

200400620A

厚生労働科学研究費補助金

平成16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17年3月

主任研究者 倉根一郎

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告	
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・・・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）	
研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	24
II. 分担研究報告	
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白検出 ELISA によるクリミア・コンゴ出血熱診 断・・	28
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
2004 年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断・・・・・・・・・・・・・・・・	38
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
デング血清診断における血清中 IgM 抗体検出と有用性の検討・・・・・・・・	45
分担研究者：名和 優（埼玉医科大学・微生物）	
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・・・	54
分担研究者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）	
日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染状況：8 県の住民を対象とした調査・・・	63
分担研究者：小西英二（神戸大学・医学部）	
我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス・・・・・・・・・・・・・・・・	69
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
一般向け WNV に関する啓発ビデオ（日本語版）の作製とホームページの充実・・・・・・・・	74
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要因解析およびヤブカ寄生原虫 <i>Ascogregarina spp.</i> に関する基礎的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	91
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）	
蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、およびイナトミシオカの本ウ イルス感受性・・	105
分担研究者：江下優樹（大分大学・医学部）	
サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析・・・・・・・・・・・・・・・・	114
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4価DNAワクチンのマウスにおける評価・・・・・・・・・・・・・・・・	120
分担研究者：小西英二（神戸大学・医学部）	
デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析・・・・・・・・	130
分担研究者：奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所）	
ウエストナイルウイルスDNAワクチンの作製と免疫原性に関する検討・・・・・・・・	136
分担研究者：只野昌之（琉球大学・医学部）	
ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法の確立・・・・・・・・	142
分担研究者：前田秋彦（北海道大学大学院・獣医学研究科）	
無血清培養VeroE6細胞でのウエストナイルウイルスの増殖に関する研究・・・・・・・・	147
分担研究者：前田秋彦（北海道大学大学院・獣医学研究科）	

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）クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出 ELISA 法を開発した。２）輸入デング感染症として、成田空港において 7 症例を確認した。また、国内医療機関からの依頼により 20 症例を確認した。３）デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出の有用性を確認した。４）新しいデング熱遺伝子診断法として、RT-LAMP 法を確立した。５）日本における近年の日本脳炎ウイルス年間自然感染率は 0.2%–3.4%と推定された。６）ブタ血清から日本脳炎ウイルス株を複数分離した。また、無菌性髄膜炎症例の髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。

（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）東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大を確認した。２）マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性を確認した。３）我が国のイナトミシオカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを確認した。

（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）サルにおけるデングウイルス感染後、感染増強抗体の出現を明らかにした。２）デング 4 価 DNA ワクチンがマウスにおいて高いレベルの型交差性中和抗体を誘導することを示した。３）デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析が可能となった。４）ウエストナイルウイルス DNA ワクチンを作製し、マウスにおける免疫原性を示した。５）全長ウエストナイルウイルスゲノムとレプリコン RNA の cDNA を作製した。６）無血清培養 Vero E6 細胞でのウエストナイルウイルスの増殖を可能にした。

（４）啓発用 CD-ROM、ビデオの作成：ウエストナイル熱に関する一般向け啓発ビデオ（日本語版）を医療関係者のみならず、各地の諸団体に広く配布しウエストナイル熱に関する理解を深めることに貢献した。

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）

奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所 副部
長）

前田秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科
助教授）

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）

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である。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、さらに致死性であるものも多い。近年、海外旅行者の増加に伴い、デング熱等にみ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、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。一方、そ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) 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。(3) 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。(4) 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。また、啓発用のCD-ROMやビデオを作成するとともに、広く国内への普及を図る。

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) クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出ELISA法の開発：これまで感染性Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF)

ウイルスを用いることなく CCHF の診断を下せるよう CCHF ウイルスの組換え核蛋白を抗原とした血清学的診断システムを開発してきた。本研究では、さらに組換え核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、それを捕捉抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (Ag-capture ELISA) を開発し、その CCHF の診断における有用性を急性期の CCHF 患者から得られた血清を用いて評価した。

2) 輸入デングウイルス感染症の検査・診断：本感染症に対する検査・診断を成田空港検疫所と国立感染症研究所で行った。い、厚生行政に資することを目的とした。リアルタイム RT-PCR、ウイルス分離、IgM-捕捉 ELISA および IgG-ELISA により IgM および IgG 抗体を測定した。

3) デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討：1 型—4 型のプロトタイプデングウイルス株は蚊由来 C6/36 cell へ感染し、4—5 日後の感染培養上清をベータプロピオラクトン不活化 4 価抗原として用いた。IgA-ELISA 法は既に論文発表された方法を応用した。

4) デング熱遺伝子診断のための LAMP 法の確立：①プライマーの設計には基本ソフトとし

て Netlaboratory を利用した。プライマーの配列は表 1 に一括して示した。プライマーは HPLC 精製した物を用いた。②RT-LAMP 法：RT-LAMP 増幅はプライマーを用いて栄研化学社の 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。

5) 日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染状況：①血清：疫学調査に用いたのは、2001 年に南日本（福岡、宮崎）、中日本（長野、山梨、愛知）及び北日本（秋田、山形、福島）の住民から採取された 1,765 検体であり、国立感染症研究所血清バンクより分与された。②NS1 抗体測定法：抗原は、NS1 発現 CHO 細胞と非発現 CHO 細胞を混合して 6 穴マイクロプレートにコロニーを形成するまで培養し、エタノール固定して作製した。顕微鏡下で NS1 発現細胞と非発現細胞の染色強度の差が確認できる血清の最大希釈度を血清の NS1 抗体価とした。

③統計解析：NS1 抗体陽性率の有意検定にはカイ二乗検定を用いた。また、平均抗体価の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。いずれも 5%以上の有意水準で差が認められたときに有意差とみなした。

6) 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス：①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、一部乳のみマウス脳内接種法による分離法を行なった。E 領域に設定した 5 つのプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、E 領域の遺伝子解析を実施した。②原因不明無菌性髄膜炎症例からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出：臨床的に無菌性髄膜炎と診断された患者 (0~15 歳) のうち、ウイルス分離などで病原体が明らかにされなかった 57 検体の脊髄液を用いた。この脊髄液から RNA を抽出し RT-nested-PCR 法を行なった。cDNA の増幅 (E 遺伝子領域) が確認された検体

は、塩基配列の決定を行った。

7) 一般向け WNV に関する啓発ビデオ (日本語版) の作製とホームページの充実: CDC のビデオ CD には、英文脚本があるため、それを研究協力者により和訳し、映像部分の流れに沿って日本語脚本を作成した。このビデオは、成田空港・関西新空港などで放映され、旅行者への啓発・情報提供を実施した。また、厚生労働省健康局結核感染症課を通じて各都道府県・政令市・特別区の衛生主管部に CD を配布し、公衆衛生部局担当者、医療従事者、動物等取扱業者、一般の方等へのウエストナイル熱の普及啓発への活用を促した。また、日本医師会感染症危機管理対策室長にも送付し、活用をお願いした。

(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 Dengue 熱媒介蚊の分布域拡大に関する要因解析およびヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的研究: ①東北地方でのヤブカの分布調査: 各都市の神社、寺院、公園、古タイヤ集積場等にある墓石、手水鉢、花立て、プラスチック容器、古タイヤ等からピペットで幼虫を採取し、国立感染症研究所に持ち帰り、成虫まで飼育してから種の同定を行った。

年平均気温を地理情報的に解析するために東北地方 1km メッシュ気温データ表示・検索システム (東北農業研究センター地域研究基盤研究部) を用い、2000—2004 年の年平均気温のメッシュ気候図を作成し、蚊の分布域との関係を検討した。

②ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* に関する基礎的研究: ネットイシマカ由来の *Ascogregarina culicis*、ヒトスジシマカ由

来の *As. taiwanensis* 原虫オーシストを幼虫に大量に感染させ、蛹を飼育した水からオーシストを回収した。今年、ヤマトヤブカの rDNA の配列を検討し、また、新たにオオクロヤブカおよびトウゴウヤブカから検出された *Ascogregarina* 原虫の系統を保存するために感染実験を繰り返し、オオシストの増殖を試みた。

2) 蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、およびイナトミシオカの本ウイルス感受性: ①マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性: マウスの有用性を調べるために、ウエストナイルウイルス、ナイジェリア株に感染したアカイエカにマウス吸血の機会を与えて、マウス臓器内のウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で検討した。②イナトミシオカに対するウエストナイルウイルスの感受性試験: 感染実験に用いたイナトミシオカは、大阪港湾区域で採集後、実験室内で 2 世代飼育した個体群を用いた。経口および胸部接種感染後、3 組のウエストナイルウイルスプライマーセットの比較および、感染蚊の腹、胸、脚、頭部組織から精製した総 RNA 中のウイルスゲノムの有無を検討した。

(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) サルにおける Dengue ウイルス感染増強抗体の解析: カニクイザル各 2 頭に Dengue ウイルス 1 型 (Dengue 熱分離株) および 2 型 (Dengue 出血熱分離株) を、さらに 1 頭は非感染細胞上清を接種した。感染後、血清を経時的に採取し、ウイルス血症の推移、臨床症状、血小板減少の有無を調べた。さ

らに血清型特異的中和価、IgM 抗体価、感染増強抗体の推移を検討した。

2) デング 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける評価: 1 型から 4 型に対する DNA ワクチンの混合液 (各 25 μg 、計 100 μg /匹) を 4 週齢の BALB/c マウスに 3 週間隔で 2 回免疫した。対照として各型に対する単価 DNA ワクチン投与群及び pcDNA3 投与群を設けた。接種は、大腿部に針無注射器 (シマジエット、島津製作所) を用いて行った。採血は、眼窩静脈叢から行い、ELISA 抗体値を個々の血清で、中和抗体価をプール血清で測定した。2 次免疫応答を調べるための感染性ウイルスの接種は、 10^7 FFU を腹腔内に行った。

3) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析: デングウイルス免疫マウスをモデルとして、RT-PCR 法にて抗体の抗原認識部位を含む重鎖可変領域を増幅させ、PCR 産物を TA クローニング後、塩基配列を決定しアミノ酸を推定した。

4) ウエストナイルウイルス DNA ワクチンの作製と免疫原性に関する検討: DNA ワクチン候補の構築: ウエストナイルウイルス (NY 株) 遺伝子 RNA を鋳型として調製した prM-E 蛋白質領域 cDNA を哺乳動物発現ベクター pCMV の CMV プロモーター下流に挿入し、西ナイルウイルス DNA ワクチン候補 pCMV (WN/prM-E) とした。種々の量の pCMV (WN/prM-E) をマウスの皮下に 2 週間毎に接種し、血中特異抗体を測定した。

5) ウエストナイルウイルスのリバースジェネティクス法の確立: ウエストナイルウイルス (WNV) のリバースジェネティクスを確立するために、WNV のゲノム RNA より、ウイルスの複製に関与しない構造蛋白

質の遺伝子を取り除いた残りの部分の cDNA を合成し、これを WNV のレプリコンとして利用することを試みた。レプリコン RNA の合成は、プラスミドに組み込んだレプリコン cDNA から合成する方法と、PCR 増幅したレプリコン cDNA を直接使用して合成する方法について検討した。

6) 無血清培養 Vero E6 細胞でのウエストナイルウイルスの増殖に関する研究: E6 細胞を SFM (VP-SFM AGT, 12559, GIBCO) で 3 ヶ月以上培養し、SFM に馴化させた (E6/SFM)。E6/SFM 細胞に WNV の Eg101 株を感染させ、感染に伴う細胞変性効果 (CPE) を異相差顕微鏡下で観察した。また、ウイルス蛋白質の合成をウエスタンブロット法で検討した。培養上清中のウイルス力価の経時的な変化は、プラークアッセイ法で測定した。

(倫理面への配慮) 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。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。また、蚊の飼育および媒介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。

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) クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出 ELISA 法の開発: CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体 1B7 を用いた Ag-capture ELISA を作製した。中国西部の CCHF 患者 20 名 (2001 年 8 人, 2002 年 12

人) から血清が採取され研究に供された。血清 20 検体中 9 検体からウイルスゲノムが RT-PCR による増幅された。そのうち 3 検体が Ag-capture ELISA で陽性を示した。Ag-capture ELISA で陽性を呈したのは、すべて IgG 抗体、IgM 抗体ともに陰性の検体であった。

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、デング感染症検査を実施した総数は 128 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、7 症例が陽性 (男性: 5、女性: 2) であった。②国内医療機関からの依頼検査成績：国内医療機関からのデングウイルス感染に関する検査依頼件数は、2004 年は 54 件であった。このうち、デングウイルス感染が確認された症例は 20 例であった。本年特記すべき事例は、ミクロネシアヤップ島における日本人渡航者の集団感染事例 (7 例) であった。

3) デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討：①患者血清中の IgA 抗体産生は IgM 抗体と同時期に検出レベルに達するが、血中における持続期間は IgM 抗体より短期間で、おおよそ 2 週間程度で検出限界以下に低下するものと考えられた。デング患者血清中より IgA 抗体が検出された場合、発熱後 3 週間程度の期間内に感染を受けた可能性が高い。②日本脳炎ウイルスとの交差反応を検討した。日本脳炎患者血清中の IgA 抗体は日本脳炎ウイルス特異的であったが、日本人デング患者血清中の IgA 抗体は日本脳炎ウイルスおよびデングウイルスに交差反応性を示した。日本人デ

ング患者血清中 IgA 抗体の応答は、日本脳炎ウイルスに対する二次免疫応答と考えられた。

4) デング熱遺伝子診断のための LAMP 法の確立：①RT-LAMP 法を用いた新しいデングウ

イルス遺伝子検出系が確立された。②RT-LAMP 法による検出時間は 40 分以内であり、検出時間の短縮が図られた。③今回設計した LAMP プライマーでは日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、西ナイルウイルスなどのデングウイルスと近縁なフラビウイルスとの交叉は認められず極めて特異性の高い結果となった。④本遺伝子増幅方法はデングウイルス血清型特異的な検出系であることが確認できた。本遺伝子増幅方法は蛍光観察による反応産物の確認が可能であった。

5) 日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染状況：

①県別の陽性率の比較：全体の陽性率は 4.4%であった。県別にみると 0.5-6.7%であり、南ほど高い傾向を示した。山形の陽性率 (0.5%) は福岡、愛知、長野、福島 ($P < 0.01$) 及び宮崎 ($P < 0.05$) と比較して有意に低かった。②性別及び年齢別の陽性率の比較：男の NS1 抗体陽性率は 4.3%、女は 4.5%であり、有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。しかし年齢別に解析すると、陽性率は 10、30 及び 50 歳代のグループが、0、20 及び 40 歳代のグループよりも高い傾向にあった。③年間自然感染率の推定：NS1 抗体陽性率と推定 NS1 抗体持続期間 (2 年) から、年間自然感染率を求めた。各県において 0.2%-3.4%であった。

6) 我が国における日本脳炎ウイルスサー

ベイランス：①ブタ血清からの日本脳炎ウイルス分離：3県（三重県、香川県、島根県）のブタ血清から日本脳炎ウイルス複数株が分離された。②無菌性髄膜炎症例の髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子：4検体から目的とする cDNA を検出した。このうち、2つ（No. 1, 2）はおのおの 326bp と 247bp の塩基配列が決定され、JE ウイルス中山株（遺伝子Ⅲ型）と高い相同性を示した。No. 3 と 4 はおのおの 121bp と 187bp の塩基配列が決定され、JE ウイルス石川株（遺伝子Ⅰ型）に高い相同性を示した。

7）一般向け WNV に関する啓発ビデオ（日本語版）の作製とホームページの充実：出発前の米国への旅行者に、ウエストナイルウイルスに関する情報を提供することが出来た。各地の諸団体や医療関係団体が、この CD-R を有効に活用した。また、我々のウエストナイル熱ホームページを紹介したり、リンクさせた団体もありウエストナイル熱に関する国民の理解に大きく貢献した。

（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要因解析およびヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的研究：①東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大：湯沢、横手、盛岡、花巻、北上、釜石等で調査を行い、新庄では 13/14 コロニー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 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 年に盛岡で初めてヒトスジシマカが確認された寺院の墓地で、2004 年 9 月に調査をお

こなった。ヒトスジシマカは確認されず、多くがヤマトヤブカであった。秋田県および青森県の日本海側には、現在、ヒトスジシマカは分布していないことが明らかとなった。2000 年から 2004 年までの年平均気温のメッシュ気候図を作成したところ、各年によって、ヒトスジシマカの分布と関連がある 11℃以上を示す地域の広がりが大きく変化していた。2004 年は 11℃以上の地域が青森県の平野部まで大きく広がり、東北地方全体に分布可能な地域が広がっていた。現在分布が確認されている地域は、ヒトスジシマカの世代数から考えると、3.5—4 世代となることが示された。②ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. 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。これらのオーシストからの DNA 回収法を確立、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い、*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）を明確に区別し得る塩基配列を見出した。

2）蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、およびイナトミシオカの本ウイルス感受性：①マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性：マウスの脳、肝臓、脾臓中の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ウエストナイルウイルスゲノムが明瞭なバンドとして

検出された。マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性が示唆された。一方、蚊の胸部にウイルスが感染していたことから唾液腺の感染が強く示唆された。②ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカ感受性：(i)胸部接種法で感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム：28℃温度で10日間飼育したイナトミシオカでは、いずれの3個体から特異的 PCR 産物が認められた。胸部接種感染蚊3個体の各組織でのウイルスゲノム検出率は、腹部では3個体/3個体、胸部は3/3、脚部は2/3、また頭部は1/3であった。(ii)経口感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム：28℃で10日間飼育した経口感染イナトミシオカでは、いずれの4個体から特異的 PCR 産物が認められた。ニューヨーク株の経口満腹吸液した感染蚊1個体では、腹、胸、脚、頭部いずれからもウイルスゲノムが RT-PCR で検出された。

(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) サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析：ウイルス血症は感染後3日目まで認められた。IgM 抗体は感染後2週間目をピークに減少し続け、12週目まで持続した。中和試験による交叉中和抗体価は感染後46週目まで、増加したが、その後減少した。また、型特異的中和抗体価は感染後46週目まで上昇したが、その後減少した。未希釈血清を使用した場合、交叉性抗体による感染増強は感染後2、46、50、54、58週目の血清を用いた場合確認されたが、型特異抗体ではいずれの場合も確認されなかった。

2) デング4価DNAワクチンのマウスにおける評価：100 µgのDNA（各血清型について25 µg）を1回投与したBALB/cマウスは、3週目に70%プラーク減少法で低いレベル（1:10）あるいは検知レベル未満（<1:10）の抗体価しか示さなかったが、2回目の免疫から3週目（初回免疫から6週目）には1:20-1:80の中和抗体価を示し、26週目まで抗体価を保持した。また、単価DNAワクチンと比較することにより、4価DNAワクチンによる抗体誘導は、各血清型間で干渉を起こさないことが明らかにされた。さらに、4価ワクチン免疫マウスに感染性ウイルスを接種することにより中和抗体の2次応答が認められた。この中和抗体は、単価ワクチン免疫マウスの2次応答で誘導された中和抗体より、高いレベルの型交差性を示した。

3) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析：複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体のH鎖可変領域を増幅させることに成功した。さらに、PCR産物をTAクローニングすることにより、H鎖可変領域のfull-lengthのアミノ酸配列の解析が可能になった。

4) 西ナイルウイルス DNA ワクチンの作製と免疫原性に関する検討：種々の濃度で pCMV(WN/prM-E) を 2 週毎に 7-8 週齢の Balb/c マウスに皮下接種し、液性免疫応答を調べたところ、接種した DNA の量に応じた抗体力価で免疫応答が確認された。1 回あたり 50 マイクログラムの DNA を接種されたマウス群では、1 度の接種で特異抗体がすべてのマウスに誘導され、免疫を重ねる毎に抗体価が上昇した。また、同様の傾向が、10 マイクログラムの DNA を接種したマ

ウス群でも認められたが、50 マイクログラムを接種した群よりは免疫応答が低かった。さらに、接種量を減らすと免疫応答が弱くなった

5) ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法の確立：ゲノム RNA の全長をカバーする4つの cDNA 断片を組み込んだプラスミドが得られた。この WNV ゲノム RNA の4つの cDNA 断片を鋳型として、WNV のゲノム RNA の全長をカバーする様に PCR をデザインしたところ、全長の WNV ゲノムとレプリコン RNA の cDNA を得る事が出来た。

6) 無血清培養 Vero E6 細胞でのウエストナイルウイルスの増殖に関する研究：無血清培地に馴化させた Vero E6 細胞 (E6/SFM) を用いて、ウエストナイルウイルス (WNV) の増殖を検討した。10%牛胎仔血清 (FCS) を含む培地 (E6) を用いて WNV を産生した場合、WNV の産生は3日目にピーク (2×10^9 p. f. u. /mL) に達した。一方、E6/SFM 細胞に WNV を感染させると、2日目にピーク (2×10^{10} p. f. u. /mL) に達した。また、E6 細胞の WNV 感染で認められた細胞変性効果は、E6/SFM 細胞への感染では認められなかった。しかし、感染後の急激な pH の減少に伴って、E6/SFM の生細胞数は急激に減少した。

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) クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出 ELISA 法を開発した。2) 輸入デング感染症として、成田空港において7症例を確認した。また、国内医療機関からの依頼により20症例を確認した。3) デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出の有用性を確認した。4) デング熱新遺伝子診断法として、RT-LAMP 法を確立した。5) 日本における近年の日本脳炎ウイルス年間自然感染率は0.2%–3.4%と推定された。6) ブタ血清から日本脳炎ウイルス株を分離した。また、無菌性髄膜炎症例の髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。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) 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大を確認した。2) マウスを用いた蚊のウエストナイルウイルス媒介試験の有用性を確認した。3) 我が国のイナトミシオカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを確認した。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) サルにおけるデングウイルス感染後、感染増強抗体の出

現を明らかにした。2) デング4価DNAワクチンがマウスにおいて高いレベルの型交差性中和抗体を誘導することを示した。3) デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析が可能となった。4) ウエストナイルウイルスDNAワクチンを作製し、マウスにおける免疫原性を示した。5) 全長ウエストナイルウイルスゲノムとレプリコンRNAのcDNAを作製した。6) 無血清培養Vero E6細胞でのウエストナイルウイルスの増殖を可能にした。さらに、ウエストナイル熱に関する一般向け啓発ビデオ（日本語版）を医療関係者のみならず、各地の諸団体に広く配布しウエストナイル熱に関する理解を深めることに貢献した。

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、輸入例を早期に診断することにより治療等に結びつけることができる。2) 1類感染症であるクリミア・コンゴ出血熱に対する一層迅速な検査法を確立したことにより、患者からの2次感染を未然に防ぐことを可能にする。3) 日本脳炎ワクチンの必要性について判断基盤を与える。4) 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と水際対策を可能にする。5) デング熱、ウエストナイル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。さらに本技術を現在ワクチ

ンのない他の節足動物媒介性ウイルスに応用することを可能にする。6) ウエストナイル熱に関して国民及び医療関係者の理解を一層増進することができる。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

クリミア・コンゴ出血熱の核蛋白検出ELISA法を開発し有用性を示した。海外旅行からの帰国者についてウエストナイルウイルス、デングウイルス感染の検査を行った。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、デング熱の検査法としてRT-LAMP法とIgA検査法を開発した。日本脳炎に関しては、日本脳炎ウイルス年間自然感染率を推定し日本脳炎ウイルスの活動を裏付けた。さらに、数例の無菌性髄膜炎症例の髄液中にも日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。媒介節足動物の状況の把握においては、東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大を確認した。さらに、日本のイナトミシオカがウエストナイルウイルスに感受性を有することを確認した。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、サルにおけるデングウイルス感染後、40週を過ぎて感染増強抗体が出現することを示した。また、デングDNAワクチン、ウエストナイルウイルスDNAワクチンの免疫原性をマウスにおいて明らかにした。ウエストナイルウイルスゲノムとレプリコンRNAのcDNAを作製し、無血清培養Vero E6細胞でのウエストナイルウイルスの増殖を可能にした。さらに、ウエストナイル熱に

関する一般向け啓発用 CD-ROM、ビデオ（日本語版）を医療関係者のみならず、各地の諸団体に広く配布しウエストナイル熱に関する理解を深めた。

F. 健康危機管理情報

- 1) 輸入感染症としてのデング熱は今年度も多数見られた。海外旅行者にデングウイルス感染への注意喚起を行なうべきである。
- 2) 日本脳炎ウイルスの自然感染は現在でも起こっている。また、ブタからの日本脳炎ウイルス分離も可能であることから、我が国では、日本脳炎ウイルス感染の可能性があることを注意すべきである。
- 3) 夏季に発生する無菌性髄膜炎のなかに、日本脳炎ウイルスが原因であると考えられる症例が存在する。
- 4) ウエストナイルウイルスに感受性を有する蚊が日本に存在する。また、デングウイルス、ウエストナイルウイルス媒介蚊となるヒトスジシマカの分布域は拡大している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57. 2004

Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Recombinant

nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75:295-299, 2005

Ernawati Dewi Beti, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J. Virological Methods*. 121: 171-180. 2004

Chanama, C., Anantapreecha, S., A-nuegoonpipat, A., Sa-gnasang, A., Kurane, I., and Sawanpanyalert, P.: Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections : levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of Clinical Virology*. 31:185-189, 2004.

Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Reiko Nerome, Shigeru Tajima and Ichiro Kurane. Development and Evaluation of Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan RT-PCR) Assays for Dengue Virus Types 1-4. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5935-5937, 2004

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Mikako Ito, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Detection of Dengue Virus Serotype-specific IgM by IgM capture ELISA in the presence of sodium

- thiocyanate (NaSCN). *Dengue Bulletin WHO* 28: In press 2004.
- Kunishige M, Mitsui T, Leong HN, Takasaki T, Kurane I, Mihara A, Matsumoto T. Preferential gray matter involvement in dengue myelitis. *Neurology* 63(10):1980-1981. 2004
- Edward Gitau, Matumbi Mathenge, Maria del Carmen Parquet, Yasutomo Funakoshi, Seiji Houhara, Pooi Fong Wong, Akitoyo Ichinose, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita. Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice. *Journal of General Virology*. Vol.85: 2503-2513, 2004.
- Nga PT., Parquet MC, Cuong VD, Ma S-P., Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS and Morita K. Shift in JEV genotype circulating in northern Vietnam: Implication for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *Journal of General Virology*. Vol.85: 1625-1631, 2004
- Eiji Konishi, Mizue Shoda, Naoko Ajiro and Takashi Kondo: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5087-5093, 2004
- Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model. *Viral Immunol*, 18, 206-213, 2005
- Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11:471-473, 2005
- Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikiyo Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332:38-44, 2005
- Saito, Y., Hattori, J., Chinone, S., Nihei, N., Tsuda, Y., Kurahashi, H. and Kobayashi, M.: Yeast-generated CO₂ as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling. *J. Am. Mos. Control Assoc.*, 20:261-264, 2004.
- Ushijima, H., and Eshita, Y.: Molecular

- epidemiology of viral infection in Asia. *Pediatrics International*. 46(2):202-206, 2004
- Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., and Eshita, Y.: Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic. *Virus Genes*, 29(2): 219-227, 2004
- Makino, Y., Shichijo, A., Bello, C., Eshita, Y., Disla, M., Cesin, A.J., Galcia, B., Lora, M., Valdez, S., Aquino, J.D., Aono, H., Ma, S-P., and Takeshita, M.: Seroepidemiology of dengue and assessment of public awareness in the Dominican Republic. *Trop. Med. Health*. 32: 305-309, 2004
- 森川 茂: ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20, 2004
- 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎: クリミア・コンゴ出血熱. *ウイルス* 54:223-228, 2004
- 田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美、村田以和夫、諸角 聖、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎. デングウイルス初感染例における中和抗体測定による血清型判定が可能な病日期間の検討. *臨床とウイルス*. 32(1). 30-35, 2004
- 森田公一: 日本脳炎、その他の脳炎ウイルス、今日の治療指針 2004, p143-144, 2004
- 森田公一: 西ナイル熱のワクチン、*Medical Technology* Vol. 32:347-348, 2004
- 森田公一: 新興・再興感染症に対するワクチン「西ナイル熱」 *総合臨床* 53:1963-1967, 2004
- 森田 公一: デング熱・デング出血熱. 今日の治療と看護(改定第2版). 967-968, 2004.
- 森田 公一: ウイルス性出血熱. 今日の治療と看護(改定第2版). 968-970, 2004.
- 森田 公一: 「西ナイルウイルス感染症」臨床とウイルス, Vol. 32:7-12, 2004
- 森田公一: 「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」、in ナースのための感染症対策マニュアル(監修:増田剛太)、p72-73, 2004
- 森田公一: 「セントルイス脳炎」 in 人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 編)、p84-85, 2004.
- 森田公一: 「ウエストナイル熱」 in 人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 編)、p86-88, 2004.
- 森田公一: 「デング熱・デング出血熱」 in 人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 編)、p89-91, 2004.
- 森田公一: 「カリフォルニア脳炎」 in 人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 編)、p92-93, 2004.
- 森田公一: 「ウエストナイル熱・脳炎」 - 最

- 近の動向一」、LBEAM, Vol. 16:1-4, 2004.
- 森田 公一：「日本脳炎」. 感染症、朝倉書店 (竹田 美文 木村 哲 編集) 149-152, 2004.
- 森田公一：「人と動物の共通感染症、ブタと人 (日本脳炎・ニパウイルス)」、Pharma Medica、Vol. 22:39-42, 2004.
- 森田公一：「ウエストナイル熱・脳炎」、日本内科学会誌、Vol. 93:2328-2333. 2004.
- 森田公一：感染症の診断・治療ガイドライン 2004, 日本脳炎. 日本医師会雑誌. 132:148-151, 2004.
- 森田公一：「ウエストナイル熱」、東京小児科医会報、Vol. 23:19-23, 2004.
- 森田公一：「デング熱、デング出血熱」、今日の治療指針 2005, p143, 2005.
- 森田公一：「国際感染症、日本脳炎」、臨床看護、Vol. 31, 169-172, 2005
- 森田公一：「西ナイル熱・脳炎ー最近の動向」、長崎市医師会報、Vol. 39, 14-16, 2005
- 小西英二：日本脳炎ウイルス自然感染率：ワクチン不要論は正しいか？「臨床とウイルス」 32, 372-379, 2005
- 高崎智彦：急性脳炎 (ウエストナイル脳炎及び日本脳炎を除く)。感染症の診断・治療ガイドライン 2004 (日本医師会感染症危機管理対策室、厚生労働省健康局結核感染症課 監修) 190-191, 2004
- 高崎智彦：日本脳炎. 感染症の事典 (国立感染症研究所学友会編集) 朝倉書店 186-187, 2004
- 高崎智彦.：日本脳炎、その他のウイルス性脳炎. 家庭医学大全科 p2631-32 (2004)
- 新井 智、多屋馨子、岡部信彦、高崎智彦、倉根一郎：わが国における日本脳炎の疫学と今後の対策について. 臨床とウイルス. 32：13-22, 2004
- 高崎智彦、倉根一郎：ウエストナイル熱. 日本医事新報 4200:24-27, 2004
- 伊藤美佳子、高崎智彦：[西ナイルウイルス] クリニカルエンジニアリング 15:951, 2004
- 小林睦生、二瓶直子、栗原 毅：わが国のデング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布拡大について. 病原微生物検出情報, 25(2)：10-11, 2004.
- 小林睦生：海外旅行と感染症ー虫よけ. 治療学, 38(3)：42-44, 2004.
- 小林睦生：ウエストナイルウイルスの伝播と媒介蚊の役割. 獣疫学雑誌, 8(1)：5-7, 2004.
- 倉根一郎、小林睦生：ウエストナイル熱. INTERRET, 3(8)：6-7, 2004

江下優樹、高崎智彦、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎: ウエストナイルウイルスとその媒介蚊. 九州実験動物雑誌 20 : 31-39, 2004

江下優樹、牛島廣治: 日本脳炎以外のアルボウイルス感染防止-とくにウエストナイル熱およびデング熱-. 特大号 ワクチンのすべて. 小児科診療 67:154-160, 2004

2. 学会発表

1) 国際学会

Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka

Tomohiko Takasaki. Newly developed method for dengue diagnosis. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

Mika Shigematsu, Tomohiko Takasaki, Kazuyo Yamashita, Mikio Kimura, Nobuhiko Okabe. Imported dengue fever cases in Japan. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

K. Kishiro, Y Kurosawa, A Yamamoto, M Nakayama, T Ogawa, S Inoue, T Takasaki, R R Matias, F Filipinas Natividad, K Morita, I Kurane. Detection of anti-dengue virus IgM by a particle

agglutination assay system using hydroxyapatite-coated nylon beads. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Shunro Imura, Yukinori Uchida, Ikuo Takashima, Ichiro Kurane. Diagnostics dengue and West Nile viruses in mosquitoes. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

Morita K. : Pathogenesis of dengue virus infection. 37th Annual Academic Session, Ceylon College of Physicians. (Colombo, Sri Lanka. September 23-25, 2004)

Morita K. : Chip and other new technologies for dengue virus infection. WHO/TDR PDVI Workshop on Dengue diagnosis and dengue classification/case management. (Geneva, Switzerland, October 4-6, 2004)

Morita K. : Arboviral encephalitis in Asia; The old and the new. International Symposium on Emerging Viral Infections. (Pune, India, October 11-13, 2004)

Parida M., Minekawa H., Notomi T., Inoue S., Hasebe F., and Morita K. : Real-Time Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay as a rapid diagnostic tool for Emerging Viruses. 53rd Annual Meeting of

American Society of Tropical Medicine and Hygiene. (Miami, Florida, USA, November 7-11, 2004)

Morita K: Pathogenesis of dengue virus infection. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infections Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Mathenge G. M. M., Parquet M. C., Funakoshi Y., Houhara S., Wong P. F., Ichinose A., Hasebe F., Inoue S., Morita K.: Construction of dengue 4 virus and Japanese encephalitis virus chimera and biological characterization. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infections Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Parquet M. C.: Ecology of Japanese encephalitis virus in East Asia. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infections Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Nga P. T., Thuy N. T., Suu P. T., Parida M., Morita K.: Isolation of new arboviruses from cerebrospinal fluids of acute encephalitis syndrome patients in the North Vietnam. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infectious Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases

in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Parquet M. D. C., Nga P. T., Cuong V. D., Ma S. P., Hasebe F., Inoue S., Makino Y., Takagi M., Nam V. S., Morita K.: Ecology of Japanese encephalitis virus in East Asia. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infectious Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Huong V. T. Q., Parquet M. D. C., Mai L. T. Q., Ha D. Q., Hasebe F., Inoue S., Morita K.: Molecular epidemiology of dengue-4 viruses in Vietnam; Implication of local evolution. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infectious Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Hirayama K., Kikuchi M., Huong V. T. Q., Ngu V. T. T., Tham V. D., Dat T. V., Ha D. Q., Morita K.: TNF- α promoter polymorphism and DHF in Vietnam. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infectious Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Oishi K., Saito M., Inoue S., Dimaano E. M., Alera M. T. P., Robles M. P., Estrella, Jr. B. D., Kumatori A., Moji K., Alonzo B. M., Buerano C. C., Matias R. R.,

Morita K., Natividad F. F., Nagatake T. : Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. Nagasaki Symposium on Tropical Emerging Infectious Diseases and JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam. (Nagasaki, Japan, November 25-27 2004)

Parquet M. D. C., Huong V. T. Q., Mai L. T. Q., Hasebe F., Inoue S., Morita K. : Molecular Epidemiology of Dengue 4 Virus in Vietnam; Identification of New Genotypes and Evidence of Local Independent Evolution. Fortieth U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto, Japan, December 7-10, 2004)

Tafuku S., Tadano M., Arakawa T., Komesu A., Arakaki S., Sugawa H., Takashima I., Morita K., Mori N. : Protective Effects of DNA Vaccine Encoding West Nile Virus prM-E Glycoproteins in Mice. Fortieth U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto, Japan, December 7-10, 2004)

Ma S. P., Morita K., Makino Y., Tadano M., Yoshida Y., Ogawa M., Kanemura K. : Shift of Dominant Genetic Clusters of Japanese Encephalitis Virus in Japan During 1935-2002. Fortieth U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. (Kyoto, Japan, December 7-10, 2004)

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Tomohiro Suzuki, Takashi Kondo, Satoru Arai, Keiko Taya, Nobuhiko Okabe: Recent Japanese Encephalitis Virus Activity in Japan: Can We Stop Vaccination? Fortieth Anniversary Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto (2004).

Tajima Shigeru, Tomohiko Takasaki, Yuki Eshita, Ichiro Kurane. Characterization of Yokose virus, a Flavivirus, which was isolated from the Bat in Japan. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

Eshita, Y., Takasaki, T., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I., Kurane, I. (2004) : Diagnostics on dengue and West Nile viruses in mosquitoes. *In*: Vector-borne infectious diseases and control. Joint symposium on parasitic panel and viral disease panel, Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004. Kyoto

Tafuku, S., Tadano 他 Protective effects of DNA vaccine encoding West Nile virus prM-E glycoproteins in mice. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto, Japan, December 7-10, 2004.