

F. 研究危険情報
なし。

G. 研究発表
1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
第40回日本脳炎生態学研究会
「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」(神奈川、2005.5.26)

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
なし。

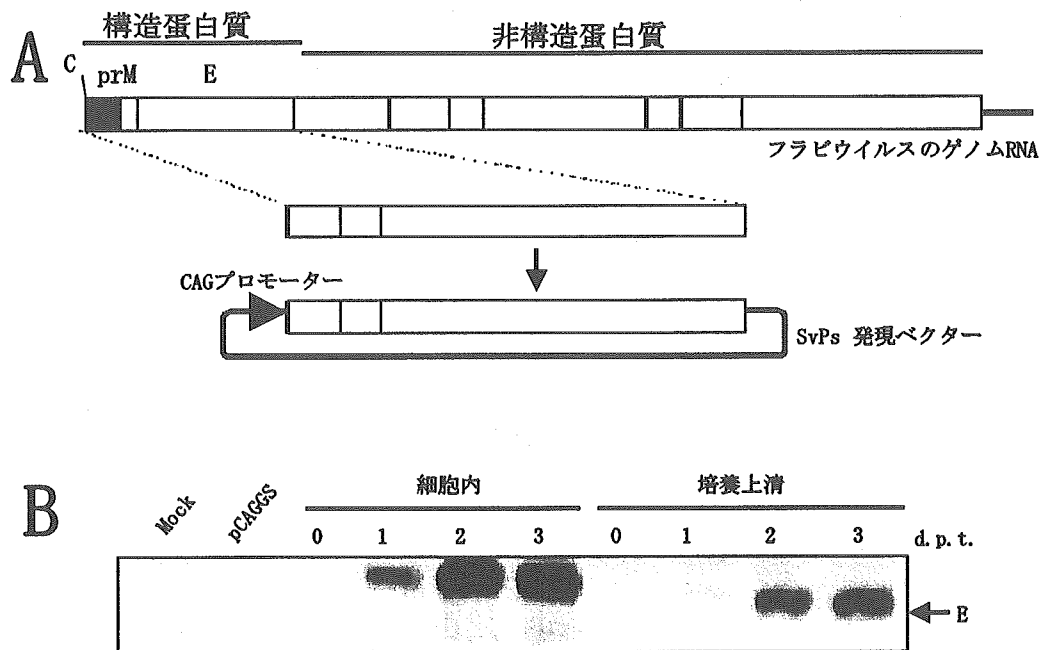


図 1. フラビウイルスの中空ウイルス粒子 (SvPs) の作製

A. フラビウイルスのゲノム RNA の構造と SvPs 発現ベクターの構築について示す。フラビウイルスのゲノム RNA は、その 5' 末端にウイルスの粒子形成に必要な構造蛋白質を、3' 末端にウイルスの転写に必要な非構造蛋白質をコードしていると考えられている。ウイルスの SvPs の発現には、C 蛋白質の C 末端のアミノ酸と prM および E 蛋白質で必要十分である。そこで、WNV の NY 株の本領域の cDNA を発現ベクターである pCAGGS プラスミドに組み込んだ。B. WNV の NY 株の SvPs 発現ベクターを、293T 細胞に導入し、導入後、1 日毎に細胞内と培養上清中のウイルスの E 蛋白質をウエスタンブロッティング法により検出した。

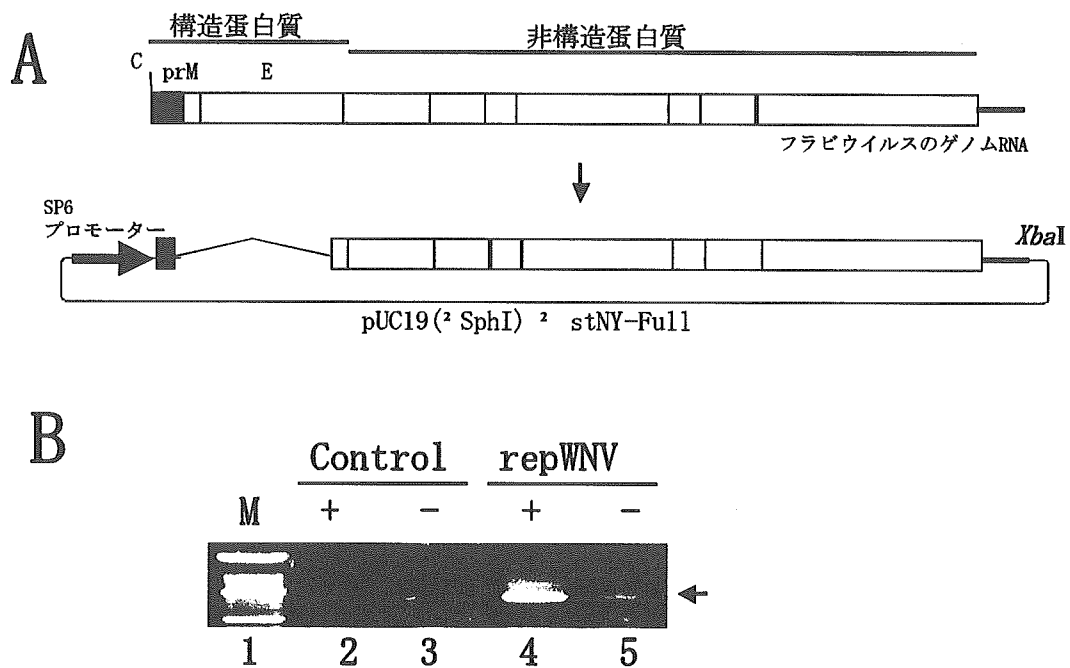


図2. フラビウイラスのレプリコンの作製

A. フラビウイラスのゲノム RNA の構造とレプリコンを含むプラスミドの構築について示す。ウイルス遺伝子の構造蛋白質の大部分を欠く cDNA を合成し、pUC19($\Delta SphI$) (予め *SphI* を破壊したもの) に組み込んだ。B. 本プラスミドを *XbaI* で切断し、マングベーン核酸切断酵素で処理することにより、切断端を平滑化した。SP6 ポリメラーゼを用いて *in vitro* 転写することにより、レプリコン RNA を合成し 293T 細胞に導入した。細胞より全 RNA を抽出し、RT-PCR によりレプリコンのプラス鎖とマイナス鎖の RNA を検出した。1; 100 bp DNA マーカー、2; 非導入細胞から抽出した RNA を用いた場合のウイルスのプラス鎖 RNA の検出、3; 非導入細胞から抽出した RNA を用いた場合のウイルスのマイナス鎖 RNA の検出、4; 導入細胞から抽出した RNA を用いた場合のウイルスのプラス鎖 RNA の検出、5; 導入細胞から抽出した RNA を用いた場合のウイルスのマイナス鎖 RNA の検出を示す。

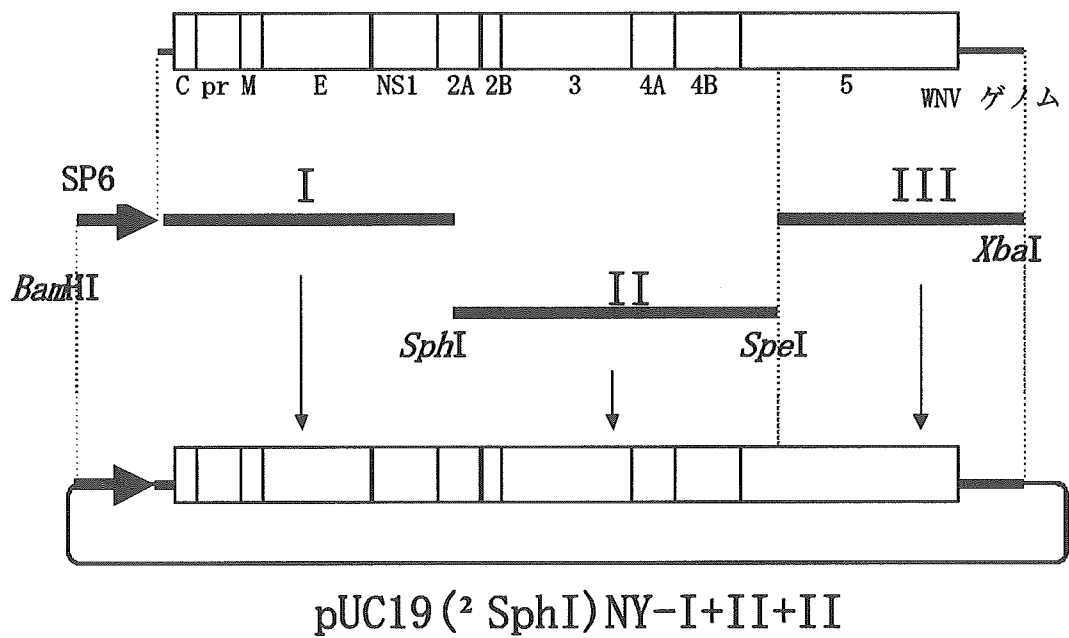


図3. 完全長のWNVのNY株cDNAクローンの作製構想図

WNVのNY株のゲノム全長をクローニングするために、ウイルスのPCRフラグメントI, IIおよびIIIを得た。次に、図に示す制限酵素部位を利用して、完全長のcDNAクローンの構築を試みた。

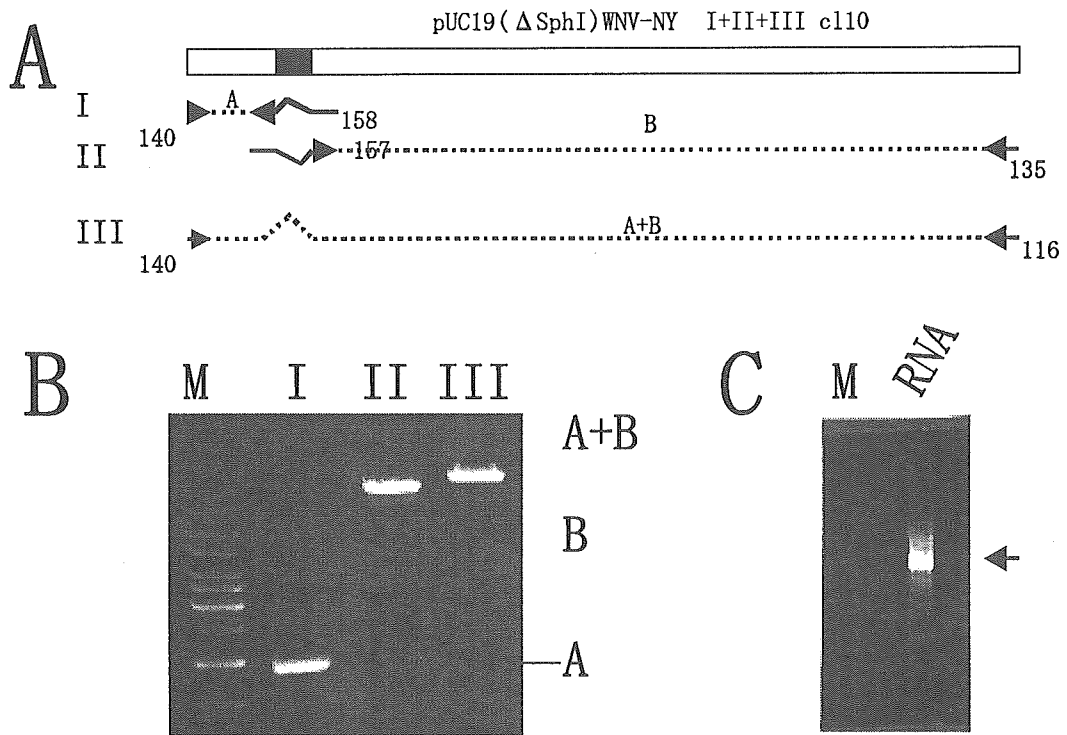


図5. PCRを基盤とするWNVのNY株の組み換えウイルスcRNAの作製

pUC19($\Delta SphI$)WNV-NY I+II+III c1 10 を鋳型として、挿入されている大腸菌の遺伝子を除く様に設計したプライマーセットを用いて1stPCRを行う。プライマーセット140と158、157と135を用いて得られたPCR産物IとII(B)を混合し、アニーリングさせた。DNAポリメラーゼを用いてゲノム全長のcDNAを作製した(III)。プライマー140の5'末端にはSP6プロモーターが付加されているため、SP6ポリメラーゼを用いて*in vitro*転写したところ、完全長のウイルスcRNAが得られた(C)。

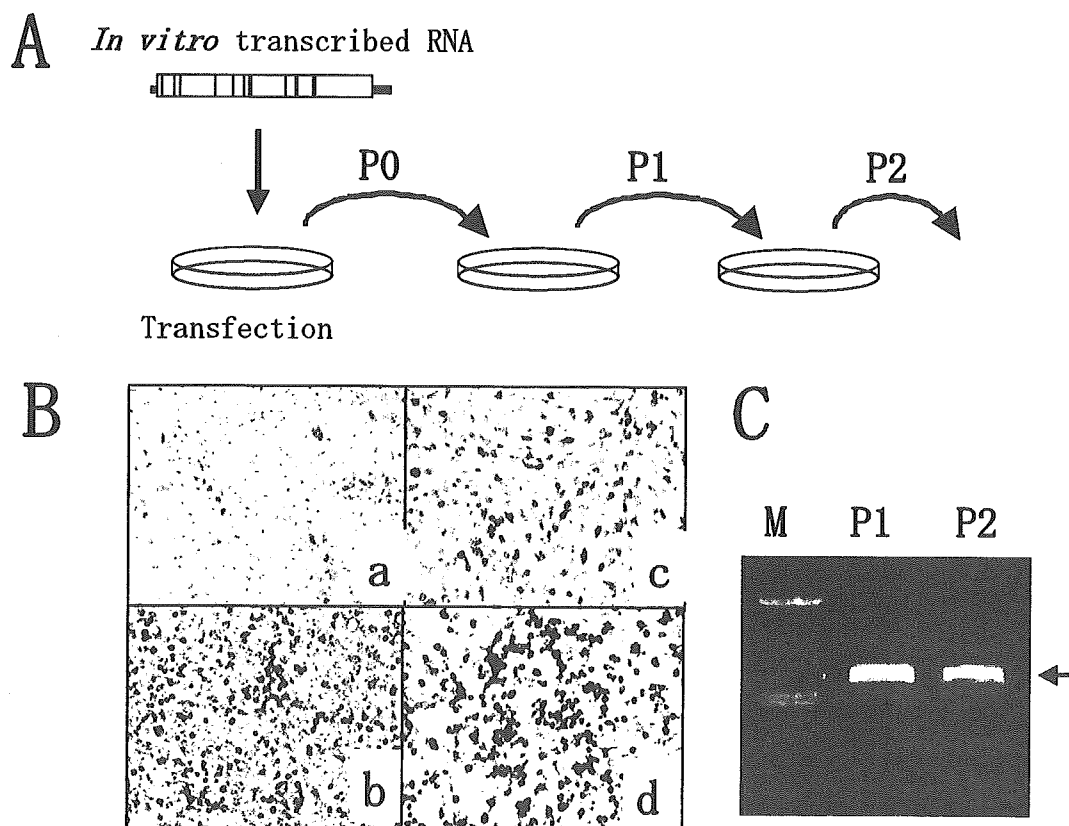


図6. 組み換え WNV の作製

In vitro 転写により得られたウイルスの cRNA を Vero E6 (B, b) と BHK (B, d) に導入した。ウイルスの E 蛋白質で免疫染色したところ、導入細胞では (B, b と d) E 蛋白質の発現が認められたが、非導入細胞 (Vero E6 (B, a) および BHK (B, c)) では、検出されなかった。次に、ウイルスの cRNA を導入した BHK 細胞の培養上清 10 μ l を、非感染細胞に接種し、継代培養した (A)。P0 あるいは P1 の培養上清を接種した細胞 (C, P1 および P2) より、全 RNA を抽出し RT-PCR により WNV に特異的な RNA の検出を行った (C)。M; 100 bp DNA マーカーを示す。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析

分担研究者 倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第一部)

協力研究者 伊藤美佳子(国立感染症研究所ウイルス第一部)

高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス第一部)

研究要旨：デングウイルスは初感染とは異なる血清型のウイルスによる感染増強が確認されている。感染増強のメカニズムを解明するために、サルにおけるデングウイルス感染モデルを用いて、デングウイルス血清型特異中和抗体、交叉性中和抗体および感染増強抗体の出現を検討した。サルにデングウイルスを感染後、血清を経時的に採取し、ウイルス血症、血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価を明らかにし、さらに、感染増強抗体の出現を U937 細胞を用いて解析した。

中和試験による交叉中和抗体価は感染後微量ながら増加した。また、型特異中和抗体価については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、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 週目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った。よって、ヒト体内において、デングウイルス再感染時の感染増強がより発生しやすいのは、初期感染時の中和抗体が残存し、再感染時のウイルスの血清型が初感染時とは異なる場合であることが考えられた。さらに、初感染時に型特異中和抗体価の上昇が低い場合は、初感染とは異なるウイルス型の再感染時において交叉性中和抗体の上昇が抑えられることが明らかとなった。初感染時の十分な型特異中和抗体の上昇がその後の交叉性中和抗体の上昇に関与し、異なる血清型の再々感染時のデングウイルスによる生体防御機構に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

蚊によって媒介されるフラビウイルスであるデングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱、日本脳炎ウイルス等はヒトに感染して重篤な感染症を引き起こす。特にデング

ウイルスは患者数、世界的な分布、重篤度数から最も重要なものと言える。デングウイルスには4つの血清型が存在する。デングウイルスに対する防御免疫は終生持続するが、他の型に対しては短期間持続するのみ

である。デングウイルスに感染した場合、典型的な症状を示す場合一過性の熱性疾患であるデング熱、致死的疾患であるデング出血熱という2つの異なる病態を示す。デング出血熱の病態がなぜおこるかは、現在でもデングウイルス感染症研究の最も大きなテーマといえる。デング出血熱の病態機序は生体の免疫状態によるとするもの、デングウイルス自体の毒性の違いによるとするものの2通りが考えられている。

初感染とは異なる血清型のウイルスによる感染増強が確認されている。そこで、生体の免疫状況がどのように感染増強に関わるかについてサルにおけるデングウイルス感染モデルを用いて、デングウイルス中和抗体および感染増強抗体の出現を検討した。

B.研究方法

カニクイザル各2頭にデングウイルス1型（デング熱分離株）および2型（デング出血熱分離株）を、さらに1頭は非感染細胞上清を接種する。感染後、血清を経時的に採取し、

- ①ウイルス血症の推移を plaque titration およびリアルタイム RT-PCR で観察し、
- ②同時に発熱等の臨床症状、血小板減少の有無を調べる
- ③血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価を中和試験により、IgM 抗体価を ELISA 法により測定した。
- ④次に中和抗体および感染増強抗体の出現を解析するために、50ul(4×10⁵PFU)

のデングウイルスを10倍階段希釈した交叉性中和抗体または型特異的中和抗体(1:1)により1時間4℃で処理した後、U937細胞を50ul加え、2時間37℃で感染(MOI=4)させた。24時間および48時間後にIFAによりデングウイルス感染細胞を観察した。

- ⑤また、1年4ヶ月後に、上記により免疫されたサル(初感染)に、さらに2頭の新感染群を加え、デングウイルス2型を再度接種し、再感染による感染増強の有無を観察するために、ウイルス血症の推移や血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価の変化を継続的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会により承認された。

C.研究結果

デングウイルス1型、2型を接種したサルにおいて非常に短期間ながらウイルス血症が確認された。ウイルス血症は感染後3日目まで認められた(Fig1-a)。IgM抗体は感染後2週間目をピークに減少し続け、12日目まで持続した。中和試験による交叉性中和抗体価は感染後微量ながら増加した。また、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(Table1-1,1-2)。

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った。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。

そこで、上記に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(Fig1-b)、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った。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(Tabke2-1,2-2)。

D. 考 察

感染後46週目以降の血清を用いた場合のみ未希釈交叉性抗体による感染増強が確認されたことから、初感染とは異なる血清型のウイルスは同型よりも再感染時に感染増強が発生しやすいことが示唆された。このことから、ヒト体内において、デングウイルス再感染時の感染増強がより発生しやすいのは、初期感染時の中和抗体が残存し、

再感染時のウイルスの血清型が初感染時とは異なる場合であることが考えられた。このように *in vitro* において感染増強抗体による感染の増強は確認できたが、サルにおける感染増強の観察はできなかった。このことは、今後2頭の非免疫群を加え、感染増強抗体の出現が予想される3月にデングウイルス3型を再々感染させて経過観察することによって新たな知見が得られることが今後予想される。

また、通常は初感染とは異なる型のデングウイルスに再感染したヒトは、1-4型のデングウイルスにその後再々感染しても、防御されることが一般的に報告されている。しかし、本研究では初感染時に特異中和抗体価の上昇が低い検体は、異なるウイルス型の再感染時において交叉性中和抗体が十分上昇しなかったことが明らかとなった。初感染時の十分な特異中和抗体の上昇が今後のデングウイルス感染の生体防御機構に重要であることが示唆された。

本研究では、感染増強抗体の上昇を認めることが重要であり、長期にわたる経時的観察が今後も必要となる。

E. 結 語

現在、デングウイルスに対する有効な実験動物モデルは確立されておらず、多くの研究者はデングウイルスによるマウスの脳炎をモデルとして用いている。しかし、ヒトのデングウイルス感染において脳炎は起こらない。ヒトのモデルにより近い霊長類を用いて、感染増強のメカニズムを解明す

ることは有用な基礎データを得るために需要である。

また、デングウイルスに対する実用化されているワクチンは未だないが、初感染とは異なる血清型のウイルス再感染時における感染増強の発生が本実験により明らかとされたことから、ワクチン接種後のデングウイルス感染時においても感染増強が発生することを想定する必要がある。今後、ウイルス抗体による感染増強を考慮したワクチンの防御効果を慎重に検討することが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

Table 1-1

中和試験結果—初感染（サル：KT1、KT2）

50% reduction neutralizing antibody titer																	
Monkey : KT1																	
Immunized virus	Den1																
	1st	2nd	0day	07days	10days	2wks	3wks	12wks	16weeks	29weeks	34wks	38wks	42wks	46wks	50wks	54wks	58wks
	Den1		<10	<10	124	115.6	146.5	226.9	143.3	202.2	484	309.9	242.4	223.8	220	274	224
Challenge virus for PRNT	Den2		<10	<10	13.7	35.5	39.3	33.0	37.9	62.8	26.5	75	35.2	83.6	37.3	58.2	60.7
	Den3		<10		13.1				28.6	40				10.1			29.5
	Den4		<10		<10				32.0			<10		20.9			18.6

50% reduction neutralizing antibody titer																	
Monkey : KT2																	
Immunized virus	Den1																
	1st	2nd	0day	07days	10days	2wks	3wks	12wks	16weeks	29weeks	34wks	38wks	42wks	46wks	50wks	54wks	58wks
	Den1		<10	1:10	15.3	53	55	97.2	101	118.2	44	34.2	42.6	104.8	65.6	74	99
Challenge virus for PRNT	Den2		<10	1:10	12.8	<10	<10	<10	<10	18.5	<10	29.6	<10	<10	22.9	18	28
	Den3		<10		11.2				<10	<10				<10			14
	Den4		<10		<10				<10	<10				<10			<10

Table 1-2

中和試験結果—初感染 (サル: KT4、KT5)

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey : KT4

Days after immunization	Immunized virus 1st				Den2											
	0day	07days	10 days	2wks	3wks	12wks	16 weeks	29 weeks	34wks	38wks	42wks	46wks	50wks	54wks	58wks	
Den1	<10	1:10	12.4	31.6	26.4	15	31.3	66.2	<10	54.2	<10	152.9	38.4	57.0	38.0	
Challenge virus for PRNT	Den2	<10	<10	53.8	1256	>640	>640	>320	1144	1858	1570	6803	2037	1533	1300.9	1474.3
	Den3	<10	<10				48.3	26.7				19.8			15.5	
	Den4	<10	<10				<10	<10				48			<10	

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey : KT5

Days after immunization	Immunized virus 1st				Den2											
	0day	07days	10 days	2wks	3wks	12wks	16 weeks	29 weeks	34wks	38wks	42wks	46wks	50wks	54wks	58wks	
Den1	<10	<10	10	>10	11.5	<10	18	<10	18	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
Challenge virus for PRNT	Den2	<10	<10	367.6	261.7	257.1	244	440	377.5	134	473	>100	159.9	289.7	369	266
	Den3	<10	19.7			<10	20					<10			19	
	Den4	<10	14.4			<10						14.1			<10	

Table 2-1

中和試験結果—再感染 (サル: KT1、KT2)

初感染 (サル: KT3)

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT1

Immunized virus	1st		Den1												
	2nd		Den2												
Days after immunization	0day	07days	10days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nbv05	Janu06
Den1	426.1		5356.3	7039.1		>1000	>1000	7624.5	>1000	>1000	>1000	7229.5	10000	4738	5663
Challenge virus for FFNT	Den2	26.1		3002.9				3543.5	>1000	>1000	>1000				6458.4
	Den3	10.5	>1000	3131.8	1948.8	2646.3	2107.2		1956.2		>1000				
	Den4	<10	264.5		168				49	146.7	179.5		50.1		45.8

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT2

Immunized virus	1st		Den1													
	2nd		Den2													
Days after immunization	0day	07days	10days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nbv05	Janu06	
Den1	55.4		37.8	55.5		18.1	37.4	26.8					46.5	44.7	25.5	31.8
Challenge virus for FFNT	Den2	<10		438.4				556.3	337.2	422.9						276.1
	Den3	<10	24.8	96.9	191.7		113.2	81.7	96.8				21.3	54.7	29.9	54.1
	Den4	<10		78.9				20.5	31.6	50.9		15.9	26.3		23.6	

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT3

Immunized virus	1st		Den1												
	2nd		Den2												
Days after immunization	0day	07days	10days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nbv05	Janu06
Den1	<10		<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	11.3	<10	<10	<10	<10	12.4
Challenge virus for FFNT	Den2	<10						567.2	572.2				140.7	219.8	281.1
	Den3	<10	<10	<10	22.3	<10	<10	41.1	<10	<10		<10		<10	<10
	Den4	<10	<10		11.3			<10	<10	<10	<10	<10	<10		>10

Table 2-2

中和試験結果—再感染 (サル: KT4、KT5)

初感染 (サル: KT6)

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT4

Immunized virus	1st	Den2														
	2nd	Den2														
Days after immunization	0day	07days	10 days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nov05	Janu06	
Challenge virus for PRNT	Den1	<10		13.7	10.8	<10	27.5	226	10.1	<10	<10		19.2	<10	22.9	19.4
	Den2	401.5	6343.5		2997.4				1083.3		2550.2	2646.3				2112.5
	Den3	17.8		51.8		31.5	<10		60.3	<10	77.3		20.4		33	
	Den4	25.4	97.2						20.7	22.7	31.7	64.9	26.7	49.6		26.2

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT5

Immunized virus	1st	Den2														
	2nd	Den2														
Days after immunization	0day	07days	10 days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nov05	Janu06	
Challenge virus for PRNT	Den1	<10		14.8	11.1	16	26.3		<10		<10		<10	<10	<10	10.8
	Den2	127.5	>1000		>1000				1249	>1000	>1000	>1000				2151.9
	Den3	<10		16.2			54.9		95	97.1			12.3		17.3	<10
	Den4	<10							18.4	23.7	77.3		26.3	48.1		33

50% reduction neutralizing antibody titer

Monkey: KT6

Immunized virus	1st	-														
	2nd	Den2														
Days after immunization	0day	07days	10 days	2wks	3wks	4wks	8wks	Mar	May	June	July	August	Sep	Nov05	Janu06	
Challenge virus for PRNT	Den1	<10		<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10		<10	<10	<10	<10
	Den2		139.7,						420.4	844.2			245.5	273.5		656.9
	Den3	<10		<10	43.3	35			56.3	90.9	54.6		<10		32.2	14.2
	Den4	<10	<10		<10				<10	<10			13.6	14.4		20.6

Fig.1

a.初感染: TaqMan Real Time RT-PCRによるデングウイルスの検出

Dengue virus serotypes used for infection	Monkeys	Days after infection of viruses					
		3days (Plaque titration)	5	7	10	14	21
Den1	KT1 (serum)	+ (3×10^3 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
	KT2 (serum)	-	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
Den2	KT4 (serum)	+ (4×10^2 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
	KT5 (serum)	+ (7.5×10^2 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-

b.再感染: Virus viremia determined by TaqMan Real Time RT-PCR

Dengue virus serotypes used for infection	Identification of monkeys	Days after infection of viruses (Ct)	
		3	Titer PFU/ml
Den2	KT1 serum	+(29.7)	8.5×10^2 /ml
	PBMC	-	-
	KT2 serum	+(29.5)	5×10^2 /ml
	PBMC	-	-
	KT3 serum	+(28.4)	1.1×10^4 /ml
	PBMC	-	-
	KT4 serum	-	-
	PBMC	-	-
	KT5 serum	-	-
	PBMC	-	-
	KT6 serum	+(26.3)	1.7×10^4 /ml
	PBMC	+(43.2)	-

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo	Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist.	<i>Vaccine</i>	24	516-524	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	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	343-346	2006
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.M ed.Hyg.	73	796-802	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,	Comparison of Clinical Features and Hematologic Abnormalities Between Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Among Children in the Philippines	Am. J. Trop. Med. Hyg.	73	435-440	2005

Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake.					
Manmohan Parida, Kouhei Horioko, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, Kouichi Morita.	Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay	J. Clin. Microbiol.	143	2895-2903	2005
Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita, Yoshihiro Makino.	Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells	Microbiol. Immunol.	49	285-294	2005
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	24	402-411	2006
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
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	1055-1065	2005
Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno,	Synthesis and characterization of 2-diethyl-aminoethyl dextran-methyl methacrylate graft copolymer for nonviral	J. Appl. Polym. Sci.	98	9-14	2005

M. and Yoshida, J.	gene delivery vector.				
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
Eiji Konishi, Saori Kosugi, and Jun-ichi Imoto	Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice.	<i>Vaccine</i>		in press	2006
Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi	Mosquito cells infected with Japanese encephalitis virus release slowly-sedimenting hemagglutinin particles in association with intracellular formation of smooth membrane structures.	<i>Microbiology and Immunology</i>		in press	2006
Eiji Konishi, Mizue Shoda, Seigo Yamamoto, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya, and Nobuhiko Okabe	Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: A nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein	<i>Vaccine</i>		in press	2006
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
永安聖二、戸梶彰彦、森山ゆり、千屋誠造、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎	日本脳炎流行予測調査に用いた豚血清からの日本脳炎ウイルスの分離と遺伝子解析	高知衛研報	51	29-31	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—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	313-317	2005
高崎智彦	日本の予防接種・海外の予防接種—定期接種対象疾患：日本脳炎ワクチン	臨床と微生物	32	416-465	2005
林昌宏、高崎智彦	フラビウイルス脳炎—ウエストナイルウイルスを中心に—	臨床病理	63	721-727	2005

江下優樹、牛島廣治	再興感染症としてのデング熱とマalaria：特にそれら病原体の媒介蚊について。	小児感染免疫	17	211-219	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	33	28-32	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、デング熱を中心に）	カレントテラピー	27	722-724	2005
小西英二	日本脳炎	<i>Clinical Neuroscience</i>	7	784-785	2005
小西英二	日本脳炎	<i>Modern Physician</i>	25	591-594	2005
小西英二	日本脳炎	小児科診療	68	2128-2132	2005
小西英二	日本脳炎の臨床と疫学	日本臨床	63	2138-2142	2005
小西英二	日本脳炎ワクチンに関する最近の話題	防菌防黴	34	印刷中	2006
小西英二	日本脳炎ウイルスの不顕性感染	小児科	47	印刷中	2006
小西英二	日本脳炎ワクチン接種の問題	クリニカルプラクティス	25	印刷中	2006