

G. 研究発表

1) 論文発表

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

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

2) 学会発表

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

Morita K 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 現在出願予定はない。

研究成果に関する一覧表

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
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 <i>Aedes aegypti</i> 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
森田公一	デング熱ワクチン	臨床と微生物	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、in 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

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告

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

分担研究者 森川 茂
(国立感染症研究所ウイルス第1部第1室)
協力研究者 西條 政幸
(国立感染症研究所ウイルス第1部第1室)

研究要旨

クリミア・コンゴ出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF) の実験室診断には、ウイルス抗原検出 (ウイルス分離, ウイルス抗原捕捉 ELISA, RT-PCR) や IgM 抗体検出が有用である。これまで私たちは CCHF ウイルスの組換え核蛋白を抗原とした IgG ELISA による IgG 抗体の検出法を開発し (J. Clin. Microbiol. 40, 1587-91, 2002), その診断における有用性を確認した。今回は、組換え核蛋白を抗原とした IgM-capture ELISA を開発し、12 名の急性期 CCHF 患者から発症から 11 日以内に得られた血清 18 検体を用いて、その診断における有用性を検討した。その結果、CCHF 患者 12 名中 8 名で IgM 抗体が検出された。IgM, IgG 抗体がともに陰性の血清 10 検体中 10 検体 (100%) で、IgM 陽性, IgG 陰性血清 4 検体中 3 検体 (75%) で、IgM, IgG 抗体ともに陽性の 4 検体中 0 検体 (0%) で、RT-PCR により CCHF ウイルスゲノムが検出された。一方、RT-PCR 陽性血清 13 検体中 3 検体 (23%) で、RT-PCR 陰性の血清 5 検体中 5 検体 (100%) で IgM 抗体が検出された。RT-PCR 法と IgM-capture ELISA を組み合わせることにより、迅速でより正確な CCHF の診断が可能となる。

A. 研究目的。

クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で、致死率の高いウイルス感染症の一つである。エボラウイルス感染症などとともに、CCHF は感染症新法 (感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律) で 1 類感染症に分類されている。ヒトは CCHF ウイルスに、感染ダニ (*Hyalomma* 属, 図 1) 咬まれたり、ウイルス血症を伴う感染動物 (ヒツジなど) の血液や体液に接触したりして感染する (図 2)。また、ヒトからヒトへの感染もまれではなく、CCHF 患者の治療にあたった医療関係者が患者から CCHF ウイルスに感染する院内感染例も報告されている。さらに、抗 RNA ウイルス薬のひとつであるリバビリンが、CCHF の治療に有用であるとの報告もある。そのため、CCHF の迅速診断は、感染拡大の防止や治療に重要である。

昨年度は、RT-PCR によるウイルスゲノム検出による、CCHF の診断における有用性と問題点について報告 (「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」平成 13 年度報告書) したが、今年度は、さらに IgM 抗体検出による CCHF の迅速診断のための、組換え核蛋白を抗原とした IgM-capture ELISA の有用性を検討した。CCHF 患者におけるウイルス血症、IgM, IgG 抗体の推移を詳細に検討し、迅速で正確に CCHF を診断するためのストラテジーを考察した。

B. 研究方法

1) 血清。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 (表 1)。12 名中 6 名 (表 1, 患者 1~6) 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。12名の患者から採取された血液は、発症から11日以内に採取された。発症から採血された日までの日数は表1に示した。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。

- 2) CCHFウイルスに対するIgG抗体検出。
IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるCCHFウイルス抗体の検出の方法は、先に報告した(J. Clin. Microbiol., 40:1587-1591, 2003)。尚、昨年度の報告書にも本IgG ELISAの方法を概説しているので参照されたい。
- 3) CCHFウイルスに対するIgM抗体検出。
適量の抗ヒトIgM抗体(約100ng/well, μ -chain specific, Zymed Laboratories社)をELISAプレートにコートした。5% skim milk および0.05% Tween-20 含有PBS (M-T-PBS) でブロッキング後、50倍から2倍階段希釈された被験血清を37°Cで1時間反応させ、0.05% Tween-20 含有PBS (T-PBS) で洗浄後に精製組換えCCHFウイルス核蛋白を37°Cで1時間反応させた。次いで、洗浄後に、当研究室で作製された抗組換えCCHFウイルス核蛋白ウサギ血清(NIID#1)を37°Cで1時間反応させ、さらに、洗浄後にHRPO-標識ヒツジ抗ウサギIgG抗体(Zymed Laboratories社)を37°Cで1時間反応させた。最後にT-PBSで洗浄した後、基質(2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolone sulfonate (6), ABTS液, Roche Diagnostics社)を37°Cで30分間反応させた。そして、吸光度(OD₄₀₅)を測定した。対照として、組換え抗原の代わりに陰性コントロール抗原を用いて、それぞれの希釈された被験血清について同様の反応をおこない、対応するOD₄₀₅から対照のOD₄₀₅を差し引いた値を、組換え抗原に対するIgMによるOD₄₀₅とした。
- 4) RNAの抽出。血清中RNAは、High Pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics社)を用いて抽出された。
- 5) ウイルスゲノムの検出。CCHFウイルスゲノムは、RT-PCR法によって行われた。RT-PCRおよびnested PCR。RT反応およびPCRは、Ready-to-Go RT-PCRキッ

ト(Pharmacia Biotech社)を用いて行われ、その条件は、42°C30分(RT反応)、95°C5分(RTの不活化)、30サイクルの95°C30秒-52°C30秒-72°C30秒、および72°C5分である。RT-PCRに用いられたプライマーは、F2/C: 5'-TGG TAA CTT TCA CAA ACT C -3'およびR3C: 5'-GAC AAA TTC CCT GCA CCA -3'である。Nested PCRは、RT-PCR産物をテンプレートとして、Ready-to-Go RT-PCRキット(Pharmacia Biotech社)を用いて行われ、その条件は25サイクルの95°C30秒-52°C30秒-72°C30秒、および72°C5分である。Nested PCRに用いられたプライマーは、F3/C: 5'-GAG TGT GCC TGG GTT AGC TC -3'およびR2C: 5'-GAC ATT ACA ATT TCG CCA GG -3'である。なお、PCRに用いられたプライマーは、論文(Am. J. Trop. Med. Hyg. 57:512-518, 1997)を基本に、中国8402株のS-遺伝子塩基配列に基づいて設計された。2%アガロースゲルで電気泳動後、増幅されたDNAをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線をあてて検出した。

C. 結果

- 1) カットオフ値。陰性コントロール血清48検体の1:100希釈におけるOD₄₀₅の平均値と標準偏差はそれぞれ0.008, 0.071で、カットオフ値を平均値+3×標準偏差とすると、その値は0.205であった。
- 2) IgM抗体。12名の患者から採取された血液におけるウイルスゲノム検出、IgM、IgG抗体の成績を表1にまとめた。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(患者1~6)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。さらに、2名の患者においては、IgG抗体も検出された(図3)。
- 3) ウイルスゲノムの検出(ウイルス血症)とIgM抗体。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(図4)。
 - 4) 抗体反応とウイルス血症。IgM、IgGとともに陰性の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(表1、図4)。

D. 考察

これまで、私たちは組換え核蛋白を抗原としたIgG ELISAや間接蛍光抗体法は、CCHFウイルスに対するIgG抗体検出に有用であることを報告した(論文発表、文献1、3を参照)。組換え核蛋白を抗原としたIgG抗体検出法はCCHFの診断に有用である。しかし、IgG抗体検出によるCCHFの診断には、急性期と回復期におけるIgG抗体の有意な上昇を確認する必要があるため、迅速診断には不向きである。一方、血液中にCCHFに対するIgMを検出できれば、CCHFウイルスの急性感染を証明することができ、迅速診断に有用である。昨年度の報告書には、急性期CCHF患者1例におけるIgM、IgG抗体の経時的推移をとらえ、組換えCCHFウイルス核蛋白を抗原としたIgM-capture ELISAの有用性を示した。今年度は2001年および2002年の新疆ウイグル自治区のCCHF流行期に発生したCCHF患者の中で、協力を得られた12名の急性期CCHF患者の血清を用いて、IgM-capture ELISAの有用性をより総合的に検討した。

12名のCCHF患者中8名で、IgM抗体が検出された。しかも、今回の検討に用いられた血液は、発症から11日以内の急性期CCHF患者から採取されたもので、もし、IgM抗体陰性の患者4名からも、もう少し後に血液が採取されていれば、IgM抗体は検出されて

いたものと考えられる。このように、今回の検討から組換え核蛋白を抗原としたIgM-capture ELISAは、CCHFの迅速診断法として有用と考えられる。

CCHF患者数が少ないことと、CCHFの流行地が極めて交通の便の悪いところであったことから、CCHF患者を詳細に経過観察するのが困難であった。また、12名のCCHF患者しか対象とすることはできなかった。しかも、約1週間の間隔をあけて2度血液が得られた患者は6名のみであった(表1)。そのため、この6人の限られた患者から得られた検体を、発症3日以内に採血されたものと約1週間後に採血されたものに分けて、抗体出現、ウイルス血症の推移を明らかにした(図3)。発症3日以内ではIgM、IgG抗体は出現していないが、発症から10日以内では、3分の2の割合でIgM抗体が、3分の1の割合でIgG抗体が出現した。一方、発症から3日以内の6検体中6検体から、発症5日から11日までの間に得られた6検体中3検体からRT-PCRによりウイルスゲノムが検出された。

以上の成績から抗体の出現とウイルス血症の関係をまとめると、IgM、IgGともに陰性の血清からは100%(10/10)の確率で、IgMのみ陽性の血清からは75%(3/4)の確率で、IgG抗体が陽性になった血清からは0%(0/4)の確率で、ウイルスゲノムが検出された(図4)。これらの成績は、IgG抗体が出現するまでウイルス血症が持続し、IgG抗体が出現するステージに入るとウイルス血症が治まることを示している。

RT-PCR法によるウイルスゲノムの検出はCCHFの発症から数日以内の極急性期に有用な診断法である。しかも、用いるプライマーの塩基配列と原因CCHFウイルスの対応する部位の塩基配列の相同性が低いと、ウイルスゲノムは増幅されず、偽陰性の結果をもたらすという欠点がある(平成13年度報告書)。一方、IgM-capture ELISAは、CCHFの発症から5日目以降の血液を用いた診断に有用であることが明らかにされた。

以上のことから、RT-PCRとIgM-capture ELISAを組み合わせることによって、CCHFのより正確な診断を下すことが可能になることが明らかにされた。

E. 謝辞

本研究は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所唐青博士との共同で行われた。また、新疆ウイグル自治区巴楚衛生防疫センター長司馬義医師、本研究にご協力下さった新疆ウイグル自治区巴楚人民病院のスタッフの皆さんに感謝の意を表する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 化学療法領域 18:354-358, 2002
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda MEG, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Development of an immunofluorescence method for detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiology and Immunology* 46:633-638, 2002
- 6) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Linear B cell epitopes on the nucleoprotein of Ebola virus that distinguish Ebola subtypes. *Clinical and Diagnostic Laboratory and Immunology Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology* 10:83-87, 2002
- 7) Ikegami T, Miranda ME, Calaor AB, Manalo DL, Miranda NJ, Niikura M, Saijo M, Une Y, Nomura Y, Kurane I, Ksiazek TG, Yoshikawa Y, Morikawa S. Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in *Cynomolgus* Macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Experimental Animals* 51: 447-455, 2002
- 8) 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
- 9) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1). *Virology* 305, 288-297, 2003
- 10) Tang Q, Saijo M, Lei H, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S. Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods* 108:111-116, 2003
- 11) 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 nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic*

- Labortory immunology (in press)
- 12) Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Fernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection* (in press)
2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) Saijo M, Tang Q, Hay L, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fevrr using a recombinant viral nucleoprotein. 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
 - 5) Maeda A, Lee HB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) itegrated with small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 conjugating enzyme (UBC9). 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
 - 6) 池上徹郎, 新倉昌浩, 西條政幸, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎, 吉川泰弘, 森川茂. エボラウイルスレストン株を特異的に検出する抗原捕捉ELISAの開発. 第50回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002年10月, 札幌.
 - 7) 前田秋彦, Lee Byoung-Hee, 吉松組子, 西條政幸, 緒方もも子, 有川二郎, 倉根一郎, 森川茂. ハンタウイルスの核蛋白質 (NP) と small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) 結合酵素 (Ubc9) との結合. 第50回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002年10月, 札幌.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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, 津田沼

表 1. 各検体の、採取された発症からの日数、RT-PCR, IgG ELISA と IgM-capture ELISA の成績.

患者	発症からの日数, RT-PCR, IgG ELISA と IgM-capture ELISA の成績				2 回目に採取された血清			
	日数 ^a	RT-PCR ^b	IgM (OD ₄₀₅) ^c	IgG ^d	Days ^a	RT-PCR ^b	IgM (OD ₄₀₅) ^c	IgG (OD ₄₀₅) ^d
1	2	+	-(0.035)	-	8	+	-(0.065)	-
2 ^e	2	+	-(0.011)	-	10	+	-(0.031)	-
3	2	+	-(0.015)	-	10	+	+(0.216)	-
4	2	+	-(0.021)	-	8	-	+(1.433)	-
5 ^f	1	+	-(0.020)	-	5	-	+(2.672)	+(0.237)
6	3	+	-(0.000)	-	11	-	+(1.227)	+(0.235)
7	UN ^e	+	-(0.060)	-			ND ^h	
8	UN	+	-(0.016)	-			ND	
9	UN	+	+(2.208)	-			ND	
10	UN	+	+(0.860)	-			ND	
11	UN	-	+(0.477)	+(0.231)			ND	
12	UN	-	+(2.781)	+(0.573)			ND	

^a 発症から採取された日までの日数は、発熱がはじめて出現した日を第 1 日目として計算した.

^b “+” と “-” は、それぞれ RT-PCR によるウイルスゲノム増幅が陽性、陰性を表わす.

^c “+” と “-” は、それぞれ IgM-capture ELISA で陽性、陰性を表わす.

^d “+” と “-” は、それぞれ IgG ELISA で陽性、陰性を表わす.

^e “UN” は、発症から採血までの日数が不確定であることを示す.

^f “UD” は、採血されていないことを示す.

図1. Hyalomma 属のダニ（成虫）. 新疆ウイグル自治区にて採取され撮影された.

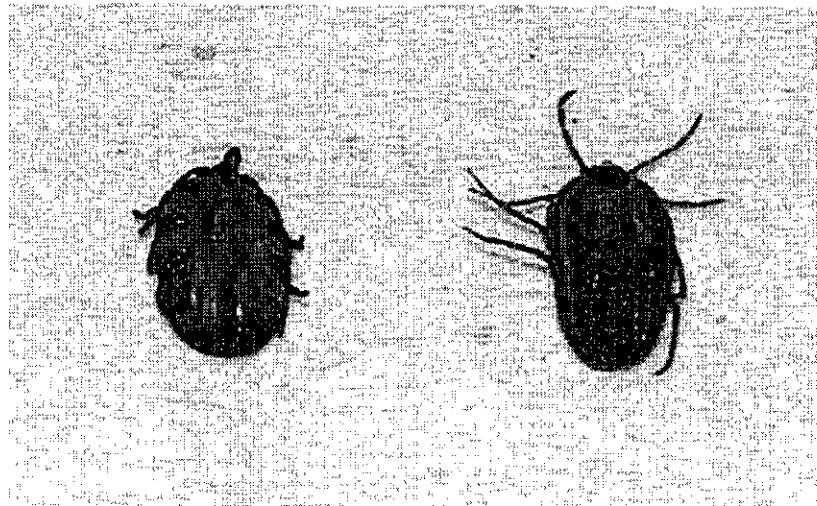


図2. CCHF ウイルスの生活環.

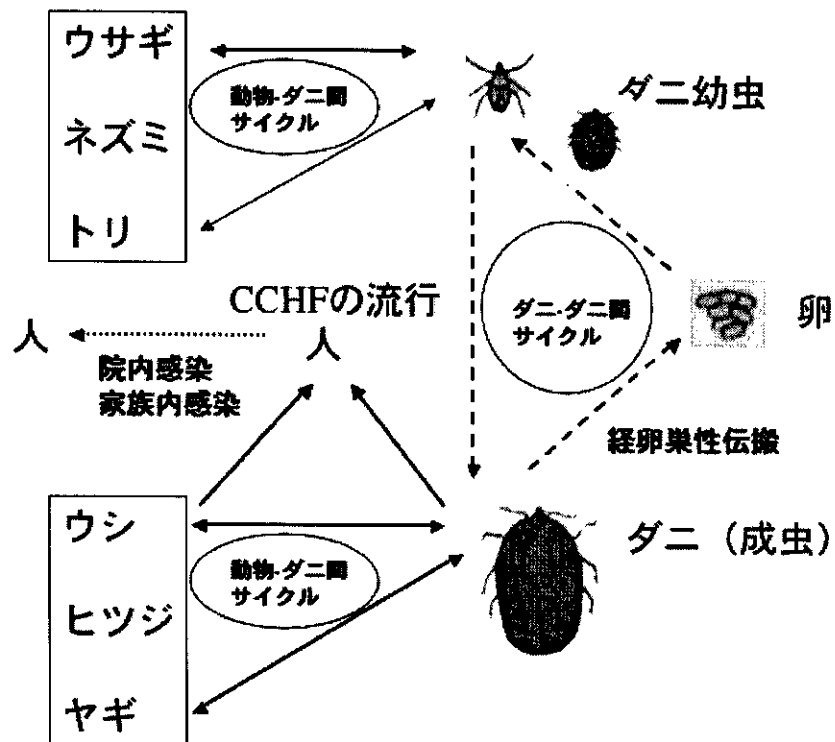


図3. 患者1~6からそれぞれ2回採取された12検体における, RT-PCR (■), IgM-capture ELISA (●), IgG ELISA (▲)の陽性率. 発症から3日以内に採取された血液6検体を1st samples とし, 2回目に採取された血液6検体を2nd samples とした.

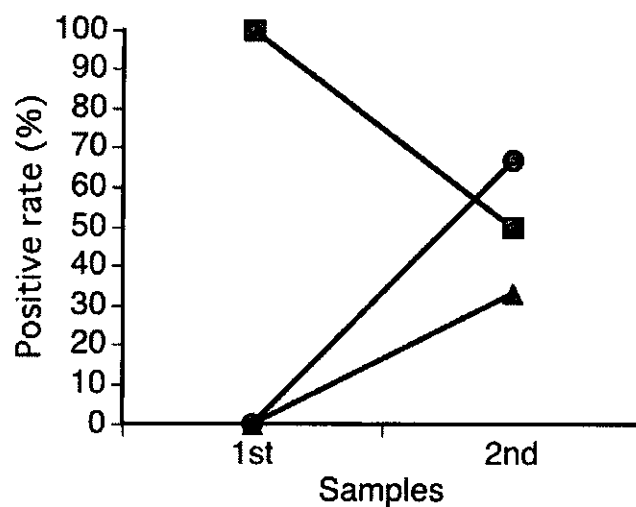
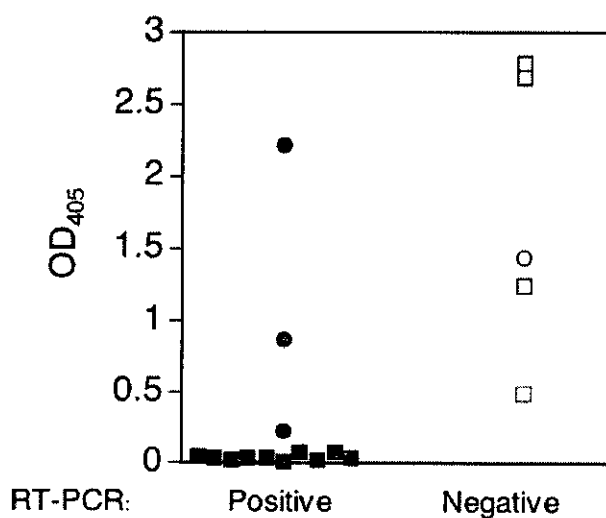


図4. RT-PCR 陽性血清および陰性血清における IgM-capture ELISA の 100 倍希釈における OD₄₀₅ 値. ■と●は, RT-PCR 陽性血清における IgM 陰性・IgG 陰性血清と IgM 陽性・IgG 陰性血清を示し, ○と□は, それぞれ, RT-PCR 陰性血清における IgM 陽性・IgG 陰性血清と IgM 陽性・IgG 陽性血清を示す.



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

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

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	助教授
共同	研究者	安西 三郎	大分医科大学感染分子病態制御講座	大学院生
		高崎 智彦	国立感染症研究所ウイルス1部	室長
		山田堅一郎	国立感染症研究所ウイルス1部	主任研究官
		内田 幸憲	神戸検疫所	所長
		倉根 一郎	国立感染症研究所ウイルス1部	部長

研究要旨：ウエストナイル熱は、アフリカ、アジア、ヨーロッパに常在するウエストナイルウイルス(WNV)感染蚊の人刺咬・吸血によって起こるアルボウイルス性疾患である。近年、北アメリカでの本症勃発以来、世界的拡大の兆候がある。WNVの主要媒介蚊種としてアカイエカ群(*Culex pipiens complex*)の蚊が含まれる。米国ではトビイロイエカ *Cx. p. pipiens*、我国ではアカイエカ *Cx. p. pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus* が生息しており、また琉球列島にはネッタイエカ *Cx. p. quiquefasciatus* が分布している。

かつて我国のフィラリア媒介蚊であったアカイエカはウエストナイル熱の防疫対策上の重要な蚊種と推測される。しかし、本種の分布が日本を含む極東アジアであることから、WNV に対する本種蚊の感受性に関する情報は多くない。そこで、本邦産アカイエカ雌成虫にウガンダ産 WNV を接種あるいは経口感染後、15-28℃で14日間飼育した蚊を準備した。その後、個別に総 RNA を抽出・精製して RT-PCR を行い、蚊体内での WNV ゲノムの有無を調べた。

その結果、WNV を成虫胸部に接種後、28℃ 14 日間飼育したアカイエカ雌個体から、フラビウイルス共通プライマーおよび WNV 特異的プライマーのいずれを用いても WNV ゲノムが RT-PCR によって検出された。さらに、20℃、25℃、28℃で14日間飼育した経口感染アカイエカ雌成虫から、WNV ゲノム由来の PCR 産物がいずれの温度でも検出された。また、それら蚊の感染率は、20℃で42.9%、25℃で12.5%、28℃で75%であった。

WNV を経口感染させたチカイエカおよびヒトスジシマカ雌成虫を、15℃から28℃で14日間飼育した際には、いずれの蚊種でもウイルスの増殖が認められた。

また 15℃で飼育したヒトスジシマカ雌成虫体内で本ウイルスが増殖することが確認された。

以上の結果から、本邦産アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ雌成虫は WNV に感受性があり、ウイルスを増殖する事_レ可能であったことから、ウイルス伝播能をも有することが推察された。ちなみに、蚊生体内には PCR 反応阻害因子が含まれていることから、分子疫学的手法によつて媒介蚊サーベイランスに際しては、考慮する必要がある。

A. 研究目的

ウエストナイル熱は、熱帯・亜熱帯地域の国々では公衆衛生上重要な再興感染症の一つである。本症は、アフリカ、アジア、ヨーロッパに常在するウエストナイルウイルス(WNV)感染蚊の人刺咬・吸血によって起こるアルボウイルス性疾患である。近年、北アメリカの東海岸地域で勃_レ起以来、2002年末には西海岸のカリフォルニアまで汚染が拡がりつつある。このように、世界的拡大の兆候があることから、日本産蚊種の WNV 感受性を調べる事は我国独自の防疫対策を構築する際に必須と考えられる。野鳥と WNV の感染環に関わる主要媒介蚊種としてアカイエカ群(*Culex pipiens* complex)の蚊があげられる。米国ではトビイロイエカ *Cx. p. pipiens*、我国ではアカイエカ *Cx. p. pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus* が分布しており、また琉球列島にはネッタイイエカ *Cx. p. quiquefasciatus* が生息している。

フィラリア媒介蚊でもあるアカイエカは現在でも我国に分布・生息していることから、ウエストナイルの防疫上重要な蚊種の一つと考えられる。ウエストナイルウイル

スの媒介蚊としては、アカイエカ群の中では少なくともトビイロイエカ、チカイエカおよびネッタイイエカが媒介蚊種として文献上知られている。しかし、アカイエカの本ウイルス感受性については、その分布域が日本を含む極東アジアに限定されることから、WNV に対する本種蚊の感受性を調べた報告は多くない。そこで、本邦産アカイエカ雌成虫に加えて、チカイエカおよびヒトスジシマカ盗_レ虫をも対象にして、WNV を経口感染後、種々の温度で所定日数を飼育した際の、蚊体内でのウイルス増殖の有無を RT-PCR 法で検討した。

また、本疾患の分子疫学的サーベイランスを実施するために、より高感度・高特異的に検出可能な one step RT-PCR 法を検討したので報告する。

我国の国際線空港では熱帯地域に生息している蚊が空港内で一時的に発生していたことが既に報告されている。このことは、地球規模での交通網の発達によって、ウエストナイル熱の流行地から媒介蚊の侵入が航空機などによってもたらされる可能性が現実問題となりつつある事を伺わせている。また、WNV 保有蚊が、我国の港湾や空港で

採集される可能性が推察されている。本報告では、これら媒介蚊のサーベイランスに分子疫学的手法の応用性を検討した。

B. 研究方法

B. 1. ワンステップ RT-PCR 法の開発

ウイルス：国立感染症研究所から分与されたウガンダ産ウエストナイルウイルス ($2-3 \times 10^7$ pfu/ml) を用いた。分与されたウイルスに感染した C6/36 蚊培養細胞の上澄液からストックウイルスを準備して、実験に供した。

供試蚊：感染実験に用いたアカイエカは、大阪市内の道路側溝で採集された後、キンチョウ研究所で継代中のものの分与を受けて、実験に供した。チカイエカは中外製薬（株）研究所で継代中の川崎産を使用した。ヒトスジシマカは福岡県久留米市産（旭町）を使用した。

蚊の飼育：25°C、日長 14 時間の飼育室内で蚊の飼育を行った。幼虫の餌として、エビオスと粉碎したマウス固形飼料を等量ずつ混合したものを乳ばち内で水を加えて液状にして幼虫に与えた。幼虫の密度は 7 平方 cm あたり幼虫 1 個体と低密度にして、ホーロー製容器を使って飼育した。羽化成虫には 4% の砂糖水を与えて飼育を行い、羽化 5 日 6 日後に実験に供した。

ウイルス感染蚊の作製：蚊胸部接種感染では、約 0.2ul ($4-6 \times 10^3$ 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（遠心後、上澄を除いた packed red blood cell）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。ちなみに充分量のウイルス液を 2ul とすると、取込んだウイルス量は $4-6 \times 10^4$ pfu/2ul となる。感染蚊は、3 重の飼育容器内に密封して 15-28°C で 14 日間飼育を行った。その後、-20°C で飼育容器を 30 分程保管して蚊を生殺した。後日、実験に用いるまで -80°C に保存した。

蚊からのウイルスゲノム RNA の精製：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。抽出の手順は日本ジーン社の説明書に従った。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。

感染蚊の総 RNA の再精製：RT-PCR の特異性と感度を高めるために、Isogen-LS で抽出/精製した総 RNA を、さらにカラム精製（RNeasy Mini Kit, QIAGEN 社製, Cat. #74103）した。精製手順は QIAGEN 社の説明書に従った。その最終段階では、100 ul の RNase free の蒸留水をカラムに加えて溶出した後、実験に使用するまで -80°C に保存した。

RT-PCR 法：RT-PCR 法の手法を簡便化するために、one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Patinum Taq DNA polymerase, Invitrogen company) を用いて、蚊からのウエストナイルウイルスゲノムの検出を行った。

フラビウイルスグループに共通で、しか

も特異的なプライマー、YF1: 5' GGTCCTCTCTAACCTCTAG 3' および、YF3: 5' GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC 3' (Rice *et al.*, 1987) を用いて、750bp の PCR 産物の有無を調べた。また、ウエストナイルウイルスに特異的プライマー、WN-S3 : 5' CACAGCGGGCTTTACTATCT 3' および、WN-C3 : 5' CATTTCAGCAGCTAGGACC 3' (Castle *et al.*, 1985 ; Wengler *et al.*, 1985) を用いて、229bp の PCR 産物の有無を調べた。

ちなみに、RT-PCR の反応条件として、RT 反応 : 53°C 30 分、PCR 反応 : (1 回) 94°C 1 分、(35 回) 94°C 30 秒、53°C 30 秒、68°C 1 分、(1 回) 68°C 2 分 を設定して、MJ Research 社の PCR 増幅装置を使用した。さらに、PCR 産物の有無は 2%アガロースゲルで泳動して特異的な PCR 産物の大きさを確認した。

(倫理面への配慮)

ウエストナイルウイルスは、大分医科大学から国立感染症研究所への分与願いに基づいて分与されたものである。また、大分医科大学医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および実験に関連して、大分医科大学医学部動物実験委員会からの承認を得た。

C. 研究結果

C. 1 実験 1. ウエストナイルウイルスに対するアカイエカ感受性試験

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°C 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、いずれの蚊からも特異的 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 (Fig. 1)。

経口感染アカイエカ雌成虫からの本ウイルスゲノムの検出 : 充分量のウイルス液を経口的に取込んだアカイエカ成虫を、20°C、25°C、28°C の種々温度で 14 日間飼育したところ、20°C では雌成虫 2 個体中 0 個体、25°C では 2 個体中 1、28°C 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 (Fig. 2)。蚊の個体数をさらに増やして検討した結果を図 3 に示した。20°C 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。ちなみに、28°C での飼育であっても、ウイルス取込み量が少ない場合には、特異的 PCR 産物は 4 個体中いずれも認められなかった (Fig. 2 のレーン 5, 6, 7, 8、図 3)。

アカイエカ体内でのウイルスゲノムの検出部位 : 28°C で 14 日間飼育した複数の経口感染アカイエカを頭部、胸部、足部、腹部に分離後 (Fig. 4)、腹部ウイルスゲノム陽性の蚊 4 個体について、残りの蚊部位におけるウイルスゲノムの有無を調べた。その結果、4 個体中の 1 個体がその他の部位でもウイルスゲノム陽性であった。しかしながら、その蚊の頭部にはウイルスゲノムの増幅は RT-PCR 法では認められなかった (Fig. 5)。極めて強い PCR 産物が足と胸部

から得られていたことから、頭部には PCR を阻害する要因が含まれている可能性も思われた。この点に関しては、今後検討する必要がある。

蚊から総 RNA を抽出精製する回数がウイルスゲノムの検出に与える影響：経口感染蚊からのウイルスゲノムを RT-PCR で検出する際には、1 回よりも 2 回の総 RNA 精製くり返しの処理が、RT-PCR によるウイルスゲノムの増幅と検出に有効であることが認められた (Fig. 6)。

C. 2 実験 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 (表 2)。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。

D. 考察

種々の温度で 14 日間飼育した日本産アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ体内のウエストナイルウイルスゲノム検出のために、本ウイルス特異的プライマーを使用して RT-PCR 法を実施した。今回の実験か

ら、アカイエカのみならず、チカイエカおよびヒトスジシマカが本ウイルス感受性であることが明らかとなった。特に、Isogen-LS 処理による 1 度の蚊総 RNA 抽出にも関わらず、15℃で飼育したヒトスジシマカおよび 25℃のチカイエカで明瞭な特異的 PCR 産物が得られたことは、かなり低温であっても蚊体内でウイルスが増殖することを示唆しているといえよう。Q 回目の Qiagen 精製の蚊総 RNA 抽出を使った結果ではさらなる感染蚊があらわれる事が予測されるが、少なくとも、日本産ヒトスジシマカとチカイエカ成虫体内でのウイルス増殖が証明された。また今後は、10℃から 15℃の温度域での蚊体内での本ウイルス増殖の有無を検討する必要がある。

経口感染アカイエカを頭部、胸部、足部、腹部に分離して、腹部がウイルスゲノム陽性個体について各部位におけるウイルスゲノムの有無を調べたところ、4 個体中 1 個体の胸部と足の組織が陽性であった。これらの部位の PCR 産物が明瞭に認められたにも関わらず、頭部は陰性であった。蚊の血リンパは体中を流れていると推察されることから、PCR 阻害要因が頭部組織に含まれている可能性が示唆された。

媒介昆虫から病原体を PCR で検出する際に、PCR 反応の阻害要因が報告されている (Vodkin, M.H., Streit, T., Mitchell, C.J., McLaughlin, G.L., and Novak, R.J. : PCR-based detection of arboviral RNA from mosquitoes homogenized in detergent. *Biotechniques*, 17(1):114-116, 1994)。蚊

由来の総 RNA を異なるキットを使って 2 回精製することは、RT-PCR 反応の阻害要因を減少させて、特異性と感度を高める事になろうと推察された。

今回の RT-PCR 法においては、フラビウイルスグループに共通のプライマーを検討して、ウエストナイルウイルスでも良好な成績を得ることができた。流行地で採集した蚊のウイルス保有状況を調査する際の一次スクリーニングに本共通プライマーを使用して、その後、ウエストナイル熱の流行が確認された際には、ウエストナイルウイルスに特異的なプライマーを使用するという手順が考えられる。

@ウエストナイルウイルスの侵入が我国でも懸念されていることから、アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、および南西諸島・琉球列島に生息するネッタイエカを少なくとも媒介蚊種として我国では位置付ける必要がある。

我国における、ウエストナイルウイルス媒介蚊のサーベイランスに、今回実施した一連の手法が応用可能と思われる。今後は、これらの手法を用いての実際的取り組みが検討されるべきであろう。また、今後は、ネッタイエカを含む 4 種蚊の疫学的重要度を検討するために、これら蚊の本ウイルス伝播能を検討する必要がある。

E. 結論

(1) 日本産アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカはウエストナイルウイルス感受性であり、蚊体内でウイルスを増殖さ

せる事が可能であった。

(2) 経口感染アカイエカを 20、25、28℃で 14 日間飼育した際には、WNV ゲノムがいずれの温度でも検出され、それぞれそれぞれの感染率は、42.9、12.5、75%であった。

(3) ヒトスジシマカでは、15℃で 14 日間飼育の蚊から WNV ゲノムが検出された。供試個体数は少ないが、感染率は 50%(1/2)であった。

(4) 本邦産蚊 3 種類の WNV 増殖が認められたことから、ウイルス伝播能を有する事が推察される。

(5) ヒトを吸血する可能性のある蚊種については、ウエストナイルウイルス感受性を広く調査する必要性が、今後の検討課題として残された。

i6) 蚊由来の総 RNA を 2 回精製することによって、RT-PCR 反応による検出感度と特異性を高める事ができた。しかし、蚊生体には PCR 反応阻害因子があるので、野外における分子疫学調査に本法を応用する際には十分な配慮が必要であろう。

F. 健康危険情報

ウエストナイルウイルス保有蚊が外国から我国へ侵入するのを未然に防ぐために、PCR 装置を使った全国的な媒介蚊サーベイランスを行う必要がある。また、我国に生息するウエストナイルウイルス感受性のアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカそしてネッタイエカ（本種は琉球列島に分布）のウイルス保有状況を検査できる体制を整備する必要がある。

さらに、ウエストナイルウイルス感受性蚊の種類が他のアルボウイルス媒介蚊のそれよりも多いことが米国での調査で指摘されていることから、前述の蚊4種以外のヒト吸血嗜好性を持つ蚊種についても本ウイルス感受性を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

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): *Biologia y epidemiologia molecular del mosquito vector del virus de dengue [in Spanish]. (Molecular biology and epidemiology of vector mosquitoes with dengue viruses). Cemadoja Cientifica (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.*

Morales, R., Morita, K., Eshita, Y., Tsuda, Y., Fukuma, T., and Takagi, M. (2002): *Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin. Med. Entomol. Zool., 53(1): 21-27.*

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.*

Tetsuya Mizutani, Masayuki Kobayashi, Yuki Eshita, Osamu Inanami, Tohru Yamamori, Akiko Goto, Yoshihiko Aki, 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.

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。

2. 学会発表

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

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.

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 Repblica Dominicana. VI Congreso Dominicano de Infectologia, (Organizado por: Sociedad Dominicana de Infectologia Inc.), 28 de Noviembre al lro de

Diciembre 2001, Hotel Meli Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

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 Dengue 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 Dengue 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 Dengue 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.

Paeporn, P., Komalamisra, N., Thongrungrat, 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.

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、菊和宏明、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、菊和宏明、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.

江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2003): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (5) 異なる温度で飼育したアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカのウエストナイルウイルス感受性。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): 42, 2003.

江下優樹、安西三郎、牧野芳大、福田昌子、高岡宏行、Disla, M.、Solis M. A. T.、Cesn, A. J.、Castro, M.、板倉英世、竹下正純 (2003): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (6) ドミニカ共和国におけるデングウイルス媒介蚊。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): 42, 2003.

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.

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

特になし