

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

(H18-新興-一般-009)

平成18年度総括・分担研究報告書

平成19年3月

主任研究者 小林陸生

国立感染症研究所 昆虫医科学部

15.	銅ファイバーを用いた蚊幼虫駆除に関する研究	
	武藤敦彦他	157
16.	雨水枡から発生する蚊に対する発生源対策の省力化に関する研究 (I)	
	—薬剤処理雨水枡から周辺雨水枡への殺虫剤の効果拡大について—	
	武藤敦彦他	163
17.	自然環境が感染症媒介蚊の発生に与える影響に関する研究 第1報	
	水田英生他	167
18.	蚊のアルボウイルス感受性、大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査、 およびデング熱流行地タイでの媒介蚊調査に関する研究	
	江下優樹他	181
19.	デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子の検出	
	高崎智彦他	189
20.	チクングニヤ熱本邦輸入2症例	
	高崎智彦他	195
21.	日本脳炎ウイルスにおける Genotype shift の生物学的意義	
	倉根一郎他	199
22.	ウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスモデルを用いた低ドーズ DNA ワクチンの中和抗体誘導能に関する研究	
	小西英二他	209
23.	デングウイルス感染の抗体検査に関する研究	
	名和 優他	217
24.	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に関する研究	
	名和 優他	225
25.	マラリア媒介蚊の行動解析に基づく防除対策および国内外の媒介蚊分布調査に 関する研究	
	高木正洋他	229
26.	動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究	
	—特に脳性マラリア発症機構について—	
	松本芳嗣	235
27.	薬剤耐性マラリアの流行拡散に関する疫学研究および海外の高リスク地域の 評価に関する研究	
	小林 潤他	243
28.	重症マラリア患者の管理および治療体制に関する研究	
	狩野繁之他	247
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	253

節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

主任研究者 小林 睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部

研究概要

我が国において、節足動物媒介性感染症は未だにある種のリスクが存在する疾病である。効果的なワクチンが未だ開発されていないデング熱は毎年のように世界規模で流行し、輸入症例も確実に増加している。一方、我が国の日本脳炎(JE)患者数は過去10年ほど顕著に減少が見られるが、豚の抗体調査が示すように、ウイルスの活動は東京以西では毎年100%近く新たな感染が認められている。媒介蚊であるコガタアカイエカのJEV保有状況は非常に高い陽性率を示す地域が確認されており、約2年間にわたって同じ地域の蚊からJEVの分離に成功した。分離株は全てGenotype I型に属し、近年東南アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。兵庫県姫路市の養豚場でのコガタアカイエカの季節消長とウイルスの分離に関して、8月上旬から感染蚊が捕集され始め、9月上旬までウイルスが検出された。9月上旬には豚舎周辺や住宅地で採集した蚊からもウイルスが分離されたことから、8-9月にかけての日本脳炎患者の発生とある種の関連が示唆された。トラップによる捕集蚊からフラビウイルスの検出、分離を試みている中で、昆虫由来の新規フラビウイルス(CxFV)がアカイエカから分離され、全塩基配列を決定し、遺伝子構造解析を行った。このウイルスは人に病原性のあるフラビウイルスの起源的なウイルスであることが強く示唆された。その後、同様のウイルスの遺伝子がヤブカ類にも認められることが明らかとなり、現在、ウイルスの分離、遺伝子構造解析を行っている。これらのウイルスが日本脳炎、ウエストナイル熱、デング熱などのフラビウイルスの伝播にどのように関わるか明らかにしなければならない。媒介蚊の発生状況調査においては、東京都および近郊でのコガタアカイエカの成虫捕集調査、北海道、鹿児島、東京都での渡り鳥飛来地での成虫捕集調査およびウイルスの検出を行い、東京都内で、近隣に水田が全く存在しない都会地でコガタアカイエカが200匹ほど捕集された。また、東京湾岸の干潟で日本脳炎ウイルスに高い感受性を示すイナトミシオカの生息が確認された。サロベツ原野の砂丘林で捕集された蚊は北方系の蚊が多く、林内で激しく人を襲う。腹部に血液を持った吸血蚊からエゾシカの血液が同定されたが、野鳥の血液は全く検出されなかった。兵庫県西宮市で、市内全域を10地区に分けて、幼虫発生源としての雨水枡の分布、有水率、発生幼虫の同定、污水管、マンホールの調査を行い、膨大な調査結果を得た。これらの結果を地理情報システム(GIS)で解析を行い、各調査地の雨水枡には全て分類番号が打たれ個々の場所が特定できるように整理した。今までに道路、公園、公共施設にある雨水枡約11,000

個を調査し、有水率、発生幼虫の種類などのデータが収集されている。横浜市、富山県、千葉県などの地方自治体での媒介蚊の調査研究において、媒介蚊の発生状況調査および一部実際に薬剤を用いた防除試験が行われた。雨水枡の幼虫発生を数ヶ月間抑える効果のある地域と、あまり効果が持続しない地域など、地域、薬剤の種類などで異なる結果を得た。我が国のコガタアカイエカは有機リン剤に対して高い抵抗性を示し、この抵抗性機構は殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性中心に近い部分のアミノ酸置換が原因であることが明らかとなっている。今回、本土、南西諸島、タイ、ベトナム、セイロンなどからコガタアカイエカを採集し、AChE の遺伝子のアミノ酸置換部位周辺の塩基配列多型を調べた。その結果、蚊の移動と殺虫剤散布によって、1つの突然変異に由来する抵抗性遺伝子が過去 50 年間にアジア地域に広く分布を広げたことが明らかとなった。

日本脳炎ウイルスは 5 つの遺伝子型 (genotype) が知られているが、1990 年以降 3 型 (genotype 3) から 1 型 (genotype 1) への genotype shift が報告されている。実際、最近媒介蚊、ブタから分離されるウイルスはほとんどが genotype 1 である。この変化がどのような機構で起こったのか、1 型と 3 型のキメラウイルスを作製し、哺乳動物、蚊由来培養細胞、神経由来細胞内での増殖能を比較した。1 型のウイルスが哺乳動物の細胞での増殖に優れていること、および病原性の低下に関連していることなどが示唆された。ウエストナイル DNA ワクチンが、蛋白 (不活化ウエストナイルワクチン) との混合投与により、少量でマウスに中和抗体を誘導できることが明らかとなり、大動物 (ブタ) でも蛋白との混合投与により中和抗体を誘導した。この方法は日本脳炎ワクチンでも同様の効果が確認され、不活化ワクチンの 1/100 のドーズと 1 μ g の DNA ワクチンの混合でブタで中和抗体を誘導した。より安価な方法の開発が開発途上国でのワクチン接種の普及に貢献すると考えられる。デングウイルス感染の診断に関し、尿および唾液中に分泌される抗体および直接遺伝子を検出する方法を検討した。また、苦痛を伴う採血をしない方法は、検査を容易に行うことを可能にする。日本人デング患者の血清、尿および唾液を経日的に採取し、ウイルス遺伝子検出、および IgA、IgM 抗体産生を解析した。輸入デング熱の 9 症例の内 2 症例の尿および唾液から遺伝子を検出することに成功した。また、デングウイルス感染者および被疑者の尿検体より IgA、IgM 抗体検出が可能で、尿中の抗体の検出が有用であることが示された。デングウイルスの細胞への感染機構の解析で、マウスの樹状細胞 (DC) にウイルスを感染させ、骨髄由来 DC の細胞増殖・活性化が C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウス共に認められ、感染 DC において蛍光抗体法でウイルス抗原 (E 蛋白、Pr M) が発現することが明らかとなった。

最近、我が国のマラリアは輸入患者が年間 80-100 名ほど報告されている。臨床医のマラリアに関する知識、治療経験がほとんどなく、患者の適切な管理に関する情報が必要である。海外渡航者 107 名に予防内服薬 (メフロキン) を投薬し、帰国後のフォローアップを行った。マラリア予防ガイドラインの改訂に向けて、予防内服の実施基準を中心に議論を行い改訂版の編集を行っている。脳性マラリアの発症機序に関し、リスザルおよび患者脳

について病理組織学的解析を行い、フィブリノーゲンおよび IgG が血管外および脳実質へ拡散した陽性反応を認めた。これらの結果より、血管周囲への出血、血漿成分の漏出が脳性マラリアの特徴的な病理像の一つであること、血液脳関門の破綻が脳性マラリアの発症に深く関わり、死亡に関わる可能性が示唆された。マラリア媒介蚊に関しては、中国、タイでコガタハマダラカの吸血嗜好性の調査を人および水牛囮法で行い、季節によって人吸血活性に差がみられること、季節によって吸血源に飛来する個体数に大きな差が認められた。

分担研究者

當間孝子	琉球大学 教授
澤邊京子	国立感染症研究所 室長
江下優樹	大分大学 助教授
狩野繁之	国立国際医療センター 研究所 部長
松本芳嗣	東京大学大学院 助教授
高木正洋	長崎大学熱帯医学研究所 教授
小林 潤	国立国際医療センター 研究所 厚生労働技官
高崎智彦	国立感染症研究所 室長
小西英二	神戸大学 助教授
倉根一郎	国立感染症研究所 部長
名和 優	埼玉医科大学 講師
水田 英生	大阪検疫所 次長

抗体が高率に検出されている。しかし、ワクチン接種および蚊に刺されにくい家屋構造が患者発生数を抑えていると考えられており、地方または地域によっては、小児へのワクチン接種が必須であると考えられる。一方、マラリアはアフリカ大陸のサハラ砂漠以南の諸国で猛威をふるっており、インド、中近東、東南アジア、中国でも多数の患者が発生しており、毎年、80-100万人ほどの乳幼児の死亡の原因となっている。デング熱は中南米、カリブ海諸国、西太平洋諸国、インド、東南アジア等で数年おきに世界規模の流行が起こっており、熱帯・亜熱帯地域で重要な蚊媒介性感染症である。両疾患は現在、輸入症例として50-100名ほどが報告されている。また、2005~2006年にかけて、インド洋諸国（モーリシャス、レユニオン、セーシェル、マヨット、コモロ）でヒトスジシマカが媒介するチクングニヤの大規模な流行が起こった。このウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類されており、我が国に分布しているヒトスジシマカ、アフリカ、インド、東南アジアに分布するネッタシマカが媒介する。今回、レユニオン島では、全人口の約1/3に当たる24万人が感染し、200名以上の死亡が報告されている。このウイルス感染症は、血液中のウイルス数がデング熱よ

A. 研究目的

我が国では種々の節足動物媒介性感染症が第二次世界大戦前後には流行していたが、戦後の急激な復興に伴う衛生状態の改善、有効な殺虫剤の普及、経済成長など種々の要因で患者発生数は激減し、1960年代にはマラリア、フィラリア、発疹チフスなどの疾病は国内感染が認められなくなった。しかし、日本脳炎(JE)は西日本を中心にウイルスの活動が活発に起こっており、ブタの

りも多いとされており、人から人への感染が起こりやすく、我が国でも輸入患者からの国内感染の可能性が否定できない。

1960年代の日本脳炎(JE)の大規模な流行後、患者数は急激に減少し、1990年代以降は蚊が媒介する感染症の大きな流行がなく、媒介蚊対策の重要性はともすれば多くの自治体で忘れ去られたかに見える。ウエストナイルウイルス(WNV)が万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する能力のあるアカイエカ種群の蚊が都市部を中心に多数生息していることを考えると、相当広範囲にWNVが広がる可能性が予想される。現在、媒介蚊の発生状況調査を行っている地方自治体は一部の府県に限られており、最近までの調査目的は日本脳炎の流行予測に関連する蚊の捕集で、郊外の水田地帯にある牛舎や豚舎での成虫捕集調査であった。しかし、WNVの我が国への侵入を想定した場合、人口密度が高い都市部の媒介蚊の発生状況調査が必要である。1999年にニューヨークで突然流行が起こったウエストナイル熱は、7年間でほぼ全米にウイルスの活動域が広がり、現在までに23,707人の患者が発生し、928人が死亡している。渡り鳥、飛行機、船舶等による感染蚊の移入などにより、我が国でいつウエストナイル熱が流行するか予断を許さない状況である。

また、最近の顕著な地球規模での温暖化傾向は、今後、節足動物が媒介する感染症がどのような流行を起こすか予測しがたい状況にある。現在までに都市部での成虫および幼虫の発生状況、アカイエカ種群の分子および形態的分類、殺虫剤抵抗性の発達

状況、蚊の吸血源動物の同定などを行い、地域によっては、蚊が媒介する感染症の流行の可能性が否定できないとの結果を得ている。H18年度の本研究事業において、疾病を媒介する蚊に関して、人口が密集している都市部の発生状況調査を地方自治体(兵庫県西宮市)と共同で行い、どのぐらいの数の雨水枡に幼虫が発生しているか、水の溜まっている雨水枡がどの程度の割合かなど、膨大な調査結果を収集した。また、アカイエカ種群とヒトスジシマカの比率に関しても貴重な結果を得た。これらの調査結果をもとに、一般住宅での調査をより充実させて、都市全体の防除対象水域の数の推定を行う。それらのデータを地理情報システムで管理し、実際の防除対策の立案に利用できるように準備することが重要と考えられる。

日本各地で採集されたコガタアカイエカからJEVの分離を積極的に行い、得られたウイルス分離株における遺伝子解析を行うことにより、地域間に見られるウイルスの遺伝的關係を明らかにし、ウイルスの我が国での越冬生態の解明を試みる。また、我が国の都市部に分布する数種の蚊に関してJEVに対する感受性を再検討し、都市部で採集されたアカイエカ、ヒトスジシマカなどからのウイルスの検出の実態を評価する。また、デング熱が流行している東南アジアでネッタシマカを採集し、ウイルスの保有状況を解析し、患者が発生した住宅周辺における成虫防除の重要性を解析する。アカイエカから分離された新規フラビウイルス(CxFV)に関しては、遺伝子構造解析を行ったが、病原性のあるフラビウイルスに対する干渉作用が認められるか重要な問題で

ある。媒介蚊の CxFeV は起源的なウイルスであることが判明し、アカイエカ以外の蚊種に関しても、より詳細に調査し、同様の昆虫フラビウイルスが存在する可能性を検討する。

DNA ワクチンの開発で中和抗体の誘導を積極的に促す接種法の開発が求められている。より安価なワクチン開発を目指すために、DNA ワクチンに従来のワクチンを混合して接種する方法の検討を行い、従来の投与量の 1/10~1/100 程度の量で中和抗体を誘導する方法を詳細に検討する。デング熱の診断法は、急性期の血液からのウイルスの分離、遺伝子の検出が困難なため、抗体による血清診断が必要となる。また、我が国では、日本脳炎のワクチン接種が行われているため、抗体価の判定が難しい場合が見られる。そこで、患者の尿および唾液からの抗体や遺伝子の検出が可能か輸入デング熱患者の検体を入手して検討を行った。

マラリア（熱帯熱マラリア）はアフリカのサハラ砂漠以南の諸国で猛威をふるっており、乳幼児の主要な死亡原因となっている。また、インド、中近東諸国、タイ、ミャンマー、カンボジア、中国南部の山間部および平野部においても、熱帯熱マラリアと三日熱マラリアの患者が多数発生しており、我が国の驚異となっている。また、韓国では 1993 年から非武装地帯を中心に三日熱マラリアが発生し、その後、軍人のみならず民間人にも 5,000 名を超す患者が全国的に発生した。このように、我が国を取り巻く節足動物媒介性感染症の流行状況は常にある種のリスクを伴っており、我が国の媒介蚊の調査および対策は平時から行うことが重要と考えられる。また、輸入感染

症として我が国に発生するマラリアに関しては、医療関係者のマラリアに関する知識、理解が不足しており、適切な治療が行われているか疑問視する意見も散見されている。

重症マラリアの治療に関する問題点を解決する目的で、「マラリア予防ガイドライン」の評価研究を行い、同ガイドラインの改定を行っている。また、医療センター内の渡航者健康管理室を訪れ、海外におけるマラリアに関しての相談者に対して予防内服薬の投薬を行い、予防効果、副作用等の調査を行った。また ATV (Artemisin combination therapy) の臨床評価をマヒドン大学および同センターで行った。

脳性マラリアの発症機序をリスザルおよび患者脳を用いて病理組織学的に解析し、フィブリノーゲンおよび IgG が血管外および脳実質へ拡散することを検討する。これらの病理反応を CT や MRI による画像解析で行い、早期診断法の確立を目指す。

B. 研究方法

1) 成虫の発生状況調査

富山県の農村地域の中規模住宅団地内、東京都健康安全センター、国立感染症研究所、渡り鳥飛来地である東京湾岸の谷津干潟および東京港野鳥公園、北海道サロベツ原野、秋田県大仙市と秋田市、富山県上市市、高知県安芸市と大月町、長崎県諫早市、兵庫県姫路市と西宮市、千葉県千葉市、タイおよび中国雲南省で、日本脳炎ウイルス媒介蚊であるコガタアカイエカ、ウエストナイルウイルスの媒介蚊と考えられているアカイエカ、チカイエカ、デング熱およびチクングニヤ熱の媒介蚊であるヒトスジシマカ、マラリアの媒介蚊であるコガタハマ

ダラカの捕集を行った。成虫の捕集は、ブラックライト型のライトトラップ、ドライアイス誘因源とした CDC 型のライトトラップ、人囿法、捕虫網によるスリーピング法によった。

2) 幼虫の発生状況調査

幼虫の調査は成虫捕集場所周辺を中心に行ったが、都市部の雨水マスに関しては柄杓を用いて四隅を掬う方法、ピペットで小水域から直接幼虫を採集する方法、野外の湿地や水田から幼虫を柄杓によって掬い取る方法で行った。採集幼虫は数を数え、種類の同定のため容器に入れて実験室に持ち帰り、必要によっては羽化成虫で同定を行った。

3) 蚊の分類および同定

幼虫および蛹の形態、羽化成虫の形態同定を行ったが、アカイエカ種群の分類は個眼数を数える方法、歩脚から抽出した DNA と特異的プライマーを用いた分子分類によった。

4) 野外捕集蚊からのウイルスの検出

フラビウイルスの検出法は種々知られているが、宮城、富山、高知、長崎等で捕集されたコガタアカイエカ成虫 20 匹を 1 プールとしウイルスの検出および分離を試みた。2006 年は全体で約 3,131 匹から 189 プールを作成し、MEM 培地で磨砕後、ヒトスジシマカ由来の細胞株である C6/36 に接種し、7 日間培養した。培養上清を再度新しい培地に接種し、細胞変性 (CPE) を確認した。継代培養上清からウイルス RNA を抽出し、フラビウイルス特異的な塩基配列をプローブにして RT-PCR で検出を試みた。

また、PCR の陽性産物はダイレクトシーケンスで塩基配列を解読した。一部の培養

上清は、日本脳炎ウイルス (JEV) の検出のために、リアルタイム PCR 用に開発された反応系で JEV の検出を試みた。また、CPE 陽性を示すが、JEV および WNV が RT-PCR で陰性のプールがアカイエカおよびコガタアカイエカから検出され、新規フラビウイルスとして遺伝子解析を行った。

5) アジアにおける殺虫剤抵抗性遺伝子の分布

本州、南大東島、沖縄本島、西表島、タイ、ベトナム、スリランカ、インドネシア由来のコガタアカイエカの *Ace2* エステラーゼ遺伝子の塩基置換の多型を解析した。PCR 法で *Ace2* 遺伝子の F455 座位を含む 1 つのエクソンの一部を増幅し、609 塩基長の配列を解析した。

6) 新規フラビウイルスの遺伝子構造解析

C6/36 の培養細胞で弱い変性を認めたものを 3 回継代培養し、その上清から RNA を抽出し、E、NS3 および NS5 の領域にプライマーを設計し、Long-PCR 法によるウイルスゲノムの大部分を包括する断片の増幅を行った。さらに得られた配列情報から特異的プライマーを設計し、RACE 法によるウイルスゲノムの増幅を行った。

7) 西宮市における幼虫発生源調査

市内を 10 地区に分け、各々の地区内の町数の 10% に当たる地域で、その地域に存在する全ての道路、小・中学校各 1 校、幼稚園、保育園は 1-6 カ所、体育館およびその他の市の施設に存在する全ての雨水マス、污水管、マンホール等の位置と数を記録し、その場所を地図上に記録し、水が停滞していた場合を有水マスとし、幼虫の生息を柄杓を用いて確認した。

8) 幼虫発生源に関する地理情報システム

の応用

西宮市土木局土木管理課で作成され、入手が可能な 1:2,500 西宮市地形図とデジタルマップデータファイルを用いた。これは GIS ソフトウェア MapInfo で動作する。多くの地図情報が判読でき、今回の調査地点を地図上に現わすことが可能である。現地調査ではゼンリンの住宅地図に調査地域全域の雨水マスとマンホールを記入し、コード化してそれぞれに番号を付けた。1:2,500 の基本地図に雨水マスの位置を転写し、A0 サイズのままスキャナーで取り込み、tif ファイルにして ArcView で展開できるデジタルマップを作成した。

9) 雨水マスの幼虫防除試験

富山市においては、農村地帯の中規模住宅団地において、雨水マスにフェニトロチオン 5%・フタルスリン 0.5%の 50 倍水性剤を 5-9 月にかけて処理し、防除効果の判定を行った。横浜市では、保土ヶ谷区、中区、南区、旭区、磯子区で昆虫成長阻害剤として知られ、周辺および水系環境に影響が少ないと考えられているジフルベンズロン、有機リン剤であるフェニトロチオンを用いて、防除試験を行った。ジフルベンズロンは 1%発泡錠をマス当たり 1 錠、フェニトロチオンは 10%乳剤を用い、雨水マス中で約 2mg/L になるように希釈して散布した。

10) 銅ファイバーを用いた幼虫駆除

容器に銅ファイバー、または黄銅ファイバーを 0.5g/L, 1.5g/L, 4.5g/L になるように調整し、アカイエカの 1 令および 4 令幼虫を入れて羽化までの日数、死亡率を調査した。また、公園内の雨水マスに実験室で用いた銅ファイバーと同様の濃度になるようにファイバーをいれ、経時的に柄杓

を用いて幼虫密度を調査した。

11) 蚊のアルボウイルス感受性

日本脳炎ウイルスの遺伝子型変遷に伴う蚊の感受性を再検討するために genotype 3 および genotype 1 のウイルスを継代飼育しているコガタアカイエカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ、アカイエカ等に微量注射および経口的に接種した。

12) デング熱患者の尿、唾液よりのウイルス遺伝子および抗体の検出

デングウイルスの遺伝子の検出はリアルタイム PCR 法により行い、患者血清の抗体は IgM-補足 ELISA kit および IgG-ELISA kit により検出した。尿中の IgA 特異的抗体の検出は、尿希釈 1:2~1:64 の範囲で、ELISA で検出した。

13) 日本脳炎ウイルスの genotype shift に関する解析

JEVME41/2002 株のウイルス cDNA を 4 つの領域に分けて PCR で増幅し、4 つの断片を 1 つのプラスミドベクターに順次連結し、最終的に完全長の日本脳炎ウイルス genotype 1 型をコードする cDNA クローンを構築した。その後、完全長ウイルス RNA を得た。組み替えウイルスクローンをを用いて、genotype 3 型の Nakayama 株、Beijing-1 株に置換したキメラウイルスを作製し、ほ乳類、蚊、神経由来細胞での増殖能やマウスでの病原性の解析を行った。

14) チクングニヤ熱患者の診断法の確立

フランスパスツール研究所からチクングニヤ患者血清を入手し、Anti-CHIKV 抗体は米国 ATCC から輸入した。抗原としては感染研内で保存されていた Af 株および BaH306 株を用い、IgM 補足 ELISA 法で抗体価を測定した。中和試験はプラーク減少法により

測定した。

15) 低ドーズ DNA ワクチンの中和抗体誘導能の評価

ウエストナイル DNA ワクチン (pcWNME) は WNV の prM/ME 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組み込み作製した。日本脳炎 DNA ワクチン (pNJEME) は JEV の prM/E 遺伝子を pNGVL4a ベクターに組み込み作製した。マウス (ICR & ddY) に pcWNME と WNVAX を混合して、単独で大腿部内側に投与した。投与はジェット式針無注射器を用いた。ブタの実験では 4 週齢 (クラウンミニ系) に pNJEME と JEVAX の混合液を麻酔下でジェット式針無注射器で投与した。投与後 1 週間間隔で採血し、中和抗体価を測定した。

C. 研究結果

① 幼虫の発生状況調査および防除試験

兵庫県西宮市で、市内全域を 10 地区に分けて、幼虫発生源としての雨水枡の分布、有水率、発生幼虫の同定、污水管、マンホールに関する調査結果をデジタルマップにそれぞれ正確に記録し、膨大な調査結果を得た。

西宮市全体の面積の約 5% を調査区域に設定し、それぞれの地域の総町数の 10% にあたる町数を無作為に抽出した。小学校、中学校の敷地内には 40-100 個ほどの雨水マスが存在し、平均でそれらの約 34% に水が溜まっていた。この傾向は、中学校においてもほぼ同様であった。一方、道路に存在する雨水マスでは、幹線道路の雨水マスにより高率に水が溜まっている傾向が見られ、全体的な有水率は 1-17% と低く、平均でも約 9% であった。一方、西宮の地形と関係すると思われるが、海岸に近い地区では

有水率が高く、中央部および丘陵での有水率は低い傾向が認められた。道路雨水マスは 43 町で 7,765 カ所を調査し、それぞれの雨水マスの位置をデジタルマップに記録するために地理情報システム (GIS) で解析を行い、各調査地の雨水枡には全て分類番号が打たれ個々の場所が特定できるように整理した。また、公園 (682 カ所)、公共施設 (1,695 カ所) に関するも有水率、発生幼虫の種類などのデータを収集した。幼虫の種類構成は、ヒトスジシマカおよびアカイエカ種群が大半で、ヒトスジシマカの比率がアカイエカ種群より高い傾向が認められた。また、今年度の調査で、40 カ所ほど認められた調整池、141 カ所で調査した防火水槽、分流式および合流式の污水管にはほとんど幼虫の発生が認められず、蚊が媒介する感染症の緊急対策として、防除対象水系から除外することが可能と判断された。

横浜市、富山県、千葉県などの地方自治体での媒介蚊の調査研究において、媒介蚊の発生状況調査および一部実際に薬剤を用いた防除試験が行われた。昆虫成長阻害剤であるジフルベンズロンの処理において、ある地域では 1 ヶ月以上にわたって成虫発生を抑える効果が認められたが、同様の薬剤を用いた別の地域での試験では、効果の持続が短く、結果にばらつきが認められた。効果的な幼虫対策を行う上での地道な調査試験がいろいろな環境、地域で行われることにより詳細な結果を得ることができる。

② 成虫の発生状況調査

媒介蚊の発生状況調査においては、東京都および近郊でのコガタアカイエカの成虫捕集調査、北海道、鹿児島、東京都での渡り鳥飛来地での成虫捕集調査を行い、東京

都内で、近隣に水田が全く存在しない都会地でコガタアカイエカが100頭以上捕集されることが明らかとなった。東京湾岸の干潟で日本脳炎ウイルスに高い感受性を示すイナトミシオカの生息が東日本で始めて確認された。東京湾の干潟では、幹線道路や工場等が隣接している小規模で人工的な造成地にも関わらず、渡り鳥や留鳥が生息し、周辺の水域でアカイエカ、コガタアカイエカ、イナトミシオカなどの蚊の幼虫の発生および成虫が確認された。北海道の北端に近いサロベツ原野の砂丘林で捕集された蚊は北方系の蚊が多く、林内で調査に入った人を激しく襲うことが明らかとなった。腹部に血液を持った吸血蚊の血液分析でエゾシカの血液が多数同定されたが、野鳥の血液は全く検出されなかった。

③媒介蚊成虫捕集とウイルスの検出

我が国の日本脳炎(JE)患者数は過去10年ほど顕著に減少が見られるが、豚の抗体調査が示すように、ウイルスの活動は東京以西では毎年100%近く新たな感染が認められている。媒介蚊であるコガタアカイエカのJEV保有状況は、非常に高い陽性率を示す地域が確認されており、約2年間にわたって同じ地域の蚊からJEVの分離に成功した。分離株は全て genotype I型に属し、近年東南アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。今までに、コガタアカイエカから50株以上を分離しているが、各々の分離株の遺伝子解析は一部しか終了しておらず、四国、九州地区におけるウイルスの系統関係の解析結果が待たれる。兵庫県姫路市の養豚場でのコガタアカイエカの季節消長とウイルスの

分離に関して、8月上旬から感染蚊が捕集され始め、9月上旬までウイルスが検出された。9月上旬では豚舎周辺や住宅地で採集した蚊からもウイルスが分離されたことから、8~9月にかけての日本脳炎患者の発生とある種の関連が示唆された。また、今回、渡り鳥飛来地における蚊からのフラビウイルスの検出を試みたが、ウエストナイルウイルスは全く検出されなかった。

④アカイエカからの新規フラビウイルス(CxFV)の分離と遺伝子構造解析

トラップによる捕集蚊からフラビウイルスの検出、分離を試みている中で、培養細胞のC6/36に弱いCPE(細胞変性)を起こすものが確認され、JE、WNVでないが、フラビウイルスに対する陽性反応が認められた。これらを継代培養し、昆虫由来の新規フラビウイルスがアカイエカから分離された。全塩基配列を決定し、遺伝子構造解析を行い、明らかにフラビウイルスの構造を持っているが、既知のウイルスと異なることが明らかとなった。このウイルスは人に病原性のあるフラビウイルスの起源的なウイルスであることが強く示唆された。その後、同様のウイルスの遺伝子がヤブカ類にも認められることが明らかとなり、現在、ウイルスの分離、遺伝子構造の解析を行っている。

⑤コガタアカイエカの殺虫剤抵抗性遺伝子の塩基配列多型

我が国のコガタアカイエカは有機リン剤に対して高い抵抗性を示し、この抵抗性機構は殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の活性中心に近い部

分のアミノ酸置換が原因であることが明らかとなっている。今回、本土、南西諸島、タイ、ベトナム、セイロンなどからコガタアカイエカを採集し、AChE の遺伝子のアミノ酸置換部位周辺の塩基配列多型を調べた。その結果、蚊の移動と殺虫剤散布によって、1つの突然変異に由来する抵抗性遺伝子が過去 50 年間にアジア地域に広く分布を広げたことが明らかとなった。

⑥日本脳炎ウイルスの genotype shift の解析と病原性に与える影響

日本脳炎ウイルスは5つの genotype が知られているが、1990 年以降3型から1型への genotype shift が報告されている。実際、最近媒介蚊、ブタから分離されるウイルスはほとんどが genotype 1 である。この変化がどのような機構で起こったのか、1型と3型のキメラウイルスを作製し、哺乳動物、蚊由来培養細胞、神経由来細胞内での増殖能を比較した。1型のウイルスが哺乳動物の細胞での増殖に優れていること、および病原性の低下に関連していることなどが示唆された。

⑦DNA ワクチンの開発

ウエストナイル DNA ワクチンが、蛋白(不活化ウエストナイルワクチン)との混合投与により、少量でマウスに中和抗体を誘導できることが明らかとなり、大動物(ブタ)でも蛋白との混合投与により中和抗体を誘導することが示された。この方法は日本脳炎ワクチンでも同様の効果が確認され、不活化ワクチンの 1/100 のドーズと 1 μ g の DNA ワクチンの混合投与を行うことにより、ブタで中和抗体を誘導した。より安価

な方法の開発が開発途上国でのワクチン接種の普及に貢献すると考えられる。

⑧デング熱患者の尿、唾液からのウイルス遺伝子および抗体の検出

デングウイルス感染の診断に関し、尿および唾液中に分泌される抗体および直接遺伝子を検出する方法を検討した。また、苦痛を伴う採血をしない方法は、小児においても受け入れやすい検査である。日本人デング患者より血清、尿および唾液を経日的に採取し、ウイルス遺伝子検出、および IgA, IgM 抗体産生を解析した。輸入デング熱の9症例の内2症例の尿および唾液から遺伝子を検出することに成功した。また、デングウイルス感染者および被疑者の尿検体より IgA, IgM 抗体検出が可能で、尿中の抗体の検出が有用であることが示された。

⑨重症マラリアの管理および治療体制

臨床医のマラリアに関する知識、治療経験がほとんどなく、患者の適切な管理に関する情報が必要である。「マラリア予防ガイドライン」を評価するためにマラリア流行地に渡航する 107 人に対して、メフロキンを予防内服のために投与し、帰国後再来院した 55 名に関して予防効果等の評価を行った。42 人は指示通りに予防内服を行い、12 人は途中で内服を中止し、2 人はアドバイスに従わなかった。55 人中 12 人は何らかの副作用を示したが、一人もマラリアに罹患しなかった。ガイドラインに関しては予防内服の項目における実施基準の適応について重点的に討議を行った。また、マラリアの流行状況、特に熱帯熱マラリアの高度流行地域への渡航に関して、より注

意を喚起する意味で、「絶対的適応」と「相対的適応」の2種類に予防内服の実施基準を分けた。アルテミシン誘導体との混合療法(ACT療法)に関して、マヒドン大学と国立国際医療センターに入院した重症例に関して臨床評価を行い、三日熱、四日熱、卵形マラリア患者に良い治療成績を得、医療センターでの重症熱帯熱マラリア患者の治療においても著効が認められた。

⑩脳性マラリアの発症機序

脳性マラリアの発症機序に関し、リスザルに熱帯熱マラリアの感染赤血球 10^9 個を接種し、6頭が感染後8から12日までに原虫血症20%以上を示し、15日までに全頭が昏睡を来した。得られた脳組織について病理組織学的解析を行い、数十個の赤血球が血管周囲に漏出した像が観察され、輪状出血像では、感染赤血球が認められた。フィブリノーゲンおよびIgGが血管周辺に広く拡散したような反応像が認められた。熱帯熱マラリア患者の脳の標本においても同様の病理学的変化が認められた。これらの結果より、血管周囲への出血、血漿成分の漏出が脳性マラリアの特徴的な病理像の一つであること、血液脳関門の破綻が脳性マラリアの発症に深く関わり、死亡に関わる可能性が示唆された。

⑪東南アジアにおけるマラリア対策

ミャンマーにおけるマラリア危険地帯に居住している住民の61%が殺虫剤浸透蚊帳の普及地域に住んでおり、蚊帳の普及率は2001年と比べると格段に向上している。しかし、住民の殺虫剤浸透蚊帳に関する理解がないことから、殺虫剤浸透蚊帳の充分

な管理がなされていないとの指摘がある。村落および住民への啓発活動の改善が必要と判断された。また、薬剤耐性マラリアのモニタリングの強化が今後必要との調査結果を得た。

⑫マラリア媒介蚊の行動解析

マラリア媒介蚊に関しては、中国、ベトナム、タイ等で成虫捕集調査を行った。13種のハマダラカが捕集され、北部タイでの捕集結果では、*An. minimus*が多数採集され、*An. dirus*もある程度多く捕集された。一方、水田や沼沢地で発生する*An. hyrcanus*や*An. conitus*が少ないことも特徴的であった。人囿法による成虫の捕集においては、*An. dirus*が人吸血嗜好性が高く、次に*An. minimus*が続いた。吸血嗜好性を、人囿および水牛囿での捕集数および人囿捕集数の比率で比較した結果、11~4月の乾期には人吸血比率が減少し、雨期には明らかに高くなる傾向が認められた。しかし、雨期の捕集蚊数が乾期と比べて少ないことから、今後のより詳細な解析が必要と考えられる。

D. 考察

マラリア、フィラリア症、デング熱、発疹チフスなど節足動物が媒介する感染症の流行が第二次世界大戦後にも認められていた。しかし、戦後の急激な復興に伴う衛生状態の改善、有効な殺虫剤の普及、経済成長など種々の要因で患者発生数は激減し、マラリア、フィラリア、デング熱、発疹チフスなどの疾病は国内感染が認められなくなった。しかし、日本脳炎(JE)は現在でも西日本を中心にウイルスが活発に活動して

おり、ブタの抗体が高率に検出されている。1990年代から日本脳炎の患者数が減少しており、ワクチン接種、コガタアカイエカの個体数の減少、養豚場の郊外への移転、蚊に刺されにくい家屋構造など、種々の要因が関係していると考えられている。一方、マラリアはアフリカ大陸のサハラ砂漠以南の諸国で猛威をふるっており、インド、中近東、東南アジア、中国で多数の患者が発生しており、毎年、80-100万人ほどの乳幼児の死亡の原因となっている。デング熱は数年おきに世界規模で大きな流行が起こっており、熱帯・亜熱帯地域で重要な蚊媒介性感染症である。また、2005～2006年にかけて、インド洋諸国（モーリシャス、レユニオン、セーシェル、マヨット、コモロ）、インド、スリランカ等で主にヒトスジシマカが媒介するチクングニヤ熱の大きな流行が起こった。レユニオン島では、全人口の約1/3にあたる24万人が感染し、200名以上の死亡が報告されている。このウイルス感染症は、血液中のウイルス数がデング熱よりも多いとされており、人から人への感染が起こりやすく、我が国でも輸入患者からの国内感染の可能性が否定できないため、「健康危険情報」を2名の患者の確定診断後に提出した。

1999年に米国のニューヨークで突然流行したウエストナイル熱は、多くの種類の野鳥でウイルスが増殖し、60種以上の蚊からウイルスが検出された。その意味で、デング熱や日本脳炎とは疾病疫学的に大きくことなるウイルス感染症である。ウエストナイルウイルス(WNV)が万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する能力

のあるアカイエカ種群の蚊が都市部を中心に多数存在することを考えると、相当広範囲に流行が起こる可能性が予想される。現在、媒介蚊の発生状況調査を行っている地方自治体は一部の府県に限られており、最近までの調査目的は日本脳炎の流行予測に関連する水田地帯での蚊の捕集であった。しかし、WNVの我が国への侵入を想定した場合、人口密度が高い都市部の媒介蚊の発生状況調査が必要である。兵庫県西宮市における媒介蚊幼虫の全市的な調査では、道路、公共施設、公園の雨水マスの数、水が溜まっている雨水マスの率（有水率）を詳細に調査した。全市の総面積の約5%が調査対象となり、膨大なデータが地理情報システムを利用して解析された。その結果、道路の雨水マスに関しては地形によって有水率に差が存在すること、また、一部の施設においても同様の結果を得た。また、污水管、調整池、防火水槽の調査では、幼虫がほとんど発生しておらず、緊急時の防除対象として除外することが可能であることが示された。

最近の顕著な地球規模での温暖化傾向は、今後、媒介蚊の発生にどのように影響を与えるか予測しがたい状況にある。現在までに都市部での蚊の発生状況をほぼ把握し、アカイエカ種群の分子および形態的同定法の確立、殺虫剤抵抗性の発達状況、蚊の吸血源動物の同定などを行い、基礎的な媒介蚊に関する情報を収集してきた。また、都市部において、アカイエカ種群とヒトスジシマカの比率に関しても貴重な結果を得、道路、公園に存在する雨水マスが両種の重要な発生源となっていることを明らかにしてきた。これらの調査結果をもとに、一般

住宅での調査をより充実させて、都市全体の防除対策の立案を行う。

日本各地で採集されたコガタアカイエカから JEV の分離を積極的に行い、得られたウイルス分離株における遺伝子解析を行っている。今までに分離された株の遺伝子型は全て genotype 1 に属するもので、東南アジアでの分離株と類似性が高い。一方、我が国に分布する数種の蚊の JEV に対する感受性を再検討し、ヤマトヤブカに感受性が認められている。また、デング熱が流行しているタイで、患者宅の屋内外でネッタイシマカを採集し、ウイルスの保有状況を解析したが、高率にウイルスが検出された。このことは、デング熱として確定診断がなされた後、患者宅周辺での殺虫剤散布はウイルスを持った感染蚊を効率よく防除するのに貢献すると考えられ、WHO が推奨している防除法に科学的根拠を与えた。

アカイエカから分離した新規フラビウイルス (Cx₁FV) に関しては、遺伝子構造解析を行ったが、アカイエカ集団のうちどの程度の個体に Cx₁FV が存在するのか、感染蚊から垂直伝播によって次代にウイルスが伝播するのか、他種のフラビウイルスに対して干渉作用を示すのかなど、種々の解決しなければならない問題がある。フラビウイルスの進化から考察した場合、新たに分離された Cx₁FV は起源的なウイルスであることが判明し、アカイエカ以外の蚊種に関しても、より詳細な調査が必要である。

DNA ワクチンの開発で中和抗体の誘導を積極的に促す接種法の開発が求められている。より安価なワクチン開発を目指すために、DNA ワクチンに従来のワクチンを混合して接種する方法の検討を行い、従来の投

与量の 1/10~1/100 程度の量で中和抗体を誘導できることが明らかとなった。デング熱の診断法は、急性期の血液からのウイルスの分離、遺伝子の検出が困難なことが多く、抗体による血清診断によることが多い。そこで、患者の尿および唾液からの特異的抗体やウイルス遺伝子の検出ができれば、患者に苦痛を与えずに診断が可能となる。輸入デング熱患者の検体を入手して検討を行った結果、患者の一部の唾液および尿からウイルス遺伝子の検出に成功した。また、尿から IgA 抗体を検出することに成功した。

重症マラリアの治療に関する問題点を解決する目的で、「マラリア予防ガイドライン」の評価研究を行い、同ガイドラインの改定を行っている。また、医療センター内の渡航者健康管理室を訪れた海外渡航予定者に予防内服薬であるメフロキンを投薬し、予防効果、副作用等の評価を行った。また ATV (Artemisin combination therapy) の臨床評価をマヒドン大学および同センターで行い、重症な熱帯熱マラリア患者にも顕著な治療効果があった。

脳性マラリアの発症機序をリスザルおよび患者脳を用いて病理組織学的に解析し、フィブリノーゲンが血管外および脳実質へ拡散し、赤血球も血管周囲に漏出することが明らかとなった。これらの病理所見と脳マラリア患者の重症度との関係は今後の解析を待たねばならない。

地球規模での温暖化傾向が今後進んだ場合、我が国でも節足動物媒介性感染症の突発的な流行の可能性は否定できない。我が国の媒介蚊の調査および防除対策は平時から行うことが重要と考えられる。また、デング熱、チクングニヤ熱、マラリアなどの

輸入感染症の症例が増加した場合、臨床医および研究機関による迅速な診断が強く望まれる。本研究事業において、媒介蚊、ウイルス、マラリアの研究が多面的に進行し、媒介蚊の調査、防除、患者の診断、治療が円滑に行われることが強く望まれる。

E. 結論

コガタアカイエカの JEV 保有状況は非常に高い陽性率を示す地域が確認されており、約 2 年間にわたって同じ地域の蚊から JEV の分離に成功した。分離株は全て genotype I 型に属し、近年東南アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁である。トラップによる捕集蚊から昆虫由来の新規フラビウイルス (CxFV) がアカイエカから分離され、全塩基配列を決定し、遺伝子構造解析を行った。このウイルスは人に病原性のあるフラビウイルスの起源的なウイルスであることが強く示唆された。東京都および近郊でのコガタアカイエカの成虫捕集調査、北海道、鹿児島、東京都での渡り鳥飛来地での成虫捕集調査およびウイルスの検出を行い、東京都内でのコガタアカイエカがある程度の数捕集されること、東京湾岸の干潟で日本脳炎ウイルスに高い感受性を示すイナトミシオカの生息が確認された。兵庫県西宮市では市内全域を 10 地区に分けて、幼虫発生源としての雨水枡の分布、有水率、発生幼虫の同定、污水管、マンホールの調査を行い、膨大な調査結果を得た。これらの結果を地理情報システム (GIS) で解析を行い、各調査地の雨水マスには全て分類番号が打たれ個々の場所が特定できるように整理した。横浜市、富山県、千葉県など地方自治体での媒介蚊の調査研究にお

いて、媒介蚊の発生状況調査および一部実際に薬剤を用いた防除試験を行った。雨水枡の幼虫発生を数ヶ月抑える効果のある地域と、あまり効果が持続しない地域など、地域、薬剤の種類などで異なる結果を得た。我が国のコガタアカイエカは有機リン剤に対して高い抵抗性を示し、この抵抗性に関係するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性中心の周辺の塩基配列多型を調べ、蚊の移動と殺虫剤散布によって、1 つの突然変異に由来する抵抗性遺伝子が過去 50 年間にアジア地域に広く分布を広げたことが明らかとなった。

日本脳炎ウイルスは 1990 年以降 3 型から 1 型への genotype shift が報告されている。実際、最近媒介蚊、ブタから分離されるウイルスはほとんどが genotype 1 である。この変化がどのような機構で起こったのか、1 型と 3 型のキメラウイルスを作製し、哺乳動物および蚊由来培養細胞、神経由来細胞内での増殖能を比較し、1 型のウイルスが哺乳動物の細胞での増殖に優れていること、および病原性の低下に関連していることなどが示唆された。ウエストナイル DNA ワクチンが、蛋白 (不活化ウエストナイル ワクチン) との混合投与により、少量でマウスに中和抗体を誘導できることが明らかとなり、大動物 (ブタ) でも蛋白との混合投与により中和抗体を誘導した。この方法は日本脳炎ワクチンでも同様の効果が確認され、不活化ワクチンの 1/100 のドーズと 1 μ g の DNA ワクチンの混合でブタの中和抗体を誘導した。デングウイルス感染の診断に関し、尿および唾液中に分泌される抗体および直接遺伝子を検出する方法を検討した。日本人デング患者より血清、尿およ

び唾液を経日的に採取し、ウイルス遺伝子検出、および IgA, IgM 抗体産生を解析した。輸入デング熱の 9 症例の内 2 症例の尿および唾液から遺伝子を検出した。また、デングウイルス感染者および被疑者の尿検体より IgA, IgM 抗体が検出された。

我が国のマラリアは輸入患者が年間 80-100 名ほど報告されている。臨床医のマラリアに関する知識、治療経験がほとんどなく、患者の適切な管理に関する情報が必要である。海外渡航者 107 名に予防内服薬（メフロキン）を投薬し、帰国後のフォローアップを行った。マラリア予防ガイドラインに関して、予防内服の実施基準を中心に議論を行い改訂版の編集を行った。脳性マラリアの発症機序に関し、リスザルおよび患者脳について病理組織学的解析を行い、フィブリノーゲンおよび IgG が血管外および脳実質へ拡散することを確認した。血管周囲への出血、血漿成分の漏出が脳性マラリアの特徴的な病理像の一つで、血液脳関門の破綻が脳性マラリアの発症に深く関わり、死亡に関わる可能性が示唆された。マラリア媒介蚊に関しては、中国、タイでコガタハマダラカの吸血嗜好性の調査を人および水牛囲法で行い、季節によって人吸血活性に差がみられること、季節によって吸血源に飛来する個体数に大きな差が認められた。

F. 健康危険情報

スリランカの在留邦人および短期旅行者に関して、血清学的検査、ウイルスの分離等を行い、本邦で始めてチクングニヤ熱の輸入症例 2 例を報告した。発生時期が冬期であったため患者居住地周辺での媒介蚊対

策は必要ないと判断されたが、夏期にこのような患者が診断された場合には、媒介蚊の防除対策を考慮する必要性がある。(健康危険情報 別紙参照)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higa Y, Hoshino K, Tsuda Y, Kobayashi M. Dry-ice trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern part of Hokkaido, Japan. *Med. Entomol. Zool.*, 57:93-98, 2006.
- 2) Tsuda Y, Suwonkerd W, Chawprom S, Prajakwong S, Takagi M. Different spatial distribution on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* along an urban-rural gradient and the relating environmental factors examined in three villages in northern Thailand. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22: 222-228, 2006.
- 3) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*, 359: 405-414, 2007.
- 4) Roychoudhury S, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Saito N, Sawabe K., Kobayashi M. Comparison of the morphology of oocysts and the phylogenetic analysis of four *Ascogregarina* species (Eugregarinidae: Lecudinidae) as inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *Parasitol. Int.*, 56:113-118, 2007.
- 5) 津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋 弘, 林 利彦, 星野啓太, 駒形 修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生. 都市域における疾病

- 媒介蚊の発生状況調査ードライアイストラップを用いた 2 年間の調査結果ー. Med. Entomol. Zool., 57: 75-82, 2006.
- 6) 津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 伊澤晴彦, 星野啓太, 林 利彦, 駒形 修, 澤邊京子, 佐々木年則, 富田隆史, 二瓶直子, 倉橋 弘, 小林睦生. 成田国際空港近接地と周辺地域の媒介蚊調査 (2003, 2004 年). Med. Entomol. Zool., 57: 211-218, 2006.
- 7) 松本令以, 植田美弥, 佐藤雪太, 比嘉由紀子, 津田良夫, 澤邊京子, 村田浩一. よこはま動物園における鳥マラリアの発生と対策. 獣医畜産新報, 59: 827-830, 2006.
- 8) 澤邊京子, 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 江下優樹, 小林睦生. 日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討. Med. Entomol. Zool., 57: 279-286, 2006.
- 9) 水田英生, 森 英人, 後藤郁夫, 白石祥吾, 杉本昌生, 藤川和生. 疫学調査における蚊からのフラビウイルス検査法についての一考察. (日本検疫医学会誌, 投稿中)
- 10) 二瓶直子. 感染症とは何か. (村井俊治, 渡辺興重, 安岡善文, 岡島成行, 二瓶直子共編), 『人とわざわい』 下巻, pp. 251-264, 2007.
- 11) 小曾根恵子. 横浜市における蚊成虫捕獲調査ー第 3 報 (2005 年度). ペストロジー学会誌, 21(2): 53-56, 2006.
- 12) Onishi Y, Eshita Y, Murashita A, Mizuno M, Yoshida J. 2-diethylaminoethyl(DEAE)-dextran-MMA graft copolymer for non-viral gene delivery. Bulletin of the Research Center of Environmental Science and Technology, Nippon Bunri University, 5: 8-13, 2006.
- 13) Dieng, H, Boots M, Eshita Y. Some insights into the concept of body size in mosquitoes. House and Household Insect Pest, 28(1): 47-62, 2006.
- 14) Dieng H, Boots M, Tamori N, Higashihara J, Okada T, Kato K, Eshita Y. : Some technical and ecological determinants of hatchability in *Aedes albopictus*, a potential candidate for transposon-mediated transgenesis. J. Am. Mosq. Control Assoc., 22(3):382-389, 2006.
- 15) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita, Y. Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. Jpn. J. Environ. Entomol. Zool., 17(4):133-141, 2006.
- 16) Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg. 2007(in press).
- 17) 水野泰孝, 加藤康幸, 工藤宏一郎, 高崎智彦, 倉根一郎. 遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例. 感染症学雑誌 (in submission), 2007.
- 18) Hamano M, Lim CK, Takagi H, Sawabe K, Kuwayama M, Kishi N, Kurane I, Takasaki T: Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. Epidemiol. Infect. 2007 (in press).
- 19) Imoto J, Konishi E. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit

vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine*, 25: 1076-1084, 2007.

20) Shirayama Y, Phompida S, Kuroiwa C, Miyoshi M, Okumura J, Kobayashi J. Maintenance behaviour and long-lasting insecticide-treated nets (LLITNs) previously introduced into Bourapar district, Khammouane province, Lao PDR. *Public Health*, 121 (2):122-129, 2007.

21) Noppadon Tangpukdee, Wipa Thanachatwet, Srivicha Krudsood, Nutthanej Luplertlop, Kanrchana Pornpininworakij, Kobsiri Chalermrut, Sasikarn Phokham, Chatnapa Duangdee, Shigeyuki Kano, Sornchai Looareesuwan and Polarat Wilairatana. Liver profile dysfunction in patients with *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Korean J. Parasitol.*, 44: 295-302, 2006.

22) Mizuno Y, Kudo K, Kano S. Chemoprophylaxis according to the guidelines on malaria prevention for Japanese overseas travelers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, 37: 11-14, 2006.

23) Mizuno Y, Kano Y, Kanagawa S, Kudo K, Hashimoto M, Kunimoto M, Kano S. A case of postmalaria neurological syndrome in Japan. *J. infect. Chemother.*, 12: 399-401, 2006.

24) 水野泰孝, 藤元 瞳, 横田恭子, 加藤康幸, 源河いくみ, 金川修造, 川名昭彦, 岡 慎一, 木村 哲, 工藤宏一郎, 狩野繁之. アーテスネート静注と血液透析による支持療法で救命しえた重症熱帯熱マラリアの1例. *感染症学雑誌* 80: 706-710, 2006.

25) 狩野繁之. マラリア予防ガイドラインの概要. *Clin. Parasitol.*, 17(1): 25-27, 2006.

26) 狩野繁之. アーテミスニン系薬剤によるマラリア治療の位置づけ. *病原微生物検出情報*, 28(1): 7-9, 2007.

2. 学会発表

1) 津田良夫, 比嘉由紀子, 澤邊京子, 村田浩一, 佐藤雪太, 松本令以, 植田美弥, 長塚信幸. 首都圏動物園および水族館における蚊の発生状況調査. 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

2) 津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 澤邊京子. アカイエカ群の個眼数に見られる季節変異と地理的変異. 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

3) 津田良夫, Kris Cahyo Mulyatno, Subagyo Yotopranoto, Sri Subekti Bendryman. インドネシア・スラバヤ市におけるイーストによる二酸化炭素発生装置を用いた屋内吸血性蚊の採集結果. 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

4) 小林睦生, 二瓶直子, 斎藤一三, 津田良夫. 東北地方における疾病媒介蚊の分布拡大および分布圏周縁部における生息密度に関する調査. 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

5) 渡辺 護, 小原真弓, 西尾恵美里, 小林睦生. 富山県における感染症媒介蚊の発生実態調査 (2003 から 2005 年). 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

6) 吉田政弘, 山下敏夫, 小林睦生. 大阪市内の冬季におけるアカイエカ群について. 第58回日本衛生動物学会大会, 18年4月6-8日, 長崎市.

7) 二瓶直子, 津田良夫, 駒形 修, 望月貫一郎, 小林睦生. 都市地理情報を用いた首