

200500678A

厚生労働科学研究費補助金

平成17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18年3月

主任研究者 高崎 智彦

(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
高崎智彦		
II. 分担研究報告		
1. TaqMan PCR法によるクリミア・コンゴ出血熱高感度診断法	-----	18
西條政幸		
2. チクングニヤ熱の血清診断法に関する研究	-----	23
森田公一		
3. デング血清診断における血清中IgA抗体検出と有用性に関する研究	-----	29
名和 優		
4. 2005年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断に関する研究	-----	38
高崎智彦		
5. 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス	-----	43
倉根一郎		
6. イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介試験、イナトミシオカの実験室内飼育法の確立、および野外蚊からのYOKOSEウイルス分離の試み	-----	51
江下優樹		
7. 東北地方における疾病媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究およびヤブカ寄生原虫 <i>Ascogregarina</i> spp. を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究	-----	59
小林陸生		
8. タンパクワクチンとの混合投与によるデング 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける中和抗体誘導能の上昇	-----	70
小西英二		

9.	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	78
	奴久妻聡一	
10.	E型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いた西ナイルウイルスに 対する経口DNAワクチンの開発	89
	只野昌之	
11.	ウエストナイルウイルスのリバーシジェネティクス法 の確立に関する研究	96
	前田秋彦	
12.	サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析	105
	倉根一郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	114
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金
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、疫学およびワクチン開発に関する研究
平成17年度 総合研究報告書

主任研究者 高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス1部 室長)
平成18(2006)年 3月

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、また海外渡航者の増加している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を対象とした包括的な研究を行なうものである。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診断法の確立：1) チクングニヤウイルスの血清診断法の開発・確立を行った。2) クリミアコンゴ出血熱ウイルスの TaqMan PCR による高感度診断法を確立した。3) デングウイルス血清診断における IgA 抗体検出法の開発とその応用法を確立した。4) 海外からの帰国者に関してデングウイルス感染に対する血清・病原体・遺伝子診断を実施し、多数のデングウイルス感染患者(死亡例1例)の存在を明らかにした。

(2) 媒介節足動物とウイルスの浸淫状況を把握するための技術開発と現状の把握：1) 現在日本においてブタの間で流行している日本脳炎ウイルスの遺伝子解析および病原性を解明した。2) 日本産イナトミシオカがウエストナイルウイルスに対して感受性があることを示した。3) 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。4) 東北地方(秋田県)における日本脳炎ウイルス媒介蚊(コガタアカイエカ)の分布状況を明らかにした。5) デング熱媒介蚊(ネッタイシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生物的防除に利用する可能性を示した。

(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向けての基礎的研究：1) タンパクワクチンとデング4価DNAワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを明らかにした。2) 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を確立し、中空ウイルス粒子・自己増殖性レプリコンの作製に成功した。3) E型肝炎ウイルスの中空粒子内にウエストナイルウイルス(WNV)の prM およびE蛋白質を発現したDNAワクチンをパッケージングすることに成功し、WNVの経口DNAワクチンの可能性を示した。4) 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を解析し、相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列が中和活性を規定していることを示した。5) デングウイルスは通常マウスに感染しないがマウスの未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖することを示した。

分担研究者：

倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）

小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部 部長）

小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座 助教授）

奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所微生物部 副部長）

江下優樹（大分大学医学部感染分子病態制御講座 助教授）

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）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所分子構造解析分野 教授）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）

前田秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科 助教授）

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。以上のことから、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、広く一般市民への啓発を図る。

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 TaqMan PCR 法による高感度診断法の開発：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの S-遺伝子の塩基配列に基づいて、TaqMan PCR 法のためのプライマーおよびプローブを設計し、高感度にクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を定量的に測定するための TaqMan PCR システムを開発した。

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：IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法 (IgA-ELISA) を用いたデング血清診断の有用性を検討する目的で、すでに確立されている IgM 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法 (IgM-ELISA) との間で、デング流行地へ旅行し、帰国後にデングウイルス感染を疑われた日本人 48 症例、86 血清検体を用いた検出感度、特異性等につき比較観察した。

4) チクングニヤ熱の血清診断法の開発：IgM-capture ELISA 法および IgG-indirect ELISA 法を用いた。抗チクングニヤウイル

ス (CHIK) 抗体および類症鑑別のため抗デングウイルス (DEN) 抗体について東南アジアおよび太平洋州の 5 カ国で採集された有熱患者からの血清 305 検体 (IgG については 422 検体) を測定した。

5) 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 領域に設定したプライマーペアおよび 3' NCR 領域に設定したプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、両領域の遺伝子解析を実施した。

(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：ネッタイシマカ由来の *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) Dengue 4 価 DNA ワクチンとタンパクワクチンの混合投与による高価中和抗体の誘導 (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 μ g、計 100 μ g/匹) および 150ng の EP ワクチンを混合し、4 週齢の BALB/c マウスに 3 週間隔で 2 回免疫した。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、107 FFU を腹腔内に行った。

3) Dengue 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：Dengue 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。レプリコンの作製は、ウイルス cDNA をプラスミド (pUC19) に組み込んだ。このプラスミドを *In vitro* 転写により WNV レプリコン RNA を合成し、哺乳動物細胞に導入した。

6) E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いたウエストナイルウイルスに対する経口 DNA ワクチンの開発：精製した HEV-VLPs を VLP 溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 20mM DTT) で室温、30 分間インキュベートし、VLPs を構成蛋白に開裂させた。次に、目的の WNV DNA ワクチンを加えた後に、CaCl₂ 溶液を滴加して Ca イオン濃度を 5mM まで引き上げ、DNA ワクチンを封入した VLPs を再構築した。

7) マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析：5.6 週令の BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から樹状細胞を分離し、GM-CSF (20ng/ml) 添加 10%FCS RPMI メディウム (20 GM-CSF Medium) を用いて培養した。3 日後、20 GM-CSF Medium を加え更に 3 日間培養した。培養 6 日後、抗 CD11c magnetic beads (MACS) を用いて、ポジティブセレクション法で CD11c 陽性 (CD11c+) 細胞を単離した。CD11c+細胞は、抗マウス CD11c ハムスター抗体と FITC 標識抗ハムスターウサギ抗体を用いてフローサイトメーターで CD11c+細胞が、90%以上であることを確認した。これらの細胞に Dengue virus type 2 (Den V 2; ニューギニア C 株) を感染させ 3 日後または 7 日後に細胞および

上清中のウイルスを間接蛍光抗体および RT-PCR 法により確認した。

(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 TaqMan PCR 法による高感度診断法の開発：TaqMan PCR と nested RT-PCR はほぼ同等の感度を有していた。TaqMan PCR 法では、高感度に、定量的に、しかも、より迅速にクリミア・コンゴ出血熱患者血清中のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を増幅し検出することが可能であった。

2) 輸入デング感染症の状況：①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 109 症例であった。これらの検体の特異遺伝子および IgM 抗体の検出により検査・診断した結果、11 症例でデングウイルス遺伝子陽性であった。そのうち 4 型ウイルス 4 例、1 型ウイルス 4 例、3 型ウイルス 3 例であった。②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、2005 年は 71 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 43 例で、そのうちデングウイルス 3 型が 13 例、1 型が 8 例、2 型が 5 例、病原体診断ができずに血清診断によって診断された症例が 13 例であった。このうち、スリランカでデング熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。発病後 18 日目に死亡し、その剖検肝臓組織からデングウイルス遺伝子を検出した。

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：日本人のデングウイルス感染診断を目的として血清中の IgA 抗体を ELISA で検出するに際し、IgM-ELISA の代替測定法としての検出感度および特異性を検討した結果、血清中の IgA 抗体検出法としての有用性を IgM 抗体検出法と比較した場合、IgA-ELISA の検出感度は 10% (正確には 9.9%) 劣っていた。しかし検出の特異性は IgM-ELISA と一致した。症例の診断を目的とし、2 回以上の採血で得た血清中の IgA 抗体を検出する、IgA-ELISA と IgM-ELISA の検出感度および特異性は一致した。

4) チクングニヤ熱の血清診断法の開発：チクングニヤ IgM-capture ELISA ではフィジー 4 例 (6.6%)、フィリピン 4 例 (11.2%)、インドネシア 5 例 (5.6%)、バングラデシュ 0 例 (0%)、スリランカ 2 例 (6.8%) の陽性例が認められ、合計 15 例の内 10 例についてはデング IgM も陽性だったため、確実にチクングニヤといえるケ

ースは 5 例 (1.6%) であった。チクングニヤ IgG-indirect ELISA ではフィジー 3 例 (4.9%)、フィリピン 8 例 (9.0%)、インドネシア 22 例 (25.0%)、バングラデシュ 9 例 (5.8%)、スリランカ 2 例 (6.9%) の合計 44 例の陽性が認められた。

5) 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス：2005 年は 10 都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。沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタからであり、表 1 に示す如く、10 都県あわせて 31 株の日本脳炎ウイルスが分離された。2004 年の分離株の遺伝子解析の結果、三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス 2 株 (Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004) が、異なるウイルスであることが、判明した。一方、香川県の分離株で 3' NCR 領域の Variable 領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点である。

(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：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003 年に盛岡では、ヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004 年の調査 (0/71)、2005 年の調査 (0/29) で同蚊は確認できなかった。これは、2003 年に一時的に盛岡に侵入したヒトス

ジシマカが定着できなかつたと判断された。2004年の日本海側の調査では、能代市内には相当高密度にヒトスジシマカが分布していることが再確認されたが、能代から北へ約20kmの八森、青森県岩崎、深浦、鱈ヶ沢、弘前では、ヒトスジシマカは確認されなかつた。一方、太平洋岸の釜石で初めて確認された。2005年の日本海側での調査では、能代の北約20kmの八森町で初めてヒトスジシマカが確認されたが、青森県の岩崎、深浦、鱈ヶ沢では依然として確認されなかつた。4年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。また、大船渡の港湾地域および2カ所の寺院での捕虫網による採集で初めてヒトスジシマカが確認された。

2) コガタアカイエカに関する調査：コガタアカイエカの分布は琉球から北海道まで、日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像されるが、2005年8月上旬、秋田県大仙市(大曲市)と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県の時同期の捕集成績と比較した。その結果、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度であった。

3) 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：媒介試験には、吸血意欲を高めるために一度産卵したイナトミシオカを用いた。胸部接種でWNVを

蚊に感染させた後、その8日後に、8週令のマウスから吸血する機会を蚊に与えた。複数の感染蚊の入った飼育容器の上部蓋のネットの上にマウス2個体を1時間載せて、蚊の吸血の有無を観察した。5個体のマウスで、毛の逆立ちなどの症状が認められた。全てのマウスは、吸血あるいは刺咬の8-9日後に、臓器内のWNVゲノムの有無をRT-PCR法で検査した。その結果、症状の認められた5個体のマウス中、4個体からウイルスゲノムが検出された。

(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：デングウイルス1型、2型を接種したサル6頭において型特異中和抗体価についても速やかな上昇が認められ、感染後58週まで維持した。U937細胞を用いたデングウイルス感染において、交叉性抗体による感染増強は1:30倍希釈で、型特異抗体は1:300倍希釈で最大値を示した。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46週以降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つた。このように、異なる血清型のウイルスに対する感染増強抗体が出現したことが*in vitro*において明らかになった。さらに2頭の非免疫群を加え、全頭にデングウイルス2型を接種し、ウイルス血症を確認したが、感染増強抗体による感染の増強を確認できる症状はサルにおいて観察できなかつた。再感染後の中和試験による型特異中和抗体価は速

やかに上昇し、再感染後1年2ヶ月後まで維持された。交叉性中和抗体価は型特異中和抗体に比較すると減弱した力価を示したが、速やかな上昇が認められ、再感染後1年2ヶ月後まで維持された。このように、再感染による速やかな特異中和抗体の上昇は全頭に認められた。一方、交叉性中和抗体は初感染と再感染時のウイルスの型が異なる時に顕著であり、初感染時の特異中和抗体が十分上昇しなかった検体においては交叉性中和抗体の上昇は認められなかった。

2) タンパクワクチンとの混合投与による Dengue 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける中和抗体誘導能の上昇：DENV2 細胞外粒子 (EP ワクチン：ニュークレオカプシドのない空の粒子型抗原) および現行日本脳炎不活化ワクチン (JEVAX) の両タンパクワクチン共に、4 価 DNA ワクチンとの混合投与群がそれぞれの単独投与群より高い中和抗体価をマウスに誘導した。この上昇は、Dengue の 4 つの型すべてに対して見られた。接種後の週数により抗体価は変化するが、混合投与群と単独投与群における抗体価の差から、この上昇効果は相乗的であった。また、初回免疫後 13 週目の投与の後、4 型すべてに対して中和抗体価は上昇し、追加免疫の効果が認められた。

3) Dengue 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：36 個のハイブリドーから RNA を抽出し H および L 鎖可変領域の RT-PCR を行い解析したところ、すべてのクローンでバンドが検出できた。L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H

鎖に比べて相同性が高い傾向を示した。わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例として、D2-V-10F1 では 18,000 の中和活性を示していたものが、L 鎖の CDR1 の 2 つのアミノ酸 (25 番目が A→T, 27 番目が R→Q) のみが変わった D2-III-10G7 では中和活性が 320 にまで低下した。

4) 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：

レプリコン RNA を合成し、293T 細胞に導入した。このレプリコン RNA が細胞内で自己増殖することを確認し、完全長の WNV の cDNA を含むプラスミドを構築した。ウエストナイルウイルス cDNA を用いて、*in vitro* 転写反応を行い、完全長のウイルス RNA を合成し、Vero E6 や BHK 細胞に導入したところ、導入後 2 日目より細胞の円形化と浮遊化が観察された。また、これらの細胞はウイルスの E 蛋白質に対する抗体に反応した。

6) E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いたウエストナイルウイルスに対する経口 DNA ワクチンの開発：HEV-VLPs を VLP 溶解緩衝液で室温、30 分間インキュベートし、VLPs を構成蛋白に開裂させ、目的の DNA ワクチンを加えた後に、CaCl₂ 溶液を滴加して Ca イオン濃度を 5mM まで引き上げ、DNA ワクチンを封入した VLPs を再構築し pCMV(WN/cME) を封入した HEV-VLPs を Caco-2 細胞株 (ヒト大腸癌由来) に接種して、DNA ワクチンの細胞内導入と発現を免疫染色法で確認した。

7) マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析: BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から DC を分離し、Den V 2 を接種し、感染後 3 日目に細胞のウイルス抗原を間接蛍光抗体法にて確認したところ、細胞質にデングウイルス特異的な蛍光が認められた。また、骨髄 DC の 3 日目と 7 日目の細胞上清から RT-PCR 法により、Den V2 遺伝子が検出された。

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。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) チクングニヤウイルスの血清診断法の開発・確立を行った。2) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの TaqMan PCR による高感度診断法を

確立した。3) デングウイルス血清診断における IgA 抗体検出法の開発とその応用法を確立した。4) 海外からの帰国者に関してデングウイルス感染に対する血清・病原体・遺伝子診断を実施し、多数のデングウイルス感染患者(死亡例 1 例)の存在を明らかにした。節足動物媒介性ウイルスに対する新型ワクチン開発に関する基礎的研究においては、1) タンパクワクチンとデング 4 価 DNA ワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを明らかにした。2) 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を確立し、中空ウイルス粒子・自己増殖性レプリコンの作製に成功した。3) E 型肝炎ウイルスの中空粒子内にウエストナイルウイルス(WNV)の prM および E 蛋白質を発現した DNA ワクチンをパッケージングすることに成功し、WNV の経口 DNA ワクチンの可能性を示した。4) 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を解析し、相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列が中和活性を規定していることを示した。5) デングウイルスは通常マウスに感染しないがマウスの未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖することを示した。

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や国際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我が国の感受性蚊の情報をもとに、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。

E. 結論

クリミア・コンゴ出血熱の TaqMan PCR 法を開発し有用性を示した。海外からの帰国者についてデングウイルス感染の検査を行った。多くのデングウイルス感染者の存在を明らかにし、出血熱による死亡例1例を確認した。また、デング熱の検査法として IgA 検査法を評価確立した。また、デング熱の鑑別疾患であるチクングニヤ熱の血清診断法を開発した。日本脳炎に関しては、近年のブタの間での流行株である遺伝子型1型ウイルスの三重県での分離株中にマウスに強い病原性を示すウイルスが確認された。2005年の夏季には沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、

東京都のブタから10都県あわせて31株の日本脳炎ウイルスが分離された。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し、その後別の血清型デングウイルスを接種したがデング熱様の症状は認められなかった。また、タンパクワクチンとデング4価DNAワクチンの混合投与によりマウスに高い中和抗体を誘導することを示した。さらに、デングウイルスがマウスにおいても未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖していることが示された。E型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子(HEV-VLPs)にデングウイルス粒子構成蛋白prMおよびE蛋白を発現するDNAワクチンをパッケージングし、培養細胞への接種で、遺伝子導入試薬と同等にウイルス遺伝子導入が可能であることを確認した。

F. 健康危機情報

スリランカでデング熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。本症例では、発病後18日目に死亡し、その剖検肝臓組織からデングウイルス遺伝子を検出した。

G. 研究発表

G.研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24 402-411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.*, Vol. 49:285-294, 2005.

Manmohan Parida, Kouhei Horioko, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.43: 2895-2903, 2005.

Celia C. Carlos, Kazunori Oishi,* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z. Tanig, Ronald R. Matias,

Kouichi Morita, Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. Comparison of Clinical Features and Hematologic Abnormalities Between Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Among Children in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol.73, 435-440, 2005.

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 848-854, 2005.

Leonora T.D. Salda, Maria D.C. Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita. Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 73, 796-802, 2005

Tajima S, Nukui Y, Ito M, Takasaki T, Kurane I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated

region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. *Virus research*. 116:38-44(2006)

Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12(10) 1235-1237, 2005

Yoko Nukui, Shigeru Tajima, Akira Kotaki, Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Kazuhiko Koike, Ichiro Kurane. Novel dengue virus type 1 with a 29-nucleotide deletion in the 3' NCR isolated from a traveler to Yap state, Micronesia, in 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12(2) 343-346, 2006

Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Research* 66:159-63, 2005

Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical*

Virology 76:111-118, 2005

Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *Journal of Virological Methods* 125:181-186, 2005

Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:520-524, 2005

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005

Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing

- persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741:4-10, 2005
- Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
- Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79:11873-11891, 2005
- Harakuni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T, Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. *Infect Immun.* 73:5654-65, 2005
- Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, Yagita H, Ohta T, Mori N. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand., *J Gen Virol.* 86:1055-65.2005
- Tang WF, Eshita Y, Tadano M, Morita K, Makino Y. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type-4/Japanese encephalitis virus to Vero cells., *Microbiol Immunol.* 49:285-94,2005
- Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, Matsuura Y., Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol.* 79:3448-58.2005
- Murakami, M., Ota, T., Nukuzuma, S., and Takegami, T., Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol*, 49, 1047-1056, 2005
- 鳥居明子、月館幸一、原田勝代、高崎智彦。来日後にデング出血熱を発症した4歳男児例。日本小児科学会雑誌。109(9) 1127-1131 (2005)
- 津田良夫, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 星野啓太, 澤辺京子, 小林陸生: ウエストナイルウイルスの主要媒介蚊を決定する生態的特

- 徴. 臨床とウイルス. 33 (1) : 17-21, 2005.
- 根路銘令子、高崎智彦. 広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査ー日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス. 日本臨床 63(増刊号 7) : 313-317 (2005)
- 高崎智彦. 日本の予防接種・海外の予防接種ー定期接種対象疾患 : 日本脳炎ワクチン. 臨床と微生物 32(5) : 461-465 (2005)
- 林昌宏、高崎智彦. フラビウイルス脳炎ーウエストナイルウイルスを中心にー. 臨床病理 63(8) 721-727 (2005)
- 森田公一 : 「 Dengue 熱、 Dengue 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
- 森田公一 : 「バイオセーフティー」 in 標準微生物学 (第 9 版)、山西弘一 監修、医学書院、2005
- 森田公一 : 「ウエストナイル熱に対するワクチン」臨床とウイルス、Vol. 33, 28-32. 2005
- 森田公一 : 「ウエストナイル熱」モダン フォーミュレーション、Vol. 25, 523-526. 2005.
- 森田公一 : 「ウエストナイル熱とワクチン開発の現状」感染症、Vol. 35, 91-96. 2005.
- 森田公一 : 「フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、 Dengue 熱を中心に)」カレントセラピー、Vol. 27, 722-724, 2005.
- 森田公一 : 「ウエストナイル脳炎」、Infectious Disease Report 2005, No28, 2005.
- 森田公一 : 「ウエストナイルウイルス」、Drug Delivery System. Vol. 20(5). 556-557, 2005.
- 森田公一 : 「西ナイル熱の現状」、Medical Science Digest Vol. 31(14). 548-549, 2005
2. 学会発表
- 1) 国際学会
- 1) Morita K.: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses (Toyama, Japan, May 14-17, 2005)
- 2) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
- 3) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
- 4) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
- 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzuki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San

Francisco, CA, USA

6) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA

7) Eiji Konishi, Saori Kosugi and Jun-ichi Imoto: Development of a dengue tetravalent DNA vaccine and its evaluation in mice. Thirty-Ninth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Palo Alto 2005

8) Tajima Sigeru, Yoko Nukui, Takasaki Tomohiko, Ichiro Kurane. Identification and characterization of deletion in the variable region located in 3' non-translated region of dengue type 1 virus. 2nd Asian regional dengue research network meeting. (Singapore) 2005/September 28-30.

2) 国内学会

1) 桑山 勝、高崎智彦、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎. 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出. 第 79 回日本感染症学会 (名古屋市) 2005 年 4 月

2) 高崎智彦、根路銘令子、桑山 勝、内田陽三、西浦哲雄、松田俊二、倉根一郎. 倉橋島におけるウイルス関連血球貪食症候群 (virus associated hemophagocytic syndrome: VAHS) 症例における日本脳炎抗体. 第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (箱根) 2005 年 5 月

3) 高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、沢辺京子、岸 昇、桑山勝、倉根一郎. 中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体

保有状況の検討. 第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (箱根) 2005 年 5 月

4) 石川知弘、Peter W. Mason、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二: 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる 3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制. 第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)

5) 井本淳一、小西英二: フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与: デングウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性. 第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)

6) 山中敦史、小西英二: 抗体依存性感染増強及び/または中和活性を示すマウス抗デング 2 型ウイルスモノクローナル抗体の解析. 第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)

7) 星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、津田良夫、比嘉由紀子、高崎智彦、小滝 徹、小林陸生、矢野和彦、澤邊京子: 本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月

8) 澤邊京子、伊澤晴彦、比嘉由紀子、葛西真治、星野啓太、佐々木年則、津田良夫、小林陸生: 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月

9) 吉田政弘、山下敏夫、小林陸生: 都市域における冬季の蚊幼虫・成虫調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月

10) 津田良夫、澤邊京子、比嘉由紀子、星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、小林陸生、桑山 勝: 広島県倉橋島の日本脳炎媒介蚊調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町

11) 高崎智彦、倉根一郎. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研

- 究. 第9回日本ワクチン学会(大阪)2005年10月
- 12) 高崎智彦、倉根一郎. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究. 第9回日本ワクチン学会(大阪)2005年10月
- 13) 細川隆史、中島秀人、佐藤智彦、藤村智恵子、石田志門、古玉大介、杉野正一、木村文治、花房俊昭、高崎智彦. 髄液から日本脳炎ウイルスが検出された無菌性髄膜炎の1例. 第10回日本神経感染症学会(東京)2005年10月
- 14) 小西英二: ウェストナイル熱. 日本防衛学会第32回年次大会(2005).
- 15) 石川知弘、高崎智彦、倉根一郎、小西英二: ウェストナイルウイルス感染症に対するDNAワクチンのマウスにおける評価. 第9回日本ワクチン学会学術集会(2005).
- 16) 松永貞一、小西英二: 東京都葛飾区の一診療所の患者からみた同地域における日本脳炎ウイルス不顕性自然感染の可能性に関する考察. 第9回日本ワクチン学会学術集会(2005)
- 17) 石川知弘、田島茂、根路銘令子、桑山勝、高崎智彦、倉根一郎、小西英二. 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が引き起こす培養細胞におけるウイルス増殖抑制. 第53回日本ウイルス学会(横浜)2005年11月
- 18) 井本淳一、小西英二: タンパクワクチンとの混合投与によるデング4価DNAワクチンのマウスにおける免疫原性の上昇. 第53回日本ウイルス学会学術集会(2005).
- 19) 山中敦史、小杉紗織、小西英二: マウス抗デング2型及び4型ウイルスモノクローナル抗体における抗体依存性感染増強と中和活性の関係. 第53回日本ウイルス学会学術集会(2005).
- 20) 奴久妻聡一、小杉紗織、小西英二: 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. 第53回日本ウイルス学会学術集会(2005).
- 21) Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日
- 22) Maria del Carmen Parquet, Phan Thi Nga, Manmohan Parida, Nguyen Thanh Thuy, Pham Thi Suu, Afjal Hossain Khan, Leonora T. D. Salda, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kouichi Morita: Novel Arbovirus in Vietnam: Isolation, Identification and Molecular Characterization. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月
- 23) Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月
- 24) Fuxun Yu, Nor Shahidah Khairullah, Shingo Inoue, Vijayamalar Balasubramaniam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Expression of Nipah virus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli* and its application in sero-diagnosis. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日
- 25) Salda Leonora Trinidad Demot, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Noboyuki Kobayashi, Kouichi Morita: Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 in the Philippines. 第46回日本熱帯医学会大会・京都, 2005年10月14-15日
- 26) 井上真吾, Nemani Talemaidoga, Aryati, Mohammed A. Islam, Efren M. Dimaano, Ronald R. Matias, Wimal Abeyewickreme, 大石和徳, Filipinas F. Natividad and 森田公一, 第12回トガ・

フラビ・ペスチ研究会（平成18年1月、東京）

27) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果(続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜

28) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜

29) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜

30) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜

31) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多

32) 西川由紀, 武井秀信, 長田陽介, 小林和郎, 徳永毅, 湊志仁, 椎貝達夫, 竹内章, 高崎智彦. 肝障害を合併したデング熱の一例. 第527回日本内科学会関東地方会例会(東京) 2005年6月

33) 町田早苗, 名和優, 高崎智彦, 倉根一郎. マウス樹状細胞におけるデングウイル

ス感染機構の解析. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005年11月

34) 伊藤美佳子, 高崎智彦, 田島茂, 林昌宏, 根路銘令子, 倉根一郎. 東チモールにおけるデング熱/出血熱流行に関する系統学的血清学的解析. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005年11月

35) 濱野正敬, 田島茂, 伊藤美佳子, 小滝徹, 高崎智彦, 倉根一郎. 小動物を用いたデングウイルス実験感染モデルの構築. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005年11月

36) 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎. デング1型ウイルス3'非翻訳領域内variable領域の機能解析. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005年11月

37) コンビナトリアルバイオロジーを用いた抗日本脳炎ウイルス中和ヒトモノクローナルFab抗体の作製とその評価. 荒川満枝, 山城哲, 只野昌之, 西園晃. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005年.

38) ウエストナイルウイルスの神経細胞およびT細胞アポトーシス誘導機構. 田福宣治, 只野昌之, 森直樹. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005年11月

39) 奴久妻聡一, 小杉紗織, 山中敦史, 小西英二. 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. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2005年

40) 村上学, 奴久妻聡一, 竹上勉. JEV感染マウスにおけるRNAiによるウイルス増殖抑制効果. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2005年

41) 竹上勉, 村上学, 劉寧, 奴久妻聡一. 日本脳炎ウイルス持続感染における非構造蛋白NS4a及び3'-UTRの生物学的役割. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2006