

岡 智一郎、片山 和彦、宮下 佳奈、山本 真民、ハンスマン グラント、脇田隆字、武田 直和「サポウイルスプロテアーゼのトランス切断活性」日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜

片山和彦「ノロウイルスの感染症の基礎」第82回日本感染症学会総会シンポジウムノロウイルス感染症の最前線 平成20年4月17-18日 島根県松江市

片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和「ノロウイルスリバーシジェネティックスシステムの制御」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイランド

片山和彦、村上耕介、鈴木さやか、岡島徹也、灘野大太、岡 智一郎、松田 幹「ノロウイルス・ウイルス様粒子(VLPs)のヒト腸上皮様 Caco-2 細胞への結合様式とウシ初乳のVLPs 結合抑制効果」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイランド

岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、脇田 隆字、佐藤 裕徳、武田 直和「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイランド

横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、神田忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会2008年12月9日(火)～12日(金)神戸ポートアイ

ランド

片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和「リバーシジェネティックスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

片山和彦「ノロウイルスのリバーシジェネティックスシステムとその展望」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、武田直和、杉山和良「国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村 和嗣、守宏美、中村浩美、脇田隆字、佐藤裕徳、武田直和「カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

北島正章、岡智一郎、片山和彦、原本英司、片山浩之、武田直和、大垣眞一郎「河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、岡智一郎、片山和彦、武田直和「長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事

例」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Hansman Grant、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本恭、秋山美穂、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

原田誠也、岡田峰幸、岡智一郎、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、中島龍一、篠崎邦子、片山和彦、武田直和「サポウイルスによる散发性下痢症の地域流行-熊本-」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

植木洋、庄司美加、山本美和子、阿部勝彦、伊藤文明、池田義文、西尾治、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛「カキを用いたサポウイルスの環境調査」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

飯塚節子、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛「サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

岩切章、山本正悟、岡智一郎、片山和彦、武田直和「リアルタイムRT-PCR法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサポウイルス排泄期間の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

小澤一弘、岡智一郎、片山和彦、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳、武田直和「調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査」第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山

村田亮、好井健太郎、荻和宏明、江下優樹、高島郁夫：ウエストナイルウイルスのE蛋白

白糖鎖が宿主内におけるウイルス増殖に与える影響：第145回日本獣医学会学術集会、相模原（2008，3）

前田潤子、村田亮、荻和宏明、倉根一郎、高島郁夫、前田秋彦：ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別中和試験法の開発：第146回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008，9）

真田崇弘、荻和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：多種類のハンタウイルス血清型の検出が可能な抗原検出法の開発：第146回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008，9）

千葉裕美子、伊川綾恵、好井健太郎、大森優紀、村田亮、荻和宏明、高島郁夫：ウイルス様粒子を用いたダニ媒介性脳炎の新たな診断法の開発：第146回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008，9）

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中空ウイルス様粒子のワクチンへの応用：第146回日本獣医学会学術集会、宮崎（2008，9）

村田亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太郎、荻和宏明、梅村孝司、高島郁夫：ウエストナイルウイルスのE蛋白白糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響：第56回日本ウイルス学界学術集会、岡山（2008，10）

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中空ウイルス様粒子のワクチンへの応用：第56回日本ウイルス学界学術集会、岡山（2008，10）

真田崇弘、荻和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、

宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：多種類のハンタウイルス血清型の検出が可能な抗原検出法の開発：第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山(2008, 10)

Nur Hardy Abu Daud、莉和宏明、石塚万里子、瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、Evgeniy Tkachenko、高島郁夫：Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTK/Ufa-97 isolated from a patient of hemorrhagic fever with renal syndrome：第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山(2008, 10)

Nur Hardy AD, Kariwa H, Ishizuka M, Seto T, Miyashita D, Sanada T, Nakauchi M, Yoshii K, Maeda A, Yoshimatsu K, Arikawa Jiro, Tkachenko E, Takashima I: Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTK/Ufa-97 to evaluate as a future vaccine candidate for hemorrhagic fever with renal syndrome: 第145回日本獣医学会学術集会、相模原(2008, 3)

莉和宏明、瀬戸隆弘、Evgeniy A. Tkachenko、Vyacheslav G. Morozov、Alexander E. Balakiev、谷川洋一、中村一郎、橋本信夫、吉松組子、宮下大輔、中内美名、好井健太郎、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8回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京(2008, 11)

山中敦史、酒井陽平、小西英二：インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

北井陽子、近藤高志、小西英二。ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利

用の抗体測定法。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二：日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中のWNV特異NS1抗体測定：ブロッキングELISA法とCDC法の評価。第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2008年10月

宮川優子、山中敦史、小西英二： Dengue 2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的NS1抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

桑原三和、小西英二：日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月

長嶋茂雄、渡辺祥二郎、石埜正穂、小林宣道。バングラデシュ(マイメンシン市)における小児および成人下痢症由来A群ロタウイルスの分子疫学的解析。第78回日本衛生学会、2008年3月、熊本。

小林宣道、長嶋茂雄、石埜正穂、渡辺祥二郎、Wang Yuanhong, Zhou Xuan. 中国・武漢市における成人および小児下痢症由来G1, G3, G9ロタウイルスの分子疫学的解析。第56回日本ウイルス学会 2008年10月、岡山

長嶋茂雄、Paul Shyamal, 渡辺祥二郎、石埜正穂、小林宣道。バングラデシュにおける小児および成人下痢症由来A群ロタウイルスの遺伝子学的解析。第56回日本ウイル

ス学会 2008年10月、岡山

渡辺祥二郎、小林宣道、中国・武漢市における成人および小児由来G1, G3, G9 ロタウイルスの分子疫学的解析. 第40回日本小児感染症学会 2008年11月、名古屋.

西條政幸, 塩田智之, 鍋谷達夫, 倉根一郎, 森川茂: 293T細胞におけるHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用: 第18回抗ウイルス療法研究会, 鹿児島 (2008. 5)

西條政幸: 1類感染症: 第3回輸入感染症講習会, 逗子市 (2008. 9)

水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 片野晴隆, 黒田誠, 関塚剛史, 渡辺俊平, 明石博臣, 竹原一明, 木原悠希, 佐藤朝光, 西村美保, 酒井宏治, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 中内美名, 倉根一郎, 森川茂: ウイルスの網羅的検出法 (RDV法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

酒井宏治, 網康至, 水谷哲也, 岩切章, 山本正悟, 平井明香, 須崎百合子, 滝本一弘, 田原口元子, 飯塚愛恵, 福士秀悦, 西條政幸, 永田典代, 長谷川秀樹, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂: 急性呼吸器疾患患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 飯塚愛恵, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: 劇症型サル痘に関する解析: 性状, ウイルス学的所見, 病理: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

飯塚愛恵, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

福士秀悦, 中内美名, 酒井宏治, 西條政幸, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: リフトバレー熱ウイルスのNPに対する単クローン抗体の作製と抗原検出ELISA法への応用: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

中内美名, 福士秀悦, 酒井宏治, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂: 南米出血熱の実験室診断法の開発: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

西條政幸, 網康至, 永田典代, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 水谷哲也, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒痘そうワクチンLC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討: 第12回日本ワクチン学会学術集会, 熊本市 (2008. 11)

村上 学, 上村 清, 及川陽三郎, 太田隆英, 石垣靖人, 竹上 勉: 石川県での分離JEVの生物活性 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 観音寺 (2008. 5)

竹上 勉, 村上 学, 佐藤杏子, 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 発現の網羅的解析, 第12回神経ウイルス研究会, 屋久島 (2008, 7)

竹上 勉, 村上 学, 佐藤杏子, 太田隆英, 石垣靖人: 日本脳炎ウイルス感染による宿主遺伝子発現およびmiRNA動態への影響, 第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究

会、岡山 (2008, 10)

村上 学、佐藤杏子、竹上 勉:石川県(1998年—2008年)での野外蚊からの日本脳炎ウイルス分離と生物活性、第56回日本ウイルス学会、岡山 (2008, 10)

中込治 ロタウイルスワクチンの現状と課題、第56回日本ウイルス学会、岡山 (2008, 10)

中込とよ子:ロタウイルス脳炎・脳症:抗原血症との関連はあるのか、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山 (2008, 10)

中込治、中込とよ子:ネパールに大規模出現した新興株G12P[6]ロタウイルスの分子疫学第56回日本ウイルス学会、岡山 (2008, 10)

中込とよ子、中込治:東アジアと南米に新興出現したG12P[9]ロタウイルスのゲノムの相同性第56回日本ウイルス学会、岡山 (2008, 10)

中込治、中込とよ子、横尾美智代、佐藤尊範:ロタウイルスワクチンのわが国への導入に関する検討、第12回日本ワクチン学会、熊本 (2008, 11)

中込とよ子、中込治:定期接種に導入したロタウイルスワクチンの有効性の検証:ブラジルでの調査 第12回日本ワクチン学会、熊本 (2008, 11)

塩田星児、Kamruddin Ahmed、三舟求真人、西園 晃:狂犬病ウイルス迅速診断キットの開発とその評価 平成20年4月17日～18日松江市 第82回日本感染症学会総会

西園 晃:狂犬病ウイルス 平成20年7月19日～20日仙台市 第7回みちのくウイルス塾(日本ウイルス学会後援)

塩田星児、後藤和代、西園 晃:狂犬病ウイルス感染成立における樹状細胞の役割とワクチン効果 平成20年10月3日～4日熊本市 第45回日本ウイルス学会九州支部総会

塩田星児、松本 昂、Khawplod Pakamatz、後藤和代、Kamruddin Ahmed、万年和明、三舟求真人、西園 晃:狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価 平成20年10月26日～28日岡山市 第56回日本ウイルス学会

塩田星児、Kamruddin Ahmed、万年和明、三舟求真人、西園 晃:狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価 平成20年11月8日～9日熊本市 第12回日本ワクチン学会

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一:長野県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査(1)、第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

鍋島武、井上真吾、住吉誠、春田泰弘、Phan Thi Nga、Hyunh Thi Kim Loan、Vu Thi Que Huong、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一:東アジア、東南アジアにおける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移、第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

井上真吾、福家功、石川豊数、Guillermo Posadas Herrera、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一:西ナイルウイルス不活化ワクチンの開発と最小有効投与量の評価、第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

村木優子、松浦正明、福家功、真鍋貞夫、

石川豊数、奥野良信、東雍、森田公一：ウエストナイルワクチンのマウス及びイスにおける免疫原性について。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

左一八、在原雅貴、杉浦信夫、木全弘治、鈴木康夫、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖分子に対するフラビウイルス結合性の解析：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

長谷部太、木下一美、VuThiQueHuong、Michael O. Baclig、Ronald R. Matias、Filipinas F. Natividad、井上真吾、森田公一：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市(琴弾荘)、2008年5月30日-31日

NGWE TUN MYA MYAT、Kyaw Zin Thant、Parquet Maria del C.、井上真吾、Yee Yee Lwin、Pe Thet Khin、Tin Myint、Khin Htwe、鍋島武、森田公一：ミャンマー北部におけるデングウイルス感染症の分子疫学および血清学的調査。Molecular epidemiological and serological surveillance on dengue virus infection in Upper Myanmar。第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

鍋島武、Hyunh Thi Kim Loan、井上真吾、住吉誠、春田泰宏、Phan Thi Nga、Vu Thi Que Huong、Parquet Maria del Carmen、長谷部太、森田公一：東アジア、東南アジアにおける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移。Japanese encephalitis virus travelling from Southeast Asia to East Asia。第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

木下一美、Huong Vu Thi Que、Hung Nguyen

Thanh、Michael Baclig O、Corazon Buerano C、Ronald Matias R、Filipinas Natividad F、井上真吾、森田公一、長谷部太：デング患者の抹消血中におけるウイルス準種(viral quasispecies)と細胞向性。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

左一八、森田公一、鈴木隆：フラビウイルス-硫酸化糖鎖分子間相互作用の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

長谷部太、Mai Le Thi Quynh、Thuy Nguyen Thi Thu、Thach Nguyen Co、Cuong Vuong Duc、Dinh Bui Thi、Phuong To Thanh、Ba Nguyen Van、井上真吾、余 福勳、Thong Vu Dinh、森田公一：ベトナムに棲息するコウモリにおける新興再興ウイルス感染症の調査。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

鍋島武、井上真吾、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一：日本脳炎ウイルスの東南アジアから日本への移動経路について。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

久保亨、井上真吾、鍋島武、森田公一：デングウイルスの4血清型の全てを同時に検出可能なデングウイルス共通 RT-LAMP 法の確立。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

久保亨、森田公一：黄熱病ウイルスに対する RT-LAMP 法の確立。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

久保亨、井上真吾、岡本健太、森田公一：精製黄熱病ウイルスを用いた間接 ELISA 法による黄熱病血清疫学診断法の確立と、そのケニア共和国における応用。第56回日本

ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008
年10月26-28日

余福勲、長谷部太、井上真吾、森田公一：
JEV NS3 protein inhibit RNA polymerase
activity of JEV NS5 protein in vitro.
第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山
県岡山市、2008年10月26-28日

森田公一：アジアにおける疫学、第12回日
本ワクチン学会学術集会・熊本市、2008年
11月8-9日

村木優子、松浦正明、福家功、真鍋貞夫、
石川豊教、奥野良信、東雍、森田公一：培
養細胞を用いた不活化ウエストナイルワク
チンの開発、第12回日本ワクチン学会学術
集会・熊本市、2008年11月8-9日

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

研究分担者 高島 郁夫 北海道大学大学院 教授

研究要旨:TBEVの中空ウイルス様粒子(SPs)を用い、野鼠からTBEV特異抗体を検出するELISA法を開発した。野鼠における本法の診断結果と中和試験での結果を比較したところ、感度91.4%、特異度100%とともに高い検出精度を示した。さらに本法は、TBEV流行地区での疫学調査で得た野鼠にも応用可能であったことから、TBEV分布状況の把握のためのスクリーニング法として有用であることが示された。ここで開発したELISAをスクリーニングに用い、中和試験で確認する方法で日本の各地の野鼠の血清を用いた血清疫学調査を実施したところ、島根県でTBEVの抗体陽性例を確認した。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis:TBE)ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、マダニ類によって媒介される危険度の高い人獣共通感染症の原因ウイルスとして知られ、ヒトに致命的な脳炎を引き起こす。

近年、北海道において患者の発生が確認され、さらに患者発生地区のヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)と野ネズミからTBEウイルスが分離されたことによって、患者発生地区に本ウイルスの流行巣が存在する事が明らかになった。北海道各地および本州にも、ベクターとなるマダニや病原巣となりうる小型野生げっ歯類が広く分布する事から、日本国内においてTBEウイルスが分布している可能性が高いと思われる。従って、TBEウイルス流行への防止対応策の確立が必要とされて

いる。

対応策の確立には、TBEウイルスに対する診断法により疫学調査を行い、ウイルスの分布状況を把握し、流行の予測を図ると同時に、ワクチンなどの予防法や特異的な治療法の確立が必要である。しかし、TBEウイルスは危険度が高く、生のウイルスを用いるためにはP3レベルの高度安全施設が必要であるなど、その使用は大きく制限されている。そこで本研究では、TBEウイルスの組換えウイルス粒子を作成し、診断法や予防法の確立へ応用した。

B. 研究方法

TBEウイルスの中空ウイルス様粒子(SPs)の発現と回収:

TBEウイルスのprM蛋白とE蛋白領域を含む

プラスミド pCAGprME(112)を、293T 細胞にトランスフェクションし、SPs を発現した。

293T 細胞を 150 cm² 細胞培養用フラスコに 3 × 10⁶ 個となるように加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一晚培養し、細胞をフラスコ底面に吸着させた。TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus) 120 μl と Opti-MEM™ (GIBCO BRL) 2,000 μl を穏やかに混和し、室温で 15 分間静置した後、pCAGprME を 40 μg 加えて穏やかに混和し、室温で 15 分間静置した。150 cm² フラスコの細胞培養液を L-グルタミン (2 mM) および BSA (1%) を含む DMEM に交換したのち、混合液を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 36 時間培養し、TBE ウイルスの SPs を発現させた。

トランスフェクション後、36 時間培養した 293T 細胞培養上清を回収し、12,000 rpm、4°C、20 分間遠心し、上清を回収した。終濃度が 10% ポリエチレングリコール (PEG) 8,000、1.9% NaCl となるように PEG-NaCl 溶液を加え、4°C で 2 時間、穏やかに振盪した。その後、16,000 × g、4°C で 20 分間遠心して上清を除き、沈澱を 160 μl の PBS(-) で懸濁し、この懸濁液を ELISA 用抗原として用いた。サンドイッチ ELISA 法の術式：

抗 E 蛋白ウサギ IgG 抗体を Capture 抗体とし、Carbonate-bicarbonate buffer (Sigma) で 5 μg/ml となるように希釈し、96 ウェル EIA プレート (Costar) に各ウェル 50 μl ずつ分注したものを、4°C にて一晚静置した。これを各ウェル 200 μl の PBST で 5 回洗浄し、超純水で 4 倍に希釈したブロックエースを各ウェル 200 μl 加え、37°C で 1 時間静置し、ブロッキングを行った。再び PBST で洗浄後、陽性抗原に SPs、陰性抗原に pCAGprME をトランスフェクションしていない 293T 細胞の培

養上清を SPs と同様に処理したものをを用い、それぞれ ELISA buffer (0.5% BSA 加 PBST) で 150 倍に希釈したものを 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置し、抗原と反応させた。再度洗浄した後、ELISA buffer で 100 倍に希釈した被検血清を 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置した。再度洗浄した後、ELISA buffer で 5000 倍に希釈した ALP 標識抗マウス IgG 抗体を 50 μl 加え、37°C で 1 時間静置した。再度洗浄した後、基質として p-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma) を各ウェル 100 μl ずつ加え、37°C で 60 分反応させ、405 nm の吸光度から 620 nm の吸光度を引いたものを測定した。

サンドイッチ ELISA 法の成績評価：

ELISA 法の成績は、陽性対照 (P) と陰性対照 (N) の差を次の式に従って算出した。

$P-N$ 値 = 陽性抗原 (SPs) における OD 値 - 陰性抗原 (トランスフェクションしていない 293T 細胞の培養上清) における OD 値

既に中和試験の結果が分かっている上磯町の野鼠血清から、中和試験陽性の血清 35 検体、陰性の血清 85 検体について ELISA 法を行った。各 $P-N$ 値において、中和試験の結果を基準として特異度 (中和試験陰性の検体のうち、ELISA 陰性である割合) と感度 (中和試験陽性の検体のうち、ELISA 陽性である割合) を求め、検出精度が最も高くなる $P-N$ 値を Cut off 値と定めた。各野鼠血清の ELISA 法における $P-N$ 値が、この Cut off 値を越える場合、ELISA 陽性と判断した。

さらに青森、島根、富山、愛知、岐阜で捕獲した野鼠の血清 692 検体について ELISA でのスクリーニングと中和試験での確定による抗体調査を実施した。

(倫理面からの配慮について)

特に無し

C. 研究結果

TBE ウイルスの疫学調査に用いる上で有用と考えられる野鼠の血清から、TBE ウイルス特異抗体を検出するサンドイッチ ELISA 法を開発した。本法の抗原には、以前当研究室で作成した中空のウイルス様粒子(Subviral particles; SPs)を用いた。SPs は、組換え pM、E 蛋白を哺乳動物細胞で発現させることで作成され、本来のウイルスと同様の抗原性および免疫原性を示すことが明らかとなっている。中和試験を基準とした本法の検出精度を検討するため、中和試験陽性 35 検体、陰性 85 検体の野鼠に対し、本法を用いて抗体の検出を行った。その結果、Cut off 値 0.089 において感度 91.4%、特異度 100%とともに高い検出精度を示した。さらに、極東型 TBE ウイルス流行地区のロシアハバロフスク市で行った疫学調査で得た野鼠血清に対し、本法を応用した。疫学調査から得られた野鼠 29 検体のうち、3 検体が ELISA 陽性と判定され、中和試験においても高い中和抗体価を示した。また、本法で陰性と判定された 26 検体全てが中和試験でも陰性と判断された。

全国各地の野鼠血清の抗体調査では島根県の 58 検体のうち 2 検体が TBEV 特異抗体陽性となった。このことから北海道以外に TBEV の汚染地が存在することが示唆された。

E. 結論

今回開発した野鼠血清用サンドイッチ ELISA 法は、中和試験の結果と非常に高い相関性をもつことが示され、また本法によって、TBE ウイルスの

流行地区での疫学調査から得られた野鼠血清より、陽性検体の検出が可能であった。さらに本法は、一度に多検体を短時間、かつ簡便に処理できることなどの利点から TBE ウイルス汚染地域特定のためのスクリーニング法として有用であると考えられる。この ELISA と中和試験による野鼠の抗体調査で島根県に新たな TBEV の汚染地を発見した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshii K, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I. Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J Gen Virol*. 2008. 89, 200-11.
- 2) Takashima I, Kariwa H, Shirato K. Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection. *Glo Env Res*. 2008. 12, 21-25.

2. 学会発表

- 1) 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中空ウイルス用粒子のワクチンへの応用：第 56 回日本ウイルス学会、岡山(2008, 10)
- 2) 2) 村田亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太郎、荻和宏明、梅村孝司、高島郁夫：ウエストナイルウイルスの E 蛋白糖鎖付加がウイルス増殖に与える影

響：第56回日本ウイルス学会、岡山(2008, 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

フラビウウイルスの疫学

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

研究分担者 小西 英二 神戸大学大学院保健学研究科国際保健学領域 准教授

研究要旨

日本脳炎ウイルス（JEV）の増幅動物として、住宅地の近辺ではブタが重要である。従って、ブタ飼育数の少ない環境におけるJEVの自然界での活動は、これまであまり調べられていない。本研究では、ジャワ島住民血清のJEV抗体保有状況を調べた。インドネシアはイスラム教国であり、特にジャワ島では他のアジア諸国と比較して養豚数は少ない。調査の結果、ジャカルタ住民の2.2%、またスラバヤ住民の1.8%が1:160以上の中和抗体価を示した。陽性の検体については4種のデングウイルスに対する抗体も調べて、このJEV抗体陽性率が、ジャワ島に共存するデングウイルスとの血清学的交差反応性に基づくものでないことを確認した。以上の結果から、ブタ飼育数が少ないにもかかわらず、ジャワ島住民は比較的高い頻度でJEVの自然感染を受けていることが明らかにされた。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）はアジアを中心に広く分布する蚊媒介性フラビウイルスである。住宅地の近辺では、JEVは媒介蚊と増幅動物であるブタとの間で生活環を築いている。インドネシアはイスラム教国であり、特にジャワ島では他のアジア諸国と比較して養豚数は少ない。そのため報告患者数も少ないとされる。一方、ジャカルタ近郊のブタからJEVが検出され媒介蚊も調べられている。しかし、抗体保有率の報告はほとんど無く、またこれらの報告も赤血球凝集抑制試験で調査されたものであり、近縁のデングウイルスに対する抗体を交差反応で捉えた可能性もある。ヒトにおけるJEV抗体保有率を調査することはJEV感染率と患者発生数の関係を解明するために重要である。本研究では中和試験によりジャワ島住民血清のJEV抗体保有状況を調べた。

B. 研究方法

調査対象：2001年にジャカルタ住民（20歳から85歳）から採取された1,211検体、及び1999年から2000年にスラバヤ住民（0歳

から100歳）から採取された1,751検体の血清を対象とした。いずれも、医療機関において疾患非特異的に採取された。これらの血清は常温で日本に輸送したため、窒化ナトリウムを最終濃度が0.1%になるように添加した。

マウス過剰免疫血清（HMAF）：ICRマウスに、デング1型ウイルス（DENV1）望月株、デング2型ウイルス（DENV2）ニューギニアC株、デング3型ウイルス（DENV3）H87株、デング4型ウイルス（DENV4）H241株を複数回接種して作製した過剰免疫血清を用いた。

中和試験：窒化ナトリウムの細胞に及ぼす影響が比較的小さい1:160以上の血清希釈度において、JEV（中山株）を用いた90%フォーカス減少法により行った。中和抗体価が1:160以上の検体については、DENV1（望月株）、DENV2（ニューギニアC株）、DENV3（H87株）、DENV4（H241株）を用いて90%フォーカス減少法による中和試験を行った。なお、フォーカスは、それぞれのウイルスに特異的な抗体を用いた免疫染色法により可視化した。

統計解析：カイ2乗検定（Yatesの補正あり）により解析し、有意水準5%未満を有意差とした。

（倫理面からの配慮について）

本研究におけるインドネシア住民血清の使用に関しては、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会により承認された。

C. 研究結果

HMAFの交差中和性：JEVと4種のDENVに対する中和抗体の交差反応性を解析するために、各ウイルス（5種類）とそれぞれのウイルスに対するHMAF（5種類）の組み合わせによる中和抗体価を90%ブランク減少法で求めた。その結果、同種のウイルスに対するHMAFの中和抗体価は1:5,120から1:10,240であるのに対して、4種のDENVで作製したHMAFのJEVに対する中和抗体価は検出限界以下（ $\leq 1:10$ ）であった。以上の結果から、我々の中和試験において、交差性中和抗体価は特異的中和抗体価の512分の1以下であることが示された。4種のDENVに対するHMAFを種々の組み合わせで混合したとき、またその混合液をJEVに対するHMAFと混合したとき、さらにそれらの混合液を正常ヒト血清に混合したときも、DENVに対する中和抗体価が512倍以下であれば、JEVに対する中和抗体価に影響を及ぼすことは認められなかった。

インドネシア住民におけるDENVに対する中和抗体価：1:160希釈の血清においてJEVに対する中和抗体が検出されたのは、ジャカルタ住民血清で27検体、またスラバヤ住民血清で31検体であった。これらの血清における4種のDENVに対する中和抗体価を図1に示す。中和抗体価の最高値は、DENV1とDENV3に対しては1:5,120、またDENV2とDENV4に対しては1:10,240であった。上記の交差反応性（512分の1以下）から、これらJEVに対する中和抗体価が1:160以上の検体は、JEV特異的抗体を保持したと考えられる。

インドネシア住民におけるJEV抗体陽性率：JEVに対する中和抗体価が1:160以上の検体数を性・年齢別に表1と2に記した。全体としてJEV抗体陽性率は、ジャカルタで2.2%及びスラバヤで1.8%であった。

性・年齢別には、ほとんど有意差は認められなかったが、スラバヤにおける9歳以下の集団と50歳代の集団の間に（ $P<0.05$ ）、また10歳代の集団と40歳代（ $P<0.05$ ）あるいは50歳代（ $P<0.01$ ）の集団の間に有意差が認められた。男女間では有意差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。また、同一年齢層間における地域間差は40歳代においてのみ認められた（ $P<0.05$ ）。

D. 考察

本研究では、JEVと血清学的交差性の高いDENVの浸淫地域であるインドネシア国ジャワ島の住民を対象として、JEVに対する抗体を中和試験により調べた。JEVに対する1:160以上の抗体保有率を求めた結果、ジャカルタ及びスラバヤにおいてそれぞれ2.2%と1.8%であった。これらの血清において、DENVとの交差反応の影響は無いことを確認した。インドネシアではJEVワクチンの定期接種は行われていないので、これらのインドネシア住民は自然界からJEVの曝露を受けていることが考えられる。

抗体陽性率を性・年齢別に比較した結果、一部に有意差が認められた。しかし、抗体価頻度分布には差が認められず（データ示さず）、また年ごとに流行の規模が大きく変わる感染症ではないので、この有意差はランダムな変動と考えた。90%フォーカス減少法による中和抗体価が1:160以上の集団が約2%存在することは、ジャワ島住民が比較的高頻度にJEVの自然感染を受けていることを示す。

インドネシアの統計局の資料に基づく、1990年から2006年までのジャワ島における年平均ブタ飼育数は、232,353頭であり、面積あたりの密度にすると1.82頭/km²である。これは日本の農林水産省が報告している日本の年平均ブタ飼育数（10,222,062頭）及び密度（27.05頭/km²）よりかなり低い。また、同じインドネシアのバリ島の年平均ブタ飼育数（965,294頭）及び密度（171.36頭/km²）と比較しても低い。

国立感染症研究所による2006年の日本脳炎感受性調査によると、ワクチンの影響がほぼないと考えられる30歳から55歳の集団における約5%が1:160以上の中和抗体価を保有した。中和試験の感度（90%減

少法か 50%減少法か)の違いがあるため正確な比較はできないが、本研究によるジャカルタ及びスラバヤ住民の中和抗体保有率と大きな差は無いと考えられる。日本では、養豚場の衛生環境が改善されたことや養豚場自体がヒトの住居地から離れた位置に移動したことなどから、ヒトへのウイルス伝播機会が減少し、ブタ飼育頭数の少ないジャワ島に近似したことが示唆される。

興味あることに、このような状況の下、ワクチンを導入していないジャワ島においても、勧奨差し控え勧告によりワクチン接種率が低下した日本においても、患者数が少ない。インドネシアにおける日本脳炎及びJEVの研究は限られてきたが、今後詳細な研究により、新たな疫学・生態学的知見が得られるかもしれない。

E. 結論

ジャワ島ではブタ飼育数が少ないにもかかわらず、住民は比較的高い頻度でJEVの自然感染を受けていることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26, 2772-2781, 2008.
- 2) Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27, 769-770, 2008.
- 3) Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi Yamanaka: Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61, 410-411, 2008.

2. 学会発表

- 1) 山中敦史、酒井陽平、小西英二: インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月
- 2) 北井 陽子、近藤 高志、小西英二: ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月
- 3) Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008
- 4) 北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二: 日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中のWNV特異NS1抗体測定;ブロッキングELISA法とCDC法の評価。第15回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会。2008年10月
- 5) 宮川優子、山中敦史、小西英二: デング2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月
- 6) 北井陽子、近藤高志、小西英二: 補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的NS1抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月
- 7) 桑原三和、小西英二: 日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月
- 8) Atsushi Yamanaka, Soengeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Eiji Konishi: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. *Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging*

- Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008
- 9) Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Aryati, Puspa Wardhani, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Eiji Konishi: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008
- 10) Peter W. Mason, Douglas Widman,

Tomohiro Ishikawa, Nigel Bourne, Ryosuke Suzuki, Evandro Winkelmann, Ilya Frolov, Ricardo Carrion, Eiji Konishi: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting, Recife, Brazil, January 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. ジャカルタにおける JEV 抗体陽性率

年齢	抗体陽性率 (%)*		
	男	女	全体
20-29	1.4 (2/145)**	2.0 (3/148)	1.7 (5/293)
30-39	2.9 (4/137)	1.6 (2/129)	2.3 (6/266)
40-49	3.0 (5/167)	3.9 (7/178)	3.5 (12/345)
50-59	1.5 (1/67)	2.0 (2/102)	1.8 (3/169)
≥60	2.3 (1/44)	0.0 (0/94)	0.7 (1/138)
Total	2.3 (13/560)	2.1 (14/651)	2.2 (27/1,211)

* JEV に対する中和抗体価が 1:160 以上の検体を対象とした。

**カッコ内は、抗体陽性検体数/全検体数。

表 2. スラバヤにおける JEV 抗体陽性率

年齢	抗体陽性率 (%)*		
	男	女	全体
≤9	4.9 (2/41)	3.2 (1/31)	4.2 (3/72)
10-19	7.8 (6/77)	0.0 (0/45)	4.9 (6/122)
20-29	1.6 (2/125)	1.7 (2/120)	1.6 (4/245)
30-39	3.8 (6/157)	0.0 (0/130)	2.1 (6/287)
40-49	0.0 (0/105)	0.7 (1/138)	0.4 (1/243)
50-59	0.8 (1/126)	0.0 (0/129)	0.4 (1/255)
60-69	0.0 (0/122)	1.9 (3/155)	1.1 (3/277)
70-79	3.0 (4/132)	2.9 (2/69)	3.0 (6/201)
≥80	3.8 (1/26)	0.0 (0/23)	2.0 (1/49)
Total	2.4 (22/911)	1.1 (9/840)	1.8 (31/1,751)

* JEV に対する中和抗体価が 1:160 以上の検体を対象とした。

**カッコ内は、抗体陽性検体数/全検体数。

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究：
フラビウイルス感染の治療法

研究分担者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

研究要旨：日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 名前後の数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。またウイルス変異の可能性を考えると、JEV の(1)病原性についての解析は継続して行っていくべきものであろう。加えるに(2)治療における新たな手法も考えていくことが必要である。我々は石川県における野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点、定時期に行い、さらにウイルス病原性についての解析を行っている。(1)近年では毎年 1,000 匹台の野外蚊(1,759 匹(2005 年)、1,458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年))を採取し、2008 年にも 990 匹野外蚊を採取した。それらの破砕液を用いて RT-PCR 法及び培養 Vero 細胞によるウイルス分離を行っている。RT-PCR 陽性サンプルは毎年 5-7 件あるが、最近のウイルス分離としては石川株(2005 年)(遺伝子タイプ 1 型)がある。石川株(05)と JaGAR01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較では細胞における増殖性は異なるが、マウスに対する病原性には差異はなかった。他方で、JEV による病原性の解析を目的としてウイルス感染時における宿主遺伝子の発現動態を DNA マイクロアレイを用いて調べ、インターフェロン(IFN)経路遺伝子発現量のレベルがウイルス増殖速度、増殖量の高低に関わることが明らかになった。また(2)shRNA 発現ベクター-pJRI を用いたフラビウイルス治療の可能性について感染マウスにおける効果を調べ、50-100ug 発現ベクター量の導入による防御効果が認められた。フラビウイルス治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

日本国内における日本脳炎患者数は近年では年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、日本脳炎感染者は年間数万人になるとされる国外におけるの流行拡大をみるまでもなく、日本国内での日脳感染動向も注意されるべきである。実際、石川県において 2007 年に 2 名の脳炎患者がでてい。こうした状況の中で、我々は 1998 年以来、石川県における定点、定時期で採取した野外蚊から JEV の分離を試みている。本研究では、日本における(1)JEV のウイルス分布状況の把握、ウイルス病原性発現機構の解明、さらに(2)治療法の開発は、脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題と考え、研究目的としている。

B. 研究方法

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによる CO₂ 採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田で行っている。

蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破砕した。破砕液は遠心(10,000 x g、10 分間)にて分画した。

shRNA 発現ベクターのウイルス感染防御効果: pJRI (shRNA 発現ベクター)を腹腔に接種し、ウイルス感染に対する効果をマウス生死によって調べた。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊破砕液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出し、得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では JEV 特異的プライマーのエンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域のプライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養

細胞株 Vero 細胞を用いた。24 穴プレートを用い、5%牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いてウイルス力価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

遺伝子発現解析: 感染細胞から抽出された RNA を増幅・標識し、DNA マイクロアレイシステム(Affymetrix)を用いて宿主遺伝子の発現量を調べた。

マウス実験: ウイルスの病原性および pJRI (shRNA 発現ベクター)によるウイルス感染防御を調べるためにマウス ICR にウイルスを接種(ip)さらに pJRI 投与し、生死を観察した。

(倫理面からの配慮について)

組換え DNA 実験については金沢医大組換え DNA 安全委員会への申請許可の下に行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

C. 研究結果

毎年、1,000 匹台の野外蚊(1,759 匹(2005 年)、1,458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年))を採取しているが、2008 年にも 990 匹野外蚊を採取した。RT-PCR 法およびヌクレオチド解析によって 5-7 件の陽性サンプルを得ているが、Vero 細胞利用のウイルス分離では 2005 年サンプルからの分離ウイルス(石川株-05(Ishikawa-K05)、遺伝子タイプ 1 型)のみであった。Ishikawa-K05 株と JaGAR01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較では、細胞における増殖性は異なるが、マウスに対する病原性に差異は無く、強いものであった。遺伝子解析を含め他の生物活性を調べている。ウイルス感染細胞における遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いて調べたところ、ウイルス増殖レベルは IFN 経路遺伝子発現量(OASL、GIP2、IFI44、IFIT1 等)の高低に依存していることが分かった。

また shRNA 発現ベクター-pJRI(50-100ug/マウス)の導入によってウイルス感染マウスの生残率

が高まることを確認した。ただし、感染後、早めに投与する事が必要であることがわかった。

C. 考察

2008 年採取野外蚊からの RNA サンプルでは RT-PCR、ヌクレオチド解析の陽性が 7 プール認められたが、ウイルス分離には至らなかった。JEV が北陸地域に分布していることは他のデータも含めてみると明らかと言える。2005 年に我々の分離したウイルス石川株(05)(Ishikawa-K05)については引き続き生物活性等を調査しているが、比較として用いている JaGAR01 株に比べ、病原性は必ずしも低くはない。またウイルス感染に伴う宿主細胞における全遺伝子発現の網羅的解析では、IFN 経路遺伝子発現の差異がウイルス増殖性に大きく影響することを明らかにすることができた。

また新たな治療剤として RNAi の役割をマウス実験で検討した結果、ウイルス感染後の早い時期に投与することでウイルス増殖抑制が図られ、ウイルス拡大に対して防ぐ効果が得られることが分かった。

ここに示した結果は、現在の日本国内において多く分布しているウイルス(遺伝子タイプ 1 型)の毒性が低下していることを必ずしも意味しない。現に 2007 年には日本脳炎患者が石川県において発生している。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要があり、引き続き分布ウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。またワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少がある現在、他方で新たな治療法の開発も重要である。

E. 結論

再度のマウス実験から 2005 年分離の JEV 株(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ 1 型)の病原性は必ずしも低いものではなく、近年の国内分布ウイルスの病原性変動に注目すべきである。DNA マイクロアレイによる解析で、JEV 増殖性に IFN 経路遺伝子発現量の差異が大きく影響することが再認識された。さらにマウス実験から RNAi によるフラビウイルス治療の可能性が示唆された。