野生鳥獣媒介性感染症の病理学的検索
早坂 大輔	長崎大学熱帯医学研究所	ダニ媒介性脳炎の発症機序の解析





結 論

- 様々な野生鳥獣媒介性人獣共通感染症について、新規診断法や実験感染モデルが開発され、病原体の鋭敏で迅速な検出や病原性解析が可能になった。
- 本研究により、野生鳥獣媒介性感染症の侵入や発生に対応するための具体的な手法の整備が進展した。
- 様々な野生鳥獣媒介性感染症の国内外での流行様式が明らかになった。

平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究

課題番号：H22-新興-一般-010

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：山田章雄

所属研究機関：東京大学

所属部局：大学院農学生命科学研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 52,500,000円 2年目 38,720,000円 3年目 34,422,000円 計 125,642,000円

I. 研究の意義

(1) 新興感染症の大部分は動物しかも野生動物に由来する。家畜の関与も大きい。

(2) 「One Health」理念(人が健康であるためには、人のみならず家畜や野生動物さらには環境全体の健康の維持が不可欠である)の実践が動物由来感染症ひいては新興感染症の制御につながる。

(3) ホリスティックなアプローチによる動物由来感染症の診断、予防、治療等の標準化、基礎的・応用的研究の推進が求められている。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) ホリスティックな観点から動物由来感染症の制御に向けた、基礎的、応用的研究を行う。

(2) 野生動物や家畜との接点の多い、ハイリスクグループにおいてその実態を明らかにする。

(3) 未だ標準化されていない診断法の確立および標準化、さらにはその普及を目指す。

(4) 接種方法の改善が求められている狂犬病ワクチンについて、その接種方法の検討を行うとともに治療法等についても検討する。

(5) わが国における動物由来感染症の実態が明らかになれば対策を講じる上での重要な情報となる。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

(1) 全体の統括と分担研究者個々の実情に合わせたサポートを行った。

・研究分担者(川端寛樹)

(1) ライム病ボレリアの型別法で国際標準法となりつつある Multiple loci sequence typing 法により、臨床分離株を含む国内分離株 93 株についてデータベースを構築するとともに、ヒトへの病原体感染経路を分子疫学的手法により明らかにした。

(2) ライム病ボレリア群の国内浸潤実態を、猟犬を歩哨動物としたサーベイランス手法を開発、実施した。

・研究分担者(岸本壽男)

(1) 家畜の調査：2009～2012年に食肉処理された全国のウシ 525 頭から *Coxiella burnetii* 遺伝子は検出されず、うち 300 頭については抗体陰性であった(残りは現在検証中)。また、日高地方の放牧ウマ 87 頭からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。(2) ペットの調査：全国のネコ 1762 匹の全血からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。(3) 野生動物の調査：ヌートリア 148 頭及び野ネズミ 133 頭からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。(4) 宿主の調査：宿主と目されるマダニ 802 匹からは *C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。(5) 以上から、国内における *C. burnetii* 感染リスクは高くないものと考えられた。

・研究分担者(棚林 清)

(1) 野兎病菌抗体検出競合 ELISA 法を開発し、多様な野生動物で調べたところツキノワグマとタヌキで抗体陽性が検出された。

(2) マウスでの病原性発現に野兎病菌 *pdpC* 遺伝子が強く関与していることを明らかにした。

・研究分担者(今岡浩一)

(1) 各種検査法の感度、特異性を比較し、ICA、IFA、MAT の有用性を示した。また WB が高感度であり抗体価の低い場合も検出できると考えられた。WB 以外の検査法では、低抗体価の感染動物を見逃す可能性があることが明らかとなった。

(2) 国内野生イノシシにおいて、凝集反応でイヌブルセラ菌に対する抗体陽性を示す少数個体が見つかった。遺伝子検出の結果からも、国内野生イノシシの一部がイヌブルセラ菌に感染歴を有すると考えられた。抗体陽性、遺伝子陰性の検体は、WB 法で全て陰性だったことから他のグラム陰性菌との交叉反応によるものと思われた。

(3) WBにより同定したブルセラ特異的抗原のアミノ酸・遺伝子解析を行いオリゴペプチド、およびフルサイズの組換えタンパクを作成した。組換えタンパクを用いたWB法で、イヌ血清では特異性が認められたが、各種グラム陰性菌に対するウサギ免疫血清については十分な特異性は得られなかった。そこで原因を特定するために2D泳動後、WB法を実施したところ、ウサギ血清においては、作成抗原と、ほぼ同サイズの組み換え用大腸菌由来と考えられるタンパクに対する反応が起こっていることが推察された。

・研究分担者(山本明彦)

(1) *C. ulcerans* ヒト5症例の環境調査により、イヌ・ネコ等の動物からヒトへの感染経路を確認した。

(2) イヌ、ネコ、家畜、猟犬、実験用サルまでの *C. ulcerans* 感染や保菌の拡大を確認した。

(3) 我が国で初のヒト分離ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の全ゲノムの解読に成功した。

・研究分担者(柳井徳磨)

(1) 猟犬をセンチネルとした人獣共通感染症の種類と分布に関するモニタリングを実施した。中部地方、島嶼部および半島部、ならびに東北地方において計461例の猟犬における血清疫学調査の結果、ジフテリア毒素陽性例は中部で11/142例、島嶼部では少数散見されたが東北地方では1例のみだった。レプトスピラは流行地に一致して高いLigAに対する抗体価が認められた。ライム病では各地で高い陽性率がみられた。トキソプラズマ抗体は20%~100%と高頻度に検出され、特に沖縄で高い頻度だった。抗ブルセラ抗体は各地で少数例検出された。破傷風抗毒素、野兎病は検出されなかった。

・研究分担者(森嶋康之)

(1) 公共データベース上にあるエキノコックス遺伝子データについて、発現候補領域を検出するための遺伝子予測を行い、その結果にもとづきマイクロアレイ用プローブの設計と選別を行った。

(2) エキノコックス幼虫の人工培養系について成虫型への分化が効率よく誘導されるよう改良した。

(3) 成虫型へ分化誘導したエキノコックス幼虫をマイクロアレイ解析を行って変動遺伝子を抽出し、各処理上位20位までの発現変動を示した遺伝子群についてqRT-PCRにより発現を確認した。

(4) 発現量の大きな遺伝子群の特徴として、成虫型分化の初期段階のそれは細胞接着関連の糖タンパクや上皮成長因子に、分化終了段階のそれは糖や脂質の膜輸送ならびに代謝にそれぞれ関与しているものが抽出されたと考えられた。

・研究分担者(菅沼明彦)

(1) ヒト狂犬病症例に対する治療法に関する文献収集とその検討を行った。

(2) 狂犬病曝露前免疫の曝露後発症予防に対する効果を検討した。

(3) 狂犬病曝露後免疫における接種回数を減じた接種方法の有効性を検討した。

(4) 狂犬病ワクチン皮下接種法の検討を行い、その有効性及び安全性を示した。

(5) ヒト狂犬病報告例、ヒト狂犬病治療法を併せ、ヒト狂犬病資料集としてまとめた。

・研究分担者(井上 智)

(1) 狂犬病対策に必要な飼育犬頭数把握を、国勢調査基本集計を利用した数値補正をペットフード協会の調査に対して行い、世帯数推計による飼育犬推定法を提案することができた。

(2) わが国の土壌から分離される *Bacillus cereus* group についてMLST解析を行い、大きく3クラスターに分類されることを示した。一部の *Bacillus cereus* で溶血反応の弱い株があり、これらは遺伝型が食中毒や敗血症由来の *Bacillus cereus* と非常に近縁であることを明らかにした。

(3) 抗ニパウイルス(NiV) IgM抗体検出ELISAをNiV感染/非感染Vero細胞の不活化抗原を用いて構築し、NiV患者血清および健常者血清を利用して抗NiV IgM抗体の検出が可能であることを示した。

(4) 狂犬病ウイルスの抗-Pタンパク scFv にビオチン化ペプチドを挿入して大腸菌内でビオチン化 scFv の発現に成功した。本 scFv を利用して、二次抗体を使用しない特異性の高い簡易な抗原検出法を確立することが可能になった。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) 本研究では、エゾヤチネズミやアカネズミの増加により、ヒトのライム病感染リスクが上昇する可能性が分子疫学的手法で示された。このことは、過去に我が国で流行したにもかかわらず、現在は稀となっている動物由来感染症についても、生態系の変化により今後大規模な再興感染症となる可能性を秘めている。今後は我が国で過去に流行した感染症について現状を把握するとともに、再流行を惹起する環境要因についてリスク評価を行うことが望ましいと考える。

(2) 北海道地方では *C. burnetii* が侵淫している可能性があるため、継続した調査が必要だが、検査診断を実施できる施設が少ないため、地方衛生研究所等の検査体制ネットワークの構築が必要。

(3) 野兎病菌や類似菌の環境での維持状況や本菌の病原性発現機構についてはさらに調査研究が必要である。

(4) ブルセラ症に関しては抗原用組換えタンパクの交差反応を防ぐため、その作成に大腸菌を用いない発現系を検討する必要がある。また2D泳動を用いて精査することで、より特異性や感度のすぐれた他の抗原部

位を検索する必要がある。それにより、ELISA や ICA など、簡便で信頼性の高い検査法の開発が可能になると考えられる。国内野生イノシシにおいては、イヌブルセラ菌に対する感染歴を示す個体が見つかったものの、家畜ブルセラ菌については、積極的に感染を疑いうる証拠は見つからなかった。今後、さらに、イノシシなど野生動物における抗ブルセラ抗体保有状況調査を継続するか否かは、検討を要すると考える。

(5) *C. diphtheriae* と *C. ulcerans* の確実な鑑別診断法の確立および *C. ulcerans* のヒトでの保菌状況から各世代における罹患リスクを評価する必要がある。*C. ulcerans* の環境中での分布調査を進め、この菌が起こす感染症へのリスクアセスメントを行う。

(6) 猟犬を用いた人獣共通感染症のモニタリングを北海道、関東、九州についても拡大し、全国的な人獣共通感染症のハザードマップを完成する必要がある。

(7) エキノコッカスに関しては GO 解析ならびにパスウェイ解析による変動遺伝子間の相互作用の検討および人工培養系における特定酵素の添加・非添加による各酵素の生理・薬理作用の特定が課題となる。

(8) 狂犬病に関しては、様々なワクチン及び接種法による狂犬病曝露後免疫における4回接種法の有効性について症例を集積し検討を行う。また、提案した飼育犬推定法を「犬猫飼育率全国調査」に適応して実際的な補正効果を検証する必要がある。

(9) 炭疽については土壌から分離された溶血反応の弱い *Bacillus cereus* と食中毒や敗血症の起因菌 (*Bacillus cereus*) との因果関係を明らかにして公衆衛生における危害度を検討・評価する必要がある。また、野外検体を利用した抗ニパウイルス IgM 抗体 ELISA の検出感度を検証・評価するとともに野外検体を利用したビオチン化 scFv によるウイルス抗原の検出感度を検証・評価する必要がある。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 本研究で得られる成績の多くはサーベイランスを中心とする今後の動物由来感染症対策に資するところが大きく、感染症対策行政に貢献すると考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.

(2) Hotta A, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Mizoguchi T, Yamada A. Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses Public Health*. 2012

(3) Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Tanabayashi K. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol*. (印刷中)

(4) Nomura, A., Imaoka, K., Imanishi, H., Shimizu, H., Nagura, F., Maeda, K., Tomino, T., Fujita, Y., Kimura, M. and Stein, G. H. Human *Brucella canis* infection diagnosed by blood culture. *Emerg. Inf. Dis.*, 16(7):1183-1185, 2010

(5) 今岡浩一, 木村昌伸. 日本におけるブルセラ症—感染症法施行前(1999年3月31日)まで—. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 186-187, 2012

(6) Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Hanazato, M., Tobiume, M., Horiuchi, M., Atarashi, R., Nishida, N., Watarai, M., Imaoka, K. and Ohno, H. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol.*, 189:1540-1544, 2012

(7) 今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋. ブルセラ症—ブルセラ症検査マニュアル—2012. in: 病原体検査マニュアル(国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会編), [http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/brucellosis_2012.pdf], 2012

(8) 菅沼 明彦, 高山 直秀, 柳澤 如樹, 西村 昌晃. 狂犬病曝露前免疫の曝露発症予防に対する効果. *感染症学雑誌*. 第84巻. 第4号

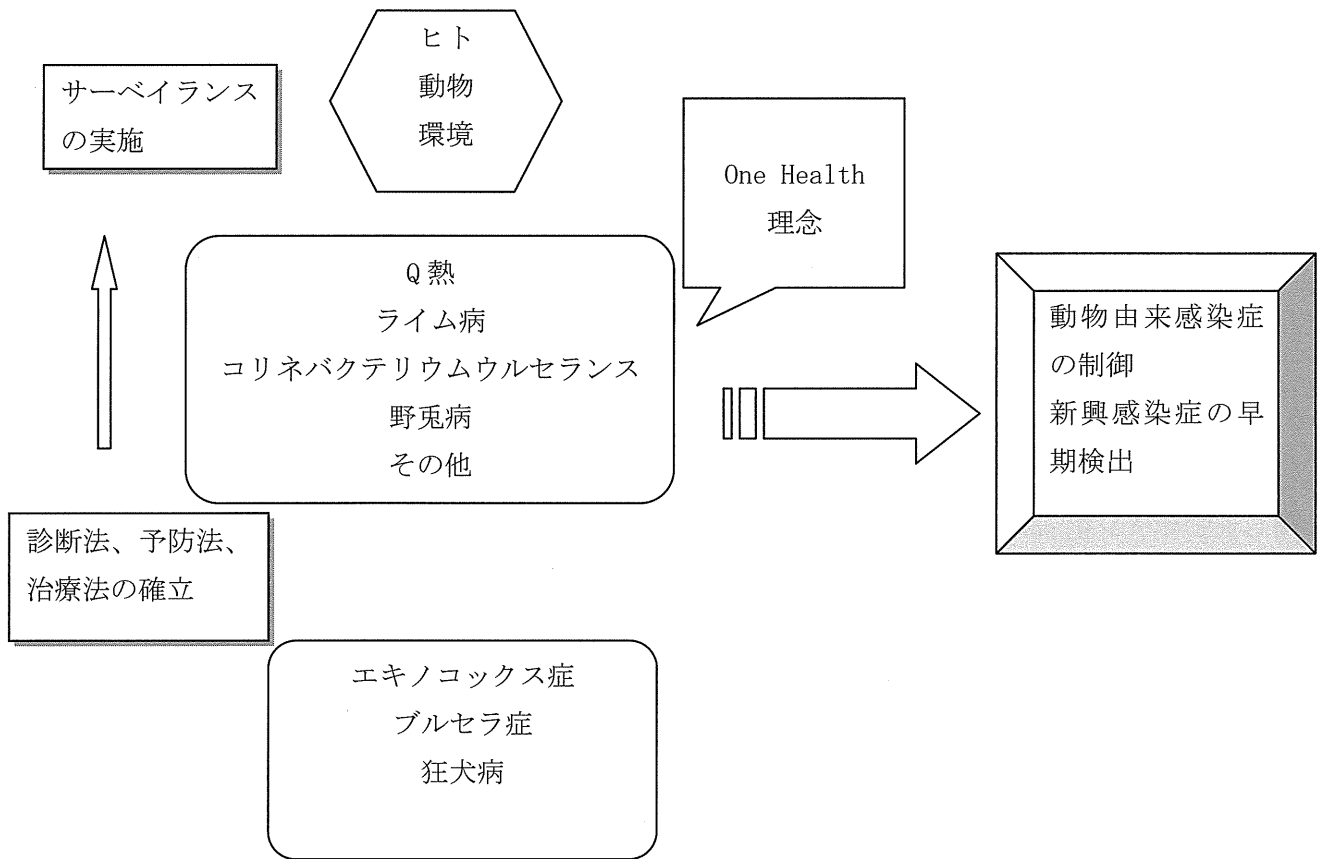
(9) Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. (2010) 10 Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). Transworld Research Network. p143-153.

(10) Okutani A., Sekizuka T., Bazartseren B., Yamada A., Kuroda M., and Inoue S. (2010) Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 72:93-97.

(11) Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, A. G., Barr, A. J., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Broder, C. C., Yamada, A., Inoue, S., and Wang, L. -F. (2012) Antigen capture ELISA system for henipaviruses using polyclonal antibodies obtained by DNA immunization. *Arch. Virol.* 157:1605-1609.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

国立予防衛生研究所

マサチューセッツ大学メディカルセンター

国立感染症研究所

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

伊藤康彦

杉浦昭

Francis A Ennis

・主な研究課題

インフルエンザウイルス感染における細胞性免疫に関する研究

ムンプスウイルスのウイルス学的研究

カニクイザルのクラス IMHC に関する研究

B ウイルス診断法に関する研究

動物由来感染症の診断、病原性に関する研究

・これまでの研究実績

1. Yurie MOTOI, Kozue SATO, Hajime HATTA, Kinjiro MORIMOTO, Satoshi INOUE and Akio YAMADA
Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. Vaccine 23, 3026-3032, 2005.
2. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Keiji Terao, and Akio Yamada.
Identification of MHC Class I B Locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics, 57, 189-197, 2005
3. Yurie MOTOI, Satoshi INOUE, Hajime HATTA, Kozue SATO, Kinjiro MORIMOTO, and Akio YAMADA. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. Jap. J. Infect. Dis.58, 115-118, 2005.
4. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis. 2006 Feb;59(1):46-51.
5. Park CH, Kondo M, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T, Yoshikawa H, Yamada A. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. J Vet Med Sci. 2006 Jun;68(6):589-95
6. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, Kurahashi H, Tanabayashi K, Hotta A, Saito T, Yamada A, Kobayashi M. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Am J Trop Med Hyg. 2006 Aug;75(2):327-332.
7. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis.60 137-139, 2007
8. Akitoyo Hotta, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clinical and Vaccine Immunology, 14, 81-84, 2007.
9. Kozue Hotta, Yurie Motoi, Akiko Okutani, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Satoshi Inoue and Akio Yamada. Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. Microbes and Infection. 9(2):167-74, 2007.
10. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada
Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray Jpn. J. Infect. Dis. 60, 355-361, 2007
11. Masanobu Kimura, Tsutomu Tanikawa, Michio Suzuki, Nobuo Koizumi, Tsuneo Kamiyama, Koichi Imaoka and Akio Yamada Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. 52, 1-7, 2008.
12. Masanobu Kimura, Koichi Imaoka, Michio Suzuki, Tsuneo Kamiyama and Akio Yamada Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci, 70, 707-709, 2008.
13. Yamada A. Emergence and spread of infectious diseases. Global Environ. Res. 12, 3-7, 2008
14. O. Fujita, A. Uda, A. Hotta, A. Okutani, S. Inoue, K. Tanabayashi and A. Yamada Genetic diversity