

20030532

厚生労働科学研究費補助金

平成15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（H15－新興－17）

研究報告書

平成16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）	
2003年度輸入デングウイルス感染症、ウエストナイルウイルス感染症の検査・診断	27
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
多施設 Quality control のための WNV(NY株)合成 RNA の作製	37
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
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	43
分担研究者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）	
日本脳炎ウイルス侵淫地域住民および非侵淫地域住民の西ナイルウイルスに対する交差中和抗体保有率	51
分担研究者：只野昌之（琉球大学大学院医学研究科）	
デングウイルス感染症の新規病原体診断法の開発	55
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
日本人デング感染例における感染ウイルス血清型特異的 IgM 抗体検出	59
分担研究者：名和 優（埼玉医科大学・微生物）	
ブタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス	70
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
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	75
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
コウモリから分離されたフラビウイルス（Yokose ウイルス）の遺伝子解析	85
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究. ヤブカ寄生原虫 <i>Ascogregarina spp.</i> を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究	93
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）	
日本産蚊類のアルボウイルス媒介能ならびに感受性	116
分担研究者：江下優樹（大分大学・医学部）	
DNA ワクチンの抗原産生能と中和抗体誘導能との関係	128
分担研究者：小西英二（神戸大学・医学部）	
抗体可変部位をコードする遺伝子配列によるハイブリドーマクローンの群別法	141
分担研究者：山岡政興（兵庫県立健康環境科学研究所）	

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、疫学及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 ウイルス第一部 部長）

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）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する血清診断法と病原体・遺伝子診断法の確立：１）ウエストナイルウイルスに対する遺伝子検出用 TaqMan RT-PCR 法を開発し、標準化を行った。２）ウエストナイルウイルス遺伝子検出用の LAMP 法を開発し、感度、特異性を明らかにした。３）デングウイルス 1-4 型遺伝子検出用 TaqMan RT-PCR 法を開発し、感度、特異性を明らかにした。４）デング血清型特異的 IgM 抗体を検出する IgM 捕捉 ELISA 法の検討を行った。５）海外からの帰国者についてデングウイルス、ウエストナイルウイルス感染に対する血清・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。ウエストナイルウイルス感染は陰性であった。６）日本脳炎ウイルス侵淫地域の中和抗体陽性ヒト血清がウエストナイルウイルスに対して交叉中和活性を有することを示した。７）現在日本において夏季流行している日本脳炎ウイルスの遺伝子型及び抗原性を明らかにした。８）ダニ媒介性ウイルスであるクリミアコンゴ出血熱ウイルスの中国における分子疫学を明らかにした。（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）東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大状況を明らかにした。２）日本産アカイエカがウエストナイルウイルスに対して感受性を有することを示した。３）日本産ミヤラシマカがデングウイルスに対して感受性を有することを示した。（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むけての基礎的研究：１）デングウイルス及び日本脳炎ウイルス DNA ワクチンの *in vitro* 及び *in vivo* における抗原産生量と抗体誘導能に関連あることが示された。２）抗体可変部位をコードする遺伝子配列によるハイブリドーマクローンの群別法が可能であることがしめされた。（４）啓発用 CD-ROM、ビデオの作成：ウエストナイル熱に対する米国 CDC 作成の啓発用 CD-ROM の日本語版を作成した。

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）

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人に感染し病気を起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病する例もあり、診断されずに見逃されている例がかなりの数におよんでいると考えられる。一方1999年よりアメリカで流行しているウエストナイル熱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が侵入する可能性も常

に存在する。従って厚生労働行政においては、これら輸入感染症として起こりうる多種の節足動物媒介性ウイルスに対しての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。ワクチンに関しては日本脳炎、ダニ媒介性脳炎、黄熱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型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は実用化されているワクチンがなく、その開発も重要である。従って本研究は以下の4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する血清診断と病原体遺伝子診断法を確立し、輸入例や国内発生例に備える。(2) 検査マニュアル等を作成し、確立した診断技術を地方衛生研究所等へ移転する。(3) 節足動物媒介性ウイルスの国内状況を血清・病原体及びベクターの面から把握する。(4) 節足動物媒介性ウイルスに対する新ワクチンの開発に関する技術的基盤を確立する。さらに、啓発用のCD-ROMやビデオを作成する。

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。米国からの帰国者に対して2000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、2003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) 多施設 Quality control のための WNV 合成 RNA の作製: ウエストナイルウイルス遺伝子検出に関し、施設間で検査の感度・特異性を統一するために、TaqMan RT-PCR 用の増幅領域である E 領域と 3' NC 領域の合成 RNA を作製した。クローン化したウエストナイルウイルスのプラスミド (クローン 2) をテンプレートにして、CDC が作製したプライマーを用いてそれぞれのシークセンスをし、プラスミドのインサートに E タンパクが存在することが確認した。このウエストナイルウイルスのプラスミドを用いて T7 Ribomax Express Large Scale RNA Production Systems により RNA を合成した。

3) Loop Mediated Amplification (LAMP) 法を用いたウエストナイルウイルス迅速診断法の開発: デザインしたプライマーを用いて 柴研化学社の Loopamp DNA amplification キットを用い、25 μ l の反応系で 63°C、60 分反応させ、反応産物をアガロース電気泳動と Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan) を用いて反応産物濁度を測定する方法で実施した。反応系の組成条件は FIP と BIP プライマー (50 pmol)、F3 と B3 プライマー (5 pmol)、F と loop B プライマー (25 pmol) 1400 μ M 各 dNTP, 0.6 M betaine (Sigma, USA), 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 8mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.125 U of AMV-RT (Invitrogen, USA), 8 U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs) でありここに、ウイルス RNA を混合する方法で行った。

4) 日本脳炎ウイルス侵淫地域住民および非侵淫地域住民の西ナイルウイルスに対する交差中和抗体保有率: 従来の検査から、沖縄島では日本脳炎ウイルスが活発に循環しているのに対して、石垣島では活動していないことが示唆された。住民の血清疫学的調査でも、沖縄島の住民は日本脳炎ウイルスの自然感染を受けているが、石垣島の住民は受けていないと考えられた。日本脳炎ウイルスの侵淫度が異なる両島に居住する住民の血清について、日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスに対する中和試験を実施した。

5) デングウイルス感染検査のための TaqMan Real Time RT-PCR の開発: TaqMan Real Time RT-PCR のプライマーおよびプローブは、世界の分離株を比較・検討し、各血清型間において相同性が低く、なおかつ各血清型内において保存された部位を選択し、作製した。本方法の評価には国立感染症研究所ウイルス第一部においてすでに初感染のデング熱感染を診断した検体を用いた。さらに、TaqMan Real Time RT-PCR 結果は従来の RT-PCR 法および Vero 細胞によるプラーク法で確認したウイルス力価とその検出感度を比較した。

6) チオシアン酸ナトリウム (NaSCN) を用いた感染ウイルス血清型特異的 IgM 抗体検出用 IgM 捕捉-ELISA の開発: デング IgM 捕捉-ELISA の反応系にタンパク分子構造を可逆的に変性させる薬剤、チオシアン酸ナトリウム (NaSCN) を添加し、デングウイルス特異的 IgM 抗体と抗原との血清型特異的反応の出現を観察した。

7) ブタにおける日本脳炎サーベイランス: 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 週前のブ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。

8) 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：中国の新疆ウイグル自治区の流行地で 2002 年の CCHF 流行期に、急性期の患者血清およびダニから RNA を抽出した。ランダムヘキサマー-p(dN)₆ で 1st strand cDNA を作製した。ここまでの実験は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所において唐青博士との共同研究で行った。患者からの血液採取にあたっては、説明し同意を得た。1st strand cDNA を鋳型として種々のプライマーを用いて S-RNA 分節を標的とした PCR を行い、PCR 産物から direct sequence により塩基配列を決定した。

9) Yokose ウイルスの遺伝子解析：Yokose ウイルスを脳内接種された乳のみマウスより得られた脳抽出液をウイルス溶液とし、これよりウイルス RNA を回収して cDNA 合成時の鋳型として用いた。最初にフラビウイルス間で比較的保存性の高い E 領域の一部と NS3 領域の一部を RT-PCR 法により増幅後、塩基配列を決定した。次に明らかとなった配列を用いて、5' および 3' RACE 法、および RT-PCR 法により残りの領域を増幅後、塩基配列を決定した。ウイルス蛋白質の翻訳開始点および蛋白プロセッシング位置は、他のフラビウイルスと比較することにより推測した。決定した E 領域の塩基配列および予想されるアミノ酸配列と他のフラビウイルスの配列とを比較し、さらにこれらの配列を用いて系統樹を作成した。

(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) 東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究：東北地方でのヤブカの分布調査においては、各都市の神社、寺院、公園、古タイヤ集積場等の墓石、手水鉢、花立て、プラスチック容器等の小用量の水が溜まっている人工容器からピペットで幼虫を採取し、ポリビンに入れて研究所に持ち帰り、成虫まで飼育してから種の同定を行った。これら人工容器から発生する蚊類には、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、フタクロホシチビカ、ヤマダシマカ、アカイエカ、キンパラナガハシカ、オオクロヤブカ、トウゴウヤブカなどであるが、都市部では多くがヒトスジシマカとヤマトヤブカの 2 種で、有機物が多い水たまりにアカイエカ幼虫の発生が見られるのみである。各都市の年平均気温は気象庁の統計資料から情報を得た。また、年平均気温を地理学的に解析するために 1 Km メッシュ気候図（気象庁、1996）を利用し、温暖化による平均気温が 1 °C—3 °C 上昇した場合のメッシュ気候図を作成し、将来の分布域拡大の予測に用いた。

2) ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究：

① *Ascogregarina* 原虫オーシストからの DNA 抽出：ネッタシマカおよびヒトスジシマカ幼虫に対し、*Ascogregarina culicis* および *Ascogregarina taiwanensis* 原虫それぞれのオーシストを大量に感染させ、蛹を飼育した水の遠心分離および羽化後の感染蚊を解剖してオーシストを回収した。回収したオーシストからのゲノム DNA の抽出は、*Eimeria* 原虫オーシストからの DNA 抽出法 (Zhao *et al.*, 2001) を参考にし、手順を一部改変して行った。

② *Ascogregarina* spp. rRNA 小サブユニット遺伝子 (SSU rDNA) のクローニングと塩基配列の解析: *Ascogregarina* spp. SSU rDNA 遺伝子の単離は、Ex Taq polymerase (TAKARA) を用いたゲノム PCR 法で行った。まず、上記の方法で回収した *As. culicis* 2 株 (タイ株、ベトナム株) および *As. taiwanensis* 2 株 (日本株、インド株) のゲノム DNA を TE buffer に懸濁し、以後の PCR のテンプレートとして用いた。プライマーには、真核生物の rRNA 小サブユニット遺伝子領域 (約 1.8 kb) の増幅用にデザインされたユニバーサルプライマー (Medlin *et al.*, 1988) を用いた。回収した PCR 産物は pGEM-T ベクター (Promega) にクローニングした後、常法に従いサイクルシーケンシングを行った。

3) ウエストナイルウイルスに対するアカイエカの感受性: ウエストナイルウイルス、ウガンダ株 ($2-3 \times 10^7$ 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。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。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。感染蚊は、3 重の飼育容器内に密封して 28°C で 14 日間飼育を行った。ウイルス媒介試験に供試蚊を用いた後、-20°C で飼育容器を 30 分程保管して蚊を生殺した。後日、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で確認するまで -80°C に保存した。WNV 感染後 14 日経過した雌蚊の入った飼育容器のメッシュカバーを介して麻酔したマ

ウスから吸血の機会を約 1 時間蚊に与えた。その間、吸血した蚊の数をマウス毎に記録した。マウスは 2 週間観察を行い、異常な症状の認められたマウスはその尾静脈から 20ul 採血して、ウイルスゲノムの有無を確認するまで -80°C に保管した。RT-PCR の特異性と感度を高めるために、Iosgen-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、50 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。One step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Patinum Taq DNA polymerase, Invitrogen company) を用いて、マウス血液あるいは蚊からの WNV ゲノムの検出を行った。

4) デングウイルスに対するミヤラシマカの感受性: タイ国産デングウイルス (10^8 pfu/ml) を用いた。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。感染実験に用いたミヤラシマカは、佐賀大学医学部の茂木博士が沖縄県石垣島で採集後に継代飼育された後、大分大学に分与されたものを実験に供した。

ミヤラシマカの蚊胸部接種感染では、約 0.2ul ($4-6 \times 10^3$ pfu/0.2ul) のデングウイルス液を、羽化 5-6 日後の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 redblood 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。

(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) DNA ワクチンの抗原産生能と中和抗体誘導能との関係：① DNA ワクチン：日本脳炎ウイルス (JEV) 中山株、デング 2 型ウイルス (DENV2) ニューギニア C 株またはデング 1 型ウイルス (DENV1) 望月株の prM/E 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組み込んで作製したプラスミド (それぞれ pcJEME、pcD2ME または pcD1ME) を用いた。② E 抗原量の測定はサンドイッチ ELISA を用いた。③ マウス実験：4 週令の雄 ICR マウス (各群 6 から 12 匹) に、50 μ g のプラスミド DNA を片脚の大腿部筋肉に通常の針付注射器もしくは針無注射器 (シマジェット、島津製作所) を用いて接種した後、4 日目まで 1 日毎に筋肉を採取した。筋肉は、1%BSA、1.5% アプロチニン及び 3.75% トリトン X-100 を含むトリス緩衝生理食塩水 (pH7.5) 中で磨砕し、10% 乳剤とした。接種筋肉と未接種筋肉で得られた吸光度の差から、抗原量を計算した。また、中和抗体を調べるために、100 μ g の DNA により 3 週間隔で 2 回免疫したマウスを、初回免疫 2 週間後から約 3 週間毎に 18 週まで経時的に採血し、プール血清の中和抗体価を測定した。

(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。ヒト検体を用いる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) 輸入デング熱の状況：

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 155 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 (14%) が陽性 (男性：14、女性：8) であった。その内、RT-PCR およびリアルタイム PCR (TaqMan 法) 9 症例でウイルス血清型が判明した。その内訳は、デングウイルス 1 型が 3 例、2 型が 5 例、3 型が 1 例であった。これらの患者の多くは東南アジア・南アジアからの帰国者であったが、ニューカレドニア、オーストラリア、コロンビアなどからの帰国者も含まれていた。

② 国立感染症研究所での検査成績：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結果は図 2 に示した。検査総数 34 症例中 23 症例 (67.6%) がデング熱と診断された。この 23 症例中 14 症例が PCR で型別が確定された (1 型：3 例、2 型：8 例、3 型：4 例、4 型：0 例)。感染者の大半はインドネシア (5 例)・タイ (6 例)、インド (3 例) など東南アジアからの帰国者であった。しかし、セイシェル、フィジー、ニューカレドニアなどインド洋や南太平洋などの島国からの帰国者もいた。

2) ウエストナイル熱の実験室検査：ウエストナイルウイルス感染に関しては、サンフランシスコで蚊に刺された添乗員の成田空港検疫所からの依頼が 1 検体あったが、

病原体診断、血清学的検査いずれも陰性であった。

3) 多施設 Quality control のための WNV 合成 RNA の作製: E 領域の合成 RNA は 7.7×10^{11} copies/ μ l であり、3' NC の合成 RNA は 7.8×10^{10} copies/ μ l の濃度の RNA が合成された。どちらも 100 copies/ μ l で確実に検出が保証でき、10 copies/ μ l が検出限界であった。

4) Loop Mediated Amplification (LAMP) 法を用いたウエストナイルウイルス迅速診断法の開発:

① 西ナイルウイルス NY 株の RT-LAMP 法による遺伝子増幅と特異性: 今回設計したプライマーにより西ナイルウイルス遺伝子は RT-LAMP 法により検出された。ウイルス RNA を入れない反応では非特異的な産物は形成されなかった。この産物は制限酵素 (AluI) により切断され予想される大きさの断片となり、増幅された遺伝子が西ナイルウイルスに特異的であることが示唆された。また精製産物の DNA を直接塩基配列を解釈したところやはり西ナイルウイルス遺伝子が増幅されていることが確認された。また他のフラビウイルスの遺伝子に対して反応は認めなかった。

② ウエストナイルウイルス特異的 RT-LAMP 法と RT-PCR 法の感度比較: 従来から開発されていた RT-PCR 法と今回開発した RT-LAMP 法の西ナイルウイルス遺伝子検出における感度の比較を行った。ウイルス RNA を 10 倍段階希釈して 2 つの方法によるウイルス遺伝子の検出を試みた。この結果、RT-LAMP 法は RT-PCR 法より約 10 倍の検出感度を示す事が確認された。

③ リアルタイム RT-LAMP と定量性: 63°C でのインキュベーションと濁度測定が同時に

出来る Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan) を用いて RT-LAMP を用いたリアルタイムでの西ナイルウイルスの遺伝子検出について評価を行った。各濃度に希釈した西ナイルウイルス RNA を同時に RT-LAMP 法にかけ経時的にその濁度を測定した。その結果、アガロース電気泳動でみられた検出感度に相関して、濁度の検出が確認された。さらに、検出開始 (反応開始) 時間は鋳型ウイルス RNA の量に相関して、即ち RNA の量が多いほど検出開始時間が短くなった。このことは、本濁度計をもちいれればウイルス遺伝子の検出とその量の定量が可能であることを示していた。

5) 日本脳炎ウイルス侵淫地域住民および非侵淫地域住民の西ナイルウイルスに対する交差中和抗体保有率: 沖縄島および石垣島住民血清について 2 株の JEV を用いた中和試験を行い、抗 JEV 中和抗体陽性検体をスクリーニングした。このスクリーニングで、沖縄本島住民血清 128 検体中 126 検体 (98.4%)、石垣島住民血清 182 検体中 129 検体 (70.9%) が用いた JEV 株のいずれかを中和した。さらに、沖縄島住民血清 128 検体および石垣島住民血清 182 検体について 2 株の WNV を用いた中和試験で交差中和抗体のスクリーニングを行った。いずれの地域住民血清でも抗 JEV 中和抗体陰性血清が、用いた WNV 株を中和することはなかった。このことから、両島に WNV が存在しないことは明かで、この実験で認められる WNV の中和は抗 JE 抗体による交差中和と考えられる。次に、両島住民血清の抗 JEV 中和抗体陽性血清検体中の WNV 交差中和率を検討した。JEV を中和する石垣島住民血清の WNV・FGC 株に対する交差中和陽性率は沖縄

島住民血清のそれより有意に低かった。一方、WNV・NY 株に対する交差中和抗体陽性率の間には有意な差が認められなかった。

6) デングウイルス感染検査のための TaqMan Real Time RT-PCR の開発：新たに開発した TaqMan Real Time RT-PCR はデングウイルス 1-4 型の標準ウイルスについて、各血清型に対する特異性が確認された。また、Vero 細胞によるプラーク法で確認したウイルス力価を基準に希釈して検出限界をもとめたところ、デングウイルス 1 型は 1.4×10^6 PFU/ml 以上、デングウイルス 2 型は 0.5 PFU/ml、デングウイルス 3 型は 1.4×10^6 PFU/ml 以上、デングウイルス 4 型は 0.5 PFU/ml 以上であった。本法によって検査したデング熱患者血清中のうち全検体でデングウイルス遺伝子が検出された。一方、従来の RT-PCR 法では、デングウイルス型特異プライマーを用いた場合は検出率 87%、デングウイルス共通プライマーを用いた場合は検出率 79% であった。血清中のウイルス力価と TaqMan Real Time RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出値 (Ct 値) には相関性が認められた。

7) チオシアン酸ナトリウム (NaSCN) を用いた感染ウイルス血清型特異的 IgM 抗体検出用 IgM 捕捉-ELISA の開発：デングウイルス感染が確定された 8 症例の血清を用いた。4 価、および D1 から D4 までのウイルス抗原を用いて、0.5M NaSCN 添加前後で得られた IgM 捕捉-ELISA を検討した。NaSCN -/+での cut off 値をそれぞれ 2.28 および 26.60 とした時、NaSCN 未添加では 7/8 例が IgM 陽性で、5/7 例で RT-PCR および IgM-ELISA の型特異性が一致した。NaSCN 添加後の IgM 陽性数は 5/8 例と 2 例少なかったが、RT-PCR 結果との一致率は 5/5 例 (100%) であった。

1 例を除く 7 例の IgM-ELISA 結果 (P/N ratio) は、NaSCN 添加と関係なく感染ウイルス血清型に対する値がその他の血清型より大きな数値を示した。NaSCN を添加した時の反応は、感染ウイルス血清型に対する反応が交差反応より強調されて出現した。

8) ブタにおける日本脳炎サーベイランス：9 県のブタ血清から日本脳炎ウイルスが分離された。8 株の E タンパク領域について遺伝子配列を決定した結果、いずれもワクチン株の 3 型とは異なる遺伝子 1 型であった。何れの分離ウイルス (Vero 細胞由来) も、ワクチン株 (マウス脳由来) 同様の高い感染価 (PFU/ml) を示し、分離ウイルスのプラークサイズはワクチン株の十倍以上の大きさを示した。HA 試験における至適 pH は、ワクチン株は pH6.4、分離ウイルスでは pH6.6 である傾向が見られた。

ワクチン株 Beijing-1 の高度免疫抗血清に対する中和抗体価 (\log_{10}) は、Beijing-1、Nakayama-NIH 株の 3.60、3.02 に比べて、sw/Hiroshima/25/2002 以外の分離株は 2.56-2.60 と 1log 程度低い値を示し、抗原性の変異が示唆された。sw/Hiroshima/25/2002 は 3.52 と高く反応し、ワクチン株に抗原性が類似していることが示唆された。哺乳マウス脳における中枢神経毒性試験の結果は、ワクチン株の Beijing-1 で最も早く、採用した全ての希釈で 4 日目に発症が見られ、LD₅₀ は 7 日目で 5pfu であった。同時に実験に供した 2 株の分離ウイルスの内 sw/Chiba/88/2002 は、ウイルス量の多いグループで 6 日目から重症化及び死亡が認められ、LD₅₀ は 8 日目で 125pfu であり、中枢神経毒性の程度は Beijing-1 株の 1/25 であった。sw/Hiroshima/25/2002 は一番ウイルスの濃

い希釈で 6 日目に、1 匹の麻痺発症が見られた以外に症状は認められなかった。新分離ウイルスの内、5 株のウイルス及び 2 株のワクチン株について 3' NTR 領域の塩基配列を決定したところ、新分離株を含む遺伝子 1 型のウイルス遺伝子には、共通して 68-80 番目の塩基の欠失が見られることが明らかになった。

9) 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：

① 6 人の急性期の CCHF 患者血清から PCR 産物が得られた。流行地で採取されたダニは、2-6 匹をプールして RNA 採取した結果、45 プールのダニ材料のうち 5 プールから PCR 産物が得られた。得られた S-RNA の PCR 産物の遺伝子配列を GenBank に登録されている CCHF ウイルスの部分配列と比較した結果、患者由来 5 検体、ダニ由来 2 検体は、1966-S 型 (1966 年分離株) (1966 年分離株 66019 株/2001 年流行) に、患者由来 1 検体、ダニ由来 3 検体は、1975-S 型 (1975, 1978, 1984, 1988 年分離株) に分類された。

② 2003 年にロシア、英国、米国から複数の CCHF ウイルス株の M-RNA の全配列が決定された。これまでに、M-RNA の部分遺伝子配列から NJ 法による分子系統学的解析を行った結果では、中国の 2 株 (7001, 79121; 1970 年型) はウズベキスタン分離株と、2 株 (8402, 88166; 1984 年型) はパキスタン分離株と、2 株 (75024, 7803; 1975 年型) はタジキスタン分離株と同じ系統に属した。今回、全遺伝子配列・アミノ酸配列から同様の解析を行った結果、1975 年型にタジキスタン、イラク分離株が分類され、パキスタン分離株は、1975 年型と 1984 年型に分類されるものがあった。ロシア分離株は、いずれの中国分離株とも異なる型に属した。

10) Yokose ウイルスの遺伝子解析: Yokose ウイルスは、全長 10857 ヌクレオチドからなり、3425 アミノ酸からなる蛋白質がコードされる領域 (10275 ヌクレオチド) と、150 ヌクレオチドの 5' 非翻訳領域および 432 ヌクレオチドの 3' 非翻訳領域が存在すると推測された。6 種類の代表的なフラビウイルス (デング 2 型、日本脳炎、ウエストナイル、黄熱、ダニ媒介性脳炎、Rio bravo) との間で予測されるアミノ酸配列を比較すると、黄熱ウイルスのものと最も相関性が高かった。系統樹解析からも、これらのウイルスのうちでは黄熱ウイルスと最も近縁であることが示唆された。

(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) 東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究：2001 年の調査で、横手(2/29 コロニー, 9.5%)、新庄(11/12, 91.7%)、気仙沼(4/18, 22.2%)で新たに同蚊の分布が確認された。その後 2 年が経過したので、定着を確認するため再調査を行い、また継続して湯沢、横手、盛岡、花巻、北上、釜石等で調査を行った。新庄では 13/14 コロニー(93%)がヒトスジシマカで、市内の広範に分布していたが、横手では 5/50(10.0%)であり、分布は市内の一部に限局しており、2 年前と比べ大きな変化が見られなかった。2003 年 9 月に、盛岡で初めてヒトスジシマカの分布が市内の 1 寺院で確認された (2 / 51 コロニー, 3.9%)。なお、湯沢、花巻、北上、大船渡、釜石で依然としてヒトスジシマカの分布は確認されず、小水域に発生する幼虫の多くはヤマトヤブカであった。各都市における過去 7 年間の年平均気温、メッシュ気候図を用いた GIS 解析、都市部における人口密度の高

い地域の面積等を分布解析に用いた。東北地方の各都市における年平均気温は、1997年から上昇傾向にあり、特に、1998-1999年にかけては、過去30年間(1961-1990)の平均と比べ明らかに上昇が認められた。1998年から調査対象の都市におけるヒトスジシマカの分布形態を解析した。1999年から2000年にかけて新たな分布・定着が起こった都市が多いことが示された。また、過去30年(1961-1990)の気象データを用いて作成されたメッシュ気候図では、年平均気温が10-11°Cの地域に存在する都市に同蚊の分布が認められるが、1°C上昇を予想したメッシュ気候図上に現在の分布をプロットした場合に、年平均気温が11-12°Cの地域に分布確認都市が存在することが明らかに示された。

2) ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究: *Ascogregarina* のオーシストは、夾雑物の混入が少なく比較的高純度で多量に回収できることから、遺伝子解析に利用可能な純度のゲノム DNA を回収するのに最も適したステージと考えられた。*Eimeria* 原虫で開発された DNA 抽出法 (Zhao *et al.*, 2001) を参考に、*Ascogregarina* オーシストからの DNA 抽出を試みた。比較的高純度のゲノム DNA の回収に成功し、本方法が *Ascogregarina* 原虫オーシストにも十分適用できることが分かった。外来遺伝子導入 *Ascogregarina* 原虫を用いた、新しいヤブカ防除法の開発を目指している。しかしこれまでのところ、本原虫に関しては遺伝子工学的操作を行う上での基礎的な知見が乏しい。そこでまず生物の種間関係の推定によく利用される rRNA の小サブユニットをコードするゲノム領域 (SSU rDNA) のクロー

ニングと塩基配列の解析を行った。材料には、*As. culicis* 2 株 (タイ株、ベトナム株) および *As. taiwanensis* 2 株 (日本株、インド株) を用いた。これら各株のゲノム DNA を用いた PCR を行い、得られた増幅産物の塩基配列を解析したところ、確かに SSU rDNA 領域であることが確認された。また本領域内には、*As. culicis*、*As. taiwanensis* 両種を明確に区別し得る塩基配列が見出された。

3) 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 吸血 10 日後までマウスを観察したところ、3、7、10 日後に麻痺用の症状が出た。それらマウスの尾静脈から採血して、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR で検討したところ、マウス 3 個体中の 1 個体で極めて薄いバンドが検出された。塩基配列を調べたところ WNV ゲノムの配列と 100% 一致した。

② マウスに感染を起こしたアカイエカ雌成虫からの本ウイルスゲノムの検出: ウイルスゲノムが検出されたマウスを吸血した蚊は 1 個体であった。その蚊を頭、胸部、腹部に分離して、それぞれの部位におけるウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で調べた。その結果、いずれの部位からも WNV ゲノムが検出された。蚊からのデータでも、胸部のウイルスが感染していたことから唾腺の感染が裏付けられた。

4) デングウイルスに対するミヤラシマカの感受性:

① 胸部接種法によるミヤラシマカ雌成虫体内でのウイルス増殖: 28°C 温度で 14 日間飼育したミヤラシマカからのウイルスゲノムの有無を調べるためにデングウイルス特異的プライマーを使用して RT-PCR を行った結果、いずれの個体からも明瞭な特異的

PCR産物が認められた。

② 経口感染雌成虫の28℃でのウイルス増殖：28℃で14日間飼育した経口感染ミヤラシマカからのウイルスゲノムの有無を調べるために、RT-PCRを行ったところ、約30%の供試蚊の体内から本ゲノムが認められた。蚊の腹部からウイルスゲノムが検出された蚊個体については、胸部、頭部、脚部におけるウイルスゲノムの有無を調べたところ、6個体中の3個体はいずれの部位でも本ゲノム陽性であったが、残り3個体では頭部や脚部陰性のものも観察された。ネッタイシマカやヒトスジシマカでも同様なことが観察されたことから、ミヤラシマカはヒトスジシマカやネッタイシマカと同様なウイルス感受性を持つと推察された。

(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) DNAワクチンの抗原産生能と中和抗体誘導能との関係：

① Vero細胞に2.0 μg のpcJEME、pcD2MEまたはpcD1MEをトランスフェクトした後、24時間毎に4日間培養液を採取し、培養液中のE抗原量を測定した。pcJEMEまたはpcD2MEをトランスフェクトした細胞から産生されるE抗原量は、2日目に最高値を示し、4日間を通してpcJEMEがpcD2MEの約10倍量のE抗原を産生した。一方、pcD1MEにおけるE抗原量は4日目まで検出限界未満(0.1 ng/ml未満)であった。これらの結果は、*in vitro*におけるE抗原産生能がpcJEME>pcD2ME>pcD1MEの順であることを示す。

② マウスの大腿部筋肉に、50 μg のプラスミドDNAを、針無注射器を用いて接種した。pcJEME接種マウスにおいて、針付注射器を用いて接種した場合E抗原は検出されなかつ

たものの、針無注射器を用いた場合には抗原が検出された。E抗原量は接種後1日目に最高値(約1.0 ng/ml)を示し、その後徐々に減少し、接種後4日目には検出されなかった。しかし、pcD2ME、pcD1ME及びpcDNA3を接種した筋肉においてE抗原は検出されなかった。また、血漿中E抗原量は全てのマウスで検出限界未満であった。

③ 中和抗体誘導能：マウスに100 μg のpcJEME、pcD2MEまたはpcD1MEを3週間隔で2回、針付または針無注射器で大腿部に接種し、免疫から2週間後に採血し、プール血清にして中和抗体価を測定した。pcJEMEまたはpcD2MEを接種したグループでは、投与方法に関わらず1回目の免疫から5週目に中和抗体価が最高値を示した。その後、中和抗体価は低下したが、pcD2MEを針無注射器で接種したグループでは、18週目まで最高値が維持された。一方、pcD1MEで免疫したグループにおいては、両投与方法において、pcJEMEまたはpcD2MEで免疫したグループに比べ3週間遅れて(8週目)、中和抗体価が最高値を示し、18週目まで維持された。針無注射器で接種したグループでは、5週目まではDNAワクチン間で誘導される中和抗体価に大きな差がみられたが、8週目にpcD1MEの抗体価がpcD2MEの抗体価と等しくなり、その後、14週目にはpcJEME、pcD2ME及びpcD1ME全ての抗体価が等しくなった(1:640)。一方、針付注射器で接種したグループにおいても、5週目に誘導された中和抗体価は、pcJEMEとpcD1MEの間に32倍の差があったが、18週後には4倍差まで減少した。

2) 抗体可変部位をコードする遺伝子配列によるハイブリドマクロンの群別法： Deng4価ワクチンの安全性をワクチンの誘導する抗体の側からクローンレベルで評

価するシステムを構築するため、実験マウスで生産される数多くのハイブリドーマの群別をより効率に行える方法を市販のプライマーを用いることによって検討した。マウスの免疫グロブリン可変部を増幅するために用意された17種類のプライマーをプロトコールに従った個々のプライマーペアによるPCR、あるいは複数単位で用いたマルチプレックスPCRを試みた。その結果、H鎖及びL鎖のそれぞれの可変部を増幅できること、増幅産物はダイレクトシーケンシング法によって直接塩基配列が確定できることが明らかになった。

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及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し、各ウイルスに対する新型ワクチン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。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する血清診断法と病原体・遺伝子診断法の確立においては、1) ウエストナイルウイルスに対する遺伝子検出用TaqMan RT-PCR法を開発し、標準化を行った。2) ウエストナイ

ルウイルス遺伝子検出用のLAMP法を開発し、感度、特異性を明らかにした。3) デングウイルス1-4型遺伝子検出用TaqMan RT-PCR法を開発し、感度、特異性を明らかにした。

4) デング血清型特異的IgM抗体を検出するIgM捕捉ELISA法の検討を行った。5) 海外からの帰国者についてデングウイルス、ウエストナイルウイルス感染に対する血清・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。ウエストナイルウイルス感染は陰性であった。

6) 日本脳炎ウイルス侵淫地域の中和抗体陽性ヒト血清がウエストナイルウイルスに対して交叉中和活性を有することを示した。

7) 現在日本において夏季流行している日本脳炎ウイルスの遺伝子型及び抗原性を明らかにした。8) ダニ媒介性ウイルスであるクリミアコンゴ出血熱ウイルスの中国における分子疫学を明らかにした。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) 東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大状況を明らかにした。2) 日本産アカイエカがウエストナイルウイルスに対して感受性を有することを示した。3) 日本産ミヤラシマカがデングウイルスに対して感受性を有することを示した。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むけての基礎的研究においては、1) デングウイルス及び日本脳炎ウイルスDNAワクチンのin vitro及びin vivoにおける抗原産生量と抗体誘導能に関連あることが示された。2) 抗体可変部位をコードする遺伝子配列によるハイブリドーマクローンの群別法が可能であることがしめされた。さらに、ウエストナイル熱に対する米国CDC作成の啓発用CD-ROM、ビデオの日本語版を作成し

た。

以上の研究成果は以下の点で厚生労働行政に貢献する

1) デングウイルス1-4型、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスによる感染をより迅速に診断することを可能にし、早期の治療及び予防対策の策定を可能にする。さらに、輸血や臓器移植によるこれらのウイルス感染を防ぐことを可能にする。また、地方衛生研究所、検疫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する。2) ウエストナイルウイルスの日本への侵入時に感染蚊を高感度で検出することが可能になり、ベクターのサーベイランスに基づく有効な感染蚊対策を早期にとることを可能にする。3) 日本脳炎に対する現行ワクチンの有効性に関して、流行しているウイルス遺伝子型を基盤に判断することを可能にする。さらに、新しい株を用いたワクチン開発の必要性について判断基盤を与える。4) ウエストナイル熱、デング熱に対する新型ワクチン開発を迅速に進めていくことを可能にする。さらに現在ワクチンのない他の節足動物媒介性ウイルスに対するワクチン開発を可能にする5) ウエストナイル熱に関しての国民の理解が増進する。今後も当初の3年間の研究計画に沿って研究を遂行する。

E. 結論

ウエストナイルウイルス、デングウイルスに対する新しい血清・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。また、日本脳炎ウイルス侵淫地域の中和抗体陽性ヒト血

清がウエストナイルウイルスに対して交叉中和活性をしていた。さらに、本年度日本において分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子型及び抗原性を明らかにした。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、日本産アカイエカがウエストナイルウイルスに対して、日本産ミヤラシマカがデングウイルスに対して感受性を有することを明らかにした。さらに、デング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの東北地方における分布域拡大状況を明らかにした。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むけての基礎的研究においては、デングウイルス及び日本脳炎ウイルス DNA ワクチンの *in vitro* 及び *in vivo* における抗原産生量と抗体誘導能に関連あることが明らかとなり、高レベルの防御免疫を誘導するワクチン開発、ワクチン投与法に示唆を与える結果を得た。

F. 健康危機管理情報

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。また、ウエストナイルウイルスに感受性を有する蚊が日本には存在する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro Kurane. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination

inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10(4) 725-728, 2003.

Sa-ngasang, A., Wibulwattanakij, S., Chanama, S., O-rapinpatipat, A., A-nuegoonpipat, A., Anantapreecha, S., Sawanpanyalert, P., and Kurane, I.: Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 56: 205-209, 2003

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *Journal of General Virology* 84: 1737-1741, 2003.

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. *Anthology of Biosafety: VI. Arthropod Borne Diseases*. Editor: Jonathan Y. Richmond; Chapter 6; Isolation of Arboviruses from Field-collected mosquitoes. *American Biological Safety Association*. 63-71 (2003)

Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. Involvement of the

JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol*. 2003 Oct;12(5):491-499.

Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. *Vaccine* 21(31) 4514-4518, 2003

Parida M., Posadas M., Inoue S., Hasebe F., and Morita K.. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 42: 257-263, 2004.

Inoue S., Morita K., Matias R. R., Tuplano J. V., Resuello R. R. G., Candelario J. R., Cruz D. J. M., Mapua C. A., Hasebe F., Igarashi A. and Natividad F. F. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J. Med. Primatol.* 32:89-94, 2003

Ohishi K., Inoue S., Cinco M., Diaano E., Alera M., Alfon J., Abanes F., Crus D., Matias R., Matsuura H., Hasebe F., Tanimura S., Kumatori A., Moirta K., Natividad F., Nagatake T: Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary

dengue virus infections. *J. Med. Virol.* 71:259-264, 2003

Pandey B., Yamamoto A., Morita K., Kurosawa Y., Rai S., Adhikari S., Kandel P., and Kurane I.: Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay. *Epidemiol. Infect.* 131:881-885, 2003.

Oishi K., Inoue A., Kuramoto T., Onizuka S., Saito M., Hasebe F., Morita K., Nagatake T.: Association of dengue virus type-specific IgG on platelets is specific for the acute phase in an imported Japanese patient with secondary dengue virus infection. *J. J. Trop. Med. Hygn.* Vol. 31:223-225, 2003.

Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa M. A major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Aug; 69(2): 151-4.

Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods*, 108: 111-116.

Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* 10(3):489-91.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Aki, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara M. and Takashima I. (2003): Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol. Biol.*, 12(1):61-66.

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* 21, 1826-1832 (2003)

Kiyoshi Tanabayashi, Ryozauro Mukai, Akio Yamada, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Masaoki Yamaoka, Aya Terazawa, and Eiji Konishi: Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *Vaccine* 21, 2338-2345 (2003)

Chiyoko Nukuzuma, Naoko Ajiro, Carl J. Wheeler, and Eiji Konishi: Enhancing

- Effect of Vaxfectin on the Ability of a Japanese Encephalitis DNA Vaccine to Induce Neutralizing Antibody in Mice. *Viral Immunology* 16, 183-189 (2003)
- Eiji Konishi, Naoko Ajiro, Chiyoko Nukuzuma, Peter W. Mason, and Ichiro Kurane: Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21, 3675-3683 (2003)
- Eiji Konishi, Aya Terazawa and Atsuko Fujii: Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. *Vaccine* 21, 3713-3720 (2003)
- Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo: Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous vaccination. *Vaccine* 22, 1097-1103 (2004)
- 高崎智彦、倉根一郎. 世界におけるデング熱・デング出血熱. 病原微生物検出情報 25(2)33-34 (2004)
- 伊藤美佳子、高崎智彦. 新興輸血感染症「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」. 血液フロンティア 13(5) 613-617, 2003.
- 高崎智彦、伊藤美佳子. ウイルス性脳炎～ウエストナイル脳炎～. 化学療法の領域 19(5) 797-801, 2003.
- 高崎智彦. 感染症診療・投薬ガイド 第II部 疾患各論 ウエストナイル熱. 総合臨床 52, 351-355, 2003
- 高崎智彦. ウエストナイル熱 (West Nile Fever) . *Current Concepts In Infectious Diseases* 22(3) 18-19, 2003
- 高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症. 畜産技術. 581(10) 28-31, 2003
- 高崎智彦. ウエストナイル熱. 臨床医. 29(10) 1779-1782. 2003
- 高崎智彦. フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割. 鶏病研究会報. 39(増刊号) 1-6. 2003
- 高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症の動向. *Medicament News* 1759 号. 4-6 (2003)
- 森田公一: 「ウエストナイル熱の脅威」、公衆衛生情報, Vol. 34:21-23, 2004
- 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
- 森田公一: 一週一話『西ナイル熱への対策』、日本医事新報、p101, No. 4122:2003
- 森田公一: ウエストナイルウイルス脳炎、

日本脳炎、臨床と微生物. 30:351-355, 2003

森田公一：「西ナイルウイルスなど、蚊由来のウイルス感染症」、健康な子ども Vol 369:42-43, 2003

森田公一：日本脳炎ワクチンの接種計画、日本医事新報、p145-146, No. 4135:2003

森田公一：注目すべき世界の感染症－西ナイルウイルス、成人病と生活習慣病、p1121-1124. Vol. 33:2003.

森田公一、Parida M. Mathenge EGM：RNAウイルスの病原遺伝子探索：フラビウイルスを中心に。細胞工学 22:1178-1181:2003

高崎智彦、根路銘令子、倉根一郎。2002年日本におけるブタから分離された日本脳炎ウイルスの解析。病原体検出情報 24(7) 153. 2003

桑山勝、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦、山田壁一郎、根路銘令子、伊藤美佳子、笠松淳也、中村就一、宮脇弘幸、香川治子、青山範子、越智一秀、原田和歌子、時信弘。2002年に発生した日本脳炎3事例についての詳報－広島県。病原体検出情報 24(7) 152-153. 2003

森川 茂 (2003)：ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、第 49 巻第 4 号、103-109

林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲 (2003)：

One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討。感染症学雑誌。 77(10):822-829

2. 学会発表

Morita K. Pandey B., Kinney RM., Kumatori A., Hasebe F., Parquet MC. Inoue S., and Igarashi A: Single Arg-to-Ile mutation in the PrM Protein of dengue 2 virus associated with inversed infectivity and enhanced cytokine production in human dendritic cells. 37th US-Japan Cooperative Medical Science Program. Houston, USA July 18-20, 2003

S. Inoue, MT Alonzo, DJM Cruz, F Tadena¹, RR Matias, K. Morita and FF Natividad. Serological Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in the Philippines. 15th Annual Convention of The Philippine Academic Society for Microbiology and Parasitology, Manila, Philippines. December 6, 2003.

Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F. and Morita K. Real-time reverse transcription Loop Mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia December 7-10, 2003.

MT Alonzo, S. Inoue, DJM Cruz, F Tadena, RR Matias, K. Morita and Natividad FF Serological Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in the Philippines. 6th Asia Pacific Congress of

Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia
December 7-10, 2003.

Inoue S., Alonzo MT, Cruz DJM, Tadena F,
Matias RR, Morita K. and Natividad FF.
Serological Surveillance of Japanese
encephalitis virus infection in the
Philippines. 8th International
Conference on Tropical Pathology, Quezon
City, Philippines, December 12, 2003.

Morita K., Recent development of dengue
research in WHO Collaborating Centre in
Nagasaki University. WHO meeting for
DengueNet Implementation in the
Asia-Pacific Regions. Kuala Lumpur,
Malaysia December, 11-13, 2003.

Mizutani, T, Kobayashi, M, Eshita, Y,
Shirato, K, Kimura, T, Ako, Y, Miyoshi,
H, Takasaki, T, Kurane, I, Kariwa, H,
Umemura, T, and Takashima, I. (2003) :
Involvement of the JNK-like protein of
the *Aedes albopictus* mosquito cell line,
C6/36, in infection of West Nile virus.
The 37th Joint Diseases Panels Meeting,
Joint Conference on Viral Diseases,
Japan-United States Cooperative Medical
Science program. Houston, USA, July
18-20, 2003.

Raweean Srisawat, Narumon Komalamisra,
Somjai Leemingsawat, Naoki Tamori,
Saburo Anzai, Yupha Rongsriyam, and Yuki
Eshita (2003) : Susceptibility of
Japanese *Aedes (Stegomyia)* mosquito to
dengue virus. Food- and Water-borne

Parasitic Zoonoses and Joint
International Tropical Medicine Meeting
2003. Siam City Hotel, Bangkok,
Thailand, December 2-4, 2003.

Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi
Imoto: Combined immunization with DNA
and protein vaccines against Japanese
encephalitis or dengue synergistically
increases their own immunogenicity in
mice. The 37th Joint Viral Diseases Panel
Meeting US-Japan Cooperative Medical
Science Program. Houston (2003) .

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路
銘令子、田島 茂、野村秀和、Ernawati Dewi
Beti, 倉根一郎. Real time PCR による
Dengue virus の血清型分類. 第 51 回日
本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎.
PBL induce increase in the permeability
on dengue virus infected-endothelial
cells associated with down regulation of
VE-cadherin. 第 51 回日本ウイルス学会
(京都) 10/27-29/2003

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳
子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異
的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チ
オシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA.
第 51 回日本ウイルス学会 (京都)
10/27-29/2003

佐々木年則、澤邊京子、伊澤晴彦、江下優
樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小
林睦生. イムノクロマトグラフィーによる