

厚生労働科学研究費
社会保障国際協力推進研究事業

ウイルス性感染症の診断、疫学及び 予防に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

平成20（2008）年3月

主任研究者 倉根一郎
国立感染症研究所ウイルス第1部

目 次

| | |
|------------------------------------|-------|
| I 総括研究報告 | (ページ) |
| ウイルス性感染症の診断、疫学及び予防に関する研究 | 1 |
| 主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部） | |
| II 分担者研究報告 | |
| 1 ウイルス感染症の疫学 | 15 |
| 分担研究者：高島郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科） | |
| 2 フラビウイルスの疫学 | 18 |
| 分担研究者：小西英二（神戸大学医学部保健学科） | |
| 3 フラビウイルス感染の治療法 | 23 |
| 分担研究者：竹上 勉（金沢医科大学総合医学研究所） | |
| 4 日本脳炎の新型ワクチン開発 | 26 |
| 分担研究者：倉田 毅（富山県衛生研究所） | |
| 5 ハンタウイルス感染症の診断法 | 31 |
| 分担研究者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科） | |
| 6 ハンタウイルス感染症の疫学 | 38 |
| 分担研究者：荻和宏明（北海道大学大学院獣医学研究科） | |
| 7 ウイルス性出血熱の診断法の開発..... | 42 |
| 分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部） | |
| 8 ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担 | 47 |
| 分担研究者：中込 治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科） | |
| 9 ウイルス性下痢症の病態解析 | 51 |
| 分担研究者：谷口孝喜（藤田保健衛生大学医学部） | |
| 10 下痢症ウイルスの病原性 | 53 |
| 分担研究者：小林宣道（札幌医科大学医学部） | |
| 11 下痢症ウイルスの遺伝子解析 | 56 |
| 分担研究者：本村和嗣（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター） | |
| 12 狂犬病に対する治療法の開発 | 62 |
| 分担研究者：西園 晃（大分大学医学部） | |

| | | |
|-----|--|----|
| 1 3 | 狂犬病の診断法の確立 | 76 |
| | 分担研究者:井上 智(国立感染症研究所獣医科学部) | |
| 1 4 | 狂犬病の診断法の開発 | 85 |
| | 分担研究者:森本金次郎(国立感染症研究所ウイルス第1部、 安田女子大学薬学部) | |
| 1 5 | 狂犬病の疫学 | 92 |
| | 分担研究者:伊藤直人(岐阜大学応用生物科学部) | |
| III | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 95 |
| IV | 研究成果の刊行物・別刷 | 99 |

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

総括研究報告書

ウイルス性感染症の診断、疫学及び予防に関する研究

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；アルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症に関し、(1) 診断、検査法の確立と、疫学調査による国内外における流行状況の解明、(2) 各種病原体の解析に基づく病態形成機序の解明、(3) ワクチン等予防治療法確立のための基盤確立、を目的して研究を進めた。アルボウイルス研究においては、日本脳炎ウイルスの新たな血清診断法を確立した。また、極東ロシアの野鳥においてウエストナイル抗体を検出した。ウイルス性出血熱研究においてはベトナムのげっ歯類においてハンタウイルス抗体の存在を示した。また、北海道のげっし類におけるハンタウイルス抗体陽性率を明らかにした。ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルス流行株の分子基盤が示唆された。また、バングラデシュにおいて新種のロタウイルスと考えられる株が分離された。狂犬病研究においてはフィリピンにおける血清疫学のための検査系を作製した。また、狂犬病ウイルスに対する免疫応答の機序を明らかにした。

分担研究者

有川二郎：北海道大学大学院医学研究科
教授

伊藤直人：岐阜大学応用生物科学部
准教授

井上 智：国立感染症研究所 室長

苅和宏明：北海道大学大学獣医学研究科
准教授

木村和嗣：国立感染症研究所 研究員

倉田 毅：富山県衛生研究所 所長

小西英二：神戸大学医学部 准教授

小林宣道：札幌医科大学 教授

西條政幸：国立感染症研究所 主任研究官

高島郁夫：北海道大学大学院獣医学研究科
教授

竹上 勉：金沢医科大学 教授

谷口孝喜：藤田保健衛生大学医学部 教授

中込 治：長崎大学大学院医歯薬総合研究
科 教授

西園 晃：大分大学医学部 教授

森本金次郎：国立感染症研究所 室長

安田女子大学 教授

A. 研究目的

日本およびわが国を取りまくアジア地域においては、依然として多くのウイルス感染症が問題となっている。アルボウイルス感染症においては、デング熱患者が東南アジアを中心に多数発生している。ウイルス性下痢症は東南アジアの幼児を中心に流行しているが近年、日本においてもノロウイルス感染症等の流行がおこり死者も発生したことから大きな問題となっている。腎症候性出血熱は中国、ロシアを中心に多数の患者発生を記録している。狂犬病は、東南アジア諸国では多数の死者を記録しており、日本においても近年輸入症例が2例確認された。本研究においてはアルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症につき、(1) 診断法の確立と普及、疫学調査により国内外における流行状況を解明する、(2) 各種病原体の解析をもとに病態形成機序を解明する、(3) ワクチン等予防治療法確立のための基盤を確立する、ことを目的とする。

B. 研究方法

1. アルボウイルス感染症；

診断法開発：日本脳炎ウイルス NS1 抗体

測定のため、補体媒介性細胞傷害活性を利用した新たな抗体測定法を開発する。さらに、IgM 抗体を特異的に検出する方法を確立した。

疫学調査：トリにおけるウエストナイルウイルス感染を調査するため少容量中和試験法を確立し、ロシアにおける血清疫学調査を行う。流行地において蚊を採集しウイルスを分離する。さらにウイルスの性状を解析する。

2. ウイルス性出血熱；

疫学調査：迅速にハンタウイルス感染を検出する血清診断法、PCR 法を開発しアジア地域でハンタウイルス感染症患者及び野生げっ歯類の疫学調査を実施しウイルスを分離する。

治療法開発：各種抗ウイルス剤のサル痘ウイルス各株に対する増殖抑制効果を *in vitro* で解析する。

3. ウイルス性下痢症；

診断法開発：シングルプライマーを用いたクローニング法により、我が国で分離されたA群ヒトロタウイルスKU株とB群ブタロタウイルスSKA-1株のゲノムのクローニングを行う。

疫学調査：G2ロタウイルスにおいて多様な遺伝子プールの中から、抗原性において選択的優位性を持ったウイルス株が増加してくるか否かを検討する。バングラデシュの下痢症患者より検出された非定型ヒトロタウイルス B219 の全遺伝子配列を決定

する。

2006 - 2007 年冬季に日本各地で流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析を行う。

4. 狂犬病；

疫学調査：フィリピンで流行する狂犬病ウイルス株に特異的な単クローン抗体を作製し、これを用いた抗原検出系の作製を行う。さらに、この系を利用しサーベイランスを行う。

病態解明：狂犬病ウイルスに対する樹状細胞の免疫応答を明らかにすることにより、狂犬病に対する防御機序を解明する。

狂犬病ウイルス街上毒株の継代による性状の変化を解析する。病原性に関連する西ヶ原 N 遺伝子の機能を明らかにする。

C. 研究結果

1. アルボウイルス感染症；

極東ロシアの野鳥から得られた 91 血清のうち 15 血清においてウエストナイルウイルス中和抗体が検出された。

日本脳炎ウイルス NS1 特異的抗体を、NS1 発現細胞への細胞障害活性を用いることにより測定する方法を確立した。さらに、本方法で非特異抗体を除き IgM 抗体を測定できること確認した。

石川県で採集した蚊において分離された日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。ウイルス分離を試みたがウイルスは分離できなかった。

富山県においてもウイルス分離を行ない、蚊およびブタ血清より 1 型の日本脳炎ウイ

ルスが分離された。

2. ウイルス性出血熱；

ベトナムにおいてげっ歯類のハンタウイルス調査を行った。ドブネズミおよびスunksにおいて抗体陽性の個体が確認された。

北海道のエゾヤチネズミはハンタウイルス抗体保有率が 5%であった。オスは 12%、メスは 3%でありオスの抗体保有率は優位に高いことが明らかになった。

シドフォビル、S2242、ピダラピン、リバピリンはいずれもサル痘ウイルス 8 株（コンゴ盆地型 4 株、西アフリカ型 4 株）に対していずれも増殖抑制効果を示した。

3. ウイルス性下痢症；

ロタウイルスの血清型が不規則に変化する背景として、G1 ロタウイルス VP7 遺伝子の変化が、G2 ロタウイルス VP7 遺伝子より影響が大きい可能性がしめされた。

A 群ヒトロタウイルス KU 株と B 群ブタロタウイルス SKA - 1 株の 11 本すべての遺伝子のクローニングを行った。B 群ブタロタウイルス SKA - 1 株についてはセグメント 3 ~ 11 について対応する長さの cDNA が得られ、クローニングが可能であった。

バングラデシュの下痢症患者より検出された非定型ヒトロタウイルス B219 の全遺伝子配列を決定した。遺伝子配列は基地の A 群、B 群、C 群ヒトロタウイルスおよび A - G 群動物ロタウイルスと異なる新種のロタウイルスと考えられた。

37 の糞便試料から GII/4 ゲノム全長の

塩基配列を得た。カプシド蛋白をコードする領域につき系統樹解析を行い、2006年秋、冬季シーズンでは単一起源の株が数ヶ月で全国に広がったことが明らかとなった。

4. 狂犬病；

弱毒狂犬病ウイルス ERA 株と強毒ウイルス CVS 株に対する樹上細胞の反応性が異なることが明らかとなった。弱毒ウイルスは樹上細胞を活性化するが、強毒ウイルスは樹上細胞を活性化しないことが示された。

フィリピンで流行する狂犬病ウイルス株に感染させたマウスから3つの単クローン抗体を作製した。これらの単クローン抗体はELISAとRFFIT法（中和抗体測定法）において優れた反応性を示した。

タイのバンコクで分離された狂犬病ウイルス街毒株は、BHK-21細胞継代株は乳のみマウス継代株より末梢感染力が10倍以上強いことが示された。

キメラウイルスを用いて病原性に関連する狂犬病ウイルス西ヶ原株のN遺伝子の機能を解析し、N遺伝子が宿主の自然免疫および炎症反応の抑制に関連することが明らかとなった。

D. 考察

日本および他のアジア地域においては、依然として多くのウイルス感染症が問題となっている。アルボウイルス研究においては、日本脳炎ウイルスの新たな血清診断法を確立した。本方法は今後の疫学的研究において有用である。

また、極東ロシアの野鳥においてウエストナイル抗体を検出したが、今後も継続的な調査が必要である。ウイルス性出血熱研究においてはベトナムのげっ歯類においてハンタウイルス抗体の存在を示した。昨年度インドにおいて不明熱患者中にハンタウイルス感染者が存在することから、南アジアや東南アジアにおけるハンタウイルス感染症の研究をさらに進めていく必要がある。

ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルス流行株の分子基盤が示唆された。すでに、ロタウイルスのリバースジェネティクス系が開発されている。今後この系を用いることによって、病原性の解明、新型ワクチンの開発等の研究が大きく進展することが期待される。狂犬病研究においてはフィリピンにおける血清疫学のための検査系を作製した。平成18年、日本人2名がフィリピンにおいて狂犬病ウイルスに感染し発症した。これらの事例から狂犬病がアジアにおいて大きな問題であることが再認識された。また感染地の確認等のためにも、アジア各国での狂犬病ウイルス株の基礎データの蓄積が重要である。

E. 結論

アルボウイルス研究においては、日本脳炎ウイルスの新たな血清診断法を確立した。また、極東ロシアの野鳥においてウエストナイル抗体を検出した。ウイルス性出血熱研究においてはベトナムのげっ歯類においてハンタウイルス抗体の存在を示した。ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウ

ウイルス流行株の分子基盤が示唆された。また、バングラデシュにおいて新種のロタウイルスと考えられる株が分離された。狂犬病研究においては血清疫学のための検査系を作製した。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang, H. Y., Takasaki, T., Fu, S. H., Sun, X. L., Zhang, H. L., Wang, Z. X., Hao, Z. Y., Zhang, J. K., Tang, Q., Kotaki, A., Tajima, S., Liang X. F., yang, W. Z., Kurane, I. and Liang G. D.: Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *Journal of General Virology*. 88(Pt 3): 885-894, 2007
- 2) Oya, A. and Kurane, I.: Japanese encephalitis for a reference to international travelers. *Journal of Travel Medicine*. 14(4):259-268, 2007
- 3) Kurane, I.: Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 30(5-6):329-340. 2007
- 4) Anantapreecha, S., A-Nuegoonpipat, A., Prakrong, S., Chanama, S., Sa-Ngasang, A., Sawanpanyalert, P. and Kurane, I.: Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 60(5):267-270, 2007.
- 5) Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C. K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R. and Kurane, I.: Dengue virus type 2 isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal. *Journal of Travel Medicine*. 15(1): 46-49, 2008.
- 6) Ishikawa, T., Takasaki, T., Kurane, I., Nukuzuma, S., Kondo, T. and Konishi, E.: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes and Infection* 9, 1089-1095, 2007
- 7) Kitai, Y., Shoda, M., Kondo T. and Konishi, E.: Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1024-1031, 2007.
- 8) Yamanaka, A., Kosugi, S. and Konishi, E.: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of Virology* 82, 927-937, 2008.
- 9) Konishi, E., Kitai, Y. and Kondo, T.: Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 88-94, 2008.
- 10) Ota T, Maeda M, Murakami M, Takegami T, Suto S, Tatsuka M: Activation of Rac1 by Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor- β with defective isoprenyl-binding pocket. *Cell Biology International*, 31: 92-96 (2007)
- 11) Dong L, Masaki Y, Takegami T, Kawanami T, Itoh K, Jin Z, Sakai T, Huang C, Fukushima T, Tong X, Sawaki T, Sugai S, Hirose Y ,

- Umehara H: Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen. *Int Immunol* 19: 331-336, (2007)
- 12) Dong L, Masaki Y, Takegami T, Jin Z, Huang C., Fukushima T, Sawaki T, Kawanami T, Saeki T, Kitagawa K, Sugai S, Okazaki T, Hirose Y, Umehara H: Clonality analysis of lymphoproliferative disorders in patients with Sjogren's syndrome *Clin. Exp. Immunol* 150: 279-284, (2007)
- 13) Sun W, Dong L, Kaneyama K, Takegami T, Segami N: Bacterial diversity in synovial fluids of patients with RMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2007) (in press)
- 14) Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T: Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol *Toxicology and Applied Pharmacology* (2008) (in press)
- 15) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L. I., Iwasaki, T. and Takashima, I.: A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54(4): 145-161, 2007
- 16) Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., Igota, H., Yamauchi, K., Ishida, S., Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Tsunemitsu, H., Koshimoto, C., Sakae, K., Chikahira, M., Ogawa, S., Miyamura, T., Takeda, N. and Li, T. C.: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152:1375-1381, 2007
- 17) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K., Arikawa, J.: Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. *Virology* sep1: 365(2) 292-301, 2007
- 18) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Truong, U. T., Truong, U. N.: Hantavirus Infection-typical rodent-borne viral zoonosis. *Tropical Medicine and Health* 35(2) 55-59, 2007
- 19) Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R. G., Mertens, M., Okumura, M., George, R. P., John, T., Balraj, V., Muliyl, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.: Seroepidemiological study on hantavirus infections in India: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene
- 20) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa J.: hantavirus infection in East Asia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30, 341-356, 2007
- 21) Bin Abu Daud, N. H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51(11): 1081-1090, 2007
- 22) Abu Daud, N. H., Kariwa, H., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus Hantavirus) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51: 1081-1090, 2007
- 23) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J.: Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 341-356, 2007. Review.
- 24) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L. I., Iwasaki, T., and Takashima, I. A comparative

- epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 145-161, 2007.
- 25) Shirato K, Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 139:78-84, 2007
- 26) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272-281, 2007
- 27) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Sata, T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.* 81:1848-1857, 2007
- 28) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152:1763-1765, 2007
- 29) Morikawa S, Saijo M, Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391-398, 2007
- 30) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182-1189, 2007
- 31) Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007
- 32) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375-389, 2007
- 33) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., Saijo, M., Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.: Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403-414, 2007
- 34) Yamagata, J., Ahmed, K., Khawplod, P., Mannen, K., Xuyen, DK., Loi, HH., Dung, NV., Nishizono, A.: Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 51(9): 833-884, 2007
- 35) Arakawa, M., Yamashiro, T., Uechi, G., Tadano, M.: Construction of human Fab($\gamma 1/\kappa$) library and identification of human monoclonal Fab possessing neutralizing potency against Japanese encephalitis virus. *Microbiol. Immunol.* 51(6), 617-625, 2007
- 36) Inoue S.: The rabies prevention and the risk management in Japan. *J. Disas. Res.* 2:90-93.
- 37) Sugiyama M, Ito N.: Control of rabies: Epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30:273-286,

2007.

- 38) Montenegro FM, Correia JB, Falbo AR, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol.* 79: 335-340, 2007
- 39) Ahmed K, Nakagomi T, Nakagomi O. Molecular identification of a novel G1 VP7 gene carried by a human rotavirus with a super-short RNA pattern. *Virus Genes.* 2007
- 40) Pun SB, Nakagomi T, Sherchand JB, Pandey BD, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA, Nakagomi O. Detectiojn of G12 human rotaviruses in Nepal. *Emerging Infectious Diseases* 13, 482-484, 2007
- 41) Papaventis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Hart CA. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerging Infectious Diseases* 13, 908-911, 2007
- 42) Ahmed, K, Ahn, D.D., Nakagomi, O. Roatvirus G5P[6] in a child with diarrhea, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1232-1235, 2007
- 43) Cunliffe NA, Allan C, Lowe SJ, Sopwith W, Booth AJ, Nakagomi O, Regan M, Hart CA. Healthcare-associated rotavirus gastroenteritis in a large paediatric hospital in the UK. *Journal of Hospital Infection* 67(3):240-244, 2007.
- 44) Cunliffe N, Nakagomi O. Introduction of rotavirus vaccines in developing countries: remaining challenges. *Annals of Tropical Paediatrics* 27(3):157-167, 2007.
- 45) Nakagomi O, Cunliffe NA. Rotavirus vaccines: entering a new stage of deployment. *Current Opinion of Infectious Diseases* 20(5):501-507, 2007.
- 46) Fleming FE, Graham KL, Taniguchi K, Takada Y, Coulson BS: Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha2betal and alpha4betal. *Arch Virol.* 152 :1087-101, 2007
- 47) Rahman, M., Matthijinssens, J., Yang, X., Delberke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., Iturriza-Gomara, M., Iftekhauddin, N., Azim, T., Ranst, M.V.: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses.
- 48) Alam, M.M., Kobayashi, N., Ishino, M., Ahmed, M.S., Ahmed, M.U., Paul, S.K., Muzumdar, B.K., Hussain, Z., Wang, Y-H., Naik, T.N.: Genetic analysis of an ADRV-N-like rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch. Virol.* 152:199-208, 2007.
- 49) 有川二郎: ハンタウイルス肺症候群, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 126-130, 2007
- 50) 有川二郎: 腎症候性出血熱, 日本臨床, 65 巻, 増刊号 3: 112-116 (2007)
- 51) 西園 晃.: 人獣共通感染症 1. 狂犬病, 日本内科学会誌, 96 (11), 2400-2405, (2007)
- 52) 伊藤直人, 杉山誠: 狂犬病ウイルスの病原性に関する研究の進展, ウイルス, 57: 191-198 (2007)
- 53) 森本金次郎: 解説「狂犬病」 感染症 37 巻 第 4 号 15 - 18 (2007)
- 54) 森本金次郎: 日本における狂犬病の予防と対策 日中医学 第 22 巻 第 2 号 11 - 15 (2007)
- 55) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006 秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析”; 病原体微生物情報 (IASR)

10月号 p3-p4, (2007)

- 56) 本村和嗣, 岡智一郎, 佐藤裕徳 “2006年に我が国に流行したノロウイルス GII/4株のゲノム解析”; 食品衛生研究 11月号 p19-p26 (2007)
- 57) 2007年8月18日; 産経新聞 朝刊「昨年日本で流行ノロウイルス; 欧州と同じ新型」
- 58) 2007年9月12日; 読売新聞 朝刊「昨冬流行 ノロウイルス新型だった」
- 59) 2007年11月25日; 読売新聞 朝刊「感染症国境なき拡大」

2. 学会発表

- 1) 名和 優、町田早苗、高崎智彦、田島茂、原田文植、水野泰孝、加藤康幸、倉根一郎: デングウイルス感染の抗体検査: 患者尿中より IgA, IgM 抗体の検出. 第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 東京 2007年1月19日
- 2) 高崎智彦、小滝徹、原田文植、西村聖美、水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、倉根一郎. 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検出. 第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 東京 2007年1月19日
- 3) 水野泰孝、加藤康幸、原田文植、工藤宏一郎、高崎智彦、倉根一郎. 尿および唾液中よりデングウイルス遺伝子が検出された1例. 第81回日本感染症学会(京都)2007年4月10-11日
- 4) 貫井陽子、田島茂、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルス Genotype shift の生物学的意義. 第81回日本感染症学会第(京都)2007年4月10-11日
- 5) 井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二. プタ流産予防を目的とした日本脳炎

DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川県白山市)2007年5月18-19日

6) 田島茂、貫井陽子、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎. Genotype 間キメラウイルスを用いた日本脳炎ウイルスの性状解析. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川県白山市)2007年5月18-19日

7) 町田早苗、名和 優、高崎智彦、Ming-Rong Harn、倉根一郎. 台湾でのデング感染診断における IgA 抗体捕捉 ELISA の評価. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川県白山市)2007年5月18-19日

8) 高崎智彦、林 昌宏、小滝 徹、水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、渡邊 香奈子、倉根一郎. チクングニヤ熱輸入2症例と実験室診断法. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会(石川県白山市)2007年5月18-19日

9) Meng Ling Moi, Lim Chang-Kweng, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Role of human Fc-gamma II receptor in antibody dependent enhancement of dengue viral infection. 3rd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. 2007. August, 21-24

10) 林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、モイメンリン、伊藤美佳子、倉根一郎. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より日本で初めて分離されたチクングニヤウイルスの性状解析. 第55回日本ウイルス学会(札幌市)2007年10月

11) 田島 茂、高崎智彦、倉根一郎. デング1型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響. 第55回日本ウイルス学会(札幌市)2007年10月

12) 藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎. 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤細胞の T cell receptor レパトア解析. 第55回日本ウイ

ルス学会（札幌市）2007年10月

13) 貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定。第55回日本ウイルス学会（札幌市）2007年10月

14) 高崎智彦、田島 茂、小滝 徹、水野泰孝、倉根一郎。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検出。第55回日本ウイルス学会（札幌市）2007年10月

15) 名和 優、町田早苗、高崎智彦、田島茂、水野泰孝、倉根一郎。デングウイルス感染の抗体検査：患者尿中のIgA抗体検出。第55回日本ウイルス学会（札幌市）2007年10月

16) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太郎、荻和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子およびその組換え発現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討：第144回日本獣医学会、江別（2007, 9）

17) 糸田川優、小西英二：中和活性または感染増強活性を示す抗デング1型マウスモノクローナル抗体。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月

18) 井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二：ブタ流産予防を目的とした日本脳炎DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月

19) 北井陽子、近藤高志、小西英二：新しい日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法：補体媒介性細胞傷害の利用。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月

20) 山中 敦史、小西 英二：ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立：デング2型ウイルスを用いた予備的

検討。第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007年5月

21) 井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：ブタにおける日本脳炎DNA/蛋白ワクチン混合針無投与方法の有用性評価。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

22) 桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いたデング蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

23) 北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

24) 山中敦史、小西英二：デングワクチンの防御効力を評価するマウスモデル。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

25) 酒井陽平、小西英二：インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

26) 糸田川優、小西英二：抗デング1型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び感染増強活性の解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月

27) 村上 学、太田隆英、竹上 勉：siRNA発現および JEV 感染細胞におけるインターフェロン誘導、第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、石川（2007, 5）

28) 村上 学、太田隆英、竹上 勉：日本脳炎ウイルス感染に対する RNAi による防御およびインターフェロン誘導、第11回神経ウイルス研究会、草津（2007, 7）

29) 竹上 勉、村上 学、太田隆英、石垣靖人：日本脳炎ウイルス感染における宿主遺伝子発現変動 DNA マイクロアレイを用い

た網羅的解析、第14回トガ・フラビ・ベ
スチウイルス研究会、札幌 (2007, 10)

30) 村上 学、竹上 勉：日本脳炎ウイ
ルス感染細胞およびマウスにおける抗ウイ
ルス剤(shRNA)導入後のインターフェロン誘
導、第55回日本ウイルス学会、札幌
(2007, 10)

31) 竹上 勉、村上 学、太田隆英、石垣
靖人：日本脳炎ウイルス感染に伴う宿主遺
伝子発現とウイルス病原性、第30回日本
分子生物学会、横浜、(2007, 12)

32) 小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井
雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅：富山
県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保
有状況(2004年~2006年)：第42回日本脳
炎ウイルス生態学研究会、白山(2007, 5)

33) 有川二郎：腎症候性出血熱(HFRS)とハ
ンタウイルス肺症候群(HPS)ーげっ歯類媒
介性の人獣共通感染症：第54回日本実験動
物学会総会(2007.5)

34) 山本博、李天成、伊藤薫、越本知大、
宮下信和泉、有川二郎、八神健一、他：国
動協および公私動協傘下の動物実験施設に
おいて動物実験に用いられたサルおよびブ
タのHEV感染調査：第54回日本実験動物学
会総会(2007.5)

35) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Kariwa
H.: Epidemiology and Epizootiology of
Hantavirus Infection in East Asian
Countries. VII International Conference
on HFRS, HPS and Hantavirus, Buenos Aires,
Argentina (2007.6)

36) Yoshimatsu, K., Taruishi, M.,
Kariwa, H., Arikawa, J.: Studies on
Structure and Function of N and GP of
Hantaan Virus. VII International
Conference on HFRS, HPS and Hantavirus,
Buenos Aires, Argentina (2007.6)

37) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Abu Daud,
N.H., Lokugamage, N., Lokugamage, K.,

Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K.,
Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M.,
Takashima, I.: Animals Models for
Puumala Virus Infection Using Several
Rodent Species of Laboratory Animal. VII
International Conference on HFRS, HPS
and Hantavirus, Buenos Aires, Argentina
(2007.6)

38) Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Araki,
K., Okumura, M., Nakamura, I., Kajino, K.,
Arikawa, J.: Pathological and
immunological analysis of the
experimental model mice of the Hantaan
virus infection. VII International
Conference on HFRS, HPS and Hantavirus,
Buenos Aires, Argentina (2007.6)

39) Okumura, M., Yoshimatsu, K.,
Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M.,
Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok,
S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T.,
Yanagihara, R., Arikawa, J.: Studies of
Thottapalayam Virus: a Hantavirus
Isolated from Shrew. VII International
Conference on HFRS, HPS and Hantavirus,
Buenos Aires, Argentina (2007.6)

40) 吉松組子、垂石みどり、有川二郎：ハ
ンタウイルスエンベロープ糖タンパク G2
の細胞外ドメインに関する研究、第55回日
本ウイルス学会 (2007.10)

41) 垂石みどり、吉松組子、エルデネサイ
ハン テグシドーレン、有川二郎：ハンタ
ウイルス持続感染モデルマウスにおけるウ
イルス特異的 T 細胞の解析、第55回日本ウ
イルス学会 (2007.10)

42) エルデネサイハン テグシドーレン、
吉松組子、垂石みどり、有川二郎、石原智
明：ホンドネズミ (*Microtus montebelli*)
の Puumala 型ハンタウイルスおよび Tula 型
ハンタウイルスに対する感受性に関する研
究、第55回日本ウイルス学会 (2007.10)

43) 瀬戸隆弘、苅和宏明、谷川洋一、吉松
組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、好

- 井健太朗、有川二郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域におけるハンタウイルス感染症の疫学的研究、第 55 回日本ウイルス学会 (2007. 10)
- 44) 宮下大輔、苅和宏明、瀬戸隆弘、好井健太朗、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査、第 55 回日本ウイルス学会 (2007. 10)
- 45) 瀬戸隆弘、苅和宏明、谷川洋一、Nur Hardy Bin Abu Daud、中村一郎、宮下大輔、好井健太朗、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域に生息する野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査と遺伝子解析：第 143 回日本獣医学会、つくば (2007, 4)
- 46) 宮下大輔、苅和宏明、村田亮、Nur Hardy Bin Abu Daud、瀬戸隆弘、好井健太朗、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の血清疫学調査：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 47) 村田亮、好井健太朗、原田祐里、苅和宏明、高島郁夫：ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 48) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子およびその組換え発現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討：144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 49) 中内美名、好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫：SARS コロナウイルス N たんぱく質の粒子形成における機能領域の解析：第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 50) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., and Kariwa, H.: Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in East Asian countries: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 51) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Bin Abu Daud, N. H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., and Takashima, I.: Animal models for Puumala virus infection using several rodent species of laboratory animal: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 52) 中込治 ロタウイルスワクチンの現状と課題. 第 48 回 日本臨床ウイルス学会, 富山 (2007. 6)
- 53) 中込とよ子, 中込治: ロタウイルスワクチンのインパクト: 定期接種導入後のブラジルにおけるロタウイルス下痢症の発生状況. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007. 10)
- 54) Nakagomi O, Yokoo M, Nakagomi T: Rotavirus in Japan: Disease burden and the perception of parents and pediatricians towards rotavirus vaccines. The Sixth Meeting of the Asian Rotavirus Surveillance Network Bangkok, Thailand (2007. 12)
- 55) Nakagomi O, Sherchand J, Nakagomi T, Dove W, Pandey BD, Cuevas LE, Hart AC, Cunliffe NA: Rotavirus Diarrhea among children aged less than 5y in Nepal: A 2 year study (November 2005 - October 2007) The Sixth Meeting of the Asian Rotavirus Surveillance Network Bangkok, Thailand (2007. 12)
- 56) 横尾美智代、宮城由美子、中込とよ子、中込治. 小児科医および 3 歳児保護者のロタウイルスワクチンに対する意識: 北九州市における質問紙調査. 第 11 回日本ワクチン学会, 横浜 (2007. 12)
- 57) 長嶋茂雄、石埜正穂、小林宣道: 成人下痢症由来の新奇なヒトロタウイルス B219 株の分子疫学的解析: 第 77 回日本衛生学会、大阪 (2007、3)

58) 本村和嗣、Jianbo CHEN, Wei-Shau HU, “HIV-1 と HIV-2 のゲノム組換え効率の解析”, 第 81 回感染症学会総会: 京都 (2007. 4)

59) 本村和嗣, 岡智一郎, Hansman Grant, 横山勝, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007 シーズンに流行したノロウイルスのゲノム解析”, 衛生微生物技術協議会第 28 回研究会: 岡山 (2007. 7)

60) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007 シーズンの冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 のゲノム解析”, 第 5 回感染症病態研究会: 熊本 (2007. 9)

61) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007 年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第 19 回 ウイルス性下痢症研究会: 札幌 (2007. 10)

62) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007 年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第 55 回 日本ウイルス学会総会: 札幌 (2007. 10)

63) 後藤和代, 塩田星児, 伊波英克, アハメド・カムルディン, 西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染症に及ぼす影響: 第 60 回日本細菌学会九州支部総会及び第 44 回日本ウイルス学会九州支部総会, 長崎 (2007. 10)

64) 後藤和代, 塩田星児, 伊波英克, アハメド・カムルディン, 西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染成立に及ぼす影響: 第 55 回日本ウイルス学会, 札幌 (2007. 10)

65) 後藤和代, 塩田星児, 伊波英克, 西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染成立に及ぼす影響: 第 37 回日本免疫学会,

東京都 (2007. 11)

66) 塩田星児, Khawplod, P., 後藤和代, 伊波英克, Ahmed Kamruddin, 三舟求真, 西園晃: 日本製狂犬病ワクチンの皮内接種法の検討: 第 11 回日本ワクチン学会, 横浜 (2007. 12)

67) 井上 智, ボルドバータ・バザーツレン, 堀田こずえ, 野口 章, 加来義浩, 奥谷晶子, 山田章雄. DNA 免疫を利用した簡便で特異性の高い抗狂犬病グロブリン産生モデル実験系の検討. 第 11 回日本ワクチン学会, 2007, 12 月 10 日, 横浜

68) 正谷達膳, 清水健太, 伊藤直人, 杉山誠: 狂犬病ウイルスの I 型インターフェロン誘導能は N 遺伝子により決定される: 第 144 回日本獣医学会, 江別 (2007, 9)

69) 正谷達膳, 清水健太, 伊藤直人, 杉山誠: 狂犬病ウイルス N 遺伝子が神経細胞の遺伝子発現に及ぼす影響: 第 55 回日本ウイルス学会, 札幌 (2007, 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ウイルス感染症の疫学

分担研究者 高島 郁夫 北海道大学 教授

研究要旨: ウエストナイルウイルス(WNV)の血清診断法として最も信頼性が高く、特異性の高い手法は中和試験である。しかし、通常の中和試験は多検体の血清の検査には不向きである。そこで、一度に多数の検体を短時間で検査でき、少量の血清でも応用可能な96穴プレートを用いた間接蛍光抗体法による少容量中和試験を構築した。極東ロシアの野鳥における疫学調査で得られた91例の血清のうち15例から、少容量中和試験によってWNV特異抗体が検出され、同地域の野鳥間にWNVが侵淫していることが示唆された。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス(WNV)はフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、自然界においては蚊と野生鳥類の間で感染環が維持されている。人や馬は感染蚊に吸血されることによって感染し、時に致死性の脳炎を発症する。WNVは1999年にアメリカ合衆国のニューヨーク州においてアメリカ大陸で初めて出現して以来、急速にアメリカ大陸全土に拡がった。しかし、いまだヒト用の効果的なワクチンや治療法は開発されておらず、世界的に公衆衛生上の重要な問題となっている。

現在日本において、WNVの国内感染例は報告されていないが、日本にはWNVを媒介可能な蚊と増幅動物である鳥類が存在している。したがって、ウイルスが侵入した際の初期段階でヒトや鳥

類においてウイルス感染を迅速に検出することが、我が国での感染拡大を最小限に抑えるために非常に重要であり、そのための簡便で特異性の高い診断系の確立が緊急の課題となっている。特に、日本には、WNVと抗原的に交差反応を示す日本脳炎ウイルス(JEV)が存在するため、WNVの診断においてはJEVとの鑑別が重要である。

WNVの血清診断法として最も信頼性が高く、特異性の高い手法として広く用いられているのは中和試験である。しかし、中和試験は通常、6~24ウェルプレートを用いたブラック減少法を用いて行われるため、多検体の血清の抗体測定や野鳥のように少量の血清しか利用できない場合には不向きである。そこで本研究では、一度に多数のサンプルを短時間に検査でき、少量の血清でも

応用可能で、かつ特異性が高い抗体検出法として、96 ウェルマイクロプレートによる少容量中和試験を構築した。

WNV は多くの野鳥類が増幅動物となっている。日本の北隣に位置する極東ロシアでは2003年から2004年にかけて死亡野鳥から WNV 遺伝子が検出されたとの報告がされた。極東ロシアに WNV が蔓延していれば、渡り鳥を介して日本に WNV が侵入してくる可能性が高いと考えられる。そこで、当教室では、極東ロシアにおける WNV の侵淫状況を調査し、同地方から日本への WNV の侵入の可能性を推定することを目的として疫学調査を実施した。

B. 研究方法

間接蛍光抗体法 (IFA) による少容量中和試験

96 ウェル平底マイクロプレート (nunc) で2日間単層培養した BHK 細胞に、2%の FCS を含む MEM 培地により適宜希釈した WNV または JEV を感染させ、1.5%のカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC; Wako) を含む MEM 培地を重層し、IFA により感染細胞をフォーカスとして染色し、ウイルスの感染価を focus forming unit/ml として算出した。

被検血清を MEM 培地で希釈し、96 ウェルマイクロプレートに 20 倍から始まる血清の 2 倍階段希釈列を作製し、これにほぼ 100 フォーカス/ウェルとなるように MEM 培地で希釈した WNV 液または JEV 液を等量加えた。各マイクロプレートには、終濃度 50 フォーカス/ウェルとなるよう MEM 培地で WNV 液または JEV 液を希釈した血清対照群を 4 ウェル置いた。このプレートを 37°C で 60 分間、5%CO₂ インキュベーター内に置き、ウイルスの中

和反応を行った。

ウイルスと血清の反応液を 96 ウェル平底マイクロプレートで2日間単層培養した BHK 細胞にウェルあたり 50 μl を、血清希釈ごとに2ウェルずつ接種し、37°C で60分間、5%CO₂ インキュベーター内で吸着を行った。

各ウェルの接種液を除き、PBS (-) で2回洗浄した後、1.5%の CMC を含む MEM 培地をウェルあたり 110 μl 重層し、24時間、37°C、5%CO₂ インキュベーター内に静置培養した。続いてこのプレートから培養液を除去し、PBS (-) で3回洗浄した後、170 μl のメタノールを加えて細胞を固定した。

プレートを PBST { 0.05% Tween20 加 PBS (-) } で3回洗浄後、各ウェルに 3%カゼイン加 PBST を 200 μl ずつ分注し、37°C で1時間ブロッキング処理した。これを PBST で3回洗浄し、一次抗体として 1.5%カゼイン加 PBST で 500 倍に希釈した抗 WNV マウス高度免疫腹水または 800 倍に希釈した抗 JEV マウス免疫腹水を各ウェル 50 μl ずつ加え、37°C で1時間反応させた。このプレートを再び洗浄し、二次抗体として 400 倍に希釈した Alexa 555 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を 50 μl ずつ加え、37°C で1時間反応させた。これを再び PBST で3回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察し、Alexa 555 により蛍光を発しているウイルス感染細胞の集落 (フォーカス) を数えて、各階段希釈の平均値を算出した。

中和抗体価は、血清対照群の各ウェルでフォーカスが約 50 個形成されたことを確認後、被検血清で中和したウェルのフォーカス数の平均値が血清対照群における平均値より 80% 以上減少した最高血清希釈倍率の逆数で表わした。