

200726002B

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ウエストナイルウイルスの侵入に備えての診断、
予防対策への基盤的研究（H17-新興-一般-018）

平成17年度-平成19年度

総合研究報告書

主任研究者 倉根一郎

（国立感染症研究所）

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総合研究報告

- ウエストナイルウイルスの侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究・・・・・・ 1
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

II. 分担研究報告

- ウエストナイルウイルス侵入に備えての一般市民及び渡航者の認知調査と地方衛生研究所における検査体制・・・・・・ 2 7
分担研究者：岡部信彦（国立感染症研究所・感染症情報センター）
- 急性脳炎患者におけるウエストナイルウイルス除外サーベイランス・・・・・・ 3 7
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）
- 野外捕集蚊からのウエストナイルウイルスおよび昆虫フラビウイルスの検出及びウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカ種群蚊における生理・生態学的基礎研究・・・ 4 2
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
- 富山県における蚊の発生調査とウイルス浸淫状況・・・・・・ 5 3
分担研究者：滝澤剛則（富山県衛生研究所・ウイルス部）
- 鳥類における WNV 検出および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究・・・・・・ 6 0
分担研究者：山田章雄（国立感染症研究所・獣医科学部）
- ヒト用ウエストナイル熱ワクチン開発に関する研究・・・・・・ 7 4
分担研究者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）
- 遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発・・・ 8 7
分担研究者：小島朝人（国立感染症研究所・感染病理部）
- フラビウイルスワクチン用アジュバント開発に関する研究・・・・・・ 9 6
分担研究者：森 康子（医薬基盤研究所・基盤研究部）
- 治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明・・・・・・ 1 0 1
分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）
- 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用いた WNV 感染症の新規検査法および新規ワクチンとしての弱毒化ウイルス作製に関する研究・・・・・・ 1 0 5
分担研究者：前田秋彦（北海道大学大学院・獣医学研究科）
- ウエストナイルウイルスによる脳炎発症に関わる T 細胞の解析・・・・・・ 1 1 0
分担研究者：鈴木隆二（国立病院機構相模原病院・臨床研究センター）

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	113
-------------------	-----

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究

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：ウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤を確立することを目的として、社会学・疫学研究、検査・診断研究（予防・治療法研究、蚊検査法研究、鳥検査法研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究）の3項目に分けて遂行した。社会学・疫学研究においては、(1) ウエストナイル熱流行状況に関する国民向け情報をホームページに掲載した。(2) ウエストナイル熱予防対策用CD-R説明書、ウエストナイル熱予防対策用CD-R説明書を作成し国民の啓発に努めた。また、(3) ウエストナイル熱に関する国民の理解状況を明らかにした。(4) 地方衛生研究所と検疫所におけるウエストナイルウイルス検査準備状況を明らかにした。検査・診断研究においては、(1) 病原体・血清検査法を確立し、国内の各研究機関に技術移転した。輸入ウエストナイル奨励を確定診断した。(2) 非感染性ウイルス用粒子を用いた検査キットを作製した。(3) 蚊からのウイルス分離法、感染蚊検出法を確立した。(4) 媒介蚊からのウイルス分離法、遺伝子検出法を確立した。国内におけるウエストナイルウイルス媒介蚊の分布域の拡大状況、また定点での消長を明らかにした。検査した蚊はすべて陰性であった。(5) 鳥類からのウエストナイルウイルス遺伝子、抗体検出法を確立した。国内の鳥類における抗体保有状況を検査しすべて陰性であった。予防・治療法研究においては、(1) 組織培養細胞由来不活性化ワクチンの試験的作製を行い、動物における防御能を示した。さらに安全性試験により安全性を確認した。(2) サブユニットワクチン候補として中空粒子による中和抗体誘導を明らかにした。(3) フラビウイルスワクチンにおけるポリ・グルタミンサ酸のアルミアジュバント効果を確認した。(3) 病態解明のための動物モデルを作製した。(4) ウエストナイルウイルスに対する細胞免疫解析法を確立し、脳内進入T細胞の役割を明らかにした。成果は、国民の理解の増進、ウエストナイル熱・脳炎の輸入症例や国内発生時の診断、ウイルス水際対策の促進、媒介蚊対策、鳥類サーベイランス、ワクチン開発の促進、治療法開発、への活用が可能である。以上よりウエストナイルウイルスに対する総合的な厚生労働行政施策を策定するための科学的基盤を進展させた。

分担研究者：

岡部信彦（国立感染症研究所感染症情報センター センター長）

小島朝人（国立感染症研究所感染病理部 室長）

小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部 部長）

佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部 部長）

鈴木隆二（国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長）

高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部 室長）

滝澤剛則（富山県衛生研究所 部長）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

山田章雄（国立感染症研究所獣医科学部 部長）

前田秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科 准教授）

森 康子（医薬基盤研究所基盤研究部 部門長）

A. 研究目的

ウエストナイル熱・脳炎は北米大陸においては2007年にも引き続き多くの患者発生が報告されている。また、2005年には日本でも初めて輸入ウエストナイル熱患者が確認された。さらに近年シベリア等世界の他の地域においても流行やウイルスの侵入が報告されている。このような状況からウエストナイルウイルスはわが国にとっても大きな脅威であると考えべきである。現在、ウエストナイルウイルスは未だわが国へは侵入していないが、高感受性を有するトリや蚊は日本国

内にも存在することから、仮にわが国に本ウイルスが侵入した場合には急速に日本各地に侵淫することも予想される。また輸血、臓器移植、母乳、透析、経胎盤感染等、蚊の吸血以外の経路による感染対策も必要となる。また、国内への侵入に備えたワクチンの早急な整備も必要となる。さらに、海外において感染した疑い患者が帰国した場合には、迅速な検査による確定診断が必要となる。従って、ウエストナイルウイルス感染対策としてウイルス、ヒト、蚊、トリ等多面的な研究が要求される。

ウエストナイルウイルス対策のための総合的科学的基盤の確立を目的とする。以下の7つの目標を有する。1) 世界のウエストナイル熱流行状況の把握により、国民のウエストナイル熱・脳炎に対する理解を深める、2) ウエストナイル熱検査法の確立、ウイルス検出法の確立と標準化、国内各施設への技術移転、およびウエストナイルネットワークの構築を行う、3) 国内への侵入に備えたワクチンの早急な整備のための基盤確立する、4) 感染蚊検査法の確立、標準化、及び国内各施設への技術移転、および日本における媒介蚊の感受性を明らかにする、5) 感染トリ検査法の確立、標準化、及び国内各施設への技術移転を行う、6) 治療法開発に向けてのウエストナイルウイルス高病原性機序を解明する、7) ウエストナイルウイルスに対する防御免疫を解明する、ことにより新たな治療法開発への基盤を確立する。本研究の研究成果は我が国において、北米におけるようなウエストナイル熱・脳炎の大流行を防ぎ、

国民の健康を守り、社会の安定を維持することに貢献する。

B. 研究方法

本研究は主任研究者倉根、分担研究者11名（岡部、小林、山田、高崎、森田、小島、森、佐多、前田、鈴木、滝澤）の計12名が遂行した。本年度は当初の研究計画に沿い、社会学・疫学研究、検査・診断研究（予防・治療法研究、蚊検査法研究、鳥検査法研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究、防御免疫基盤研究）に関して研究を進めた。国内におけるウエストナイル熱の理解状況、病原体・遺伝子検査法の確立、感染蚊・感染鳥検出のための検査法の確立、ワクチン及びアジュバント開発の基盤的研究、及びウイルスの高病原性解明のためのモデル開発、病原性の分子基盤の解明、を行なった。研究はこれらの各分担研究が独立した科学的事実の集積にとどまることなく、有機的に関連して進められるよう主任研究者の責任を持って進められた。さらに、確立した技術の国内各機関への技術移転、継続的な改訂を行なうことにより、日本全体におけるウエストナイル検査システム網の充実を行なう等、研究成果が行政施策に直結しうるように遂行した。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。研究対象者に対して、研究の目的、個人の不利益、危険性に対して十分

に説明し、倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサインあるいは捺印を得た上で遂行する。動物を用いる実験の倫理面においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なった。

C. 研究結果

1. ウエストナイル熱の認知状況と準備状況

1) ウエストナイルウイルス侵入に備えての一般市民及び渡航者の認知調査：

①. 一般市民の認知

回答数は1回目調査（9月に実施）は5987名、2回目調査（10月に実施）は4268名であった。

WNV感染症の認知は20%であった。死亡リスク（感染経路）まで認知しているのは15（12）%であった。侵入リスクは75%が懸念している。第1例の報道を知っているのは21%であった。需要予測は、小児（6ヶ月以上12歳以下の子供）の推定結果、高齢者の推定結果、成人の推定結果を示し、これらの推定結果をもとに需要曲線を示している。接種費用を5000円、副反応率1/1000万として現在の状況で導入すると、接種希望率は、小児15%、成人8%、高齢者5%であった。

②. 渡航者の認知

対象者情報；20-59歳であるものからは1792人から回答を得た。60-69歳を対照としたはがきを用いた調査において、回答率（2次調査対象者（375人）のはがき提出率）は88%であった。2次調査で回答

が得られたものの内、性・年齢が把握できた 2102 人（有効回答率 99.1%）を集計対象とした。集計対象の年齢中央値は 46 歳（20-69 歳）、男女比は 1:1.4 であった。2102 人のうち渡航歴のないものは 317 人（15.1%）、渡航回数 1-3 回 1456 人（69.3%）、4-6 回 215 人（10.2%）、7-9 回 44 人（2.0%）、10 回以上 70 人（3.2%）であった。

WNV 認知状況；WNV を「見聞きしたことがある (a)」集団は全体の 72.5%（男性；77%、女性 69%）と昨年度調査結果（29%）と比して非常に高かった（ $P<0.01$ ）。「見聞きしたことがある (a)」且つ「感染経路 (b)」を蚊の穿刺だけ選択したものは 20.6% であり、同様に昨年度調査結果（15%）よりも良い結果（ $P<0.05$ ）が得られた。しかし、上の 2 項目且つ「死亡リスク (c)」の高い年齢群として 65 歳を選択したのは、2%（47 人）と昨年（4%）よりも成績は悪かった（ $P<0.01$ ）。

今年度の調査対象において、渡航歴がある者は「見聞きしたことがある (a)」且つ「感染経路 (b)」を蚊の穿刺だけ選択したものが、渡航歴のないものと比して多かった（ $P<0.05$ ）。また、渡航回数が 10 回以上であるものは、(a)、(b)かつ (c)の割合は、渡航歴が 10 回以下のものと比して高かった（ $P<0.05$ ）。(a)、(b)かつ (c)の認知状況と渡航先とは関係はなかった。(a)、(b)かつ (c)の割合は、50 代男性で最も高く、60 代を除く他年齢群の男性と、また同年代の女性と比して有意な差があった（ $P<0.05$ ）。

③ 患者発生情報（サーベイランス）の公開方法の検討（2 年目）

地図データの材料は、NESID からのデー

タ抽出は可能であることが確認された。GIS 表記のための作業量は、データマッチングにおいては簡易な作業であった。このデータマッチングは住所地を「ポイント」としての場所をマッチングさせることができた。GIS 表記は、3 種類を検討し、地理上での表示が可能であることが確認された。1 つは、等級量シグナル表示（ポイント表示）であり、該当箇所に患者数に応じて、等級量を色別で表示する方法である。患者数が多い場合を赤、患者数が少ない場合を青、など識別することが可能な方法であり、色によるクラスターを把握することができる。2 つ目は、比例シグナル表示（ポイント表示）であり、該当箇所に患者数に応じて、表示ポイントの大きさを比例して表示する方法である。患者数が多い場合には大きく、患者数が少ない場合には小さく表示し、大きさによって識別することが可能な方法である。これは、大きさによるので、ある地域に密集する場合表示が重なることもある方法であった。3 つ目は、ある単位で集計した等級量表示（面表示）であり、ポイントで表示されたものを地理上のある単位で空間結合した表示する方法である。該当箇所に患者数に応じて、地理上で集計されたデータを、等級量に応じて色別で表示する方法である。またこれらのシグナル表示、集計表示された地図に、他の情報を組み合わせて、重ねて表示できることが可能であることも確認できた。例えば、患者発生数に死鳥が確認された位置を表示すること、その場所から半径 5 キロ圏内を表示すること、半径 5 キロ圏内にある医療機関、行政機関などを表示

することが確認された。

2) 地方衛生研究所と検疫所におけるウエストナイルウイルス検査準備状況

ウエストナイルウイルス感染症が疑われた場合その検査を担当すると思われる地方衛生研究所における検査体制を把握し、より効果的な体制作りのため、地方衛生研究所ネットワークにおけるメーリングリストを用いて全国の地衛研77カ所と、郵送法による検疫所を対象にした質問票調査を実施し、得られた回答について単純集計を行った。回答を得たすべての全ての都道府県型地衛研と、79%の市区型地衛研において検査実施可能と回答を得た。遺伝子検査は多くの地衛研で実施することが可能であった(98%)が、血清学的検査の実施可能率は低かった(11%)。多くは国立感染症研究所が公開しているマニュアルにしたがって検査の実施が予定されているが、迅速性・簡便性や特定の株の検出を目的として独自選定されたプライマーセットやRT-LAMP法などが導入されている。地域ブロック内における協力体制は、近畿支部と中国・四国支部において構築されており、検査依頼などが可能とされている。また、検査に関する相談先が確保できていない地衛研が存在することが認められ、ウイルス検査専任担当者が3人未満の地衛研においては、協力体制の構築・相談先の確保ともにその割合が3人以上の地衛研と比して低かった。検疫所においては、検査の実施が2検疫所で実施することが定められており、検疫所内における協力体制が構築されていた。

2. ウエストナイルウイルス感染の検査・診断法に関する研究

1) 急性ウイルス性脳炎患者におけるウエストナイルウイルス感染検査:

日本脳炎症例および日本脳炎を疑われた急性脳炎症例について、日本脳炎およびウエストナイルウイルスに関する実験室診断を実施した。2005年は、ウエストナイル熱・脳炎を疑った検査依頼が13件、日本脳炎の検査依頼が12件の計25件があった。そのうち、日本脳炎が5例、ウエストナイル熱が2件であった。ウエストナイル熱はどちらも米国ロサンゼルスで感染した輸入症例で、中枢神経系の症状はなかった。どちらも血清学的診断により確定した。2006年は、ウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が4例であった。2007年もウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が6例であった。2006年の日本脳炎症例のなかの1例は、発病後7ヶ月に渡って経時的に抗体価を測定した。急性期の検体(血清、髄液)は得られなかった。最初の血清は、発病後21日めであった。この血清中のIgM抗体は、日本脳炎ウイルス(JEV)に対してIndex20以上、ウエストナイルウイルス(WNV)に対してはIndex=3.04とどちらも陽性であったが、日本脳炎に有意に高かった。また、中和抗体は、日本脳炎に対して2560倍(陽性)、ウエストナイルウイルスに対して80倍(陽性)であった。IgM抗体は、発病後4ヶ月では陰性となったが、抗WNV中和抗体は4ヶ月目まで80倍を維持し、5ヶ月目に40倍に低下したが、7ヶ月後でも40倍を維持し

た。一方抗 JEV 中和抗体は、7 ヶ月後も 2560 倍を維持した。また、IgG 抗体に関しては、発病後 21 日目、28 日目の時点で抗 JEV IgG 抗体は陽性であったが、抗 WNV IgG 抗体は陰性であった。その後、抗 JEV IgG 抗体はさらに上昇し、抗 WNV IgG 抗体も陽性となった。しかし、抗 WNV IgG 抗体は、84 日目をピークに減少傾向を示した。抗 JEV IgG 抗体は 7 ヶ月後まで上昇傾向を示した。

2006 年の日本脳炎症例では発病後、7 ヶ月にわたり抗体検査を実施し、抗ウエストナイル抗体および抗日本脳炎抗体の推移を検討した。その結果、本日本脳炎患者における抗体推移は、抗日本脳炎抗体に比べて、交叉性抗ウエストナイル抗体は早期に低下あるいは陰性化した。北米でのウエストナイル熱は依然として終息の気配を見せていない。今後も日本脳炎患者あるいは日本脳炎を疑われる患者において、ウエストナイル脳炎は、依然として重要な鑑別疾患であり、今後も除外診断が必要である

2) ウエストナイルウイルス感染蚊検出のため検査法の確立と調査:

蚊からのウエストナイルウイルス (WNV) の検出法として、VecTest、RT-PCR 法、TaqMan 法について、その経済性、検出限界ウイルス力価、迅速性、および煩雑性などを比較検討し、本ウイルスの侵入が確認されていない我国においては、蚊乳剤をまず Vero あるいは BHK 細胞接種後少なくとも 2 代盲継代した後に C6/36 細胞接種系に移し、RT-PCR 法あるいは TaqMan (RT-PCR) 法でウイルス遺伝子を

検出する方法が推奨された。その方法に従って 2003~2006 年の 4 年間で 11 属 50 種、合計 24,407 頭の蚊を捕集し、作成した 1,431 プールからウイルス分離および遺伝子検出を行った。これまでのすべての検体から WNV は検出されず、本ウイルスの日本国内への侵入は未だ見られないと結論された。また、WNV 検出過程でヤブカ属蚊 3 種から新規フラビウイルスを見出し、*Aedes flavivirus* (AEFV) と命名した。そのウイルスゲノムの配列情報から、本ウイルスは昆虫特異的なフラビウイルスであり、国内産アカイエカから分離された *Culex flavivirus* (CXFV) とは異なる系統のものであることが明らかになった。

雌成虫の外部形態では分類が困難であるアカイエカとチカイエカを判別するために、成虫の個眼数による同定法を再検討した。飼育系統を用いた限りでは複眼の 5 あるいは 6 列目の個眼数が 8 個の個体をチカイエカ、9 個をアカイエカと判定してもよいと思われた。しかし、個眼数は幼虫発育時の気温に依存して変動し、さらに、地理的変異も存在した。個眼数によって判別された野外捕集のアカイエカとチカイエカの平均寿命を比較したところ、アカイエカの平均寿命 (36-37 日) はチカイエカ (17-22 日) よりも有意に長く、これらの結果から、アカイエカの疾病媒介能はチカイエカよりも高いと評価された。次いで、アセチルコリンエステラーゼ (ACE) 上に見出される多型領域を利用してアカイエカおよびチカイエカに特異的なプライマーをそれぞれ作成し、それらを一度の PCR で判定するマルチプ

レックス PCR 法を確立した (ACE2-assay)。本法は成虫の脚 1 本、および卵舟由来のテンプレートを用いても目的領域が増幅できる非常に感度に優れる方法である。ACE2-assay によって野外捕集蚊をアカイエカとチカイエカに判別し、それぞれの脂質および脂肪酸含量を比較した。アカイエカ越冬成虫は脂質 (26%) およびシス型パルミトオレイン酸 (C16:1) (50%以上) を多く含み、アカイエカは、低温・短日の冬季への環境変化に向けてパルミトオレイン酸量を増加させることが示唆された。また、この傾向は低温・短日条件下で飼育されたアカイエカにも見られたことから、低温下でもパルミトオレイン酸量を増加させることができるアカイエカは低温下での生存が有利になり、越冬を可能にしていると推察され

3) 富山県における蚊の発生調査とウイルス浸淫状況

ウエストナイルウイルス (WNV) の侵入監視のため、富山県内における蚊の発生状況と幼虫の発生源を調査した。5 年間の蚊成虫調査で 6 属 13 種 9850 頭 (9649 ♀, 201 ♂) が捕集され、アカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカの 3 種で 96.3% を占めた。コガタアカイエカは、水田近くの一般住宅で特に多く捕集された。アカイエカ群は都市部や海岸付近において多く捕集された。ヒトスジシマカも都市部で多く採集された。海岸付近の一般住宅では、イヌが死亡した後に捕集されるアカイエカ群の個体数が大幅に減少した。トラップを樹上にも設置した地点では、アカイエカ群とハマダライエカが樹

上において有意に多く捕集された。幼虫の発生源は、3 年間の調査において 184 種類 1,053 個の溜水環境を調べ、有水率 76.5%、幼虫生息率 26.9% であった。蚊の種類としては、ヒトスジシマカの幼虫が多く場所に分布し、しかも多数生息していることが示唆された。現時点での富山県内の WNV と日本脳炎ウイルス (JEV) の浸淫状況を把握するため、蚊におけるウイルス保有状況、カラスおよびコウモリの抗体保有状況を調べた。2006~2007 年に調査した蚊から WNV は検出されなかったが、10 プールから I 型の JEV が分離された。カラスおよびコウモリからは WNV および JEV に対する抗体は検出されなかった。蚊のウイルス保有調査と野生動物の抗体調査を総合すると、現時点で県内における WNV の浸淫の可能性はないと考えられる。

4) 鳥類における WNV 検出および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究:

① WNV 遺伝子検出法の確立

鳥における WNV 感染を検出する方法について JEV との鑑別を考慮しながら検討した。V および JEV 遺伝子の検出方法として、従来より用いられている PCR、TaqMan PCR に加えて、あらたにハイブリダイゼーションプローブを用いた LightCycler による Real-Time RT-PCR と特異的遺伝子検出のためのカスタムアレイを開発した。これらの方法では、JEV、WNV とともに、その Lineage や Genotype を判別する事を可能とした。

② カスタムマイクロアレイを用いた WNV 遺伝子検出:

ウエストナイルウイルス遺伝子検出の特異性および感度を検討するため、ウエストナイルウイルスをはじめとする各種のフラビウイルス属ウイルスならびに鳥類のウイルス性疾患の原因ウイルス遺伝子をプローブとしたカスタムマイクロアレイを作製した。ウエストナイルウイルス4株、日本脳炎ウイルス3株からRNAを抽出・精製して試験材料とし、カスタムマイクロアレイの反応特異性および検出感度を検討した。その結果、ウエストナイルウイルス4株のうちの3株、日本脳炎ウイルス3株はRNA濃度4 ng/・1でそれぞれウエストナイルウイルス、JEV遺伝子プローブ群と特異的反応が見られ、他種のウイルス遺伝子プローブ群とは反応が認められなかった。0.4 ng/・1では検出限界以下となった。今回作製したカスタムマイクロアレイによって、ウエストナイルウイルス遺伝子の特異的な検出が可能であったが、一部のWNV株では特異的反応が認められなかった。

③ 鳥類における特異抗体の測定：

Blocking-ELISAでは、抗原にWNVを用いたときは、スズメおよびハトのWNV感染血清とWNV免疫ニワトリ血清は特異的にmAbの結合抑制効果を示した。一方、抗原にJEVを用いたときは、JEV免疫ニワトリ血清は特異的にmAbの結合抑制効果を示した。WNV免疫血清も抑制を示したが、スズメおよびハトのWNV感染血清では、全く交差反応を示さなかった。鳥類におけるWNVおよびJEVに対する抗体検査法では、各々に特異的なBlocking-ELISAを確立した。このBlocking-ELISAとPRNTを用いて、鳥類におけるWNVおよびJEV

に対する抗体保有状況を調査した結果、PRNTにより陽性を示す物が、ろ紙による採取法を用いたサンプルからのみ認められた。しかし、いずれもBlocking-ELISAやWestern-Blottingにより特異性の検証を行った結果、サンプルの非特異的反応の可能性が否定できなかった。

3. ウエストナイルワクチン開発に関する研究

1) 不活化およびリコンビナント生ウエストナイルワクチン開発に関する研究：

ウエストナイルウイルスは人や馬での感染では急性熱性感染症を引き起こし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。日本でもウエストナイルウイルスが侵入し定着した場合、多くの動物での発生ならびにヒトにおいても多くの脳炎患者が発生することが危惧される。したがって、本研究ではヒト用不活化ワクチン並びに家畜用リコンビナント生ワクチン開発を目的としている。

平成17年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンをVero細胞を用いた組織培養法で作製し、ワクチン効力試験をマウスにて実施し、その100%感染防御効果を確認した。家畜用リコンビナント生ワクチン開発には、Fusion-PCR法によりウエストナイルウイルスNY99株のE蛋白遺伝子を弱毒日本脳炎生ワクチン株(ML17株)に挿入したキメラウイルスを作出し、ウエストナイルウイルスNY99株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下しており、弱毒株であることを確認した。次いで、ワクチン効力試験をマ

ウスにて実施し、100%感染防御効果を確認した。

平成18年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンについてはGLP試験を実施し、安全であることを確認した。家畜用リコンビナント生ワクチンについてはマウス脳内接種による神経毒性試験を実施したところ若干の病原性が認められたため、キメラのcDNA中に認められた遺伝子変異を修復した。また、ウエストナイルウイルスに対する単クローン抗体を作出した。

平成19年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンについては100%感染防御効果を示すための最少有効投与量および必要IgG抗体価を検討した。さらには追加のGLP試験を実施し、安全であることを確認した。

2) 遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発:

ウエストナイルウイルス(WNV)ワクチン開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子(VLP)産生細胞の樹立を目的とした。平成17年度はWNV prMの上流に配置するシグナルシーケンスのアミノ酸配列長が粒子産生効率に大きな影響を与えることを明らかにし、VLP産生効率を最適化することに成功した。平成18年度はVLPが強い中和活性を持つモノクローナル抗体への反応性を有しており、直径20-25nmの粒子構造を形成していることを明らかにした。平成19年度は、VLP抗原産生細胞株の樹立を試みた。遺伝子導入後の薬剤選択により樹立したCHO細胞

クローンからVLP産生量の大きいクローンを選択した。さらに再クローニングを行いVLP産生量のより大きいクローンを選択した。2度目の再クローニングで、得られたクローンのVLP産生量は1度目の再クローニングを超えなかった。樹立したクローンを無血清培地へ馴化させた結果、細胞は付着培養系より浮遊培養系へと変化した。無血清培地へ馴化した細胞はさらにタンパク質不含培地でも継代可能であることが分かった。樹立した細胞クローンを50代以上継代したがVLP産生量は低下しなかった。また、抗WNV E抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察したが、細胞クローンはほぼ100%の確率で抗原陽性であった。ウエスタンブロット法による解析で、細胞内でのE、prMおよびM抗原の発現は感染細胞ライセートとVLP発現CHO細胞クローン、および無血清培地馴化クローンでそれぞれ発現量の比やプロセッシングに差が見られたものの、培養上清超遠心ペレットには、すべてのクローンで成熟したE、Mタンパク質を確認できた。ショ糖密度勾配による解析により、CHO細胞クローン由来のVLPは、比重1.15g/mL付近のフラクションに単一のピークを示した。電子顕微鏡による観察により、CHO細胞クローン由来の精製VLPは直径25nm程度のサイズの均一な粒子を形成していることを確認した。不活化ウイルス同様、VLPを免疫した血清はWNVによるプラーク形成を阻害できることを確認した。また、VLPをBALB/cマウスに免疫した血清が中和活性を示すことを確認した。次にウイルスチャレンジ実験を行い、VLPのワクチン有効性を検証する段

階まで到達した。

3) ウエストナイルウイルス (WNV) のリバーシジェネティクスを用いた WNV 感染症の新規検査法および新規ワクチンとしての弱毒化ウイルス作製に関する研究：

ウエストナイルウイルス (WNV) の日本への侵入に備え、WNV 感染症の診断法や抗ウイルス薬のスクリーニング法の開発、新規ワクチン候補の作製を目的として、WNV のリバーシジェネティクス法を開発した。ウイルスの構造蛋白質である prM と E 蛋白質を哺乳類動物細胞に発現させることにより、ウイルスの中空ウイルス粒子 (Subviral particles, SvPs) を作製した。ウイルスの構造蛋白質遺伝子の大部分を除去することによって、転写可能であるが粒子形成を欠損したウイルスのレプリコン RNA、レプリコンをウイルスの構造蛋白質と共発現することによって、レプリコンをパッケージングしたウイルス様粒子 (Virus-like particles, VLPs)、そして弱毒組み換えウイルスを作製した。

① SvPs の作製: WNV と日本脳炎ウイルス (JEV) の SvPs を作製し、これらを抗原とした ELISA 法や IFA, Western blot 解析により各ウイルスの感染抗血清を鑑別することが出来た。しかし、各感染抗血清と抗原として用いた両ウイルスの SvPs は弱い交差反応を示した。

②レプリコンの作製: 各種のレポーター遺伝子を発現する WNV レプリコンを作製した。レプリコンのウイルス構造蛋白質の欠失領域にレポーター遺伝子として、DsRed および AcGFP 遺伝子や SEAP 遺伝子

を組み込んだ(それぞれ

repWNV/NY/DsRed, repWNV/NY/AcGFP および repWNV/NY/SEAP)。これらのレプリコンは導入した哺乳類動物細胞において、それらレポーター蛋白質の発現が確認された。

③VLPs の作製: 上述の各種レポーター蛋白質発現 WNV レプリコンを WNV の構造蛋白質と細胞に共発現させ、WNV の VLPs を作製した。また、JEV の構造蛋白質と細胞に共発現させることにより、JEV の構造蛋白質を殻とする VLPs を作製できた。

④組み換えウイルスの作製: WNV の病原性に関与すると考えられている、WNV E 蛋白質の糖鎖付加配列 (ウイルスのポリプロテインの N 末端より 446 番目のアミノ酸) に変異を導入し、糖鎖付加のない E 蛋白質を持つ組み換えウイルスを作製した。本組み換えウイルスは、(糖鎖付加が起こる) 野生型のウイルスに比べ、ウイルス粒子の形成が抑制されていた。また細胞に対する毒性効果も低く、WNV に対する新規ワクチン候補になるものと考えられた。

4) ウエストナイルワクチン用アジュバントの開発に関する研究：

ウエストナイルウイルス侵入に備えての予防対策にはワクチン開発は大きな意義を有する。特に不活化ワクチンあるいは非感染性のサブユニットワクチン開発においては安全かつ効果的なアジュバントの併用が重要である。モデルとして日本脳炎ウイルスに対する新しいワクチン候補として期待されている中空粒子

(VLP) を用いた新規ワクチンの効果および、アルムアジュバントとの併用投与による同ワクチンの感染防御効果の是非について検討した。腹腔内への2回接種後でのVLP免疫マウスの血清中に中和抗体が検出されたが、その抗体価は現行の不活化ワクチン投与に比較し低値を示した。ところがVLPにアジュバントとして水酸化アルミニウムゲルあるいはガンマ-ポリグルタミン酸ナノ粒子を併用することによって中和抗体価の増強がみられた。上記を免疫したマウスを用いてウイルス攻撃試験を行った結果、ワクチン非投与群では20%の生存率であったが、VLP1マイクログラム2回投与群ではアジュバントの有無に関わらず100%の生存率を示した。しかし、VLP1マイクログラムの1回投与群では、マウスが8匹中3匹しか生存しなかった。対して、VLPと水酸化アルミニウムを混合投与した群では8匹中7匹、VLPとガンマ-ポリグルタミン酸ナノ粒子混合投与群では9匹中8匹が生存した。本結果より、VLPとアジュバントの混合投与がより効果的である可能性が示唆された。

また、日本脳炎ワクチンは流行地域への渡航のためのトラベラーズワクチンとしての需要などもあり、1回接種で十分な感染防御効果を示すワクチン改良の検討が望まれる。既存のJEワクチンを用いてアジュバント併用によるワクチンの1回接種法の有用性の検討についてマウスを用いて行った。JEワクチンの1回接種後の中和抗体価は2回接種時の約10分の1であり、JEV感染に対する生存率は50%に留まった。一方、同ワクチンにアジュ

バントとして水酸化アルミニウムゲルないしポリ- γ -グルタミン酸ナノ粒子を加えることで1回接種後の中和抗体価が2回接種時のレベルに上昇し、生存率も100%となった。以上の結果より、併用により1回接種で十分な感染防御効果を誘導するアジュバント開発の可能性が示唆された。

4. ウエストナイルウイルスの病原性の解明に関する研究

1) 治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明:

ウエストナイルウイルス(WNV)の病態解明および開発した治療薬あるいはワクチンを評価するための動物モデルの作製を試みた。BALB/cマウスにWNVを感染させた結果、マウスは消瘦、沈鬱などの臨床症状を示した。組織学的検索で、これらのマウスの一部に脳炎が見られ、免疫組織化学法により神経細胞にWNV抗原が検出された。一方で、腸管病変を示す個体が見られた。ウイルス接種5日目からマウスは、体重減少、立毛などの臨床症状を示した。重症例では後肢の弛緩性麻痺、沈鬱、立毛を示す脳炎症状、あるいは腹部膨満を伴う食欲低下を示し、静脈内接種27匹中25匹、皮下接種26匹中18匹が致死性であった。残りは一過性の体重減少後、回復あるいは無症状で耐過した。材料採取が可能であった、静脈内接種群5匹と皮下接種群13匹を病理学的に検索した。

弛緩性麻痺のみられた2例では脊髄の神経細胞の脱落とそれに伴う炎症が、脳炎症状の見られた3例では大脳皮質の神

経細胞でウイルス抗原が陽性であり、それに伴う炎症所見が認められた。一方で、一過性の体重減少後、回復した4例では、21日目の経過観察後の解剖で、脳あるいは脊髄の一部に炎症所見が認められた。同様の臨床症状のもの1例が、組織学的に著変はみられなかった。立毛、腹部膨満で死亡した3例で、腸管上皮の壊死、リンパ球のアポトーシス(TUNEL法により確認した)が観察され、腸管の神経叢で一部壊死所見がみられたが、その特異性は不明であった。これらの個体で脳炎所見はみられなかった。無症状で21日耐過した5例はいずれも組織変化はみられなかった。WNV抗原陽性細胞は一週間目に死亡した個体の神経細胞にみとめられたが、9日以降ではほとんど検出されなかった。なお、接種方法による特徴的な病変の相違はなかった。組織病変を脳炎のみ、脳炎+腸炎、腸炎のみ、組織病変なしの4つに分類し、接種ウイルスの濃度、経路別または解剖した日数別に特徴を見た。ウイルス濃度、経路別では病変の出現に対し特徴は見られなかったが、解剖日別に分類すると7,8日目に瀕死となったマウスに腸管病変の出現が多いことが分かった。しかし、脳炎および病変なしについては、どの解剖日にも出現しており、特徴は明らかにならなかった。

2) ウエストナイルウイルスによる脳炎発症に関わるT細胞の解析:

ウイルス感染時において、細胞性免疫はウイルス感染細胞の排除に重要な役割を担っていると考えられている。本研究

では、WNV感染マウス脳炎モデルを用いて、WNV感染時における中枢神経障害のメカニズムを免疫調節に関与するT細胞に着目し、これが脳炎の発症と防御に果たす役割を明確に解明する事を目的に、脳炎発症に伴い脳内に浸潤するT細胞の詳細な解析を行った。まずJEV感染モデルにおいても解析を行った。感染10日目の脳内には3個体に共通した特徴的TCRレパトアの偏りとして、 $V\alpha 5-1, 17-1, 19-1, V\beta 2-1, 8-3, 13-1$ を認めた。CDR3 size spectratypingによりclonalityを検討した結果、 $V\alpha 5-1, 11-1, 18-1, V\beta 8-3, 13-1$ にclonalityが観察された。これらTCRのCDR3アミノ酸配列の結果、 $V\alpha 5-1, 11-1, 18-1, V\beta 8-3, 13-1$ に高頻度に同一もしくは近似したクローンが存在していた。リアルタイムPCRによる脳内浸潤T細胞の機能的な解析を行った結果、感染が進むにつれてCD3、CD8、 $INF\gamma$ 、 $TNF\alpha$ の上昇が認められ、Th1/Tc1タイプであることが確認された。

次にWNV感染マウス脳炎モデルを用いて、WNV感染時における中枢神経障害のメカニズムを免疫調節に関与するT細胞に着目し、これが脳炎の発症と防御に果たす役割を明確に解明する事を目的に、脳炎発症に伴って脳内浸潤T細胞の詳細な解析を行った。感染10日目の脳内には3個体に共通した特徴的TCRレパトアの偏りとして、 $V\alpha 1-1, V\alpha 2-1, V\beta 5-2, V\beta 8-2, V\beta 11-1, V\beta 16-1$ を認めた。また、偏りが認められたTCRレパトアに対して、CDR3 size spectratypingによりclonalityを検討した結果、 $V\alpha 1-1, V\alpha 1-2, V\alpha 2-1, V\beta 5-2, V\beta 8-2, V\beta 15-1$ にお

いて、高い clonality が認められた。これらのうち、CDR3 アミノ酸配列の解析では、 $V\alpha 1-1$, $V\alpha 2-1$ に関しては、異なる個体間で同一のクローンが高頻度に存在している事が確認され、 $V\beta$ に関しては高頻度で共通した TCRJ 領域の使用を認めた。リアルタイム PCR による脳浸潤 T 細胞の機能的な解析を行った結果、感染が進むにつれて CD3、CD8、 $INF\gamma$ 、IL-2、 $TNF\alpha$ の上昇が認められ、Th1/Tc1 タイプであることが確認された。また WNV エンベロープに対する特異的プライマーを用いて、組織中に存在したウイルス RNA 量を検討した結果、脳内に多数のウイルスが存在することも確認された。

以上より、感染 10 日目の脳内には特徴的な T 細胞レセプター (TCR) レパトアの偏りが観察された。さらに、偏りのあった各レパトアは高い clonality が存在している事が観察された。複数の個体間で CDR3 に同一のアミノ酸配列を示すクローンが存在していた。また、感染後に $INF\gamma$ 、IL-2、 $TNF\alpha$ の増加が経時的に認められた。以上の事から、近交系マウスを用いた WNV 脳炎モデルでは、脳内に浸潤した T 細胞はクローンレベルで同一もしくは近似した WNV 関連エピトープを認識している事が示唆された。さらに、脳内に浸潤した T 細胞が Th1/Tc1 タイプであることが明らかとなった。

D. 考察

ウエストナイル熱・脳炎は北米大陸においては 2007 年も多くの患者の発生があった。さらに、日本へ渡り鳥が飛来するシベリアにもウエストウイルスが侵入し

ていることが明らかとなっている。本研究はウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤の確立を目的として遂行された。

現在わが国におけるウエストナイル熱における問題点として、(1) ウエストナイル熱・脳炎に対する国民の理解、啓発のための情報は十分でない、(2) ウエストナイル熱・脳炎の実験室診断技術の標準化、普及は十分でない、(3) ウエストナイル熱ワクチンは実用化されていない、(4) 日本産蚊種のウエストナイルウイルス媒介能や分布調査は行われていない、(5) ウエストナイルウイルス感染鳥検査技術の確立と標準化、普及は十分でない、(6) ウエストナイルウイルスに対する防御免疫、高病原性の機序は解明されていない、等があげられる。その解決を目標として、研究を遂行した。研究は大きく社会学・疫学的研究、検査・診断研究(実験室検査法開発研究、蚊検査法研究、鳥検査法研究)、予防・治療法研究(ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究)の 3 項目に分けて遂行された。

倉根はウエストナイル熱予防対策用 CDR 説明書および Q & A 小冊子を作成し国民の理解を進めた。岡部はウエストナイル熱に関する国民の理解状況を明らかにするとともに、流行状況をリアルタイムに示すシステムを確立した。小林は媒介蚊からのウイルス分離法、遺伝子検出法を確立し、国内で収集した検査した蚊がすべて陰性であることを示した。山田は鳥類からのウエストナイルウイルス遺伝子検出法および抗体検査法を確立した。国内の鳥類における抗体保有状況を

検査しすべて陰性であった。高崎はウエストナイル熱検査法の改良を行い、同時に、ウエストナイル熱疑い患者検体を検査し感染を否定した。また、ウエストナイルワクチンと日本脳炎ワクチンそれぞれの特異的防御を示し、また部分的交叉性防御と抗体応答を明らかにした。森田は組織培養不活性化ウエストナイルワクチンの試験的作製を行い、安全性を確認した。小島はサブユニットワクチン候補として中空粒子による中和抗体誘導を明らかにした。森はフラビウイルスワクチンにおけるポリ・グルタミン酸アジュバントの有用性を確認した。佐多はウエストナイル熱、脳炎の病態解明のための動物モデルを作製し、病理学的検索に有用な特異抗体の検討と陽性コントロールの作製を行った。前田は新型検査キットの開発に使用しうる非感染性ウイルス用粒子の作製に成功した。鈴木はウエストナイル脳炎における脳内の細胞性免疫解析法を確立した。滝澤は富山県における蚊捕獲数の変化を示した。今年度は計画どおり研究が進展した。

成果は今後以下のように活用される。

(1) ウエストナイル熱・脳炎に対する国民の理解が増進される。(2) ウエストナイル熱・脳炎の輸入症例、国内発生時の迅速かつ確実な診断が可能となり、さらに、地方衛生研究所や検疫所のウエストナイル熱検査の向上と水際対策が促進される。(3) ウイルス侵入時におけるウエストナイルウイルス媒介蚊サーベイランス、および媒介蚊対策に対する科学基盤が提供される。(4) 鳥類による国内へのウエストナイルウイルス侵入のサーベイ

ランス、および侵入した場合の対策を促進する。(6) ウエストナイル熱ワクチン開発が促進される。(7) アジュバントによる防御免疫誘導の増強が可能となる。(7) ウエストナイルウイルス病原性の科学基盤に基づいた治療法開発が可能となる。以上により、わが国における総合的なウエストナイルウイルス対策の推進が可能となる。

E. 結論

わが国におけるウエストナイルウイルス対策のための総合的科学的基盤の確立を目的とし、社会学的研究、検査・診断研究（実験室検査法開発研究、蚊検査法研究、トリ検査法研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究、防御免疫基盤研究）を遂行した。ウエストナイル熱・脳炎はまだ一般国民に十分には認識されていない。一方、検査・診断研究においては、確立した実験室診断法がヒトにおけるウエストナイルウイルス感染の確定診断に有用であるが、他の類似ウイルス感染時の交差反応に注意すべきであることが明らかとなった。感染蚊や感染鳥の検出法の確立も進展した。これまでに検査した蚊や鳥はすべてウエストナイル陰性であった。予防・治療法研究においては、組織培養細胞由来不活性化ワクチンの試験的作製を行い前臨床試験として安全性を示した。また、ウエストナイルウイルスの病原性解明のためのモデルが確立した。本研究によって、ウエストナイルウイルス対策のための総合的科学的基盤が大きく進展した。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 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.

Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, Saxena, N. K., Ambuj, P. S., Sahni, A. K., Rao, P. V. Lakshmana, and Morita, K. Development and Evaluation of Reverse transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of Japanese Encephalitis Virus. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 44: 4172-4178, 2006

Natividad, F.F., Daroy, M.L.G., Alonzo, M.T., Matias, R.R., Suarez, L.A.C., Inoue, S., Use of IgM-capture ELISA for confirmation of Japanese encephalitis infections in the Philippines. *Southeast Asian J Trop Med*

Public Health, Vol.37 (suppl 3), 136-139, 2006.

Oishi, K., Mapua, C.A., Carlos, C.C., Cinco-Abanes, M.T.D.D., Saito, M., Inoue, S., Morita, K., Natividad, F.F., Dengue and other febrile illness among children in the Philippines. *Dengue Bulletin* Vol.30, 26-34, 2006.

Carlos, C.C., Oishi, K., Cinco, M.T.D.D., Mapua, C.A., Inoue, S., Cruz, D.J.M., Pancho, M.A.M., Tanig, C.Z., Matias, R.R., Morita, K., Natividad, F.F., Igarashi, A., Nagatake, T., 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 (2), 435-440, 2006.

Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M. (2006) Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern Hokkaido, Japan. *Med. Entomol. & Zool.* 57: 93-98. 2006

Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M. and Sawabe K. (2007) Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology.* 359: 405-414. 2007

Hamano, M., Lim, C.K., 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. *Epidemiology and Infection*, 12, 1-4, 2007
- Nerome, R., Tajima, S., Takasaki, T., Yoshida, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Ito, M., Sugiyama, A., Yamauchi, A., Yano, T., Kameyama, T., Morishita, I., Kuwayama, M., Ogawa, T., Sahara, K., Ikegaya, A., Kanda, M., Hosoya, Y., Itokazu, K., Onishi, H., Chiya, S., Yoshida, Y., Tabei, Y., Katsuki, K., Tabata, K., Harada, S., Kurane, I. Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J. Gen. Virol*, 2007. 88(Pt 10):2762-8.
- Yu, F., Hasebe, F., Inoue, S., Mathenge, E. G., Morita, K., Identification and characterization of RNA-dependent RNA polymerase activity in recombinant Japanese encephalitis virus NS5 protein. *Arch Virol*. Vol.152 (10): 1859-1869, 2007.
- Dimaano, E. M., Saito, M., Honda, S., Miranda, E. A., Alonzo, M.T.G., Valerio, M.D., Mapua, C.A., Inoue, S., Kumatori, A., matias, R., Natividad, F.F., Oishi, K. Lack of efficiency of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 77 (6), 1135-1138, 2007.
- Pandey, B.D., Morita, K., Khanal, S.R., Takasaki, T., Miyazaki, I., Ogawa, T., Inoue, S., Kurane, I., Dengue Virus, Nepal. *Emerging Infectious Diseases*. Vol.14 (3), 514-515, 2007.
- Kitabatake, M., Inoue, S., Yasui, F., Yokochi, S., Arai, M., Morita, K., Shida, H., Kidokoro, M., Murai, F., Le, M.Q., Mizuno, K., Matsushima, K., Kohara, M., SARS-Co V spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine*, Vol.25, 630-637, 2007.
- Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 2008
- Maeda, A., Maeda, J., Takagi, H., and Kurane, I. Detection of small RNAs containing the 5'- and the 3'-end sequences of viral genome during West Nile virus replication. *Virology* 371 : 130-138, 2008
- Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A. A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods* 148 : 244-252, 2008
- Zheng, K., Zhou, H.-Q., Yan, J., Ke, C.-W., Maeda, A., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., Ma, H., and Xie, X.-M. Molecular

characterization of the E gene of dengue virus type 1 isolated in Guangdong Province, China, in 2006. *Epidemiology and Infection* In press 2008

Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I: Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61(1):40-8.

Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawabe, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Ishikawa, T., Motoki, M., Takahashi, T., Tanikawa, T., Yoshida, M., Shinjo, G., Hashimoto, T., Higa, Y. and Kobayashi, K. PCR-Based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press) 2008.

Okamoto, S., Yoshii, H., Ishikawa, T., Akagi, T., Akashi, M., Takahashi, M., Yamanishi, K., Mori, Y. Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 26:589-594, 2008.

森田公一：西ナイル熱・脳炎 — 最近の動向. 長崎市医師会報 39: 14-16, 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：ウエストナイル熱. モダンフィジシャン 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 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、デング熱を中心に）. カレントセラピー 27 : 722-724, 2005.

森田公一：ウエストナイル脳炎. *Infectious Disease Report* No28, 2005.

森田公一：ウエストナイルウイルス. *Drug Delivery System.* 20 : 556-557, 2005.

森田公一：西ナイル熱の現状. *Medical Science Digest* 31 : 548-549, 2005

小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史：本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. *感染症学雑誌* 80:56-57, 2006

林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルス. *日本臨床* 63（増刊号 7）：321-323, 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*, 53: 721-727, 2005

林 昌宏、高崎智彦：ウエストナイル熱/脳炎. *遺伝* 59: 37-42, 2005

林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策. *山口獣医学雑誌*, 32 : 1-12, 2005