

F-1 野生生物集団の絶滅プロセスに関する研究

(2) 寄生者・病原体の効果と伝播機構の解明

①病原体に対する抵抗性発達に関する研究

研究代表者 国立環境研究所生物圏環境部 椿 宜高

環境庁国立環境研究所

生物圏環境部

上席研究官

椿 宜高

地球環境研究グループ

野生生物保全研究チーム

高村健二・永田尚志

(委託先)

東京大学農学部

甲斐知恵子

九州大学理学部

矢原徹一

平成8-10年度合計予算額 31,056 千円

(平成9年度予算額 13,032 千円)

〔要旨〕感染症の流行が野生植物集団に及ぼす影響を、ヒヨドリバナ有性型・無性型とジェミニウイルスの関係について調べた。ウイルス感染は、クロロフィルの減少を通じて死亡率を増大させ、無性型集団を絶滅させることがわかった。遺伝的変異の多い有性型集団では、ウイルス感染率は低かった。ヒヨドリバナには、耐病性をにう多数の遺伝子があることが判明した。保全上はこのような耐病性遺伝子の変異を保つことが重要である。

近年、イヌおよび野生動物にイヌジステンパーウイルス(CDV)感染症の流行が起こっている。我々はこの流行の原因・伝播機構を解明することを目的に、流行状況の調査およびウイルス病原体変異などの基礎的研究を行った。まず日本のイヌでの調査研究により、従来とは異なる症状型の存在とウイルスの遺伝子の変異を明らかにした。日本のタヌキの流行はイヌからの伝播によると推察し、海棲哺乳類でも流行が起きていることを明らかにした。

〔キーワード〕ウイルス病、耐病性、遺伝的変異、イヌジステンパーウイルス、モービリウイルス

自然生態系の中に存在する生物集団においては、農業生態系におけるような病気の蔓延はほとんどないと考えられてきたが、近年はこの認識を改める必要性が生じている。それは、近年の人間活動による自然生態系の攪乱により病気の蔓延の様態が変化しつつあるからである。その変化の内容として、人間や人間が導入する生物による新しい病原体への接触機会が増加すること、生物集団の病気抵抗性に関する遺伝的多様性が低下し感染性が高くなることが示唆されている。そこで、野生生物の病気感染のメカニズムを早急に明らかにする必要がある。ここでは植物と動物の2種類系を選び、宿主・ベクター・病原体の3者の動態を解析する。ヒヨドリバナでは寄主だけでなくウイルスの遺伝的多様性にも着目し、両者の多様性の動態および相互作用を共進化の視点から明らかにする。ジステンパーウイルスに関しては近年新しいタイプのウイルス病の流行が世界中で頻発していることから、ウイルスのDNA配列の比較研究によって遺伝子進化を再構築しジステンパーの感染経路を明らかにすることを目的とした。

1. ウイルス病の感染機構、動態、耐病性と遺伝変異の関係

(1) はじめに

感染症の流行は野生集団の存続にとってしばしば大きな脅威となると考えられている。しかし、感染症の流行下にある野生生物個体群の動態を追跡した研究はごくわずかしかなく、病気だけでは野生生物は絶滅しないという意見もある。また耐病性の遺伝的変異が減少すると感染症が流行しやすくなると考えられているが、その証拠はまだほとんど得られていない。

本研究は、ヒヨドリバナ有性型・無性型とそれに感染するジェミニウイルスの関係をモデルシステムとして、ウイルス感染症が野生植物個体群に与える影響を解明するために行われた。また、野生植物集団における耐病性遺伝子の遺伝的変異を調査する技術の確立をめざした。

(2) 材料および方法

ヒヨドリバナは日本に広く分布するキク科の多年草であり、有性生殖型と無性生殖型を含む。ふつうに見られるのは無性生殖型である。無性生殖型は有性生殖型よりも種子生産量が多く、たった1個体でも交配せずに多量の種子をつける性質がある。このため、伐採跡地、道路沿いの草地などにすばやく進入し、数年で大きな集団を形成する。無性型は頻繁にジェミニウイルスの感染を受ける。感染個体は葉が黄化するので容易に認識できる。ウイルス感染が見られる3集団について、個体群動態を3年間にわたって追跡調査した。また、感染個体と非感染個体の光合成速度や成長率を実験条件下で比較した。

ジェミニウイルス感染はタバココナジラミ・スイカズラコナジラミによって媒介される。いちど感染を受け、全身症状をあらわした個体からウイルスが消失することはない。

ジェミニウイルスについては分子生物学的研究が急速に進み、ゲノムの構成や遺伝子の機能がよくわかっている。多くの植物ウイルスがRNAウイルスであるのに対して、ジェミニウイルスはDNAをゲノムに持つ。ヒヨドリバナに感染するのは、タバコ巻き葉ウイルス(TLCV)である。これに近縁なジェミニウイルスのゲノムサイズは約2700塩基対であり、7つの遺伝子を持つ。このうちORF C4が、ホストレンジの決定(ホストに感染できるかどうかの決定)に関与しており、この遺伝子のアミノ酸が変化すると、感染できるホストの範囲が変化する。さまざまなヒヨドリバナ無性遺伝子型からウイルスを含む全DNAを単離し、このORF C4の塩基配列をPCRで増幅して配列を決定した。

ヒヨドリバナの耐病性の遺伝子を探索するために、LRR-NBS型耐病性遺伝子の保存的領域をもとに設計したプライマーを用いてDNA断片を増幅し、その塩基配列を決定した。

(3) 結果

光環境を制御した実験条件下での感染個体と非感染個体の成長・生存を比較した結果、ジェミニウイルスに感染したヒヨドリバナでは、クロロフィルが減少し、その結果光合成速度、成長

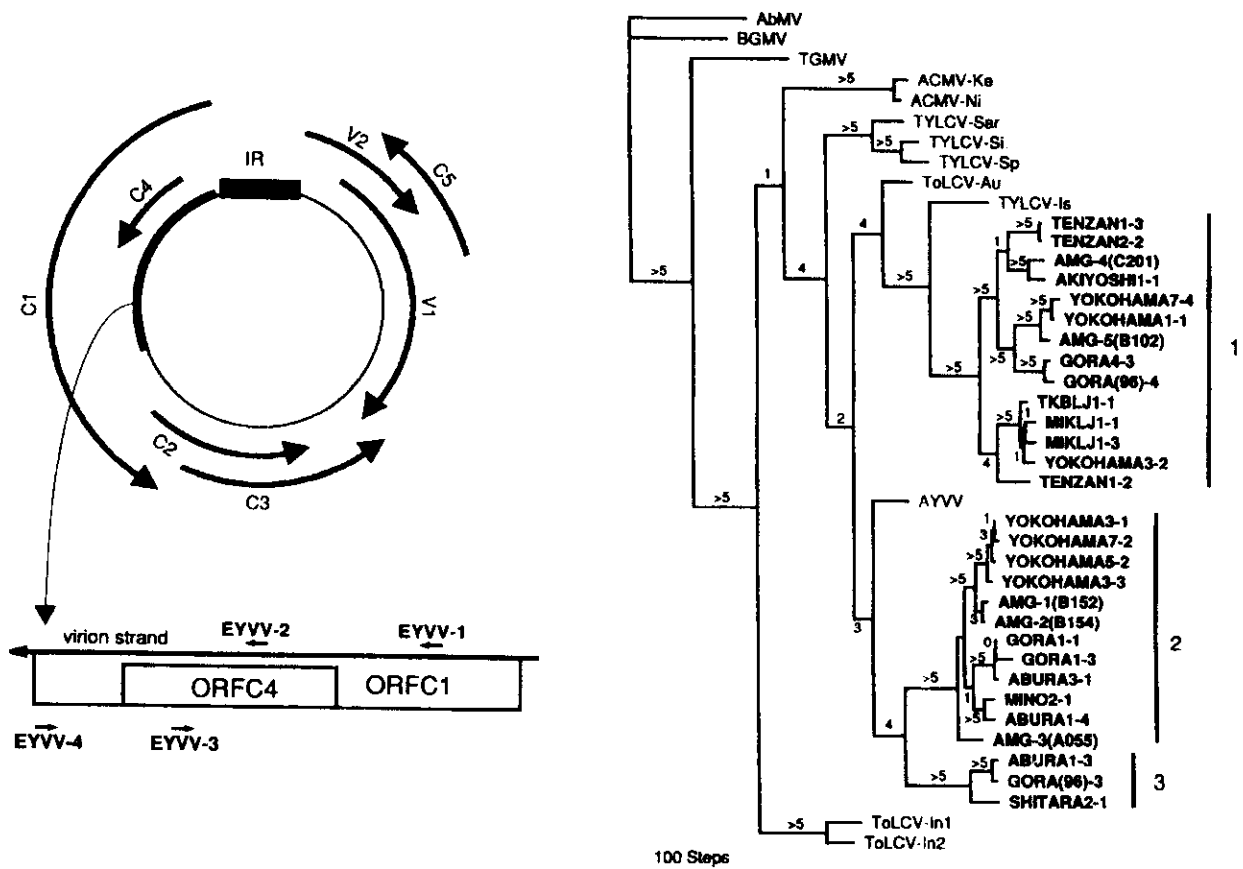


図 2.1. 図 ジェミニウイルスのゲノムの構造、およびヒヨドリバナに感染していたジェミニウイルス（太字）およびそれに近縁なジェミニウイルス（細字）の分子系統。系統樹はゲノム構造の模式図に図示した領域の塩基配列にもとづいて作成した。大きく3つのグループに分かれる多様なウイルスがヒヨドリバナに感染していることがわかる。

速度が低下した。この悪影響は光条件が悪いほど顕著であり、50%遮光区では感染個体・非感染個体ともに100%生存したが、13%遮光区では非感染個体の生存率93%に対して、感染個体の生存率は47%に低下した¹⁾。

野外個体群の観察によれば、ウイルスの侵入後、感染症はわずか1年で集団中に蔓延した。したがって、コナジラミによる媒介はきわめて効率よく行われた。感染個体は非感染個体よりも成長量が小さく、生存率が低く、ジェミニウイルス感染は、ヒヨドリバナ無性型野外集団における主要な死亡要因だった。また感染個体では繁殖が抑制される傾向があった。光条件が悪い環境では、ウイルス感染の悪影響がとくに強くあらわれ、ときには数年で集団がほぼ絶滅に至ることが

わかった²⁾。感染葉から抽出された DNA サンプルを用いて、ジェミニウイルスの ORF C4 の塩基配列を比較した結果、ヒヨドリバナ無性型には非常に多様なジェミニウイルスが感染していることがわかった³⁾。図 2.1 に示すように、これらのウイルスは 3 つの単系統群に分類された。単系統群 1 は TYLCV-Is と、単系統群 2・3 は AYVV と近縁であり、ヒヨドリバナに感染するウイルスは多系統だった。また ORF C4 は非常にアミノ酸置換を起こしやすい遺伝子であることがわかった⁴⁾。

静岡県天城山における隣接する有性型集団と無性型集団で比較を行ったところ、遺伝的変異に富む有性型集団ではウイルス感染率が低かった。これらの集団における感染パターンを ORF C4 の SSCP プロフィールで比較した。有性型集団・無性型集団いずれにおいても、単一感染に加え、遺伝的に異なるウイルスの二重・三重感染が見られた。これらのウイルスの ORF C4 を含む領域の塩基配列を決定したところ、有性型から単離されたウイルスの配列では、ORF C4 のアミノ酸置換数が増大していた⁵⁾。このことから遺伝的変異性の高い有性型集団で感染を続けるためにはウイルスはより高速で進化しなければならず、そのために容易に蔓延できないことが示唆された。

ヒヨドリバナ 1 個体から得た DNA サンプルを用いて、LRR-NBS 型耐病性遺伝子のホモログを PCR によって増幅することに成功した。既知の配列と高いホモロジーがあり、機能的なアミノ酸配列をコードしているホモログを 12 個得た。既知の配列とともに系統解析を行った結果、ヒヨドリバナの LRR-NBS 型耐病性遺伝子は単系統であった。

(4) 考察

作物においては、病気の流行がしばしば収量を大きく低下させることがよく知られている。しかし、これは遺伝的に均質な品種が大面積にわたって栽培されるために起きる現象であり、野生植物では病気が個体群に与える影響は小さいと考えられてきた。この考え方に対し、Budon は 1987 年に「病気と植物の集団生物学」と題する教科書を執筆し、野生植物個体群でも病気の影響が小さくないことを強調した⁶⁾。その後、植物寄生菌類による病気が植物野外個体群に大きな影響を与えることについて、いくつかの報告がなされた。本研究は、ウイルス感染症が野生植物個体群に与える影響をはじめて明らかにしたものである。ウイルス感染症は野生植物においても一般的に見られるが、感染の有無を確認するには通常生化学的方法が必要なため、生態学的にはこれまでほとんど研究されてこなかった。

ヒヨドリバナにおけるジェミニウイルス感染症は、葉脈黄化という顕著な可視的病徴をあらわす。この病徴は人為的接種後すみやかにあらわれること、野外における緑色葉からは PCR によってジェミニウイルス DNA を増幅できないことから、葉脈黄化によって感染の有無を判定することは妥当である。このような利点を生かして、本研究では 3 つの野外集団における感染症の流行過程を追跡することができた。その結果、感染症はわずか 1—2 年で集団に蔓延し、光条件が悪い場合には数年のうちに集団を絶滅させることが明らかになった。

野外の個体の成長・生存には多様な要因が関与するため、野外研究だけで集団の激減・絶滅がウイルス感染によるものであることを結論づけることは難しい。本研究では、光環境を制御した実験によって、ウイルス感染がたしかに個体の成長速度・生存率を低下させることを証明した。また、ウイルス感染がクロロフィルおよびそれに結合するタンパク質の破壊を通じて光合成速度

を低下させることを生理学的に証明した。これらの結果から、ウイルス感染がヒヨドリバナ野外集団における主要な死亡要因であることが明らかになった。

ウイルスを含む病原体は、宿主植物よりも世代時間がはるかに短いため、短期間に宿主植物の特性に適応する可能性がある。このような可能性は理論的には指摘されていたが、そのプロセスを実証することは困難であった。その理由は、野生植物の病原体については、ほとんど病理学的な研究が行われていないためである。ヒヨドリバナに感染するジェミニウイルスに関しては、例外的に詳しい性質がわかっており、ホストレンジ決定に関与する ORF C4 を含む DNA 断片を PCR によって増幅し、その分子進化を解析することができた。本研究の結果から、ヒヨドリバナに感染するジェミニウイルスが遺伝的にきわめて多様であり、タバコなどの作物に感染するのはそのごく一部であることが明らかになった。さらに、ヒヨドリバナ無性型集団から、より遺伝的変異に富む有性型集団に侵入し、ひろがる過程では、ORF C4 のアミノ酸置換数が増大することが明らかになった。この結果は、有性生殖・組み換えによって遺伝子型の多様性を増やすことが、病原体の蔓延を防ぐ効果があるという、いわゆる「赤の女王仮説」を支持するものである。この結果から、野生植物集団の保全上は、耐病性遺伝子の変異を保持することが重要であると考えられた。

そこで、野生植物集団における耐病性遺伝子の変異を調査するための方法を検討した。耐病性遺伝子は、1993 年にはじめてクローニングされ、その後 5 年間に急速に研究が進んだ。その結果、多くの作物では、5'側に核酸結合部位 (NBS)、3'側にロイシンリッチリピート (LRR) を持つ一群の遺伝子を持つことが明らかになった。これらの作物の遺伝子に見られる保存的領域の配列をもとに、NBS-LRR 型耐病性遺伝子ホモログを PCR によって増幅し、配列を決定することに成功した。その結果、ヒヨドリバナは、1 個体でも少なくとも 12 個の遺伝子を持つことが判明した。これまで野生植物集団の遺伝的変異は中立的な遺伝子を使って調査されてきた。本研究で採用した方法は、機能的な遺伝子を使って集団の変異を調査することを可能にするものであり、今後広く応用されるであろう。

引用文献

- 1) Funayama, S., K. Hikosaka & T. Yahara. 1997. Effects of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (Compositae). *American Journal of Botany* 84: 823-829.
- 2) Funayama, S., I. Terashima & T. Yahara. Effects of virus infection and light environment on population dynamics of *Eupatorium makinoi* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, submitted.
- 3) Ooi, K., S. Ohshita, I. Ishii & T. Yahara. 1997. Molecular phylogeny of geminivirus infecting wild plants in Japan. *Journal of Plant Research* 110: 247-257.
- 4) Yahara, T., K. Ooi, S. Ohshita, I. Ishii & M. Ikegami. 1998. Molecular evolution of a host-range gene in geminiviruses infecting asexual populations of *Eupatorium makinoi*. *Genes and Genetic Systems* 73: 137-141.
- 5) Ooi, K. & T. YAHARA. 1999. Genetic variation of geminiviruses: comparison between

sexual and asexual host plant populations. *Molecular Ecology* 8: 89-97.

- 6) Burdon, J. J. 1982. *Diseases and Plant Population Biology*. Cambridge University Press, Cambridge. 208pp.

2. イヌジステンパーウイルスの野生動物での流行状況とその伝播機構の解析

(1) 東京地区における近年のイヌジステンパー発生状況に関する疫学的観察

①材料と方法

最近の東京における CDV 感染症の発生について臨床症状や CDV 中和試験(VN test)による疫学的調査を行った。

②結果

罹患犬は臨床症状から、全身症状と、神経症状のみを示すグループの2つが約半々の割合で存在することが明らかになった。また、ワクチン株に対する血清は分離した2つの野外株に対しては低い反応性を示した。

③考察

野外において異なるタイプの CDV が存在することが示唆された。

(2) immunocapture ELISA 法を用いた CDV の血清学的解析

①材料と方法

CDV を直接検出するための、迅速かつ高感度の方法として immunocapture ELISA の開発を試みた。さらに、VN test に本法を応用した。

②結果

この方法の感度と特異性は実用に当たり十分なものであった。また、ワクチン株を実験感染させたイヌと、野外感染例のイヌの血清での交差中和活性に違いがあったことから、野外の CDV の抗原性には違いがあることが示唆された。

(3) CDV の NP 遺伝子のクローニングおよびNP蛋白の発現

①材料と方法

CDV Ondrstepoort 株 NP 遺伝子の全長 cDNA クローンを得、RVSV のプロモーターを用いた遺伝子発現システムを用い、Vero 細胞でのNPの発現を試みた。

②結果

種々の抗 CDV-NP 抗体や抗麻疹ウイルス-NP 抗体を用いた間接蛍光抗体法やウエスタンブロッティングによって NP の発現を確認した。

(4) 日本で認められた CDV 感染症の病理組織学的特徴

①材料と方法

中部地方と東京においてイヌジステンパーを発症した 11 例のイヌについて、臨床・病理組織学的検討を行った。

②結果

全例で呼吸器症状と神経症状が見られ、病理組織学的にも気管支肺炎と脱髄性脳炎が観察されたが、消化器症状においては差が認められた。中部地方のイヌ 4 例中 3 例は重度の消化器症状を示し、病理組織学的には粘膜上皮に多数の好塩基性封入体が存在した。対照的に、東京の 7 匹のイヌは消化器症状も、胃や腸の上皮細胞における封入体も認められなかった。

③考察

腸管組織における病原性が異なる二つのタイプのイヌジステンパーが存在することが示唆された。

(5) 野外分離 CDV の H タンパクの性状解析

①材料と方法

3 株の CDV を日本の犬から分離し、それらの H タンパクの性状を免疫沈降法、塩基配列決定および遺伝系統樹により解析した。

②結果

免疫沈降法において、野外株の H タンパクはワクチン株の分子量 (78 kDa) とは異なる 84 kDa であった。塩基配列解析により、糖鎖付加部位がワクチン株の H タンパクが 4 カ所であるのに対し、分離株には 9 カ所存在することが明らかとなった。また遺伝系統樹的に、新しい日本の分離株はヨーロッパやアメリカの最近の分離株および野生動物からの分離株と同じクラスに属し、ワクチン株と異なることが明らかになった。

③考察

今後、日本のイヌジステンパーウイルスの研究は野生動物の流行解明の一助となると思われる。

(6) 野外分離 CDV F タンパクの性状解析

①材料と方法

CDV 野外分離株の F タンパクの性状を免疫沈降法および塩基配列決定解析した。

②結果

MAb に対する反応性及び免疫沈降法での電気泳動度には、ワクチン株と比較して顕著な差が認められなかった。また塩基配列の解析でも、野外分離株と対照株とは約90%の相同性を示した。

③考察

野外分離株のFタンパクではHタンパクほどの変異が起こっていないと考えられた。

(7) 日本におけるCDV 近年流行株のRFLPによる同定

①材料と方法

RT-PCR 法によりウイルスゲノムのH遺伝子の一部を増幅し、制限酵素EcoRVで切断後アガロースゲル電気泳動により観察した。

②結果

ワクチン株は切断されず、近年野外から分離された株は2つに切断される泳動像が得られた。この方法はCDV感染犬の臓器材料を用いた検索にも有効であった。

③考察

本法により、CDVがワクチン株を含む旧型か、日本で流行している新型かを迅速かつ簡便に型別出来るようになった。また本法は、ワクチン接種歴のあるイヌのCDV感染症発症における病因ウイルスの同定に有用である。

(6) 野生タヌキ由来イヌジステンパーウイルスの性状解析

①材料と方法

神奈川県のカンザン様症状を示すタヌキの末梢血リンパ球からウイルスの分離を試みた。分離ウイルスについて、免疫沈降法、塩基配列決定などにより、性状を検討した。また、ELISA法とVN testによる血清疫学調査を行った。

②結果

分離したウイルスはH遺伝子の塩基配列の解析により、ワクチン株よりも日本の野外分離株と近縁であることが、明らかになった。モノクローナル抗体(MAb)を用いた免疫沈降試験でも、イヌの野外株とほとんど同様の反応性を示したが、Hタンパクに対する1つのMAb(JD7)についてのみ異なっていた。推定アミノ酸配列解析から、イヌからの野外分離株の相違は4カ所であり、これがMAbの反応性の違いに関与していることが示唆された。血清疫学調査により、1983-1997年の間に神奈川県、大阪府、兵庫県、広島県で採取されたタヌキ血清において抗CDV抗体を検出した。

③考察

野生のタヌキから分離されたウイルスは、塩基配列、及び抗原性において、ワクチン株を含む旧型株よりも近年の日本の流行株と近縁であったことから、野生動物における CDV 感染症の発生にはイヌの流行株の伝播であることが示唆された。

(9) 日本近海の海棲哺乳類におけるモービリウイルスの血清疫学調査

①材料と方法

日本各地の水族館所有および日本近海のイルカ類、及び鯨類について ELISA 法と VN test とを用いて血清疫学調査を行った。

②結果

イルカ類においては、VN test で 1996 年で 50%、1997 年で 15.7% の陽性率であった。また、採取地別では太平洋側に陽性例が存在した。鯨類においては、抗アザラシジステンパー抗体の陽性率は 1994 年で 100%、1995 年で 20%、1996 年で 71.4%、1997 年で 45%、1998 年で 62.6% であった。

③考察

日本近海の太平洋に生息するイルカ類において 1996 年以前にモービリウイルスの感染があったことが推察された。鯨類においては 1994 年における陽性率がもっとも高かったことから、1994 年以前に広く伝播したと考えられた。

(10) カスピ海・バイカルアザラシにおけるモービリウイルスの血清疫学調査

①材料と方法

1997 年に初めて CDV 感染が報告されたカスピ海アザラシと、1987 年に CDV 感染症の流行があり、1992 年までは調査報告があるバイカルアザラシの血清について ELISA 法および VN test を用いて血清疫学調査を行った。

②結果

カスピ海アザラシの血清においては 1993 年に採取した 14 例中 1 例が ELISA および中和抗体共に陽性を認め、1997 年では 10 例中 9 例が両検査法とも抗体陽性であった。また、それらのほとんどが高い中和活性を持っていた。1998 年に採取したバイカルアザラシ血清においては 7 例中 6 例で中和試験、ELISA 法とも陽性であった。

③考察：1997 年のカスピ海アザラシに高い抗体価が認められたことから、カスピ海においても 1997 年初頭か 1996 年頃にモービリウイルス感染の流行があったことが推察された。バイカル湖では、今回は高い抗体価は認められなかったものの、ほとんどの個体が抗体を保持して

いたことから、近年もCDV感染が起こっていると推察された。

研究成果の発表状況

論文発表

- Gemma T., Wtari T., Akiyama K., Miyashita N., Shin Y.-S., Iwatsuki K., Kai C. & T. Mikami: Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 547-550. (1996)
- Gemma T., Iwatsuki K., Shin Y.-S., Yoshida E., Kai C. & T. Mikami: Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 791-794. (1996)
- Kobune F., Takahashi H., Terao K., Ohkawa T., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N., Sakata H., Yamanouchi K. & C. Kai: Nonhuman Primate Models of Measles. *Laboratory Animal Science* 46: 315-320. (1996)
- Shin Y.-S., Mori T., Tomonaga K., Iwatsuki K., Kai C. & T. Mikami: Expression of the nucleocapsid protein gene of the canine distemper virus. *Journal of Veterinary Medical Science* 59: 51-53. (1997)
- 甲斐 知恵子: モービリウイルス-人間社会・動物社会双方向エマージングウイルス-。科学 特集「現代社会を揺るがす感染症」 67:143-148 (1997)
- Iwatsuki K., Miyashita N., Yoshida E., Gemma T., Shin Y. -S., Mori T., Hirayama N., Kai C. & T. Mikami: Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin proteins of field isolates from dogs naturally infected with canine distemper virus. *Journal of Veterinary Medical Science* 78: 373-380. (1997)
- Okita M., Yanai T., Ochikubo F., Gemma T., Mori T., Maseki T., Yamanouchi K., Mikami T. & C. Kai: Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *Journal of Comparative Pathology* 116:403-408. (1997)
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y-S., Mori, T., Hirayama, N., Kai, C. & T. Mikami: Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin proteins of field isolates from dogs naturally infected with canine distemper virus. *Journal of General Virology* 78: 373-380. (1997)
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Shin, Y-S., Ohashi, K., Kai, C. & T. Mikami: The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 381-385. (1998)
- 甲斐 知恵子: 環境変化と野生動物の伝染病流行 (特集: 人と野生動物のかかわり-野生動物の危機を考える-)。獣医畜産新報 JVM 50:497-499. (1997)
- 甲斐 知恵子: ジステンパーウイルス感染症の現状。SAC 107: 11-15. (1997)
- 甲斐 知恵子: 野生動物のウイルス感染症 (特集: 獣医野生動物学研究の最先端)。獣医畜産新報 JVM 50: 685-690. (1997)

- 甲斐 知恵子: 伝染病が野生動物個体群に及ぼす影響 (総説) (特集: 環境科学としての獣医学 -その発想と研究の実験-)。日本野生動物医学会会誌。2: 113-117. (1997)
- Nakamura, K., Oishi, K., Okubo, S., Kamata, H., Yamanouchi, K., Fujiwara, K. & C. Kai: Immunization of rabbits against systemic rinderpest virus infection by vaccinia virus expressing the nucleoprotein of rinderpest virus. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Disease* 21: 91-99 (1998)
- Yoshida, E., Iwatsuki, K., Miyashita, N., Gemma, T., Kai, C. & T. Mikami: Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan.. *Veterinary Microbiology* 59: 237-244 (1998)
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Shin, Y-S., Ohashi, K., Kai, C. & T. Mikami: The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 381-385 (1998)
- Yamanouchi, K., Barrette, T. & C. Kai: New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 17: 641-653 (1998)
- 甲斐知恵子: 犬のジステンパーウイルスの遺伝子。 *ProVet* 11: 21-25 (1998)
- Ohashi, K., Iwasaki-Horimoto, K., Nakamura, K., Mikami, T. & C. Kai: Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 1209-1212 (1998)
- 甲斐知恵子: ウマからヒトに感染するモービリウイルス感染症 遺伝.53: 24-28 (1999)
- 矢原徹一・松田裕之・魚住雄二: マグロは絶滅危惧種か? 絶滅のリスク評価をめぐって。 *科学* 66: 775-781 (1996)
- Funayama, T., K. Hikosaka & T. Yahara: Effects of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (Compositae). *American Journal of Botany* 84: 823-829. (1997)
- Yahara, T. & K. Ooi: Virus infection and the evolution of sex in flowering plants. *J. Rep. Dev.* 43 (Suppl.): 9-10. (1997)
- Ooi, K., S. Oshita, I. Ishii & T. Yahara: Molecular phylogeny of geminivirus infecting wild plants in Japan. *J. Pl. Res.* 110: 247-257. (1997)
- Sharma, A., A. Maruyama, T. Osaki, K. Ooi, T. Yahara & M. Ikegami: Genotypic variability in AC1 ORF region of Tobacco Leaf Curl Geminivirus from naturally infected wild plants. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 63: 298-303. (1997)
- Matsuda, H., T. Yahara & Y. Uozumi: Is the tuna critically endangered? Extinction risk of a large and overexploited population. *Ecological Research* 12: 345-356. (1997)
- 松田裕之・矢原徹一: 保全生物学—ミナミマグロは絶滅危惧種か—。 *月刊海洋* 29: 320-324 (1997)
- Yahara, T., K. Ooi, S. Oshita, I. Ishii & M. Ikegami: Molecular evolution of a host-range

- gene in geminiviruses infecting asexual populations of *Eupatorium makinoi*.
Genes & Genetic Systems 73, 137–141. (1998)
- Matsuda, H., Y. Takenaka, T. Yahara, & Y. Uozumi: Extinction risk assessment of declining wild populations. *Researches on Population Ecology* 40: 271–278. (1998)
- 矢原徹一: 赤の女王を追って 性を捨てたヒヨドリバナとジェミニウイルスの共進化。 *遺伝* 52(9): 20–26 (1998)
- Ooi, K. & T. Yahara: Genetic variation of geminiviruses: comparison between sexual and asexual host plant populations. *Molecular Ecology* 8: 89–97. (1999)