

20020629

厚生労働科学研究費補助金

平成14年度

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及び

ワクチン開発に関する研究 (H12-新興-32)

研究報告書

平成15年3月

主任研究者 倉根一郎

(国立感染症研究所)

## 目 次

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究・・・	1
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
ウエストナイルウイルス感染症に対する実験室診断法の確立と日本におけるウエストナイル ウイルスサーベイランス・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	25
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
2002年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断・・・・・・・・・・・・・・・・	32
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
ブタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス・・・・・・・・・・・・・・・・	39
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
デング IgM-ELISA へのベータプロピオラクトン不活化ウイルス抗原の応用・・・・・・・・	48
分担研究者：名和 優（埼玉医科大学微生物学教室）	
節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究・・・	55
分担研究者：森田公一（長崎大学医学部熱帯医学研究所）	
組換え核蛋白を抗原とした IgM-capture ELISA によるクリミア・コンゴ出血熱の診断・・・	61
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
ウエストナイルウイルスに対する日本産蚊類、特にアカエイカの感受性・・・・・・・・	69
分担研究者：江下優樹（大分医科大学感染分子病態制御講座）	
デング熱媒介蚊の寄生原虫 <i>Ascogregarina</i> spp. を用いた新しい防除法の開発、蚊からのウエス トナイルウイルスの検出における VecTest と RT-PCR 法との比較、ウエストナイル熱の媒介蚊 対策に関するガイドライン作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	88
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部）	
カニクイザルにおける日本脳炎 DNA ワクチンの有効性に関する研究・・・・・・・・	94
分担研究者：棚林 清（国立感染症研究所獣医科学部）	
日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法・・・	100
分担研究者：山岡政興（兵庫県立健康環境科学研究所）	
日本脳炎 DNA ワクチン：ウイルス体内移行を抑制する中和抗体の役割・・・・・・・・	106
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）	
粘膜免疫型日本脳炎ワクチンに関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	114
分担研究者：只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座）	
陽イオン親和性薬剤のクロルプロマジン添加による Vero cell への日本脳炎ウイルス感染の抑 制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	119
分担研究者 名和 優（埼玉医科大学微生物学教室）	

総括研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第1部 部長）

研究要旨：研究要旨：節足動物媒介性ウイルスは数十種がヒトに病気をおこし、新興・再興感染症として、また日本にとっては輸入感染症として非常に重要な位置を占める感染症である。本研究は、節足動物媒介性ウイルス感染症に対する包括的な研究を行うものである。本年度の研究では以下の成果が得られた。

（1）節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の確立と疫学的研究：1）ウエストナイルウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法が確立された。米国からの帰国者に関して検査を実施したが、いずれも陰性であった。2）海外旅行からの帰国者についてデングウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断を行い多数のデングウイルス感染患者の存在を明らかにした。3）豚から日本脳炎ウイルスを分離し遺伝子解析を行った。4）チクングニヤウイルスの塩基配列を決定し遺伝子診断法を開発した。5）組換え核蛋白を抗原とした IgM 捕捉 ELISA により中国におけるクリミア・コンゴ出血熱患者を診断した。

（2）媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握：1）ウエストナイルウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立し、アカエイカ、チカイエカ、ヒトスジシマカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを明らかにした。2）RT-PCR と市販ウエストナイル抗原検出キットいずれも蚊においてウエストナイルを十分検出することを示した。3）わが国にウエストナイルウイルスが進入した場合を想定したウエストナイルウイルス媒介蚊対策に関するガイドラインを作成した。

（3）節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫の解明と新型ワクチンに必要な基礎技術の開発：1）日本脳炎ウイルス prM・E 遺伝子を含む DNA ワクチンがカニクイザルにおいて中和抗体を誘導することを示した。2）針無し注射器接種法が日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強することをマウスにおいて示した。3）DNA ワクチンによる日本脳炎の防御には中和抗体によるウイルスの体内移行の抑制が重要であることを示した。4）粘膜免疫型日本脳炎ワクチンによって日本脳炎ウイルス中和抗体を誘導した。

分担研究者：

江下優樹（大分医科大学感染予防医学講座  
助教授）

小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座  
助教授）

小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部  
部長）

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一  
部 室長）

只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座  
助教授）

棚林 清（国立感染症研究所筑波霊長類セ  
ンター 主任研究官）

名和 優（埼玉医科大学微生物学講座 講  
師）

森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一  
部 室長）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所分子構  
造解析分野 教授）

山岡正興（兵庫県立健康環境科学研究セン  
ター 研究主幹）

#### A. 研究目的

現在、日本国内で感染しうる節足動物媒介性ウイルスは、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスのみと考えられている。しかし、世界的にみれば節足動物媒介性ウイルスは数十種のウイルスがヒトに感染し病気をおこすことが知られており、デングウイルスや黄熱ウイルスのように海外において毎年多数の感染者が発生し、さらに致死的であるものも多い。近年、海外旅行者の増加に伴い、デング熱等に見られるように海外旅行中に感染し帰国後発症するいわゆる輸入感染症として診断されている症例があるが、診断されずに見逃されている例

もあると考えられる。一方、1999年にアメリカ合衆国でみられた西ナイル脳炎のように、過去国内に存在しない節足動物媒介性ウイルス感染症が出現する可能性も存在する。したがって、これら輸入感染症あるいは輸入感染症として国内に侵入する可能性のある多種の節足動物媒介性ウイルスに対して診断法を確立しておくこと、さらに、これらのウイルス感染症の日本国内における状況を血清、病原体、ベクターの面から把握することが重要である。一方、ワクチンに関しては日本脳炎、黄熱、ダニ媒介性脳炎に対してのワクチンは実用化されているが、現行ワクチンにはない特徴をもつ新規ワクチン開発の意義は大きい。さらに、これ以外の節足動物媒介性ウイルスに対して実用化されているワクチンはなくその開発も重要である。従って、本研究は以下の3つの目的を有する。(1) 日本に侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対して、血清診断法と病原体診断法を確立する、(2) 節足動物媒介性ウイルスの国内における感染状況を病原体およびベクターの両面から把握する、(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチンの開発に向けて、動物実験を含めた基礎的研究を行う。

#### B. 研究方法

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の確立と疫学調査

1) ウエストナイルウイルスの実験室診断法とサーベイランス：IgM 捕捉 ELISA 法と RT-PCR 法で行った。今年度は、米国疾病管理予防センター (CDC) より分与されたウエストナイルウイルス感染者血清 20

検体を用いて、IgM抗体検出法の評価を実施した。フラミンゴから分離した WNV (NY strain) の配列から、Oligo™ Primer Analysis Software (Molecular Biology Insight, Inc.)を用いて以下のプライマーセットを設計し使用した。サーベイランスについては、米国からの帰国者に対して 2,000 年より夏季に成田空港にて、熱等の症状の有る方や蚊にさされた記憶があり心配な方に血液検査(PCRによる遺伝子検出、特異的 IgM抗体検査)を実施する旨を呼びかけており、2002 年度も健康相談の上、検査希望者には血清・病原体・遺伝子診断を実施した。

2) プタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス：ウイルス分離は以下のように行った。日本脳炎ウイルス IgM抗体が陽性となった時点より、1 週ないし 2 週前のプタ血清をウイルス分離材料として用いた。分離は株化細胞による分離法を主として用いた。Vero 細胞および C6/36 細胞を用いた。

3) デング IgM 捕捉 ELISA 法へのベータプロピオラクトン不活化ウイルス抗原の応用：1 型—4 型のデングウイルスを C6/36 cell へ感染させ、感染培養上清を抗原として用いた。感染培養上清中に含まれる感染性ウイルスを不活化するため、ベータプロピオラクトンを直接、最終濃度 0.2%に添加し、37°C、10 分から 1 時間保温した。BPL によるウイルス不活化の測定は、Vero cell を用いたフォーカス形成法を用いた。

4) チクングニヤウイルスの塩基配列の決定と遺伝子診断法の開発：回転培養法で大量に培養したヒトスジシマカ培養細胞クローン C6/36 細胞にチクングニヤウイルスを感染させ培養液中に産生されたウイルス粒

子を CS レジン、蔗糖密度遠心勾配超遠心法などを用いて高純度に精製し、ウイルス遺伝子 RNA を抽出する。逆転写酵素を用いてウイルス遺伝子 RNA に相補的な一本鎖 cDNA を合成する。この一本鎖 cDNA から LongPCR 技術を用いてチクングニヤウイルスの遺伝子断片を増幅してジーンウォーキング法で直接遺伝子断片の塩基配列を読んだ。5' と 3' 末端についてはそれぞれ 5' RACE 法、3' RACE 法にて塩基配列を読んだ。上記の完全長のチクングニヤウイルス遺伝子塩基配列を他のアルファウイルスと比較解析し特異的 RT-PCR 法を構築した。

5) 組換え核蛋白を抗原とした IgM-capture ELISA によるクリミア・コンゴ出血熱の診断：2001 年と 2002 年に新疆ウイグル自治区西部の CCHF 流行地で発生した 12 名の急性期 CCHF 患者から採取された血清 18 検体を用いた。12 名中 6 名からは約 1 週間の間隔をあけて 2 回血液が採取された。これらの血液は CCHF のウイルス学的診断目的にインフォームドコンセントを得た上で採取され研究に供された。また陰性コントロール血清として、CCHF 非流行地のヒト血清 48 検体を用いた。CCHF ウイルスに対する IgG 抗体検出法、CCHF ウイルスに対する IgM 抗体検出法、ウイルスゲノムの検出法についてはすでに報告した。

(2) 媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握

1) ウエストナイルウイルスに対する日本産蚊類、特にアカイエカの感受性：ウガンダ産ウエストナイルウイルスを用いた。分与されたウイルスに感染した C6/36 蚊培養細胞培養上清からストックウイルスを準備して実験に供した。感染実験に用いたアカ

イエカは、大阪市内で採集された後継代中のものの分与を受けて用いた。ウイルス感染蚊の作製は以下のように行なった。蚊胸部接種感染では、約0.2ul (4-6 x 10<sup>3</sup> pfu/0.2ul) のウエストナイルウイルス液を、羽化5-6日後のアカイエカ雌成虫の胸部側板内に接種した。また、経口感染では、PBSで3回洗ったヒト赤血球にほぼ等量のウイルス液を加え、最終濃度4%の蔗糖を加えた。感染蚊から総RNAを抽出するために、Isogen-LS(日本ジーン社製)を使用した。抽出した総RNAペレットは10ulのRNase freeの蒸留水に溶解した後、実験に使用するまで-80°Cに保存した。

2) 蚊からのウエストナイルウイルスの検出におけるVecTestとRT-PCR法との比較：米国で近年市販された「VecTest」(Medical Analysis System社)とフラビウイルス検出で一般的に用いられるRT-PCRとの検出感度の比較を行った。WNV感染蚊は大分医科大学において2種の国内産蚊(ヒトスジマカ、アカイエカ)に約2×10<sup>3</sup>乗個を注射し作成した。また、感染症研究所ウイルス1部で系統維持されている培養されたWNVを各濃度に希釈し、各々のウイルス液を非感染蚊50匹の摩砕液に混合し、上記2種でのウイルス検出法の検出限界を調べた。

(3) 節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究

1) カニクイザルにおける日本脳炎DNAワクチンの有効性に関する研究：JEV中山株のprM及びE遺伝子をpNGVL4aベクターに挿入して得られたpNJEMEのDNAを精製し、ワクチンとして使用した。コントロールとしてはベクターDNAを用いた。国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで出

生、育成された年齢11-20歳のカニクイザル9頭(実験1)、年齢4歳(オス)9頭(実験2)を用いた。実験1においては、カニクイザルにベクターDNA(2頭)、免疫方法日本脳炎ウイルスprMとE遺伝子を含むDNAワクチン(pNJEME)pNJEME(3頭)300mcgを筋肉内(im)に接種し、2頭にはジーンガンを用いて3mcgを接種した。対照として参照日本脳炎ワクチンをヒトの1用量を皮下に接種した(2頭)。接種は4から6週間隔で3回行った。実験2では、5頭にpNJEME500mcgを大腿部筋肉内に4週間隔で3回投与した。4頭には対照としてベクターDNA500mcgを同様に接種した。最終免疫から2から3週間後に北京株またはJaTH株を攻撃ウイルスとして経鼻接種し、観察した。血清ウイルス中和抗体は90%または70%ブランク法により行った。

2) 日本脳炎及びデングDNAワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法：日本脳炎ワクチンとしては、市販のpcDNA3ベクター(Invitrogen)にJEウイルス、中山株のシグナル/prM/E遺伝子を組込んだプラスミドpcJEMEを用いた。デングワクチンとしては、デングウイルス2型ニューギニアC株の同遺伝子を組込んだpcD2MEを用いた。作製法の詳細は平成9年度及び平成10年度の研究班分担研究報告書「日本脳炎DNAワクチンの作製」及び「デングDNAワクチンの開発：マウスにおける中和抗体の誘導」に詳述した。プラスミドDNAは、それぞれトランスフォームさせた大腸菌DH5を2xYT培地で増殖させた後QIAfilter Plasmid Megaキット(Qiagen社)を用いて精製し、1%アガロースゲル電気泳動及び分光光度計を用いた吸光度測定によ

り定量した。バネ式の針無し圧力注射器シマジェット(U-100、インスリン用：島津製作所)を使用した。

3) 日本脳炎 DNA ワクチンにより誘導される防御免疫における、中和抗体の役割：ベクタープラスミドとして、JEV 蛋白がユビキチンとの融合蛋白として発現するように設計した pUBIQ を用いた(詳細は平成 10 年度の上記研究班分担研究報告書「マウスユビキチン搭載プラスミドベクターの構築」に記載)。JEV 中山株の E 前半部、NS3 及び NS5 の遺伝子を組み込んで、それぞれ pUJEE1、pUJENS3 及び pUJENS5 を得た(詳細は平成 11 年度及び 12 年度の上記研究班分担研究報告書に記載)。これらのプラスミド DNA は、Qiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen 社製)を用いて精製した。雄 BALB/c マウスに、DNA を 1 匹あたり 100ug のドーズで筋肉内接種することにより免疫した。中和抗体誘導型 DNA ワクチン (pcJEME) については 6 週齢時の 1 回または 6 と 8 週齢時の 2 回、また CTL 誘導型 DNA ワクチン (pUJEE1、pUJENS3、pUJENS5) については 6、8 及び 10 週齢時の 3 回で免疫した。12 週齢時に JEV 北京 3 株を腹腔内接種し 21 日間観察した。

4) 粘膜免疫型日本脳炎ワクチンに関する研究：コレラトキシン B 蛋白 (CTB) と日本脳炎ウイルス E 蛋白ドメイン III (ウイルス JE-E3) の融合遺伝子を含むプラスミド pBI[CTB/JE-E3]を鋳型に、PCR 法で下流に 6 つの His をコードするオリゴヌクレオチドを含む CTB/JE-E3 融合遺伝子 cDNA 断片を調整した。この cDNA を大腸菌発現ベクター pET43 のクローニングサイトに挿入して pET[CTB/JE-E3/6H]を構築した。発現蛋白の

検出と濃度測定、抗原性を  $G_{M1}$ -ELISA によって検討下。ELISA プレートに固相化した  $G_{M1}$  ガングリオシドに CTB ペンタマー、あるいは試料中の CTB/JE-E3/6H 複合体を捕捉し、一次抗体に抗 CT ウサギ抗体や抗 JE ウサギ抗体、二次抗体に AP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用いる間接法で行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行なわれた。ヒト検体を用いた研究は各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た後行われた。

### C. 研究結果

(1) 節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の確立と疫学調査

1) ヒトウエストナイルウイルス感染者血清を用いた IgM 捕捉 ELISA 法の評価とサーベイ

ランス：CDC より分与されたウエストナイル熱患者血清を用いて、確立した IgM 捕捉 ELISA 法を評価した。その結果現在陽性の基準としている Positive/Negative ratio 2.0 以上を陽性とする基準にすべて該当した。また、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルス間の交差反応による擬陽性を防止する基準として West Nile virus/Japanese encephalitis virus ratio (W/N ratio)を設定し、ウエストナイルウイルスに対して陽性でかつ W/N ratio 1.5 以上の場合をウエストナイル特異的 IgM 抗体陽性と判定できることが確認された。米国からの帰国者に関しては、18 名の検体に関しウイルス分離、PCR 法による遺伝子診断お

よび IgM 抗体による血清診断を実施したが、いずれも陰性であった。

2) 輸入デング感染症の状況：① 成田空港検疫所での検査成績：熱帯地域から成田空港に帰

国した時に不明熱があり、デング感染症の検査依頼があった総数は 132 症例であった。これらの検体を特異遺伝子および IgM 抗体の検出により検査・診断した結果、22 症例 (16%) が陽性 (男性：13、女性：9) であった。これらの患者の多くは東南アジア・南アジア (タイ、フィリピン、マレーシア、インドネシア、ミャンマー、ベトナム、ネパール、インドなど) からの帰国者であったが、ブラジルからの帰国者も 2 症例含まれていた。② 国立感染症研究所での検査成績：国内各地の医療機関、衛生研究所から検査依頼のあった不明熱患者の検体について検査した。検査総数 46 症例中 31 症例 (67%) がデング熱 (男性：19、女性：12) と診断された。この 31 症例中 13 症例が PCR で型別が確定された (1 型：10 例、2 型：2 例、3 型：0 例、4 型：1 例)。感染者の大半はインドネシア (11 例)・タイ (9 例)・フィリピン (5 例) など東南アジアからの帰国者であったが、昨年と異なりタイよりもインドネシア特にバリ島で感染した症例が多かった。

3) ブタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス：国内 8 県のブタ血清から分離を試みたが、5 県の検体からウイルスが分離された。香川県、三重県、静岡県 of ブタ血清から分離したウイルスのうち増殖の良いものから遺伝子解析を実施したが、いずれも遺伝子型は 1 型であることが明らかとなった。三重県と静岡県 of 分離ウイルス間の

ホモロジーは 99.6% であった。香川県の分離ウイルスは、三重県の分離株とは、98.1% のホモロジーであり、静岡県の分離株とは 97.9% のホモロジーであった。

4) デング IgM 捕捉 ELISA 法へのベータプロピオラクトン不活化ウイルス抗原の応用：BPL によるデングウイルスの不活化を観察し、結果に基づき 0.2% BPL で 37°C 30 分間処理したウイルス抗原を用いた。BPL 処理後のウイルス抗原は、検出抗体と無関係に反応性が幾分低下した。ヒト血清検体を用いて、BPL 処理前後の抗原で IgM を検出した。BPL 処理前後の抗原で得られた結果 (P/N ratio) の相関係数 ( $r^2$ ) は 0.824 であった。これは、得られた数値の 67.9% は説明できる値であったことを示し、3 回の測定で 2 回以上の一致を意味した。

5) チクングニヤウイルスの塩基配列の決定と遺伝子診断法の開発：① チクングニヤウイルスの全塩基配列：チクングニヤウイルスのプロトタイプウイルスである S27 株 (タンザニア株) の全塩基配列を決定した。他のアルファウイルス群と比較した結果、本ウイルスは遺伝子の翻訳領域ではオニオンニオンウイルス (ONN) と高い近似性を示したが、5' および 3' 非翻訳領域の配列および反復配列構造が全くことになっており、ONN ウイルスとは異なる種として分類されるべきであると結論した。この配列は GenBank に (AF369024) として登録された。この結果チクングニヤウイルス特異的 RT-PCR に用いるプライマーの設計が容易になった。② チクングニヤウイルス特異的遺伝子検出診断法の確立：ウイルス全塩基配列のデータをもとに診断用プライマーを設計・合成してデングウイルスと鑑別診断可



能な迅速遺伝子検出法を確立した。1998年にマレーシアで発生した流行時に採取された血清を用いて検証した結果、今回作製したチクングニヤ特異的 RT-PCR 法は特異性が高く、同時に遺伝子増幅産物が分子疫学にそのまま利用可能であることが示された。

6) 組換え核蛋白を抗原とした IgM-capture ELISA によるクリミア・コンゴ出血熱の診断：12名の患者から発症から11日以内に採取された血清のうち、8名の血清から IgM 抗体が検出された。残りの4名の血清からは CCHF ウイルスに対する抗体は検出されず、ウイルスゲノムのみ検出された。発症から血液が採取されるまでの日数が明らかで、2回血液が採取された6名の患者において、発症から3日以内に1度目に採取された血液には IgM, IgG 抗体は検出されなかったが、4名の患者において発症から11日以内に2度目に採取された血液には IgM 抗体が検出された。2名の患者においては IgG 抗体も検出された。12名の患者から採取された血液を、ウイルスゲノム陽性血液(13検体)と陰性血液(5検体)の2つのグループに分類すると、ウイルスゲノム陽性血液では3検体(23%)にウイルスゲノム陰性のすべての血清5検体(100%)で IgM 抗体が検出された。IgM, IgG ともに陰性の10検体すべてから IgM のみ陽性の4検体中3検体からウイルスゲノムが検出された。IgG, IgM ともに陽性の4検体からはウイルスゲノムは検出されなかった。

(2) 媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握

1) ウエストナイルウイルスに対するアカイエカの感受性：①胸部注射したアカイエカからの本ウイルスゲノムの検出：アカイ

エカ成虫胸部にウイルスを接種後、28℃14日間飼育した雌成虫4個体から総 RNA を個別に抽出して、RT-PCR を実施した。フラビウイルスグループのウイルスゲノムを検出可能な特異的プライマーを使った際には、すべての蚊からも特異的 PCR 産物が得られ、アカイエカ体内でのウイルス増殖が確認された。②ウイルス液を経口的に取込んだアカイエカ成虫を、20℃、25℃、28℃の種々温度で14日間飼育したところ、20℃では雌成虫2個体中0個体、25℃では2個体中1、28℃では4個体中4で、ウエストナイルウイルスに特異的な PCR 産物が認められた。20℃でも蚊体内で十分にウイルスは増殖可能な結果が得られた。

2) ウエストナイルウイルスに対するチカイエカ、ヒトスジシマカの感受性試験：経口感染雌成虫の15℃、20℃、25℃、28℃でのウイルス増殖：種々の温度で14日間飼育したチカイエカ、ヒトスジシマカ、そしてアカイエカからのウイルスゲノムの有無を調べるために、ウエストナイルウイルス特異的プライマーを使用して RT-PCR を行った。Isogen-LS による蚊からの総 RNA 抽出のみで、Qiagen による2回目の総 RNA 精製を行って「ないものの、15℃のヒトスジシマカおよび25℃のチカイエカから明瞭な特異的 PCR 産物が認められた。

3) 蚊からのウエストナイルウイルスの検出における VecTest と RT-PCR 法との比較：VecTest、RT-PCR のいずれの方法でも、リン酸緩衝液中で事前にホモジナイズした蚊粗抽出を作り、それを基にウイルス検出の手順をスタートさせることで、肉眼的により判定しやすい結果を得ることができた。感染蚊を用いた実験では、RT-PCR、VecTest

のいずれでも、それぞれの種の感染蚊（WNV  $10^5$ 個以上のウイルスプラーク形成）を50匹中に1匹の割合で混ぜたウイルス濃度で検出可能であった。希釈したウイルス液を用いた実験では、WNV 特異的なプライマーを用いた場合、RT-PCR で検出される濃度は VecTest でのそれより約100~1000倍優れていた。

（3）節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究

1) カニクイザルにおける日本脳炎 DNA ワクチンの有効性に関する研究：日本脳炎ウイルス prM と E 遺伝子を含む DNA ワクチン（pNJEME）の筋肉内免疫により3頭中2頭で中和抗体価が認められたが1頭は検出限界以下だった。ジーンガンによる免疫でも弱いけど中和抗体が誘導された。ベクターコントロールでは抗体誘導は認められず、現行ワクチン接種では2頭ともに抗体の上昇が認められた。ウイルス攻撃後に著しい中和抗体の上昇が認められたが、抗体上昇の無い1頭と弱く反応した1頭で発症死亡した。コントロール2頭では抗体上昇もないが発症もなかった。実験2においては免疫5頭中4頭で中和抗体の誘導が認められたが1頭では検出されなかった。この1頭はウイルス攻撃後も抗体上昇がなかった。ウイルス攻撃後には2頭で抗体誘導が認められた。抗体上昇のなかった1頭は発症死亡した。2回の実験において免疫期間中、臨床的に全身および局所的反応は認められなかった。

2) 日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法：100 mcg の pcJEME を2週間隔で2回 ICR マウスの大腿部に接種し、ELISA 抗体、中

和抗体及び攻撃後の防御効果について調べた。中和抗体価は1回免疫後には検出されなかった( $<1:10$ )が、2回免疫後には針付き注射器接種群では雌雄とも1:20であったのに対して、針無し注射器接種群では、雌及び雄においてそれぞれ1:40及び1:80の中和抗体価が誘導された。ELISA 抗体の結果も中和抗体の結果と一致しており、針無し注射器接種群に高い抗体値が示された。3) 日本脳炎 DNA ワクチンにより誘導される防御免疫における、中和抗体の役割：100 mcg の pcJEME を1回接種したグループでは部分防御（33%生存）であったが、2回接種により完全防御（100%生存）を示した。一方、CTL 誘導型 DNA ワクチンを3回接種したグループではいずれも部分防御であり、生存率は33%（pUJEE1 接種グループ）、50%（pUJENS3 接種グループ）、また67%（pUJENS5 接種グループ）であった。また、pUBIQ 接種グループでは全てのマウスが死亡した。以上の結果は、中和抗体誘導型 DNA ワクチンは、CTL 誘導型 DNA ワクチンより効力が高いことを示す。中和抗体の作用機序に関しては、脾臓や肝臓などの攻撃ウイルスによって感染した組織から血液中に供給されるウイルスが、中和抗体によって中和または排除されたことを示された。

4) 粘膜免疫型日本脳炎ワクチンに関する研究：CTB/JE-E3/6H を発現する大腸菌の抽出液からニッケルカラム法で精製されたサンプルは精製前に比べて、抗 CT 抗体を一次抗体としたときの  $G_{M1}$ -ELISA 活性が数百上昇した。ウェスタンブロッティングによる解析で、加熱処理しない精製 CTB/JE-E3/6H は抗 CT 抗体、および抗 JE 抗体の両方、あるいはどちらか一方に反応するものを含め

て、少なくとも7つの複合体を含むことを示す結果が得られた。精製 CTB/JE-E3/6H を用いたマウス免疫実験で、単独で腹腔内接種した方が最も高い免疫応答を示したが、単独で鼻腔内接種免疫したマウスでも粘膜アジュバントと共に鼻腔内接種した場合と同等の ELISA-JE 抗体が産生された。

5) 日本脳炎ウイルスの脊椎動物由来培養細胞への侵入様式：クラスリン依存性およびカベオラ依存性エンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスを抑制するクロルプロマジン、ナスタチン、そしてサイトカラシン D を用いて Vero cell へのウイルス増殖感染への影響を観察した。日本脳炎ウイルスの増殖感染はクロルプロマジンの前処理で有意に抑制されたが、ナスタチン、サイトカラシン D では抑制されなかった。クロルプロマジン処理細胞へ吸着したウイルスは、エンドソーム画分に検出されなかった。日本脳炎ウイルスの Vero cell への侵入にクラスリン依存性エンドサイトーシスの関与が示唆された。

#### D. 考察

本研究全体の計画は以下の通りであった。日本国内に存在する、あるいは海外から侵入する可能性のある節足動物媒介性ウイルスに対して、血清・病原体・遺伝子診断法を確立し、その検査法を用いてウイルスの侵淫状況を調査する。一方、媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発を行いさらに現状を把握する。次に、上記診断方法を用いて、節足動物媒介性ウイルスの国内における侵淫状況を人およびベクターの両面から把握する。ワクチン開発については、まず節足動物媒介性ウイル

スに対する防御免疫を解析する。その結果に基づき、各ウイルスに対する防御エpiteopeを含む新型ワクチンを開発する。さらに、これらの新型ワクチンが対象とするウイルスに対して防御免疫を誘導することを、動物実験により確認する。以上の研究計画に従い、本年度は以下のように研究を実施した。節足動物媒介性ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法の開発と疫学調査においては、1) ウエストナイルウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法が確立された。米国からの帰国者に関しては検査を実施したが、いずれも陰性であった。2) 海外旅行からの帰国者についてデングウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法を行い多くのデングウイルス感染者を明らかにした。3) 国内の豚から日本脳炎ウイルスを分離し遺伝子解析を行った。4) チクングニヤウイルスの塩基配列を決定し遺伝子診断法を開発した。5) 組換え核蛋白を抗原とした IgM 捕捉 ELISA により中国においてクリミア・コンゴ出血熱患者を診断した。媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発と現状の把握においては、1) ウエストナイルウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立し、アカエイカ、チカイエカ、ヒトスジシマカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを明らかにした。2) RT-PCR と市販ウエストナイル抗原検出キットいずれも蚊においてウエストナイルを十分検出することを示した。3) 我が国においてウエストナイルウイルスの侵入が確認された場合を想定したウエストナイルウイルス媒介蚊対策に関するガイドラインを作成した。節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫

の解明と新型ワクチンに必要な基礎技術の開発においては、1) 日本脳炎ウイルス prM・E 遺伝子を含む DNA ワクチンがカニクイザルにおいて中和抗体を誘導することを示した。2) 注射器接種法が日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強することをマウスにおいて示した。3) DNA ワクチンによる日本脳炎の防御には中和抗体によるウイルスの体内移行の抑制が重要であることを示した。4) 粘膜免疫型日本脳炎ワクチンによって日本脳炎ウイルス中和抗体を誘導した。

本年度の研究は、当初の計画に沿って進められ以上のような成果を得た。これらの研究結果は以下の点で厚生労働行政に貢献する。1) デング熱、ウエストナイル熱、チクングニア、クリミア・コンゴ出血熱等の実験室診断法は旅行者による輸入感染症の実体把握に貢献する。また、検疫所、地方衛生研究所等への技術移転によりウイルスの日本への侵入阻止に貢献し得る。2) ベクターの分布を把握し、感染蚊の検出法を整備し、ガイドラインを作成することにより、節足動物媒介ウイルスの日本侵入時における、早期の感染症対策を可能にする。3) 現在ワクチンが存在しない節足動物媒介性ウイルスに対する新ワクチン開発を推進する。

#### E. 結論

節足動物媒介性ウイルスに対する実験室診断法として、ウエストナイルウイルス、デングウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法を確立し、海外旅行からの帰国者について検査を行った。ウエストナイルウイルス感染者はいなかったが、多くのデ

ングウイルス感染者の存在を明らかにした。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する血清・病原体・遺伝子診断法も確立し有用性を確認した。媒介節足動物とウイルスの侵淫状況を把握するための技術開発として、ウエストナイルウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出法を確立し、アカエイカ、チカイエカ、ヒトスジシマカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを明らかにした。また、RT-PCR と市販ウエストナイル抗原検出キットいずれも蚊においてウエストナイルを十分検出することを示した。さらに、ウエストナイルウイルスの侵入が確認された場合を想定したウエストナイルウイルス媒介蚊対策に関するガイドラインを作成した。節足動物媒介性ウイルスに対する防御免疫の解明と新型ワクチンに必要な基礎技術の開発として、日本脳炎ウイルス prM・E 遺伝子を含む DNA ワクチンがカニクイザルにおいて中和抗体を誘導することを示した。また、針無し注射器接種法が日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強することを示した。さらに、粘膜免疫型日本脳炎ワクチンによって日本脳炎ウイルス中和抗体を誘導することを示した。

#### F. 健康危機管理情報

(1) ウエストナイル熱は米国で大流行している。ウエストナイルウイルスは現在まで日本には侵入していないが、今後一層の注意が必要である。

(2) アジアにおいてはデング熱・デング出血熱は数年の周期で大流行を繰り返す傾向がある。輸入デング熱患者は存在するが、デングウイルスは日本に侵入していない。

デングウイルスに関しても今後一層の注意が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24(3):203-209. 2002

Yuuji Yamamoto, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Mikio Kimura, Kazushige Washizaki, Hiroki Yoshikawa, Akihiro Hitani, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. *Journal of Infection and chemotherapy* 8:175-177, 2002

Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using

hydroxyapatite-coated nylon beads. *J Virol Methods*. 104:195-201, 2002

Masaki Takahashi, Toshiki Miwa, Ken-Ichi Yamada, Yuki-yoshi Sato, Keikin Ikawa, Yasuharu Matsumoto, Tomoaki Sano, Tomohiko Takasaki, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ichiro Kurane. Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo International Airport. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55:215-216. 2002.

Vargas R. E. M., Morita K., Eshita Y., Tsuda Y., Fukuma T. and Takagi M. Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severity in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin. *Journal of Medical Entomology and Zoology* 53:21-27. 2002

Hasebe F., Parquet M. C., Pandey B. D., Mathenge E. G. M., Morita K., V. Balasubramaniam V., Saat Z., Yusop A., Sinniah, M., Natkunam S. and Igarashi K. Combined Detection and Genotyping of Chikungunya Virus by a Specific Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Virol.* 67:370-374. 2002

Parquet M. C., Kumatori A., Hasebe F., Edward G. M. Mathenge E. G. M. and Morita K. Saint Louis Encephalitis Virus induced pathology in culture cells. *Archives of*

Virology 147:1105-1119, 2002

Afjal Hossain Khan, Kouichi Morita, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Edward G. M. Mathenge and Akira Igarash. Complete Nucleotide Sequence of Chikungunya Virus and Evidence of an Internal Polyadenylation site. J.Gen.Virol 83:3075-3084, 2002

Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Prehaud C, Morikawa S. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology 40:372-375, 2002.

Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology 40: 1587-1591, 2002

Morikawa S, Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane, I. (2002): Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. Virology 296:159-164, 2002

Han L, Tang Q, Zhao X, Saijo M, Tao X. Serologic studies of Xinjiang hemorrhagic fever in Bachu county, 2001.

Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 3:179-181, 2002

Tang Q, Saijo M, Lei H, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S. Detection of immuno-globulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immuno-fluorescence assays. Journal of Virological Methods 108:111-116, 2003

Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleo-protein-based antibody detection systems. Clinical and Diagnostic Laboratory immunology. In press 2003

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Aoki, C., Takaoka, H., Matsumoto, A., Uchida, K., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K. y Kurane, I. (2001): Biología y epidemiología molecular del mosquito vector del virus de dengue [in Spanish]. (Molecular biology and epidemiology of vector mosquitoes with dengue viruses). Cemadoja Científica (Republica Dominicana), 1(2):28-31.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K. y Kurane, I.

- (2001): Competencia del mosquito como vector del virus de dengue [in Spanish]. ( Vector competence of mosquitoes against dengue viruses). *Cemadoja Cientifica (Republica Dominicana)*, 1(2):31-34.
- Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., Kato, K. and Tahara, H. (2002): Reproductive activity and survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Japan at high temperature. *J. Med. Entomol.* 39(1):185 -190.
- Tetsuya Mizutani, Masayuki Kobayashi, Yuki Eshita, Osamu Inanami, Tohru Yamamori, Akiko Goto, Yoshihiko Aka, Hirotsugu Miyoshi, Hironobu Miyamoto, Hiroaki Kariwa, Mikinori Kuwabara and Ikuo Takashima (2003): Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol. Biol.* 2003 Feb; 12(1):61-66.
- Eshita Y, Takasaki T, Yamada K and Kurane I. (2003): Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes. *In: Anthology VI* (Edited by Richmond JY), Chapter 18. The American Biological Safety Association. in press.
- Tanabayashi, K., Mukai R., Yamada, A., Takasaki, T., Kurane, I., Yamaoka, M., Terazawa, A., and Konishi, E.: Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *Vaccine*, in press. 2003
- Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Terao, K., and Yamada, A.: Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.*, in press.
- Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T.: Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *Journal Medical Entomology*, 39(1): 4-11, 2002.
- Sasaki, T., Kobayashi, M. & Agui, N.: Detection of *Bartonella quintana* from bodylice, *Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae), infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. *Journal Medical Entomology*, 39(2):427-429, 2002
- Kobayashi, M., Sasaki, T. & Agui, N.: Possible food contamination with the excreta of housefly with enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Medical Entomology and Zoology*, 53: 83-87, 2002
- Nihei, N. Hashida, Y. Kobayashi, M. Ishii, A.: Analysis of malaria endemic areas on the Indochian Peninsula using remote

- sensing. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:160-166, 2002.
- Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki: Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations. *Vaccine* 21, 98-107 (2002)
- Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi Imoto: Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice. *Vaccine* in press.
- Kurane I.: Immune responses to Japanese encephalitis virus. *Current Topics in Immunology and Microbiology.* 267: 91-103, 2002.
- 高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス感染症. *小児科診療* 65:2077-2081 (2002)
- 多賀賢一郎、井村俊郎、林 昭宏、鎌倉和政、橋本 智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲. 日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討. *感染症学雑誌* 76(9):738-746, 2002
- 徳田敦子、多部田弘士、杉戸一寿、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎: フィリピンへの団体旅行で感染した Dengue 熱の 3 症例. *感染症学雑誌* 76(11):953-957, 2002
- 高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *東獣ジャーナル* 441(12):14-16 (2002)
- 高崎智彦. 日本脳炎、その他の脳炎ウイルス. *今日の治療指針* 2003 年版. 医学書院 143-144. 2003
- 高崎智彦. 新世紀の感染症学「ウエストナイル熱/脳炎」*日本臨床* 61(増刊号 2):288-291. 2003
- 高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *Modern Media* 49(2) 1-6. 2003
- 森田公一: デング熱ワクチン. *臨床と微生物* Vol. 29:137-141, 2002.
- 森田公一: 日本脳炎、小児内科 34: 1084-1086, 2002
- 森田公一: デング熱・デング、出血熱新世紀の感染症学上、*日本臨床* 61:302-305, 2003
- 森田公一: 西ナイルウイルスとその予防策: *日本薬剤師会雑誌*、55:73-75, 2003
- 西條政幸. ウイルス性出血熱. *化学療法の領域* 18:354-358, 2002
- 林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、橋本 智、井村俊郎、東島弘明、原田誠、飯塚信二、青木英雄、江下優樹、内田幸憲 (2002): 検疫所で捕獲された蚊のフ



ラビウイルス検査結果について (第2報)。  
日本検疫医学会誌 4(4) : 50-51.

林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英  
人、橋本 智、井村俊郎、江下優樹、内田  
幸憲 (2003) : RT-PCR による媒介蚊からの  
フラビウイルスゲノムの検出。 日本感染  
症学会雑誌。印刷中。

小林 睦生 (三橋 淳 監修)「昆虫学大辞  
典」(分担) 害虫各論 1.9 衛生害虫 p.  
920-933, 朝倉書店、東京、2003 年3月出  
版

## 2. 学会発表

K. I. Yamada, T. Takasaki, M. Nawa, I.  
Kurane: The future of dengue fever cases  
during 1998-2001 at National Institute  
of Infectious Diseases, Japan. XIIth  
International Congress of Virology  
(Paris) July. 2002

Morita 他 : Construction and  
characterization of a Japanese  
encephalitis/dengue 2 chimeric virus :  
第12回世界ウイルス学会総会

Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M,  
Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The  
intercellular association of the  
nucleocapsid protein (NP) of Hantaan  
virus (HTNV) with small ubiquitin-like  
modifier (SUMO-1) conjugating enzyme 9  
(UBC9). 36th Joint working conference on  
viral diseases, June, 2002, Matsumoto

Saijo M, Tang Q, Morikawa S, Maeda A,  
Kurane I. Recent outbreak of  
Crimean-Congo hemorrhagic fever in China.  
36th Joint working conference on viral  
diseases, June, 2002, Matsumoto

Morikawa S, Tang Q, Xinqin Z, Saijo M,  
Kurane I. Genetic diversity of the M RNA  
segment among Crimean-Congo hemorrhagic  
fever virus isolates in China. 12th  
International Congress of Virology, July,  
2002, Paris

Saijo M, Tang Q, Hay L, Niikura M, Maeda  
A, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis of  
Crimean-Congo hemorrhagic fever using a  
recombinant viral nucleoprotein. 12th  
International Congress of Virology, July,  
2002, Paris.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka,  
Y., Takaoka, H., Matsumoto, A., Uchida,  
K., Igarashi, A., Uchida, Y., and Kurane  
I. : Biología y Epidemiología Molecular  
del Mosquito Vector del Virus del Dengue.  
Programa Segundo Seminario  
Internacional de Educación Médica,  
(Organizado por: Centro de Educación  
Médica de Amistad Domingo Japonesa  
(CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr.  
Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperación  
Internacional del Japon (JICA) ). 22,  
23, 24, 25 de Agosto 2001, Hotel Santo  
Domingo, Santo Domingo, República  
Dominicana.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., and Kurane I. : Competencia del Mosquito como Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonesa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA) ). 22, 23, 24, 25 de Agosto 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

Garca, B., Castro, M., Cesn, A. J., Valdz, S., Lora, M., Disla, M., Petit, A., Taveras, D., Shichijyo, A., Makino, Y., Eshita Y. y Takeshita M. : Seroprevalencia de anticuerpo de dengue y confirmacin diagnstica por mtodos rpidos, y PCR en pacientes febriles, de junio del 2000 a octubre 2001 en la Republica Dominicana. VI Congreso Dominicano de Infectologia, (Organizado por: Sociedad Dominicana de Infectologia Inc.), 28 de Noviembre al 1ro de Diciembre 2001, Hotel Meli Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

Paeporn, P., Komalamisra, N., Thongrunkiat, S., Deesin, V., Eshita, Y., Rongsriyam, Y. (2002): Potential development of temephos resistance in *Aedes aegypti* related to its mechanism

and susceptibility of dengue virus. Joint International Tropical Medicine Meeting 2002 (The 8th Chamlong-Tranakchit Harinasuta Lecture), Abstract 149, Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand, November 20-22, 2002.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Shirato, K., Kimura, T., Eshita Y., Aki, Y., Miyoshi, H., Kariwa, H. Takashima, I. (2003) : West Nile Virus entry into the C6/36 mosquito cells is inhibited by SP600125, a specific inhibitor of JNK. American Society for Virology, 22nd Annual Meeting, University of California at Davis, USA, July 12-16, 2003.

Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki: Evaluation of an inactivated Japanese encephalitis vaccine by comparing ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis virus infections in vaccinated and unvaccinated populations. The 36th Joint Working Conference of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Matsumoto (2002).

根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎。フラビウイルス科、フラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案。第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会。(大分)7月。2002年

中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス分

離株の遺伝学的変異と、その抗原性解析. 第 50 回日本ウイルス学会. (札幌) 10 月. 2002 年

高崎智彦、倉根一郎. シンポジウム: 新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状. 第 43 回日本熱帯医学会大会 (高知) 11 月. 2002 年

中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎. 組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究—Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討—. 第 6 回日本ワクチン学会 (千葉) 11 月. 2002 年

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦. 2000 年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 第 6 回日本ワクチン学会 (千葉) 11 月. 2002 年

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦. 2000 年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 第 6 回日本ワクチン学会 (千葉) 11 月. 2002 年

長谷部 太、森田公一他: 日本脳炎ウイルス NS3 蛋白の Helicase Motif II の役割: 平成 14 年日本ウイルス学会総会

余福勲、森田公一他: 日本脳炎ウイルス NS5 の機能解析: 平成 14 年日本ウイルス学会総会

Basu Pandey, 森田公一他: Study of Genetic Determinant by Site Directed Mutagenesis in Relation to Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever: 平成 14 年日本ウイルス学会総会

西條政幸、森川茂、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱の抗原検出 ELISA による診断の有用性と問題点. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.

西條政幸、森川茂、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎. 中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学的解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.

西條政幸、唐青、森川茂、前田秋彦、倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎: 蚊類のアルボウイルス媒介能 (2) PCR を用いたウイルス媒介蚊の識別. 第 54 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 51 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会. 2001 年 10 月 27 日、北九州市、産業医科大学、 Med. Entomol. Zool., 52: 2001.

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一

郎、内田幸憲、倉根一郎 (2002) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (3) PCR を用いたデングウイルス媒介蚊 2 種の識別. 第 54 回日本衛生動物学会大会大会、東京、一橋記念講堂、2002 年 4 月 2・3 日、Med. Entomol. Zool., 53 (suppl.) :35, 2002.

牧野芳大、七条明久、竹下正純、青野裕士、江下優樹、只野昌之、Bello, M. C.、Cesn, A. J.、Valdz, S.、Garca, B.、Lora, M.、Disla, M. (2002) : ドミニカ共和国におけるデングウイルス感染症の血清疫学. 2002 年 7 月

4・5 日、第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、大分保健福祉センター、ヘルシーパル別府。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会講演抄録・プログラム : 22。

江下優樹、牧野芳大、福田昌子、安西三郎、高岡宏行、Disla, M.、Solis M. A. T.、Petit, A.、Taveras, D.、Garca, B.、Cesn, A. J.、Valdz, S.、Lora, M.、Castro, M.、七条明久、板倉英世、竹下正純 (2002) : ドミニカ共和国におけるデング熱およびその媒介蚊. 2002 年 7 月 4・5 日、第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、大分保健福祉センター、ヘルシーパル別府。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会講演抄録・プログラム : 24。

江下優樹、安西三郎、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、林 昭宏、鎌倉和正、多賀賢一郎、内田幸憲、倉根一郎 (2002) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (4) ウエストナイルウイルスに対する日本産アカイエカの感受性. 第 55 回日本寄生虫学会南日本支部

大会・第 52 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2002 年 10 月 26-27 日、長崎市、長崎大学医学部ポンペ会館、Med. Entomol. Zool., 53 : 2002.

水谷哲也、小林正之、江下優樹、木村享史、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、梅村孝司、荻和宏明、高島郁夫 (2003) : JNK 阻害剤によるウエストナイルウイルスの感染の阻害効果。2003 年 1 月 27-29 日、千葉工業大学津田沼校舎、抗ウイルス療法研究会。

水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、荻和宏明、高島郁夫 (2003) : ヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞におけるウエストナイルウイルスの感染防御 - ウイルス感染における JNK シグナル伝達の役割。第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) :24, 2003.

内田桂吉、大森大二郎、江下優樹、福永昭廣 : アカイエカの濾胞退化とアポトーシス。第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) :26, 2003.

佐々木年則、沢辺京子、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生 (2003) : VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 41, 2003.