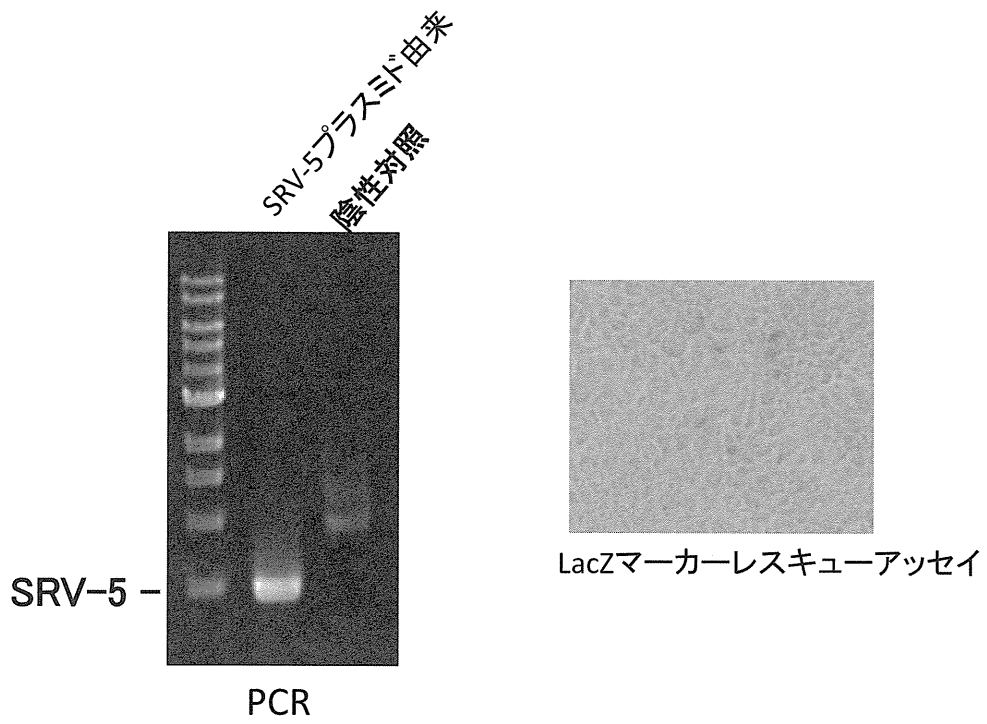


図3:SRV-5プラスミドの感染性確認



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 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 (H25-新興-一般-008)

分担研究課題：野生動物の動物由来感染症病原体の保有状況の網羅的調査

研究分担者：前田健 (山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)

研究協力者：下田宙、高野愛、畝田龍星、寺田豊、米満研三、濱崎千菜美 (同)

研究要旨：野生動物を中心とした動物由来感染症病原体の保有状況を把握するために、本年度は、新規発見したラプトウイルスであるニシムロウイルスのイノシシでの疫学調査、別のグループが発見したフレボウイルスとトーゴトウイルスのイノシシでの疫学調査を実施した。更に、フェレットにおける新規血清型フェレットコロナウイルス、イノシシやシカ、ダニから新規フラビウイルスを発見した。

A. 研究目的：

野生動物や伴侶動物には未だ知られていない感染症が多く存在する。また、ウイルスが分離されていてもその生活環が不明なものもある。本研究は野生動物の保有する動物由来ウイルスの探索を目的として、新規ウイルスの野生動物での感染状況の調査と新規動物保有のウイルスの検出を行った。

B. 研究方法：

1) 検査材料

有害鳥獣あるいは狩猟期に捕獲された動物、死亡個体から血清あるいは臓器を回収して検査に供試した。

ダニは、旗振り法にて回収、または動物に付着していたものを検査に供試した。

2) 抗体検出系

ニシムロウイルス感染および Mock 感染 Vero 細胞より抗原を抽出し、ELISA 用抗原に用いた。また新規フレボウイルス、新規トーゴトウイルス感染 Vero 細胞も同様に抽出し、ELISA 抗原として用いた。ELISA プレートにそれぞれ $0.5 \mu\text{g}$ を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。感染細胞抗原ウェルの吸光度を Mock 感染細胞抗原ウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

3) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

血清から QIAamp viral RNA mini kit、あるいは肝臓とダニから RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出後、プライマー cFD2 と MAMD と QIAGEN OneStep RT-PCR kit を用いて、RT-PCR を実施した。さらに nested プライマー cFD2 と FS778 を用いて nested PCR を実施した。電気泳動にて特異バンドを確認後、塩基配列を決定した。

4) フェレットコロナウイルス抗体検出系の作出

大腸菌にてフェレットコロナウイルス Yamaguchi 株のヌクレオカプシド(N)蛋白の N 末端側 (1-179) と C 末端側 (180-374) を GST 融合蛋白として大腸菌にて発現・精製を行った。精製 GST 融合蛋白および GST 蛋白を ELISA プレートにそれぞれ $0.5 \mu\text{g}$ を吸着させ、ブロックエースによりブロッキング後、1:100 希釈の動物血清を 1 次抗体、Protein A/G を 2 次抗体として用い、発色は Peroxidase substrate kit (Bio-Rad) を用いて実施した。GST 融合蛋白を抗原としたウェルの吸光度を GST 蛋白を抗原としたウェルの吸光度で引くことにより、特異的吸光度とした。

(倫理面からの配慮について)

野生動物：有害鳥獣として捕獲された個体、死亡個体、狩猟期に捕獲された個体から材料を採取している。

フェレット：飼育者に調査研究に用いることの許可を得ている。

C. 結果：

1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスの疫学調査

我々がイノシシの血清中から新規に分離したニシムロラブドウイルスは、イノシシ、シカ、ウシ、ブタに感染することが明らかになっている。しかし、その感染環に関しては不明な点が多い。今回、ニシムロラブドウイルスに対する抗体の検出を目的として、ELISA 系の確立を行った。その結果、吸光度 0.2 で多くの陰性個体が排除できることが判明した (図 1)。そこで、山口県と栃木県のイノシシの疫学調査を実施した結果、山口県で 43.1% のイノシシが感染していることが判明した (表 1)。栃木県のイノシシは 1.1% であったが、これは非特異反応によるものと考えられた (表 1)。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average+3*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。

2) 新規フレボウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新規フレボウイルスの抗体保有率を調査した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 として判定した結果、栃木県では 69% の抗体陽性率で最も高かったが、全国に本ウイルスが蔓延していることが確認された。

3) 新規トーチトウイルスの疫学調査

イノシシにおけるダニから分離された新

規トーチウイルスの抗体保有状況の調査を実施した。Cut-off 値は暫定的に 0.5 とし判定した結果、栃木県のイノシシには感染していないことが判明した。今後は、栃木県のイノシシは全て陰性と考えて、Average+3*SD を Cut-off 値と設定して、調査を継続する必要がある。一方、西日本では多くのイノシシが陽性となった。

4) 新規血清型のフェレットコロナウイルスの発見

フェレットコロナウイルスは 2000 年に初めて見つかった新興感染症である。我々は、国内におけるフェレットコロナウイルスの遺伝子解析を行ってきた。しかし、ウイルスが未分離であることから抗体の検出方法が確立されていない。そこで、我々は、コロナウイルスで比較的保存されており、抗原性が高いヌクレオカプシドプロテイン (N) 蛋白を大腸菌にて発現し、抗体検査用の抗原として用いた。N 末端領域 1-179 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した蛋白 N(1-179)と C 末端領域の 180-379 番目のアミノ酸を GST 蛋白と融合した N(180-379)を発現・精製後、ELISA 抗原として用いた。その結果、多くのフェレット血清は N(1-179)と N(180-379)に同じように反応したが、2 頭の血清は N(1-179)とはよく反応したが、N(180-379)とはほとんど反応しなかった(図 3、白丸)。このうち一頭の No.22 はウイルス遺伝子も検出されていたのでコロナウイルス共通プライマーで遺伝子解析を実施し

系統樹を作成した結果、これまで報告されているフェレットコロナウイルスとは異なるクラスターに位置することが判明した(図 4)。更に、フェレットから検出されるコロナウイルスの遺伝子解析を行った結果、No.160 も同様のウイルスに感染していることが判明した(図 4)。この結果、フェレットコロナウイルスには、抗原性の異なる新規のウイルスが存在することが示された。

5) 新規フラビウイルスの遺伝子検出

野生動物およびダニからのフラビウイルスの遺伝子の検出を目的として、フラビウイルス共通プライマーを用いて、semi-nested RT-PCR を実施した。その結果、シカの血清から日本脳炎ウイルス、シカおよびイノシシの血清とダニ体内から同じ新規フラビウイルス、イノシシの肝臓からダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)様新規フラビウイルス遺伝子が検出された(表 2)。塩基配列を決定した結果、今回、イノシシ、シカ、ダニから検出された新規フラビウイルスは全く新しいウイルスである可能性が示唆された(図 5)。また、北海道以外で TBEV 様ウイルスが検出されたのは初めてである。

D. 考察：

1) 新規ラブドウイルスであるニシムロウイルスは非常に多くの動物種に感染していることが判明した。また、地

域差もありそうである。しかし、その感染環やベクターの存在に関しては不明である。ヒトへの感染状況なども調査する必要があるのかもしれない。

- 2) 新規フレボウイルス、新規トゴトウイルスとともに少なくともイノシシにおいて広く蔓延していることが判明した。新規トゴトウイルスはサルへの感染も検出された（現在確認中）。両ウイルスの感染環並びにヒトへの感染状況を調査する必要がある。
- 3) フェレットのおいても異なるウイルスが2種類感染していることが証明された。コロナウイルスは、様々な変異を引き起こして、異種間伝播や高病原性を獲得することがある。今後も、調査の継続が必要である。
- 4) 北海道以外で初めてダニ媒介性脳炎様フラビウイルスが検出された。ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。
- 5) ダニとイノシシとシカから共通の新規フラビウイルスが検出された。様々な動物に感染することから、ヒトへの感染を調べるとともに、ウイルス分離をする必要があるだろう。

E. 結論

国内の野生動物・節足動物間で、新規ラブドウイルス、フレボウイルス、トゴトウイルス、フラビウイルスが蔓延していることが判明した。ヒトへの感染を含めて感

染環を詳細に解析する必要がある。

フェレットコロナウイルスに認められるようにまだまだ未知のコロナウイルスが存在することが確認された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K*. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates*. 2014 Jul; 55(3): 441-445.
- 2) Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K*. High prevalence of hepatitis E virus in wild boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 2014;50(2):378-383.
- 3) Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K*. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 2014 Feb; 20(2): 284-287.
- 4) 鍬田龍星, 杉山弘樹, 下田 宙, 前田 健 「蚊が保有・媒介するウイルス感染症」(総説) *Japanese Journal of Veterinary Parasitology*. 13(2); 91-101
- 5) 米満研三、服部志保、鈴木准子、浜崎千

菜美、下田 宙、前田 健「ニホンイノシシのウイルス感染症」兵庫県におけるニホンイノシシの管理の現状と課題（兵庫県森林動物研究センター研究部編集）第8章 p93-105, 2014

- 6) 前田 健：「イヌジステンパーウイルスの今」*Companion Animal Practice* 2014. Apr: 298: 47-50 (緑書房)

2.学会発表

- 1) 米満研三、原由香、寺田豊、高野愛、下田宙、小寺祐二、竹田努、前田 健「新規開発 ELISA を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス感染状況調査」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.10-11)
- 2) 鍬田龍星、杉山弘樹、米満研三、服部志保、鈴木絢子、南昌平、濱崎千菜美、寺田豊、谷口雅康、下田宙、前田 健「牛舎捕集蚊の消長と分離ウイルスについて」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 3) 米満研三、下田宙、鍬田龍星、寺田 豊、高野愛、前田 健「野生動物、ダニからフラビウイルス遺伝子検出」第 21 階トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、横浜市（パシフィコ横浜）(2014.11.9)
- 4) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井 健太朗、寺田 豊、野口慧多、鍬田龍星、高野 愛、前田 健「国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検

出」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道 (2014.9.9)

- 5) 野口慧多、下田 宙、寺田 豊、Nguyen Dung、水谷哲也、中村昇太、中屋隆明、鈴木哲朗、本道栄一、前田 健「キクガシラコウモリ由来新規ガンマヘルペスウイルスの遺伝子解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道 (2014.9.10)
 - 6) 南 昌平、寺田 豊、下田 宙、前田 健「フェレットコロナウイルス抗体検出系の確立とその評価」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道(2014.9.10)
 - 7) 寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Nguyen Van Dung、鍬田龍星、城ヶ原貴通、織田銑一、高野 愛、本道栄一、前田 健「実験動物スンクス *Suncus murinus* からの新規コロナウイルスの検出」第 29 回中国四国ウイルス研究会（山口大学）(2014.6.29)
 - 8) 米満研三、原 由香、寺田 豊、高野 愛、下田 宙、小寺祐二、竹田 努、前田 健「新規開発 ELISA 法を用いた野生動物における E 型肝炎ウイルス抗体保有状況調査」第 29 回中国四国ウイルス研究会（山口大学）(2014.6.29)
 - 9) 下田 宙、米満研三、早坂大輔、好井健太朗、寺田 豊、野口慧多、鍬田龍星、高野 愛、前田 健「山口県の野生動物およびダニからフラビウイルスの検出」第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口大学）(2014.5.17)
- H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

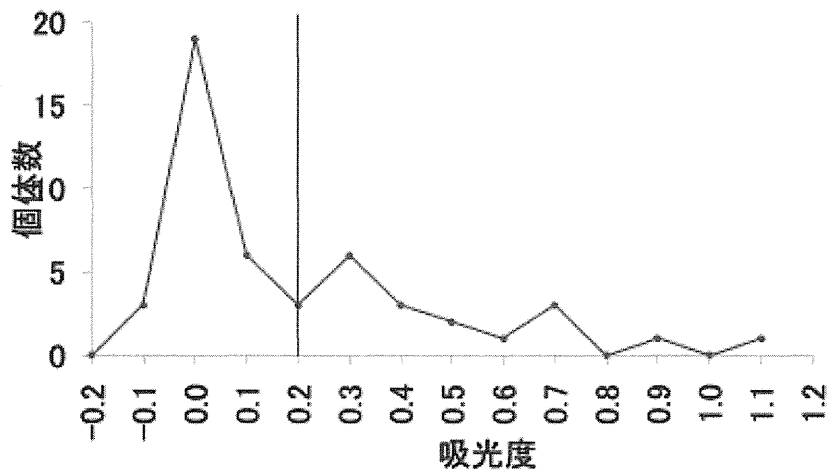


図1 イノシシの抗ニシムロウイルス抗体測定におけるCut-off値の設定

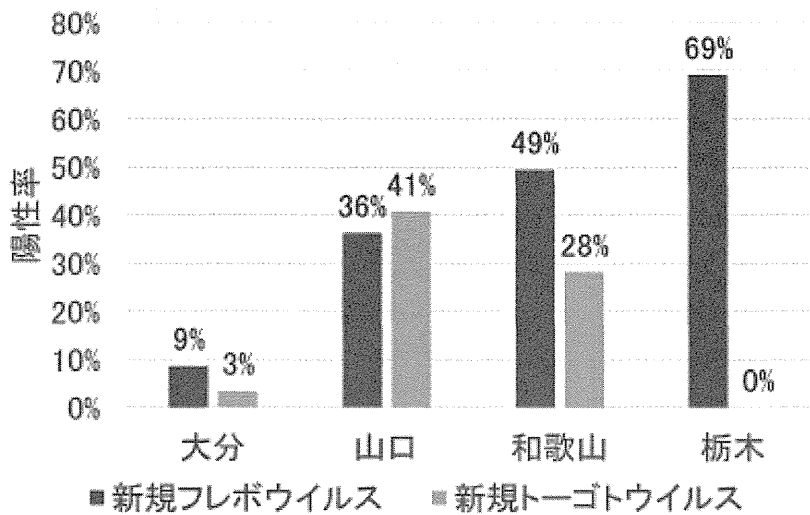


図2 イノシシの新規フレボウイルスおよび新規トーチトウイルスに対する抗体保有状況

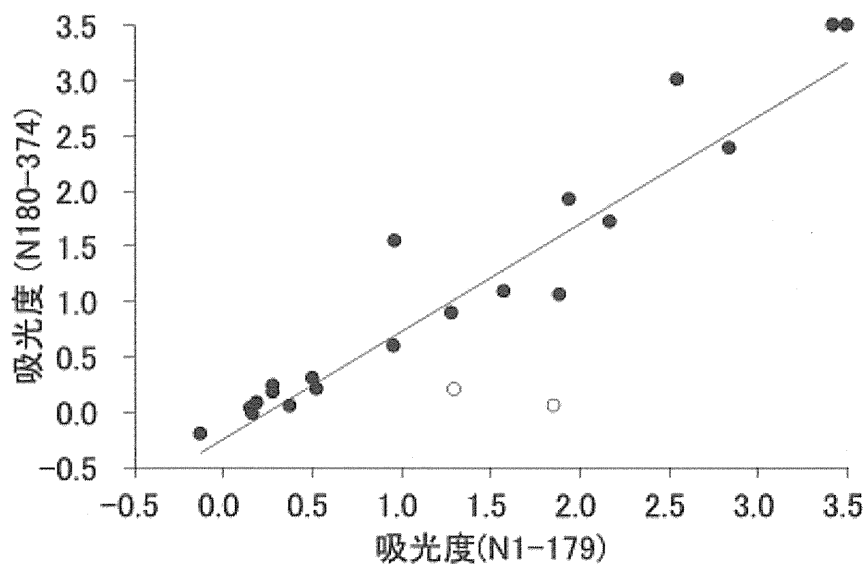


図3 フェレットコロナウイルスの大腸菌発現N蛋白の反応性の比較

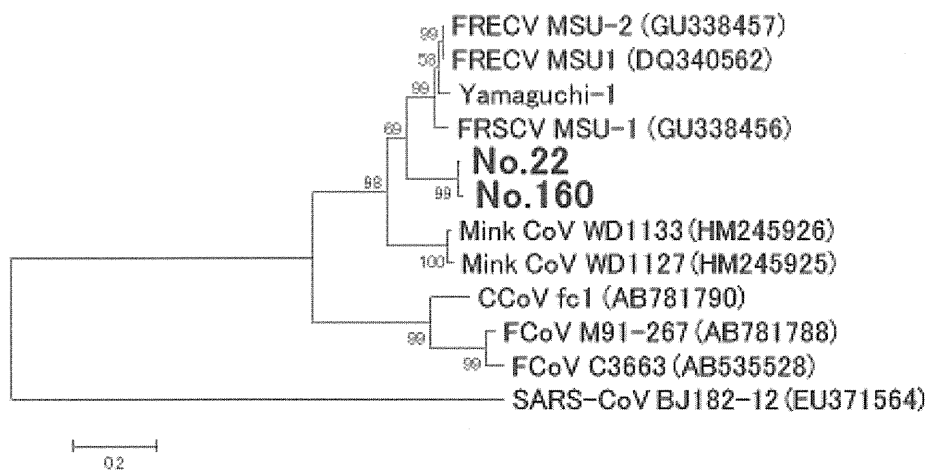


図4 フェレットコロナウイルス株間の遺伝子の比較

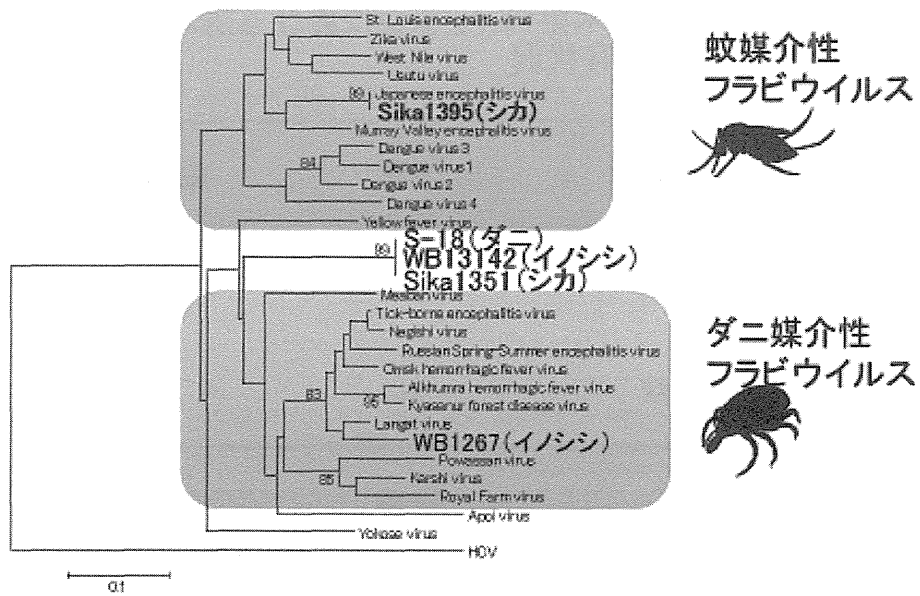


図5 検出されたフラビウイルスの系統樹(NS5, 55aa)

表1 山口県と栃木県のイノシシにおける抗ニシムロウイルス抗体保有状況

イノシシ	下関	栃木
検査頭数	72	188
陽性頭数	31	2
陽性率	43.1%	1.1%

表2 シカ、イノシシ、ダニから検出されたフラビウイルス遺伝子

ID	動物種	性別	体重	臓器	検出
13-95	シカ	オス	24kg	血清	日本脳炎ウイルス
13-51	シカ	オス	38kg	血清	新規フラビウイルス
13-142	イノシシ	メス	26kg	血清	新規フラビウイルス
S-18	キチマダニ	若虫		50匹	新規フラビウイルス
12-67	イノシシ	オス	12.5kg	肝臓	TBEV様新規ウイルス

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（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）〕

分担研究報告書

動物由来感染症の対応に関する研究（H25-新興-一般-008）

輸入回帰熱の診断法確立と標準化

研究分担者 川端寛樹（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 高野 愛（山口大学 共同獣医学部）

研究協力者 佐藤 梢（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究要旨：回帰熱はアフリカ、中近東、中央アジアで流行するダニ媒介性感染症であり、特にアフリカではマラリアと誤診断されるケースが報告されている。そこで本研究では、新規の回帰熱の抗体検査抗原を開発に着手した。本研究では、輸入例における抗体検査法ならびに、ライム病、新興回帰熱との鑑別法も確立することを目標としている。

A. 研究目的

回帰熱はライム病群ボレリアとは異なる1群のボレリア属細菌による感染症で、アフリカ諸国での感染例が最も多く、北米や南欧、中近東、中央アジアなどでも感染例が報告されている。これら地域内では、散発的、もしくは集発的な感染が報告され、かつ死亡例も散見される。回帰熱には、ヒメダニが媒介する種類とシラミによって媒介されるものがあるが、現在上記地域で流行しているもののほとんどがヒメダニ媒介性回帰熱である。バルトネラ属細菌感染症の塹壕熱やリケッチア属細菌感染症である発疹チフス同様、シラミによって媒介される回帰熱は、戦争等により衛生状況が悪化し、シラミ寄生が蔓延した場合に流行する。第一次世界大戦中、兵士や避難民の間で回帰熱が流行し、

1919年から1923年の間におよそ500万人の患者が亡くなったと推計されている。ダニ媒介性の回帰熱は2つに大別される。1つは旧来から知られているヒメダニ媒介性回帰熱（古典的回帰熱の一部）で、抗菌薬による治療を行わない場合、その致死率はヒメダニ媒介性回帰熱では2-5%とされている（シラミ媒介性回帰熱では4-40%とされている）。もう一つは、2011年に初めて報告された *Borrelia miyamotoi* 感染による新興回帰熱である。*B. miyamotoi* は1995年に我が国で発見・同定されたボレリアで、発見当時はその病原性は不明であったが、2011年のロシアでの感染例を皮切りに、アメリカ、オランダ、日本で患者が報告された。本ボレリア感染症の全容は未だ不明であるが、*Ixodes* 属マダニが病原体を伝播すると考えられている。

我が国では2010年、2012年に中央アジア、アフリカからの「古典的回帰熱」の輸入例が報告されるとともに、新興回帰熱の国内感染例が2013年に報告され、急速に未自家な感染症となりつつある。一方、古典的回帰熱、新興回帰熱の抗体検査用として確立された抗原として glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) があるが、必ずしも検査感度は高い訳ではないことから、新規の診断抗原開発が急務とされてきた。

そこで本研究では、回帰熱ボレリアに特異的な抗原を組換え体として作成し検査用抗原としての可否を評価するとともに、古典的回帰熱と新興回帰熱の鑑別法を確立することを最終目的とし、以下研究を開始した。

B. 研究方法

1) 比較ゲノム解析による回帰熱ボレリア特異的遺伝子の検索

Draft genome 配列として公開されている回帰熱群ボレリアの一種 *Borrelia miyamotoi* FR64b ゲノム配列 (ゲノムサイズ:1.38Mb, Accession 番号: CP004217-CP004266, 変更修正日:2014/10/01)の内、ボレリア種間で variation が多いプラスミド性配列と推測される 48 contig (CP004218- CP004266)に含まれる 649 orfs の各々について、BLASTP 解析を行った。BLASTP 解析はライム病群ボレリアの3種 {*Borrelia burgdorferi* B31 (taxid:224326)、*Borrelia garinii* PBi (taxid:290434)、および *Borrelia afzelii* PKo (taxid:390236)}ならびに回帰熱群ボレリア3種 {*Borrelia turicatae* 91E135 (taxid:314724)、*Borrelia recurrentis* A1

(taxid:412418)、および *Borrelia duttonii* (taxid:40834)}のゲノム配列を参照して実施し、相同性の有無を Cutoff E-value:1e-5 で判定した。

2) 抽出された候補遺伝子群の特性解析

抽出された候補遺伝子群について、そのアミノ酸配列から、各々の1)シグナル配列の有無、2) Lipoprotein である可能性の予測、ならびに3)膜貫入ドメインの有無に関する予測を行い、候補抗原の性質について計算・予測を行った。またこれに先立ち、ボレリア属細菌の抗原で、その Localization が明らかな 28 抗原 (膜タンパク質、ペリプラズマ抗原、ならびに細胞質タンパク質) について同様の計算を行い、予測の正確性について検証を行った。これら解析は CBS prediction server (www.cbs.dtu.dk) を用いて行った。

3) 抽出された候補遺伝子群のパラログ解析

抽出された遺伝子について、各々 Position-Specific Iterated-BLAST(PSI-BLAST)により「Coverage (>80%) および Identical (>80%)」条件下で *B. miyamotoi* FR64b(taxid:1292392) genome 内に配列が見つかったものをパラログとした。

4) 候補遺伝子の大腸菌を用いたクローニング

候補遺伝子から必要に応じて5'末端側の推定シグナル配列を除いた配列を、*Borrelia miyamotoi* FR64b 株 DNA を鋳型とし、KOD-FX Neo (TOYOBO)を用い PCR で増幅した。PCR 産物の精製には HighPure PCR product purification kit(Roche)を用いた。精製した PCR 産物は T4 DNA polymerase 処理により5'突出末端を形成させた後、pET46 Ek/Lic ベクター (Novagen)とアニーリングさせた。本ベクター

での組換えタンパク質はその N 末端に 6XHis が付加されるよう設計した。クローニングした遺伝子の発現には大腸菌 Rossetta (DE3) pLys 株を用いた。以上の組換え DNA 実験は、国立感染症研究所 組換え DNA 実験安全委員会により承認を受けて行われた (承認番号: 機 26-83)。

4)組換え抗原の発現

大腸菌での組換え抗原発現を見るため、形質転換を行った大腸菌を LB 培地もしくは SOB 培地で 37°C、一晚震盪培養した後、培養液を MagicMedia (Lifetechnologie)へ 1/100 接種し、20°Cもしくは 28-30°Cで 36-46 時間震盪培養を行った。培養液は、2XSDS-PAGE buffer と等量混和後、SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルは常法に従い PVDF 膜(Bio-Rad)へ転写した。一次抗体には Anti-His monoclonal 抗体(BDL)、二次抗体には HRP ラベルされた Anti-mouse IgG(KPL)を用い、HRP の検出には ECL prime kit(GE Healthcare)を用いた。

(倫理面からの配慮について)
該当しない。

C. 研究結果

1) In silico 解析

BLASTP 解析により全 649 orfs は、回帰熱群ボレリア間で保存される 45 orfs、*B. miyamotoi* FR64b 株に特異的な 34 orfs、Variable membrane protein (VMP) 遺伝子群 64 orfs、ならびに *Borrelia* 属で保存されている 506 orfs に分けられた (表 1)。これら各群から paralog family を PSI-BLAST により検索し、それぞれの中から

代表的な 1 orf を組換え抗原作製候補として選定した (表 1、表 2)。また、*Borrelia* 属で保存されている 506orfs 中、推定される homolog に対して相同性が低い 12orfs 中、paralog を除いた 7orfs も候補に加えた (表 1)。

ボレリア属細菌の既知抗原を用いた細胞内局在を SignalP 4.0/LipoP 1.0/TMHMN 2.0 protocol によって推定した場合、SignalP 4.0/LipoP 1.0 protocol により、細胞質抗原と膜抗原/ペリプラズム抗原間は、SignalP による D 値および Spl/SpII サイトの有無により高確度で判別可能である (data not shown)。本研究で候補に選定した 59orfs の内 26orfs は膜抗原/ペリプラズム抗原と推定された (表 2)。

2)各 59orfs の組換え抗原の大腸菌による発現成績
試験に供した 59orfs 中、3orfs(BOM 1320, BOM 1183, BOM 1515)を除き、大腸菌の形質転換株が得られた。これら各々の orf 形質転換株について、anti-His 抗体を用いた Immunoblot 法によりいずれかの条件で組換え抗原の発現が見られた株は 44orf を保持する大腸菌株であった (表 3)。

D. 考察

ボレリア属細菌は大腸菌等で血清型決定基となるような LPS を持たないこと、また鞭毛抗原遺伝子は高度に保存されていること等からこれらをもとにした血清型による型別や感染病原体種の血清学的同定が不可能である。これらのことから、いずれのボレリア感染症においても抗体検査によってその感染種の同定は困難とされてきた。しかしながら、ゲノム解析

技術の向上により、回帰熱群特異的抗原や新興回帰熱群特異的抗原が in silico 解析で抽出できるようになってきた。本研究で候補として選定した 59orfs の内、44 orfs (74.5%)が大腸菌を用いて単離・発現させることができた。今後、これら組換え抗原を用いて、まず、回帰熱群ボレリア、新興回帰熱ボレリア、ライム病群ボレリアを感染させたマウス血清を用い、抗体が誘導される抗原の選定・絞り込みを行う。次いで海外研究機関と連携し、絞り込まれた抗原の感度、特異性を検討する予定である。

E. 結論

海外から輸入される回帰熱について、ゲノム情報を活用した新規抗体検査系確立のための基礎的情報を提供した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi T, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Medical Entomology and Zoology*. 65(1): 13-21, 2014.
- 2) Oda S, Kabeya H, Sato S, Shimonagane A, Inoue K, Hayashidani H, Takada N, Fujita H, Kawabata H, Maruyama S. Isolation of

pathogenic *Yersinia enterocolitica* 1B/O:8 in from *Apodemus* mice in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 51(1): 260-264, 2015.

2.学会発表

- 1) 藤田信子, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 川端寛樹. 四国型恙虫病の媒介種トサツガムシの現況 (予報). 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 2) 川端寛樹. 新興回帰熱病原体 *Borrelia miyamotoi* の病原性解析. 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会. 愛知, (2014.11)
- 3) 梶田弘子, 岩淵香織, 高橋雅輝, 佐藤直人, 山内貴義, 斎藤幸一, 高野愛, 川端寛樹, 宇田晶彦, 森川茂. 岩手県におけるマダニの生息調査および病原体保有状況. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 4) 川端寛樹, 今内覚, 高野愛, 中尾稔, 伊東拓也, 佐藤梢. 北海道におけるマダニ媒介性新興回帰熱病原体ボレリアの分布調査. 第 60 回日本衛生動物学会北日本支部大会・日本寄生虫学会北日本支部合同大会. 盛岡, (2014.10)
- 5) Kyunglee Lee, 高野 愛, Kyle Taylor, 左鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 覚, 川端寛樹, 坪田敏男. A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and *Haemaphysalis* ticks in Hokkaido. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)
- 6) 大場真己, 大松勉, 安藤秀二, 川端寛樹, 高野愛, 片山幸枝, 古谷哲也, 長井誠, 水谷

哲也. コウモリマルヒメダニから分離された新規ブニヤウイルスについて. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)

7) 川端寛樹. ダニ媒介性細菌感染症の疫学および診断法. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 札幌, (2014.9)

8) 川端寛樹, 高野愛, 大西真. 後向きサーベイランスにより明らかとなった新興回帰熱の 2 例. 第 88 回日本感染症学会学術講演会. 福岡, (2014.6)

9) 岡恵子, 川端寛樹. スウェーデンで *Borrelia* 保有のマダニに咬着された 2 例. 第 30 回臨床皮膚科医会総会. 横浜, (2014.4)

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. *Borrelia miyamotoi* 649 orfs の相同性検索成績

	Relapsing fever			<i>Borrelia</i>	
	Conserved	<i>Borrelia miyamotoi</i> specific	VMPs	Conserved	Low similarity
Orf number (Total 649)	45	34	64	494	12
	Paralog family=7 (including 23 orfs)	Paralog family=5 (including 16 orfs)	Paralog family=1 (including 64 orfs)	Not counted	Paralog family=3 (including 8 orfs)
Used in this study	29	23	–	–	7

表 3. 大腸菌を用いた、Anti His-Tag 抗体による各々の組換え抗原発現の有無.

No.	3OM No.	試験条件			いずれかの条件で発現が見られたもの
		20℃, 36hrs	30℃, 36hrs	28-30℃, 46hrs	
1	885	+	+	+	+
2	947	+	+	-	+
3	1172	-	-	-	
4	1280	-	-	+	+
5	1284	-	-	+	+
6	1341	+	+	+	+
7	1367	-	-	-	
8	1374	-	-	+	+
9	1378	+	+	+	+
10	1381	+	+	-	+
11	1440	+	+	+	+
12	1441	+	+	+	+
13	1092	+	+	+	+
14	1167	-	-	-	
15	1197	-	-	+	+
16	1218	-	-	-	
17	1226	-	-	+	+
18	1232	+	+	+	+
19	1318	+	+	+	+
20	1320	/	/	/	/
21	1385	+	+	+	+
22	1394	+	+	+	+
23	1470	+	+	+	+
<hr/>					
1	886	-	-	-	
2	889	-	-	+	+
3	891	+	+	+	+
4	892	+	+	-	+
5	896	+	+	+	+
6	897	+	+	+	+
7	899	+	+	+	+
8	900	+	+	+	+
9	902	+	+	-	+
10	903	+	+	+	+
11	911	+	+	+	+
12	930	-	-	-	
13	931	+	+	+	+
14	932	-	-	+	+
15	934	+	+	+	+
16	937	-	-	+	+
17	1029	-	-	-	
18	1071	-	-	-	
19	1134	+	+	+	+
20	1137	+	+	+	+
21	1183	/	/	/	/
22	1195	-	-	+	+
23	1323	+	+	+	+
24	1377	+	+	+	+
25	1379	+	+	-	+
26	1399	+	+	+	+
27	1486	-	-	-	
28	1065	-	-	-	
29	1515	/	/	/	/
<hr/>					
1	1038	+	+	+	+
2	1147	+	+	+	+
3	1148	+	+	+	+
4	1149	+	+	+	+
5	1382	-	-	+	+
6	1383	+	+	+	+
7	1384	-	-	-	

BOM 1320, BOM 1183 および BOM1515 の各 orf は大腸菌を用いて単離出来なかった。

表 2. 本研究で組換え抗原を作製した *Borrelia miyamotoi* 由来 orfs と各種 In silico 解析結果

No.	3OM No	Annotation	BLASTP		PSI-BLAST B.miyamotoi FR64b (bid:1292392) Independency [Coverage (>80%) & Identical (>80%)]	SignalP 4.1	LipoP 1.0	
20	1	885	Hypothetical protein	M23 peptidase domain-containing protein	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.256)	-
30	2	947	Hypothetical protein	holin [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.110)	-
38	3	1172	Hypothetical protein	Single-strand DNA binding protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	969 (969,1172,1307,1340)	- (0.086)	-
44	4	1280	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.220)	SpII
45	5	1284	Hypothetical protein	Smf protein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.087)	-
46	6	1341	Hypothetical protein	DNA gyrase subunit A [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1341 (970,1171,1341)	- (0.208)	-
47	7	1367	Hypothetical protein	BppA [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.185)	-
16	8	1374	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01449 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.287)	SpII
49	9	1378	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.145)	-
51	10	1381	Hypothetical protein	adenine specific DNA methyltransferase [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.107)	-
57	11	1440	Hypothetical protein	oligoendopeptidase F [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	Independent	- (0.219)	SpII
18	12	1441	Hypothetical protein	hypothetical protein BAPKO_3547 [Borrelia afzelii PKo]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific	1441(1198,1199, 1285, 1441)	+ (0.526)	SpII
9	13	1092	Fibronectin-binding lipoprotein	antigenic protein P35 [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1092 (1516,1517,1092)	+ (0.538)	SpII
37	14	1167	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.332)	SpII
41	15	1197	Mlp lipoprotein family protein	protein MlpJ [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	-
42	16	1218	Mlp lipoprotein family protein	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.366)	-
12	17	1226	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.299)	-
43	18	1232	Mlp lipoprotein family protein	MlpJ protein [Borrelia duttonii]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.325)	SpII
13	19	1318	Hypothetical protein	antigen P35-like protein [Borrelia recurrentis A1]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.376)	SpI
14	20	1320	Hypothetical protein	Mlp lipoprotein family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.279)	SpII
55	21	1385	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	+ (0.545)	SpII
17	22	1394	Fibronectin-binding lipoprotein	hypothetical protein BDCR2A_01902 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	1394 (1375,1394)	+ (0.538)	SpII
58	23	1470	Putative cytosolic protein	immunogenic protein P37 [Borrelia burgdorferi B31]	Probable <i>Borrelia miyamotoi</i> specific, Low similarity was found in LD/RF group	Independent	- (0.256)	SpII
21	1	886	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA011 [Borrelia turicatae]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.377)	SpII
22	2	889	Hypothetical protein	hypothetical protein BRE_1030 [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.162)	-
1	3	891	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01136 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.189)	SpII
23	4	892	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]1	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.124)	-
2	5	896	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA034 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.403)	SpII
3	6	897	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA035 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.274)	SpII
24	7	899	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA033 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.229)	SpII
4	8	900	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA044 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.861)	SpII
25	9	902	Hypothetical protein	putative lipoprotein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.135)	-

26	10	903	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	ribonucleoside reductase beta subunit [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.104)	-
5	11	911	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA055 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.636)	SpII
27	12	930	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.203)	-
28	13	931	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA073 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.298)	-
6	14	932	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.487)	SpII
60	15	933	Hypothetical protein	immunogenic protein A [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	932 (932,933)	+ (0.485)	SpII
29	16	934	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA092 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.264)	-
7	17	937	Hypothetical protein	arthropod-associated lipoprotein [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.711)	SpII
31	18	1029	BDR-repeat family protein	BDR-repeat family protein [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1029 (1403,1029,1164,978,1220)	- (0.110)	-
8	19	1071	Hypothetical protein	membrane protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.291)	-
10	20	1134	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01220 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	+ (0.562)	SpII
11	21	1137	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1137(1137,1472)	- (0.287)	SpII
39	22	1183	Hypothetical protein	hypothetical protein BDCR2A_01356 [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	1183 (960, 1017,1140, 1183)	- (0.137)	-
40	23	1195	BDR-repeat family protein	bdr proitein [Borrelia recurrentis A1]	Probable Relapsing fever specific	1195 (1195, 1510,1512, 1461)	- (0.101)	-
15	24	1323	Congo red-binding lipoprotein NlpH	Congo red-binding lipoprotein NlpH [Borrelia duttonii CR2A]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.313)	SpII
48	25	1377	Hypothetical protein	hypothetical protein BTA111 [Borrelia turicatae 91E135]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.123)	-
50	26	1379	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.111)	-
56	27	1399	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia persica]	Probable Relapsing fever specific	Independent	- (0.404)	SpII
59	28	1486	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific	1486 (1395, 1466, 1486, 1505)	- (0.085)	-
33	29	1065	Hypothetical protein	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	Independent	- (0.290)	-
19	30	1515	Antigen P35	hypothetical protein [Borrelia duttonii]	Probable Relapsing fever specific. Low similarity was found in LD group	1515 (1093, 1515)	- (0.307)	SpII
32	1	1038	BDR-repeat family protein	hypothetical protein BAPKO_2516 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.119)	-
34	2	1147	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q23 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1147 (953, 1147, 1420)	- (0.138)	-
35	3	1148	Hypothetical protein	hypothetical protein BB_Q22 [Borrelia burgdorferi B31]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1148 (952,1148,1419)	- (0.110)	-
36	4	1149	Hypothetical protein	hypothetical protein BafPKo_Q0007 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	1149 (1149, 1418)	- (0.098)	-
52	5	1382	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.116)	-
53	6	1383	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BAPKO_3518 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.107)	-
54	7	1384	Adenine-specific methyltransferase	hypothetical protein BafPKo_Q0015 [Borrelia afzelii PKo]	Conserved (LD groupo and <i>Borrelia miyamotoi</i>)	Independent	- (0.138)	-