

## I. 総括研究報告

# 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

研究代表者 荻和宏明

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

**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**

研究代表者	苅和宏明	北海道大学大学院獣医学研究科	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	准教授
	早坂大輔	長崎大学 熱帯医学研究所	助教
	永田典代	国立感染症研究所	室長
	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
	今岡浩一	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

**研究要旨**

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)のウイルスエンベロープ膜蛋白 E をウサギ IgG 抗体の Fc 領域と融合させることで、可溶性が高く、簡便に精製可能な分泌型抗原として発現させた。発現させた蛋白を抗原として、ELISA 法による血清中の抗 TBEV 抗体検出系へと応用した所、中和試験の成績と比較して 90% 以上の高い相関性を示した。マダニ媒介性ウイルスである重症熱性血小板減少症ウイルス(SFTSV)の定量 real-time PCR 法によるウイルス遺伝子検出法を確立した。長崎県で採集したマダニからウイルス遺伝子の検出を試みたが SFTSV およびフレボウイルスの陽性例は確認されなかった。近隣地域からの感染げっ歯類を介して侵入が危惧されるハンタウイルス感染症について、感染げっ歯類を対象とした、多項目同時検出用イムノクロマトグラフィー(Multiplex ICG)による迅速診断を開発した。ハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する 6 種類のモノクローナル抗体について免疫組織化学法における有用性を検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとブーマラウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、3 つの抗体で組織上の両種のウイルス抗原の検出が可能なが判明した。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の代替として BSL2 施設で取扱い可能な CCHFV シュードタイプを開発し、本シュードタイプを用いて CCHF 患者の急性期および回復期の血清を用いて中和抗体価の経時変化を調べたところ、回復期において中和抗体価の有意な上昇が認められた。北海道に生息するモモジロコウモリ(Myotis macrodactylus)の脳検体について、38,986 種類の病原体検出用プローブを搭載した病原体検出用マイクロアレイによるウイルス由来遺伝子の探索を行った。その結果、Human herpesvirus、Influenza A virus、Bat SARS coronavirus 等の遺伝子が検出された。狂犬病ウイルスの末梢神経侵入性の異なる固定毒 2 株(西ヶ原株及び Ni-CE 株)とこれらのキメラウイルスをマウス運動神経細胞の分離培養系を用いて増殖性を解析したところ、いずれの株も、その末梢感染性の違いにかかわらず、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有してい

ることが判明した。すなわち、末梢神経への感染効率ではなく、むしろ筋肉細胞におけるウイルス増殖が上記ウイルス株の末梢感染性の違いに関与することが示唆された。さらに、末梢感染性の高い西ヶ原株の P 遺伝子が筋肉細胞中の IFN 関連遺伝子の発現を抑制する機能を有しているのに対し、末梢感染性の低い Ni-CE 株の P 遺伝子ではこの機能が減弱していることが確認された。以上より、狂犬病ウイルスの末梢感染性には、筋肉細胞における IFN 系の回避が重要であることが示唆された。外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体について、プルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアメガエル、デニスフログからそれぞれ 1 株、計 2 株が分離された。これら、分離株 2 株は、Combinatorial-PCR、多座遺伝子解析(MLSA9)の結果、いずれも新規のプルセラ属菌であった。また、9 座連結による系統樹解析により、今回の分離菌株は、人に感染性があると考えられている *B. inopinata* 近縁の新規プルセラ属菌である可能性が示された。和歌山県で捕獲された 15 頭の野生のニホンザルの 4 頭(26.7%)から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。各個体の血中菌数は 50 ~ 12,000CFU/ml(平均 525CFU/ml)と、高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、ニホンザルは本菌の自然病原巣の一つである可能性が示唆された。東南アジアの環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られ、近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が報告されている類鼻疽(Melioidosis)について、ベトナムならびに沖縄の土壌から類鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)の分離を試みた。その結果、培養法では類鼻疽菌は分離されなかった。

#### 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、診断法の開発や疫学的な解析を行うとともに、動物モデルの開発とそれを用いた病態発現機序の解明を目指している。

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%の致死率を示す致死的な脳炎で、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、国内外において重症熱性血小板減少症、クリミア・コンゴ出血熱、プルセラ症、バルトネラ感染症、および類鼻疽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動物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、本研究では信頼性の高い診断法を開発して野生動物を対象とした疫学調査を実施することにより、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。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) E-Fc 蛋白の作製

1995 年に犬の血液より分離された TBEV の Oshima 5-10 株の prM 蛋白及び E 蛋白の細胞外領域(1-449 アミノ酸)をコードする遺伝子領

域を pCAGGS プラスミドにクローニングし、さらに発現蛋白の C 末端領域にウサギ IgG 抗体の Fc 領域が融合するように発現プラスミド ( pCAGprME449-Fc ) を構築した。pCAGprME449-Fc を 293T 細胞にトランスフェクトすることにより、E-Fc を発現させ、培養上清へと分泌させ回収した。

## 2) E-Fc を抗原とした ELISA (E-Fc ELISA) の構築

ELISA 用 96 穴プレートに抗ウサギ IgG 抗体をコーティングし、E-Fc を捕捉した。その後、被験血清を反応させ、被験動物種に対応したペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を反応させた。酵素活性を OPD 試薬を用いて測定し、陰性対象との測定値との比を基準に抗体価の判定を行った。

## 重症熱性血小板減少症

### 1) Real-time RT-PCR の開発

日本で分離された SFTSV の L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するようにプライマーを設計した (SFTS\_QPCR\_965: GCR AGG AGC AAC AAR CAA ACA TC、SFTS\_QPCR\_1069R: GCC TGA GTC GGT CTT GAT GTC、プローブ配列: 5'-/56-FAM/CT CCC RCC C/ZEN/T GGC TAC CAAAGC /3IABkFQ/-3')。Real-time RT-PCR 反応は One Step PrimeScript® RT-PCR kit (TAKARA BIO) を用いて行った。定量評価には、SFTSV L セグメント cDNA をクローニングしたプラスミドベクターから T7 RNA ポリメラーゼ反応により得られた RNA を用いた。

### 2) SFTSV の感染実験

SFTSV (NagH2013-1 株) を Vero E6 細胞に感染させ回収した上清をウイルスストック液として用いた。ウイルスストック液を段階希釈し、12 well および 24 well プレートで培養した Vero E6 細胞に 10 µl/well、1 希釈につき 3 well ずつ接種して、5 - 6 日間培養後上清中の SFTSV を確認した。また、同量を生後 2 - 3 日の IFNAR KO マウス 2 匹ずつに脳内接種し、マウ

スの発症、生死を確認した。致死マウスについては脳を採取し SFTSV 感染を確認した。

### 3) マダニの採集とウイルスの検出

5 月から 11 月にかけて長崎県各地 (長崎市、諫早市、島原市、対馬市、五島市) およびベトナム (カッティエン、カットバ島) でマダニを採集し種を同定した。採集したマダニ 1 - 30 匹を 1 プールにして、乳化し、遠心後上清を回収した。回収液より Isogen-LS を用いて RNA を抽出し遺伝子検出に用いた。また、回収液を Vero E6 細胞に接種し 5 - 6 日間培養後、上清をさらに別の Vero E6 細胞に接種、培養しウイルス分離を試みた。ウイルス分離の確認は、上清から RNA を抽出し SFTSV 特異的およびフレボウイルス共通プライマー (Matsuno K, et al. JVI 2013. doi: 10.1128/JVI.02845-12) を用いて Real-time RT-PCR および RT-PCR により確認した。

## ハンタウイルス感染症:

### 1) Multiplex イムノクロマトグラフィー (ICG) の開発

病原性ハンタウイルス感染をスクリーニングするために、抗原として HTNV, PUUV, ANDV の 3 種類を使用することとした。抗原性の強いウイルス構成タンパクとして核タンパク (N) の N 末端部位 103 アミノ酸を抗原として選択した。これを HTNV, PUUV, ANDV の 3 種類について大腸菌ベクターを用いて作成した。また、これらの抗原に結合する抗体を迅速に診断するために、ストリップ上に複数の抗原ラインを塗布した、Multiplex ICG を選択した。さらに、それぞれの宿主の免疫グロブリンを検出するために、各種二次抗体および Protein A を比較検討し、最適なストリップを作成することを試みた。SEOV をラットあるいはマウスに接種した実験感染抗血清、HTNV あるいは PUUV をマウスに接種した実験感染抗血清を用いて ICG ストリップの作成と評価を行った。

### 2) 抗ハンタウイルスモノクローナル抗体の免疫組織化学法への応用

ハンタウイルスのヌクレオカプシドタンパクに対する6種類のモノクローナル抗体 (Saasa et al., Virology 2012 428:48-57) と、1つの市販モノクローナル抗体A1C5、すでにホルマリン固定パラフィン包埋組織上の抗原検出が可能であることが判明しているハイブリドーマ細胞上清由来のモノクローナル抗体E5G6 (Okumura et al., Clin. Vaccine Immunol. 2007 14:173-181) およびウサギポリクローナル抗体NP700を免疫組織化学法に用いた。ハムスター正常肺組織、プーマウイルス感染ハムスター肺組織、ハンタウイルス感染マウス肺組織を染色する標本として用いた。

### クリミア・コンゴ出血熱

#### 1) シュードタイプの作製

CCHFV IbAr10200株由来の糖タンパク質(GP)遺伝子の相補的DNA(cDNA)を蛋白質発現用プラスミドに挿入し、293T細胞に形質導入することによりCCHFVのGPを発現させた。シュードタイプであるpVSV-CCHFV-GPはレポーターとしてルシフェラーゼを有し、水疱性口炎ウイルスVSVをベースとした増殖能欠損型を用いて作製した(Takada et al., PNAS, 1997)。

#### 2) CCHF患者血清

患者血清として、中国新疆ウイグル自治区のCCHF患者の経時血清(発熱日をDay 0としDay 1, Day 5, Day 9に採取されたもの)を用いた。これらの血清は組換えN蛋白質を用いたELISAにより、CCHFVに対するIgGおよびIgMの上昇が既に確認された血清である(Tang et al., Clin Diagn Lab Immunol, 2003)。患者血清を最終希釈1:20でpVSV-CCHFV-GPと混合し、一定時間後VeroE6細胞に接種した。20時間後、基質を加えて発光度をルミノメーターで測定した。先行研究の成績から、患者血清を加えなかった場合の39%以下に発光度が低下した場合を中和抗体陽性と判定した。中和抗体が陽性であった場合は、血清を更に2倍階段希釈し中和抗体価を求めた。

### 狂犬病:

#### 1) コウモリ検体からの病原体遺伝子検出

コウモリの捕獲と検体採取:北海道オホーツク総合振興局から管内斜里郡斜里町に生息しているモモジロコウモリ(Myotis macrodactylus)について学術研究目的での捕獲・補殺許可(鳥獣の捕獲等又は鳥類の卵の採取等許可通知書)を得て許可 10 頭について補殺を行った。コウモリは安楽殺後に性別、体重、頭胴長、尾長、耳介幅等を記録して、頭骨を切開しない方法によって採取した脳組織を RNAlater (Life technologies) の入ったサンプルチューブで保存した。

なお、本研究は捕獲区域で道コウモリの調査を長年行っている専門家を加えた共同研究の一環として行っており、捕獲したモモジロコウモリは普通種であり 10 頭を捕獲しても生態系に影響が無いことを確認している。

病原体検出用マイクロアレイ:本研究では、ウイルス 80 属 147 種 672 株、細菌 151 属 276 種 422 株、真菌 25 属 49 種 59 株、古細菌 23 属 30 種 30 株、その他 7 属 7 種 9 株、毒素 74 遺伝子を標的とした病原体検出用マイクロアレイ(38,986 種類のプローブ)を使用しており、このマイクロアレイスライドを MMPDA と呼んでいる(図1)。ゲノムプロジェクトが終了している又は進行中を含む古細菌 30 株、原虫 9 株、細菌 422 株、ウイルス 672 株の合計 1133 株の全長ゲノム配列又は一部の塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 又は NCBI (National Center for Biotechnology Information) からダウンロードして、得られた塩基配列を Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) に読み込んでアクセッション No. ごとに 10~500 種類のセンス鎖マイクロアレイプローブを設計した。総計 5 万を超える全てのセンス鎖プローブ候補は ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST 検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ 19,493 種類のセンス鎖プローブを選定し、そのアンチセンス鎖プローブと

の合計 38,986 種類のプローブをマイクロアレイに搭載した。このマイクロアレイはアジレント社 (Agilent Technologies, Santa. Clara, CA) に製造委託した。

**核酸抽出:** コウモリから採取した脳サンプルは、1/4 inch Ceramic Sphere (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) および Garnet Matrix A Bulk (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) を入れた 2.0 ml チューブに移した後、mini bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) を用いて破碎処理を行った。破碎したサンプルは、SepaGene (SankoJunyaku Co., Tokyo, Japan) を用いて DNA 及び RNA を含む核酸溶液を抽出した。抽出したサンプルから核酸 10 µg を新しいチューブへ移し、超音波破碎機で断片化処理を 5 分間行った。

**核酸蛍光標識とハイブリダイゼーション:** 断片化処理済サンプルは、ULYSIS® Alexa Fluor® 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes Inc. Eugene, OR) で蛍光標識後、エタノール沈澱し水に溶解し NanoDrop で核酸濃度を測定した。3 µg の蛍光標識済核酸を 100 µl のハイブリ緩衝液 (6× SSC, 5× Denhardt's solution, 50 mM sodium phosphate, 0.5% SDS, 20% formamide, 5% Skim milk, 50 µg/ml Yeast tRNA) に溶解した。これらのサンプルは、病原体検出用マイクロアレイと 50 18 時間ハイブリさせ、50 0.5% SDS を含む 6× SSC 5 分間、50 1× SSC 5 分間を 2 回、室温 ミリ Q 水で 10 秒間洗浄した。マイクロアレイは、DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa. Clara, CA) でスキャンし、各病原体スポットの蛍光強度は Feature Extraction Software で取得した。

**病原体検出用マイクロアレイ解析:** 各病原体の蛍光強度が記されたテキストファイルは、Gene Array Utility ソフトウェア (Symplus, Tokyo, Japan) で読み込んだ後、同ソフトで病原体検出解析を行った。本研究において、GenBank アクセション毎の蛍光強度中央値が、3 条件 (マイクロアレイ全体のバックグラウンド蛍光強

度の 2.5 倍以上、p 値が 0.001 以下、z 値が 3.5 以上) を満たした場合、該当する GenBank アクセションの病原体が陽性と判定した

## 2) マウス運動神経細胞の初代培養系の作製

マウス運動神経細胞の分離培養系は、以下のように作製した。まず、ICR マウスの子宮より摘出した 13 日目胚から脊髄を採取し、背根部を除去したものをトリプシン処理することで運動神経細胞を得た。これらの神経細胞を、ポリジメチルシロキサンを用いて作製したマイクロ流体プラットフォームの細胞体側の太流路内に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞を培養した。培養 5 日目に細流路に入り込んだ軸索が、その末端を反対側の太流路内に伸長していることを確認した後に、以下の実験に使用した。

## 3) マウス運動神経細胞への狂犬病ウイルスの感染

CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能を比較する目的で、上記の方法で作製した分離培養系の軸索末端側のウェルに GFP 遺伝子組換え CE(NiP)株あるいは Ni-CE 株 [それぞれ CE(NiP)-GFP 株、Ni-CE-GFP 株] を接種した。ウイルス接種 24、36 および 48 時間後に、蛍光顕微鏡下で神経細胞体における GFP シグナルを観察し、撮影した。撮影された画像に基づき、細胞体側の太流路における GFP 陽性細胞の割合を算出した。

## 4) マウス筋肉由来細胞への狂犬病ウイルスの感染

西ヶ原株、CE(NiP)株及び Ni-CE 株に感染した筋肉細胞における IFN 関連遺伝子の発現量を比較する目的で、マウス骨格筋由来 G-8 細胞及び C2C12 細胞に各株を moi=1 にて接種した。接種 24 時間後に、感染細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) により各種 IFN 関連遺伝子 (Ifn-、Mx1 及び Oas1) の定量を行った。なお、Gapdh 遺伝子についても定量を行

い、内在性コントロールとして使用した。

## ブルセラ症

国内 2 カ所の両生類飼育施設で発生した、黒色真菌症のアウトブレイク時に採取された外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体の臓器サンプル 32 検体を用いた。検体は、ビードピーターで粉碎後、一部を菌分離に使用し、残りのサンプルから DNA を抽出した。ブルセラ特異的遺伝子検出は、ブルセラ症の原因となる家畜ブルセラ菌 3 種とイヌブルセラ菌 1 種、計 4 種を簡易的に識別可能な Combinatorial-PCR 法を実施した。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプリメント添加 20%ウマ血清入り ATCC488 プロスで培養、適宜、BHI プレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR 法により確認した。さらに分離株については多座遺伝子解析 (MLSA9) による同定を行った。本法は、4 種の家畜ブルセラ菌、*B. canis*、*B. neotomae*、および Marine Brucella を 1~27 のシーケンスタイプ (ST) に識別し菌種と生物型を決定することができる。また、これら 9 座合計 4396bp の配列を用いて系統樹解析を行い、分離株のブルセラ属中での系統発生上の位置を確認した。

## バルトネラ感染症

2012 年 6 月~2013 年 7 月の間に、和歌山県で捕獲された野生ニホンザル 15 頭から血液を採取した。サル血液 100 $\mu$ l を 5% 兎血液加チョコレート寒天培地に塗抹し、35 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニーを数え、血中菌数を測定した。分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性 (陰性) から *Bartonella* 属菌と推定した。分離された *Bartonella* 属菌から無作為に 3 株を選択し、2 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*gltA* および *rpoB*) と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域 (ITS) の塩基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに、菌種同

定された 3 株から代表の 1 株を選択し、9 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*) を用いた Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法によって得られた配列から遺伝子型 (Sequence Type: ST) を決定した。さらに、ニホンザル分離株 (4 株) と既報のアカゲザル (37 株)、カニクイザル (16 株) およびヒト分離株 (16 株) の塩基配列から、各 ST タイプの 9 遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

## 類鼻疽

### 1. ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離

#### 1) 供試検体

供試検体として、2013 年 5 月と 11 月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 40 検体ならびに 11 月に沖縄中部で採取した畑の表土 20 検体、計 60 検体を用いた。

#### 2) 類鼻疽菌の分離・同定

供試検体 10g を、5 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) とよく混和し、その上清を Ashdown's Medium 寒天培地に接種し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取については、あらかじめインフォームドコンセントが得られている。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問題ない。病原体を用いる感染実験は病原体のリスク分類に応じた封じ込め実験室内で実施された。本研究で研究対象となった野生動物は、いずれも管理捕獲によって捕獲された個体か、あらかじめ所管官庁から捕獲許可を得て捕獲された個体である。

## C. 研究結果

### ダニ媒介性脳炎

pCAGprME449-Fc をトランスフェクトした 293T 細胞では E-Fc 蛋白が発現し、培養上清へも十分な量が分泌していることが確認された。また細胞内では E 蛋白に対するシャペロン様活性を持つ prM 蛋白との相互作用も確認され、発現・分泌した E-Fc 蛋白は本来の E 蛋白と同様の性状を保持していることが示唆された。

E-Fc 蛋白を抗原として用いた E-Fc ELISA による抗 TBEV 抗体の検出法への応用を試み、TBEV の感染が疑われた野鼠及びヒトの血清を使用して中和試験との成績比較を行った。その結果、TBEV 流行巣で捕獲された 66 検体の野鼠血清を調べたところ、E-Fc ELISA は中和試験の成績と比較して敏感度 90.6%、特異度 91.2%を示した。また、96 検体の TBE が疑われた患者血清を調べたところ、中和試験で TBE と診断された 85 検体の内、83 検体 (97.6%) が E-Fc ELISA により陽性と判定された。さらに JE 患者血清 10 検体を用いて交差反応性を調べた所、全て TBE 陰性と判定され、交差反応性は示さなかった。

これらの成績より、今回開発した E-Fc ELISA は TBEV 特異抗体を検出する血清診断において非常に有効であることが示された。

### 重症熱性血小板減少症

SFTSV L セグメント特異的 Real-time RT-PCR により、 $10^1$  RNA copies 以上の SFTSV RNA 遺伝子の検出が可能であった。

2) SFTSV 段階希釈液  $10 \mu\text{l}$  中の SFTSV 遺伝子 RNA を上記 Real-time RT-PCR にて検出した結果、 $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上の希釈液で検出が可能であった。

また、Vero E6 細胞への接種によるウイルス分離では、12 well、24 well プレートともに  $2 \times 10^1$  RNA copies 量以上の接種でウイルス増殖が確認された。一方、IFNAR KO マウス脳内接種によるウイルス分離では、 $2 \times 10^{-1}$  RNA copies 量以上の接種でマウスが死に、脳から

SFTSV が分離された。

長崎県において約 5000 匹のマダニを採集した。そのうち成虫についてはフタゲチマダニ (70.6%)、タカサゴチマダニ (10.2%)、キチマダニ (0.92%)、ヤマアラシチマダニ (2.23%)、オオトゲチマダニ (0.26%)、タカサゴキララマダニ (0.52%)、その他分類未同定のチマダニ属 (15%) およびマダニ属 (0.13%)、若虫についてはフタゲチマダニ (36.1%)、タカサゴチマダニ (10.4%)、キチマダニ (0.53%)、ヤマアラシチマダニ (0.61%)、オオトゲチマダニ (1.64%)、タカサゴキララマダニ (3.32%)、その他分類未同定のチマダニ属 (47.3%) およびマダニ属 (0.08%) が採集された。ベトナムにおいてはイノシシカクマダニ成虫、チマダニ属成虫・若虫、ウシに寄生していたオウシマダニ、イヌに寄生していたクリイロコイタマダニが採集された。

長崎県で採集されたマダニのうち、1684 匹を 487 プールにわけて SFTSV およびフレボウイルス遺伝子検出を試みたがすべて陰性であった。また、Vero E6 細胞に接種後回収した上清中からも SFTSV およびフレボウイルス遺伝子は検出されなかった。

### ハンタウイルス感染症

ヨーロッパ、アジアでは SEOV、HTNV 等のネズミ亜科のげっ歯類およびハタネズミ亜科のげっ歯類の媒介する PUUV とその近縁ウイルスが存在するため、これらのウイルスに対する抗体を検出することが必要である。そこで HTNV、PUUV の抗原を塗布した Multiplex ICG を作成した。Multiplex ICG は、まず実験感染血清を用いて評価した。抗ラット二次抗体を使用した場合、SEOV 実験感染ラット血清 4 例は HTNV 抗原のみに反応した。また HTNV 実験感染マウス血清 2 例は Protein A でも抗マウス二次抗体同様の反応を示したが、抗マウス二次抗体の方が強い反応を示した。PUUV 実験感染マウス血清 2 例は、Protein A および抗マウス二次抗体を使用した場合に PUUV 抗原のみに反応した。一方、非感染マウス血清では



いずれの場合もラインは観察されなかった。

ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマウイルス感染動物組織標本を用いて検索した結果、6種類の新規モノクローナル抗体のうち3つの抗体で組織上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。

### クリミア・コンゴ出血熱

血清無添加時の pVSV-CCHFV-GP の感染を 100%とした場合、血清添加時(希釈は 1:20)の感染相対値は経時的に低下し、Day 5 および Day 9 の血清で中和抗体陽性を示した。各血清を更に 2 倍階段希釈し、再度抗体価を測定した結果、中和抗体価も経時的に上昇し、急性期陰性であったものが Day 9 には 160 倍まで上昇した。

### 狂犬病

#### コウモリ検体からの病原体遺伝子検出

Feature Extraction によって出力されたデータテキストファイルは、Gene Array Utility version 080131 (GAU; Symplus, Tokyo, Japan) に読み込み各種解析を行った。データはアクセッション No. 毎にまとめ、さらにセンスまたはアンチセンス鎖に細分し『群』とした。群内のシグナル平均値および中央値を算出し、シグナル蛍光強度中央値の高い順に該当候補として順位を付けた。『標的スポット群』と『全スポットから標的スポットを除いた群』を形成するシグナル蛍光強度の分散状態が、統計学的有意差が観察されるか見極めるため、有意水準 ( $\alpha$ ) = 0.001 で p 値を算出した。p 値は 0.001 よりも小さい値であるとき、Z 値は 3.09 より大きい値であったとき帰無仮説が棄却できることとした。

MMDPA のシグナル平均値が 200 を越えた遺伝子プローブを持つ個体は 10 頭中 7 頭であったが、リッサウイルス属に関係する遺伝子は検出されなかった。しかし、Human herpesvirus、Influenza A virus、Bat SARS coronavirus 等の

遺伝子が一部のコウモリから検出された。

#### 培養細胞における狂犬病ウイルスの感染性の解析

軸索末端からの神経細胞へのウイルス感染能を検討する目的で、Ni-CE-GFP 株または CE(NiP)-GFP 株を神経細胞の軸索末端に接種し、GFP シグナルを観察した。その結果、いずれの株を接種した神経細胞においても、その細胞体で明瞭な GFP シグナルが観察された。Ni-CE 株は CE(NiP)株と同様、軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが示され、その能力に顕著な差がないことが示唆された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株感染 G-8 細胞における Ifn- $\gamma$  遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く ( $p < 0.05$ )、それぞれ約 1/47 及び 1/10 であった。また、各株感染 C2C12 細胞における Ifn- $\gamma$  遺伝子の発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ )。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 産生を抑制することが示された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた G-8 細胞における Mx1 遺伝子の発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低く ( $p < 0.05$ )、それぞれ約 1/74 及び 1/14 であった。また、各株感染 G-8 細胞における Oas1 遺伝子発現量についても同様に、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染細胞における発現量は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ )。以上より、西ヶ原株及び CE(NiP)株は、感染筋肉細胞において、Ni-CE 株よりも効率良く IFN 誘導遺伝子の発現を抑制することが示された。

### ブルセラ症

Combinatorial-PCRの結果、検体番号10-4、10-5(イエアメガエル)、14-1(デニスフロッグ)が複数のプライマーセットで、検体番号11-5(

種不明)が、BCSP31プライマーのみで、それぞれ陽性を示した。

検体番号10-5(イエアメガエル、大腿骨・骨髄)、14-1(デニスフロッグ、肝臓)から、各1株、計2株の菌が分離された。分離株はプルセラ特異的PCR陽性であり、2株ともに *B. suis*、*B. neotomae*と同様の陽性パターンを示したことから、分離された株は、プルセラ属菌であると判断された。

無尾類より分離された2株に既知の無尾類分離株2株(2012)の配列データを加えMLSA9によるタイピングを行った。その結果、今回の無尾類分離株2株は互いに全く同じパターンを示し、既知のSTのいずれとも異なっており、*B. inopinata*、*B. microti*および既知の無尾類分離株に近縁の新規のプルセラ属菌であると考えられた。また、9遺伝子座のシーケンス(計4396bp)による系統樹解析でも同様の成績が得られた。

## バルトネラ感染症

今回捕獲したニホンザルの26.7%(4/15)から *Bartonella*属菌が分離され、分離株の細菌学的性状ならびに遺伝子性状から全て *B. quintana*と同定された。また、各個体の血中菌数は50~12,000CFU/ml(平均525CFU/ml)であった。ニホンザル分離株の *gltA*、*rpoB*ならびにITSの塩基配列は、中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11株と同一であるか、または非常に高い相同性(99.0%)を示した。MLST法では、分離株はいずれも新規のST22に型別され、連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した4つのクラスターを形成した。

## 類鼻疽

### 1.ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離結果

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土40検体ならびに沖縄で採取した畑の土

20検体から、培養法により類鼻疽菌の分離を行ったが、いずれの検体からも分離されなかった。

## D. 考察

### ダニ媒介性脳炎

フラビウイルスのE蛋白は免疫原性が高く、診断用抗原として有用であることは以前の研究からも示されていたが、分泌したE蛋白を効率よく精製し、使用するにはこれまで煩雑な作業が必要であった。本研究ではこの点を解決するため、TBEVのE蛋白の細胞膜貫通領域をIgG抗体のFc領域に置き換えて、シャペロン様活性を持つprM蛋白と共に発現させることで、本来の性状を保ったままE蛋白を培養上清に分泌させ、簡便に精製できるようにした。

発現・分泌したE-Fcを使用したELISAは中和試験の成績と非常に高い相関性を示し、かつ他のフラビウイルス感染との交差反応も示さなかった。TBEV流行地域の一部には同じフラビウイルスである日本脳炎血清型群のウイルスの流行が報告されている地域もあるため、両者の鑑別にも使用できると考えられる。

### 重症熱性血小板減少症

SFTSV遺伝子の特異的に検出できるReal-time PCR法を確立した。SFTS Real-time PCRによる遺伝子検出、Vero E6細胞によるウイルス分離では、ともに $2 \times 10^1$  RNA copies量以上のサンプル液からウイルス検出が確認され、両者の感度は同程度であった。また、IFNAR KOマウスの脳内接種では、さらに少ないウイルス量でウイルス分離ができることを確認した。

長崎県の各地において数種類のマダニが約5000匹採集された。長崎県全体ではフタゲチマダニが最も多く採集されたが、マダニ種の割合は地区によって異なっていた。ベトナムにおいても数種類のマダニが採集されたが、採集数が少なかったため、今後さらに採集を試みる予定である。

長崎県で採集されたマダニから SFTSV およびフレボウイルスは検出されなかった。SFTSV 患者の居住周辺地域で採集したマダニからも SFTSV 検出は確認されなかった。この理由として、野外に生息するマダニにおいて、SFTSV 陽性率が低い、もしくはマダニ中の SFTSV 量が低いことが考えられた。また、Real-time PCR およびウイルス分離において、マダニ抽出物が阻害反応を起こしている可能性も考えられた。今後、より感度の高い IFNAR KO マウスの脳内接種によりウイルス分離を試みる予定である。

### ハンタウイルス感染症

ヨーロッパおよびアジアで必要とされる宿主げっ歯類摘発用のハンタウイルス multiplex ICG の試作が完了した。今後、使用例を増やして有用性を評価する必要がある。また、アフリカおよび南北アメリカ大陸についても、二次抗体等の検出用試薬の検討を進めてゆくことが必要である。

新規に作出されたハンタウイルスのヌクレオキャプシドに対する 6 つのモノクローナル抗体について、ホルマリン固定パラフィン包埋で作製されたハンタウイルスとプーマウイルス感染動物組織標本を用いて抗原検索を行った結果、このうちの 3 つの抗体で組織標本上の両種のウイルス抗原の検出ができることが判明した。今後は、同じブニヤウイルス科に属する病原性ウイルスや、急性呼吸器感染症の原因となるインフルエンザウイルス、コロナウイルス等との交差反応の有無を評価する必要がある。

### クリミア・コンゴ出血熱

本研究に用いられた患者血清(発症後 Day 1, Day 5, Day 9)は CCHF の急性期から回復期にかけてのもので、この間に CCHFV 遺伝子が消滅し組換え N 蛋白質に対する IgG および IgM 抗体価が上昇することが確かめられている検体である(Tang et al., Clin Diagn Lab Immunol,

2003)。回復に伴い、これらの血清では CCHFV に対する中和抗体価も上昇していることが予想された。この一連の経時血清の pVSV-CCHFV-GP に対する中和抗体価は上昇(検出限界以下から陽転,更に上昇)していることが判明した。感染性 CCHFV を用いて中和抗体を解析していないものの、CCHFV に対する中和抗体価を反映したものであろうことは間違いない。pVSV-CCHFV-GP を用いた中和抗体(価)測定法は CCHFV に対する中和抗体(価)測定の代替法となりうることが証明された。本法は CCHF の診断に有用である。また、血清疫学調査にも有用と考えられる。本法は“中和抗体”の測定を行うものであるため、日本近隣からの CCHFV の侵入を検出するための特異性の高い優れた検出手法であると考えられる。既に確立されている IgG-ELISA、IgM-capture ELISA、IFA と本法を組み合わせることにより、BSL2 で遂行可能な精度の高い CCHF の実験室診断が可能となった。

### 狂犬病

病原体検出用マイクロアレイによってリッサウイルスの遺伝子は検出されなかったが、調査が行われていない地域や宿主から病原微生物を検出する場合は塩基配列の変異が予想されるためウイルス株間でみられる標的遺伝子の変異を区別せず検出可能なマイクロアレイ法は大変有用であると考えられた。

また、ウイルスのみでなく、細菌、真菌類を含めて多くの標的遺伝子が検出できることは想定されていない病原体についても検出が可能になるためより網羅的な発生予測・被害推計を行えると考えられた。

今回、捕獲された 10 個体から検出された病原体の遺伝子プローブについては、ウイルス分離等を念頭に置いた詳細な調査が必要ではあるが、異なる個体から頻度高く検出された Human herpesvirus 6B と Influenza A virus がモジロコウモリに特異的なものであるのか大変に興味深い。特に、2 個体で検出された Bat

coronavirus についてはコウモリが SARS coronavirus の宿主であることを示唆する報告もあり、大変興味深い成績であった。

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、そのほとんどがコウモリを自然宿主にしているが、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離されている。

強い末梢感染性を有する西ヶ原株及び CE(NiP)株が、弱い末梢感染性を有する Ni-CE 株よりも効率よく筋肉細胞で増殖することが最近明らかになった。このことは、西ヶ原株 P 蛋白質が筋肉細胞におけるウイルス増殖に重要であることを示すと同時に、そのウイルス増殖が末梢神経の感染を成立させる上で重要な役割を担っていることを示唆している。一方で、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からのウイルス感染を直接的に促進している可能性も挙げられる。しかし、狂犬病ウイルスの粒子構造、ならびに末梢神経への本ウイルスの侵入及び軸索輸送の機序を考慮した場合、この可能性は極めて低いことが予想された。すなわち、狂犬病ウイルス P 蛋白質は、ヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子の内部に位置している。一方、狂犬病ウイルスはヌクレオカプシドではなくウイルス粒子として軸索輸送される (Klingen et al., J. Virol. 2008)。理論上、軸索末端からのウイルスの侵入及び軸索輸送の過程で、P 蛋白質がウイルス粒子の外側に露出されることはないと考えられるため、上記の過程において P 蛋白質が末梢神経の感染に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

この点を実験的に検証するため、本研究では、マウス運動神経細胞の分離培養系を用いて、CE(NiP)株及び Ni-CE 株の軸索末端からの感染能力を比較した。その結果、上記の予想

と一致して、両株とも軸索末端から神経細胞に感染する能力を有していることが確認された。以上より、西ヶ原株 P 蛋白質が軸索末端からの神経細胞の感染を直接的に促進しているのではなく、筋肉におけるウイルス増殖を促進した結果、間接的に末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

西ヶ原株及び CE(NiP)株に感染した培養筋肉細胞では、Ni-CE 株感染細胞よりも Ifn- $\beta$  遺伝子の発現量が低いことが明らかとなった。これと一致して、IFN によって発現誘導されることが知られる Mx1 及び Oas1 遺伝子でも同様の結果が得られた。狂犬病ウイルスの P 蛋白質は、IRF-3 のリン酸化を阻害することにより IFN の誘導を阻害することが知られていることから (Brzózka et al. J Virol. 2005)、西ヶ原株 P 蛋白質とは対照的に、Ni-CE 株 P 蛋白質が筋肉における IRF-3 阻害能を欠落している可能性が考えられた。

## ブルセラ症

外国産および在来種の無尾類 5 種 14 個体の生体サンプル 32 検体について、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施したところ、イエアメガエル、デニスフロッグからのそれぞれ 1 株、計 2 株が分離され、特異的 PCR によりブルセラ属菌と判定された。

さらに、多座遺伝子解析 (MLSA9) の結果、分離株 2 株は互いに全く同じパターンを示したものの、既に知られている 1-27 のシーケンスタイプ (ST) のいずれとも一致しなかった。その中で、最も近いシーケンスタイプを有していたのは、2012 年に報告された Eisenberg らの無尾類分離株 2 株と 2005 年に米国でヒト患者から分離された *B. inopinata* BO1 の 3 株であり、9 座連結 (4396bp) による系統樹解析でもこれらとともに単系統クレードを形成した。以上のことより、今回の分離菌株は、*B. inopinata* 近縁の新規ブルセラ属菌である可能性が示された。

これら 2 菌種に対するウサギ抗血清を作製し、それぞれに対する反応性を ELISA で検討し

た。その結果、いずれもホモでは強い反応性を示すのに対し、ヘテロでは反応性の明らかな減弱が認められたことから、これら2菌種には明らかな抗原性の違いがあると推測された。これについては、今後、さらに検討を加えていく予定である。

分離株10-5が分離されたイエアマガエル (*Litoria caerulea*) は、オセアニア原産、樹上棲種で、日本では、主に野生捕獲個体とごく少数の飼育下で繁殖された個体が輸入、流通している。分離株14-1が分離されたデニスフロッグ (*Polypedates dennysii*) は、東南アジア原産、樹上棲である。野生捕獲個体が輸入、流通する。

遺伝子解析の結果、今回のブルセラ分離株に、最も近縁であった *B. inopinata* と Eisenbergらの無尾類分離株2株は、いずれもアフリカ大陸南部に広く分布する地上性の大型種、アフリカウシガエル (*Pyxicephalus adspersus*) に由来する。

イエアマガエルとデニスフロッグ (どちらもアマガエル科) とアフリカウシガエル (アフリカウシガエル科) は無尾類中で系統上の位置が隔たっており、地理的にも東南アジア、オセアニアとアフリカに隔たった分布域をもっている。さらに、それら無尾類分離株と同じクレードの *B. inopinata* (宿主不明) は、北アメリカ大陸で分離されている。よって、これらのブルセラ属菌の共通祖先は、無尾類を宿主として共進化を遂げ分布を広げたと考えることもできる。

*B. inopinata* は、患者から分離され、ヒトに感染しうることが知られている。今回の系統解析の結果から、*B. inopinata* に、きわめて近縁であった我々の無尾類分離株2株と Eisenbergらの無尾類分離株2株についても、ヒトと他の動物に対し病原性をもつ可能性がある。

## バルトネラ感染症

和歌山県で捕獲された野生のニホンザルは26.7% (4/15) と高率に *Bartonella* 属菌を保有していることが初めて明らかとなった。さらに、ニ

ホンザルの *Bartonella* 属菌の平均血中菌数は 525CFU/ml ( $0.5 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml) であった。gltA, rpoB および ITS 領域の相同性解析の結果、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* FullerT 株や中国のアカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と一致もしくは非常に高い相同性値 (97.0%) を示したことから、これら分離株はいずれも *B. quintana* であることが明らかとなった。さらに、ニホンザル分離株は解析した3領域において、*B. quintana* FullerT 株に比べ、*B. quintana* RM-11 株により高い相同性を示したことから、他のマカク属のサル由来の *B. quintana* に非常に近縁であることも明らかとなった。

今回 *B. quintana* が分離されたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったこと、ニホンザル分離株はサルを由来とする *B. quintana* に近縁であったことから、サルも *B. quintana* の自然宿主である可能性が示唆された。

MLST法を用いて、ニホンザル分離株のSTを決定したところ、各ニホンザルから無作為に選択した4株は、全て同一のSTであり、新規のST22であることが明らかとなった。さらに、MLST法に基づいて22タイプのSTを系統解析したところ、ST1~22は4つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとにSTが分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株はこれまでに報告のない新規のSTであり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。しかしながら、本研究に用いたニホンザル由来の *B. quintana* は4株と非常に少なかったこと、ニホンザルの採材地域が和歌山県のみであったことから、今後、より広い地域のニホンザルから *B. quintana* の分離を試み、STを決定し、系統解析を行う必要があると考えられた。

## 類鼻疽

今回、類鼻疽の流行国であるベトナムならびに我が国で亜熱帯に位置する沖縄で、水田ならびに畑の土を採取し、類鼻疽菌の分離を試みたが、培養法では分離されなかった。今回、土の中の類鼻疽菌の定量をする意味もあり、検体から選択培地に直接塗抹する方法で分離を試みたが、分離されなかった。ベトナム南部での類鼻疽菌の分布を明らかにした報告はみられないが、東南アジアや北オーストラリアなどで、土や河川水から PCR 法により類鼻疽菌の検出を行った報告では、比較的高率に本菌が検出されており、ベトナム・メコンデルタでも汚染菌量は少ないながらも土に本菌が分布している可能性は高いと思われる。今後は増菌または PCR 法による検出を試みる予定である。

## E. 結論

本年度の研究成果により、安全で簡便かつ信頼性の高いダニ媒介性脳炎、ハンタウイルス感染症、およびクリミア・コンゴ出血熱の診断法を開発することに成功した。今後は新規に開発された診断法を用いて、近隣諸国におけるこれらの感染症の流行状況調査を行い、日本への侵入・流行の危険性を精査していく事が重要であると考えられる。

ヨーロッパおよびアジアで必要とされる宿主げっ歯類摘発用のハンタウイルス multiplex ICG の試作が完了した。

狂犬病ウイルス(西ヶ原株)の P 蛋白質は、その IFN 拮抗作用を介して、筋肉細胞でのウイルス増殖を支持し、結果として末梢神経の感染効率を高めていることが強く示唆された。

本研究において、2 種の無尾類からの分離株 2 株は、いずれも新規のブルセラ属菌であった。今回の分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であった。未だ無尾類由来のブルセラ属菌によるヒト症例の報告はないものの、飼育者への感染も起こりえるのではないかと懸念される。

野生のニホンザルは蜃壕熱の病原体である *B. quintana* を 26.7%と高率に保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然病原巣である可能性が示唆された。

ベトナム・メコンデルタならびに沖縄では、培養法では土から類鼻疽菌は検出されなかった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H.: Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, In press
- 2) Sakai, M., Yoshii, K., Sunden, Y., Yokozawa, K., Hirano, M., Kariwa, H.: The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J Gen Virol*. Epub ahead of print, 2014
- 3) Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H.: Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*, Epub ahead of print, 2014
- 4) Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Kariwa, H.: Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*, Epub ahead of print, 2013
- 5) Kariwa, H., Murata, R., Totani, M., Yoshii, K., Takashima, I.: Increased Pathogenicity of West Nile Virus (WNV) by Glycosylation of

- Envelope Protein and Seroprevalence of WNV in Wild Birds in Far Eastern Russia. *Int J Environ Res Public Health*, 10: 7144-7164, 2013
- 6) Yoshii, K., Yanagihara, N., Ishizuka, M., Sakai, M., Kariwa, H.: N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *J Gen Virol*, 94: 2249-2258, 2013
- 7) Kentaro, Y., Yamazaki, S., Mottate, K., Nagata, N., Seto, T., Sanada, 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*, 13: 406-414, 2013
- 8) 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 Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol*, 158: 1039-1046, 2013
- 9) 苅和宏明, 尾崎由佳, 真田崇宏, 池中良徳, 石塚真由美, 坪田敏夫, 好井健太郎, 吉松組子, 有川二郎, 高島郁夫: 日本のげっ歯類におけるハンタウイルス感染の血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有するHokkaido ウイルスの分離. *獣医畜産新報*, 66: 262-264, 2013
- 10) Takamatsu Y., Okamoto K., Dinh DT., Yu F., Hayasaka D., Uchida L., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.* 95(2):373-383. 2014.
- 11) Luat L.X., Ngwe Tun M.M., Buerano C.C., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Pathologic potential of variant clones of the Oshima strain of Far Eastern subtype tick-borne encephalitis virus. *Trop. Med. Health*. In press.
- 12) Hayasaka D., Shirai K., Aoki K., Nagata N., Simantini D.S., Kitaura K., Takamatsu Y., Gould E., Suzuki R., Morita K.: TNF- Acts as an Immunoregulator in the Mouse Brain by Reducing the Incidence of Severe Disease Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *PLOS ONE*. 8(8):1-18, 2013.
- 13) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S, Takakura A, Arikawa J. 2013. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in rats. *J Virol Methods* 193:42-49.
- 14) Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi, A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. *PLoS Ne.Trop.Dis.*, 7 e2144
- 15) Nguyen, A.T.K., Nguyen, T.T., Noguchi, A., Nguyen, D.V., Ngo, G.C., Thong, V.D., Olowokure, B., Inoue, S. (2014) Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. *EID*, 20:161-163.
- 16) 佐藤 克、井上 智。狂犬病。特集:ペットからの感染症 13。小児科 (Pediatrics of Japan)。54:89-95, 2013
- 17) Yamaoka S, Ito N, Ohka S, Kaneda S, Nakamura H, Agari T, Masatani T, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Mitake H, Fujii T, Sugiyama M. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in

- neuroinvasiveness. J. Virol. 2013. 87:12327-12338.
- 18) 今岡浩一. 犬ブルセラ症 - 特集・診断シリーズ・感染症. in: SA Medicine, インターズー, pp.53-56, 2013
  - 19) Sato, S., Kabeya, H, Shigematsu Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., and Maruyama, S. 2013. Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of Bartonella henselae and potential sources of infection for humans. Clin. Microb. Infect. 19:1181-1187.
  - 20) Tateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A. and Endo, Y. 2013. Molecular epidemiological survey of Bartonella, Ehrlichia and Anaplasma infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. J. Wildl. Dis. 49(3): 646-652.
  - 21) Bai, Y., Malania, L., Alvarez Castillo, D., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Suksawat, F., Maruyama, S., Knobel, D., and Kosoy, M. 2013. Global distribution of Bartonella infections in domestic bovine and characterization of Bartonella bovis strains using multi-locus sequence typing. Plos One. 8(11): e80894.
- ## 2. 学会発表
- 1) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウウイルスの増殖機構の解析. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
  - 2) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
  - 3) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 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48回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 静岡県熱海市. (2013, 5).
  - 4) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウウイルスの増殖機構の解析. 日本ウイルス学会北海道支部第47回夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. (2013, 7).
  - 5) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を用いた脳炎フラビウウイルスの増殖機構の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
  - 6) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウィルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
  - 7) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 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156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
  - 8) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウウイルスによる中枢神経系病態におけるNS5蛋白の影響の解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 岐阜県岐阜市. (2013, 9).
  - 9) 下田宙, 早坂大輔, 好井健太郎, 米満研三, 寺田豊, 野口慧多, 鋤田龍星, 高野愛, 前田健. 山口県のイノシシからダニ媒介性脳炎ウイルス様遺伝子の検出. 第20回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 兵庫県神戸市. (2013, 11)
  - 10) 平野港, 好井健太郎, 境瑞紀, 長谷部理絵, 苅和宏明. 初代培養マウス脳細胞を



- 用いた脳炎フラビウウイルスの増殖機構の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
- 11) 牧雅大, 真田崇弘, 瀬戸隆弘, 永田典代, 好井健太郎, 苅和宏明. Hantaan ウィルス AA57 株感染マウスにおける病態発現機序の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
  - 12) 好井健太郎, 寸田祐嗣, 五十嵐学, 横澤香菜, 境瑞紀, 苅和宏明, Holbrook, M. R., 高島郁夫. ダニ媒介性フラビウイルスによる中枢神経系病態に関わるウイルス因子の同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
  - 13) 境瑞紀, 好井健太郎, 横澤香菜, 苅和宏明. 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61回日本ウイルス学会学術集会. 兵庫県神戸市. (2013, 11).
  - 14) 早坂大輔, 淵上剛志, 森田公一: フラビウイルスの分子イメージング: 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 湯河原 (2013, 5)
  - 15) 青木康太郎, 早坂大輔, Mya Myat Ngwe Tun, 嶋田聡, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析: 第50回ウイルス学会九州支部総会, 長崎 (2013, 9)
  - 16) 早坂大輔, 淵上剛志, 森田公一: フラビウイルス脳炎の分子イメージング: 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜 (2013,9)
  - 17) 早坂大輔, 青木康太郎, Mya Myat Ngwe Tun, 嶋田聡, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析: 第54回日本熱帯医学会大会, 長崎 (2013, 10)
  - 18) 高松由基, 森田公一, 早坂大輔: マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの高病原性に関わる遺伝子を特定する: 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 神戸 (2013, 11)
  - 19) Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Kotaro Aoki, Aung Kyaw Kyaw, Tin Myint, Thi Tar, Kay Thwe Thwe Maung, Daisuke Hayasaka, Kouichi Morita: Emergence of Chikungunya virus African genotype in Myanmar: 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 神戸 (2013, 11)
  - 20) 早坂大輔, 青木康太郎, Mya Myat Ngwe, 嶋田聡, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析: 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
  - 21) 高松由基, 岡本健太, Dihn Tuan Duc, 余福勲, 早坂大輔, 内田玲麻, 鍋島武, Corazon C Buerano, 森田公一: 日本脳炎ウイルスの NS1'タンパク質は, 鳥細胞でのウイルス産生を増加させる: 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
  - 22) 白井顕治, 北浦一孝, 早坂大輔, 高崎智彦, 鈴木隆二, 倉根一郎: 日本脳炎感染マウスの予後に関連する脳内浸潤 T 細胞の質的な違い: 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
  - 23) Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, and Kouichi Morita: TNF- and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection: 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013, 11)
  - 24) Arikawa J, Amada T, Yoshimatsu K, Hayashimoto N, Koma T, Shimizu K, Gamage CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Takakura A : Development of an Immunochromatography Strip Test for Detecting Anti-hantavirus Antibody in Rodent and Human Sera by Using an N-terminal Common Antigenic Site of Hantavirus N protein. IX International

- Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5-7, 2013
- 25) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. IX International Conference on HFRS HPS & Hantaviruses, Beijing International Convention Center, Beijing, CHINA, June 5-7, 2013
- 26) Sanada T, Ozaki Y, Seto T, Nakao M, Saasa N, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I, Kariwa H : Isolation and Characterization of Hokkaido Virus, Genus Hantavirus. 15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada Conference and Exhibition Centre, Granada, Spain, 16 - 21 June 2013
- 27) 須田遊人, 谷英樹, 下島昌幸, 堀本泰介, 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのシュードタイプを用いた中和抗体価測定系の構築. 第156回日本獣医学会学術集会, 2013年9月, 岐阜
- 28) 須田遊人, 谷英樹, 西條政幸, 堀本泰介, 下島昌幸. シュードタイプウイルスのクリミア・コンゴ出血熱ウイルス中和抗体価測定への応用. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸
- 29) 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. IMED 2013. 15-18 Feb, 2013. Vienna, Austria.
- 30) Hoang H.T.T., Okutani A., Inoue S., Pham H.T., Dang A.D., Nguyen T.T., Dang H.N., and Nguyen H.T. Anthrax outbreaks and B.anthraxis isolation in Vietnam, issues of public health. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
- 31) Okutani A., Tungalag K., Tserennorov D., Bazartseren B., Hoang H.T.T., Nguyen H.T., and Inoue S. Novel genotyping by SNPS selected from genome-wide analysis of B.anthraxis isolation in Japan and Mongolia. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
- 32) Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornwisedsirikul S., Munepo M., Atuntee T., Noguchi A., and Inoue S. A Chiang Mai model for the humane management of rabies control at borders between the forest and city. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 33) Nguyen A.T.K., Nguyen T.T., Noguchi A., Nguyen D.V., Ngo G.C., Thong V.D., Olowokure B., and Inoue S. Survey for bat lyssaviruses in northern Vietnam. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 34) Park, C.H., Yamada, K., Kojima, D., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27-31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.
- 35) W.E. Marissen, C.E. Rupprecht, J. Ellison, T. Taylor, R. Franka, and B. Quiambao. Analysis of CL184 neutralizing capacity against Philippine rabies virus isolates as part of epidemiological surveillance. 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27-31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.
- 36) ゲエン トウイズオン、河原 正浩、加来 義

- 浩、井上 智、長棟 輝行。増殖誘導型キメラ受容体を用いた狂犬病ウイルス核タンパク質に対するイントラボディ選択。第65回日本生物工学会大会、2013年9月18日-20日、広島国際会議場、広島県
- 37) 小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-N4 14)に感染後耐過した ddY マウスの中枢神経系に関する病理学的研究。第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日-22日、岐阜大学、岐阜県
- 38) 君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-NO)を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中枢神経系および末梢組織病変。第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日-22日、岐阜大学、岐阜県
- 39) Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012. 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日-22日、岐阜大学、岐阜県
- 40) 濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。狂犬病ウイルス固定毒(CVS-26 株)で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に参与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 41) 飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 42) Yamaoka S, Ito N, Nakagawa K, Okada K, Okadera K, Sugiyama M. Rabies virus phosphoprotein gene functions to facilitate viral neuroinvasion by viral replication in muscle. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain (2013. 6)
- 43) 山岡理子、伊藤直人、大岡静衣、金田祥平、中村寛子、岡田和真、岡寺康太、藤井輝夫、杉山誠：狂犬病ウイルスの末梢神経感染機序における P 遺伝子の役割：第 61 回日本ウイルス学会、神戸(2013, 11)
- 44) 岡田和真、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠：狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォーム (P3~P5) は病原性に関与する：第61回日本ウイルス学会、神戸(2013, 11)
- 45) Koichi Imaoka. Development of diagnostic methods for brucellosis – Sero-epidemiology of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. 10th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Sep. 12-13, 2013
- 46) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. *Brucella abortus* は腸管パイエル板からの侵入に M 細胞上のプリオン蛋白質 (PrPc) を利用する. 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京, 2013
- 47) 今岡浩一. 犬猫から感染する動物由来感染症について～カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症、ブルセラ感染症など～. 厚生労働省平成 25 年度動物由来感染症対策(狂犬病予防を含む)技術研修会 東京 2013
- 48) 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正孝, 大竹正剛, 丸山総一, わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).
- 49) 有本千波, 根岸あかね, 佐藤真伍, 壁谷英則, 辻本 元, 遠藤泰之, 坂田義美, 市

川康明, 丸山総一. わが国の猫における Bartonella henselae, Bartonella clarridgeiae および Chlamydophila felis DNA の検出状況. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).

50) 藤永洋平, 國吉奏慧, 壁谷英則, 佐藤真伍, 市川康明, 丸山総一. 犬, 猫とその外部寄生虫からの Rickettsia および Bartonella の検出状況について. 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜大学, 2013 年 9 月 21 日).

51) 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根有美, 南 正人, 村田浩一, 小倉 剛, 丸山総一. わが国のマング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 13 回 人と動物の共通感染症研究会学術集会(感染研, 2013 年 11 月 2 日)

#### 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

