Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore、2009 年 12 月 8－11 日 .

Pandey B, Pun R, Pant K, Shah OP, Shah Y, Poudel A, Morita K, Inoue S, Kurane I : SEROLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF DENGUE VIRUS INFCION IN THE ENDEMIC TERAI REGION OF NEPAL. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore、2009 年 12 月 8－11 日 .

Koki Taniguchi: Diversity of rotavirus and procedures for protection against rotavirus gastroenteritis. Seminar on rotavirus disease aspect in Kenya and other countries, Nairobi, July 31, 2009, Kenya

Sumit Sharma[1], Pratima Ray, Osamu Nakagomi, Koki Taniguchi, Jon Gentsch, Roger I Glass, Vinod K Paul, M.K. Bhan Serum Neutralizing Antibody Response to G12 Rotavirus in Children with Rotavirus Gasrtoenteritis at All India Institute of Medical Sciences, Delhi
The 10th International Symposium on double-stranded RNA viruses. Hamilton Island, Australia, June 21-25, 2009 Symposium

Nakagomi T, Patel M, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cermano EM, Correia NB, Cuevas L, Parashar U, Cunliffe NA, Correia JB. Effectiveness of monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine, Rotarix, in Recife, Brazil against severe rotavirus diarrhoea caused by G2P[4] rotavirus strains. 27th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Brussels, Belgium (2009. 6)

Nisizono A, Shiota S, Khawplod P, Ahmed K 「A pilpt study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization 」 H21/10/3-10/7 Singapore Vaccine 3rd Global Congress

Bukbuk DN, Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, George A, Shuetsu F, Mizutani T, Kurata T, Kurane I, Morkawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)

Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Iizuka I, Shiota T, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains.

43rd Annual Meeting f the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)

和文発表

村田亮、橋口和明、好井健太朗、野田寛、伊川綾恵、原田祐里、苅和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9)

持舘景太、好井健太朗、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苅和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9)

高野絢子、大森優紀、好井健太朗、石塚万理子、村田亮、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9)

好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫、Holbrook Micael：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取 (2009, 9)

高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスの生態学：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

高野絢子、大森優紀、好井健太朗、石塚万理子、村田亮、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

持舘景太、好井健太朗、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苅和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

村田亮、好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009, 10)

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、<u>小西英二</u>：インドネシアのデング熱・デング出

血熱患者における血清中の総補体価CH50の測定。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

北井陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西英二：NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

田渕裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いたデング2型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

宮川優子、小西英二：デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

瀧澤山人、小西英二：デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

田渕裕子、山中敦史、小西英二：デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

左一八、在原雅貴、加藤大介、渡邊一平、森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルス感染における硫酸化糖鎖分子の構造と機能．第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日-20日

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査（第2報）．第44回日本脳炎ウイ

ルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日-20日

岡本健太、遠藤友志朗、Possadas Guillermo、余福勲、Maria del Carmen Parquet、鍋島武、井上真吾、Nguyen Thanh Thuy、Bui Minh Trang、Nguyen Tran Hien、Vu Sinh Nam、Filipinas F. Natividad、長谷部太、森田公一：プロテオミクス法を用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法の開発. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日-20日

左一八、渡邊一平、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、長岡正人、森田公一、鈴木隆：フラビウイルス感染に関わる硫酸化糖鎖分子の構造と機能. 第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日-11日

渡邊一平、左一八、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木隆：グリコサミノグリカンによるフラビウイルス感染阻害. 第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日-11日

長谷部太：デングウイルスとviral quasispecies（ウイルス準種）. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22−23日.

岡本健太、遠藤友志朗、井上真吾、鍋島武、Posadas Guillermo、余 福勲、Filipinas F. Natividad、Phan Thi Nga、長谷部太、森田公一：LC/MS/MSを用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22−23日.

Lyre Anni Murao, Kouichi Morita: RNA-dependent regulation of the interferon response by dengue virus. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22−23日.

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Murao, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Kenji Hirayama: Role of circulating plasma DNA in severe dengue disease. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22−23日.

渡辺直熙、Nguyen Thi Phuong Lan、Vu Thi Que Huong、Tran Thi Thuy、Vo Dinh Tham、Tran Van Dat、菊池三穂子、安波道郎、森田公一、平山謙二、古田隆久：デング熱の病態形成におけるマスト細胞の関与. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22−23日.

山城哲、中込とよ子、中込治：北部ベトナ

ムにおける小児重症下痢症に関する網羅的病因検索と混合感染の重要性に関する研究. 第 50 回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009 年 10 月 22－23 日.

山城哲、中込とよ子、中込治：ベトナムにおける重症小児科下痢症に関する疫学研究. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

左一八、加藤大介、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖を介したデングウイルス－宿主細胞間相互作用. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高島郁夫、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸透潤 T 細胞の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

久保亨、井上真吾、森田公一：ケニア共和国における黄熱ウイルスならびにその他の蚊媒介性熱帯ウイルス感染症の網羅的血清学的解釈. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25－27 日

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(Ishikawa-K05)の細胞と実験動物での毒性　第 44 回　日本脳炎ウイルス生態学研究会、小樽　(2009. 6)

村上　学、及川陽三郎、上村　清、竹上　勉：石川県内の水田近辺で行った CDC 型トラップによる蚊の採集結果、　第 16 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京 (2009, 10)

竹上　勉、村上　学：フラビウイルス感染における宿主応答とウイルス病原性との関わり、　第 57 回日本ウイルス学会、　東京 (2009, 10)

村上　学、竹上　勉：Ishikawa-K05（2005 年石川県分離日本脳炎ウイルス）感染時の細胞毒性と細胞応答、　第 57 回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)

和久田光毅、實方　剛、　佐々木潤、河本聡志、井手富彦、油井晶子、石川隆志、石井潤一、谷口孝喜：新しい群に属すると考えられるブタロタウイルス SKA-1 株の全塩基配列決定第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

前野芳正、油井晶子、菅田健、吉川哲史、河本聡志、守口匡子、佐々木潤、浅野喜造、谷口孝喜：　ロタウイルス感染による末梢血単核球 MMP-9mRNA の動態　第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

實方　剛、中野俊也、谷口孝喜、油井晶子：モンゴル国の急性胃腸炎患者から検出されたヒトロタウイルス　第 57 回日本ウイルス学会、2009 年 10 月、東京

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：ブラジルでの継続調査　第 13 回日本ワクチン学会学術集会　札幌　(2009. 9)

片山和彦「ノロウイルスの分子疫学」第 79 回日本衛生学会学術会議、包括的感染症制御研究会セッション-2、2009 年 3 月、東京

岡　智一郎、高木　弘隆、遠矢　幸伸、片山　和彦、脇田　隆字、武田　直和「BRET を用いたネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築」日本薬学会　第１２９年会　2009 年 3 月、京都

片山和彦「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性」第 147 回日本日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2009 年 4 月 2 日、栃木県宇都宮市

本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳　「ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京　ワークショップ

中西章、Benoit Chapellier,　片山和彦、岡智一郎、武田直和　「ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京　ワークショップ

片山和彦、岡智一郎、脇田隆字「ノロウイルスリバースジェネティックスシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京　ワークショップ

岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦「カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

北島正章、岡　智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦「Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

北島正章、岡　智一郎、原本英司、片山浩之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦「多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字「マウスノロウイルスの複製機構の解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良「マウスノロウイルス（MNV）のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦　「バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築」第 32 回日本分子生物学会年会　横浜　2009 年 12 月 9-12 日

伊藤直人、清水健太、伊藤由紀、正谷達謄、中川敬介、杉山誠：狂犬病ウイルス P 蛋白質のインターフェロン・シグナル阻害能と病原性の関連性：第 148 回日本獣医学会、鳥取（2009, 9）

伊藤直人、清水健太、伊藤由紀、正谷達謄、中川敬介、杉山誠：狂犬病ウイルス P 蛋白質による STAT1 核内移行の阻害と病原性の関連性：第 57 回日本ウイルス学会、東京（2009, 10）

小嶋大亮、朴　天鎬、辻川真太朗、小原慶子、野口　章、小山田敏文、井上　智。狂犬病ウイルス（CVS-11）を脳内接種した BALB/c マウスの脳脊髄に関する病理学的研究。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、茨城県

Boldbaatar Bazartseren、Naoko Sugiura、Jun Ryan C. Orbina、Catalino Demetria、Akira Noguchi、Mary Elizabeth Miranda、Akio Yamada 、 Satoshi Inoue 。 Rapid detection of street rabies virus by RT-LAMP。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、茨城県

小嶋大亮、朴　天鎬、小原慶子、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤　豪、野口　章、畑井　仁、小山田敏文、井上　智。狂犬病ウイルス（CVS-11）を後肢筋肉内に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの脊髄に関する比較病理学的研究。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009、9 月、鳥取市、鳥取県

塩田　星児，万年　和明，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」H21/4/23-4/24　東京都　第 83 回日本感染症学会総会

松本　昂，山田　健太郎，高田　賢蔵，西園　晃，「抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成とその性状解析」H21/9/4-9/5 佐賀市第 46 回日本ウイルス学会九州支部総会

松本　昂，山田　健太郎，アハメド　カムルディン，西園　晃「スリランカにおける狂犬病ウイルス迅速抗原診断キットの有用性と分子系統学的解析」H21/10/22-23 那覇市　第 50 回日本熱帯医学会

松本　昂，山田　健太郎，高田　賢蔵，西園　晃「抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成」H21/10/25-27 東京都　第 57 回日本ウイルス学会

吉川佳佑、苅和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、石塚万里子、吉松組子、有川二郎、Leonid Ivanov、好井健太朗、高島郁夫：極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離とウイルス遺伝子の性状解析：第 147 回日本獣医学会学術集会、宇都宮　(2009, 4)

吉田喜香、苅和宏明、高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Saasa　Ngonda、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、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が保有するハンタウイルスの遺伝子解析：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取　(2009, 9)

吉川佳佑、苅和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、石塚万里子、吉松組子、有川二郎、Leonid Ivanov、Raisa Slonova、好井健太朗、高島郁夫：極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査：日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会、札幌 (2009, 9)

吉川佳佑、苅和宏明、瀬戸隆弘、真田崇弘、好井健太朗、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：極東ロシアのげっ歯類からのハンタウイルスの分離と人におけるウイルス感染状況の調査：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,　10)

吉田喜香、苅和宏明、Celso Ramos、Cornelio Sanchez- Hernandez 、Maria Loudres Romero-Almaraz、高野絢子、戸谷理詩、宮下大輔、Saasa　Ngonda、瀬戸隆弘、真田崇弘、吉川佳佑、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が保有するハンタウイルスの遺伝子解析：：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 (2009,　10)

駒貴明、吉松組子、垂石みどり、遠藤理香、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez、Maria L. R. Almaraz、Celso

Ramos、宮下大輔、瀬戸隆弘、苅和宏明、高島郁夫、Delia Enria、有川二郎：新世界ハンタウイルス感染の血清鑑別 ELISA 法の確立：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009, 10）

遠藤理香、吉松組子、駒貴明、清水健太、安田俊平、エルテネサイハンテグシドーレン、垂石みどり、海老原秀喜、Cornelio S. Hernandez、Maria L. R. Almaraz、Celso Ramos、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：汎用 PCR プライマーを用いたハンタウイルス遺伝子検出スクリーニング法の開発：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009, 10）

新井　智、田原研司、Oh Hong-Shik、高田伸弘、Song Jin-Won, Kang hae Ji, N. Bennett Shannon, 多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、Yanagihara Richard:Genetically distinct hantavirus in the Asian lesser white-toothed shrew on Jeju island, Korea.：第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

エルテネサイハンテグシドーレン、清水健太、吉松組子、遠藤理香、駒　貴明、安田俊平、有川二郎、石原智明：トガリネズミ目（旧食虫目）由来ハンタウイルス Thottapalayamウイルス（ＴＰＭＶ）核蛋白の単クローン抗体を用いた抗原領域の解析　第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

安田俊平、吉松組子、遠藤理香、清水健太、駒　貴明、Erdenesaikhan Tegshduuren, 垂石みどり、有川二郎：ハンタウイルス自然感染ラットと実験感染ラットにおける病態の比較　第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

清水健太、イブラハムイマヌリサ、吉松組子、遠藤理香、安田俊平、駒　貴明、エルテネサイハンテグシドーレン、有川二郎：インドネシアのげっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学　第57回日本ウイルス学術集会、都市センターホテル(2009.10)

塩田智之、森川茂、飯塚愛恵、倉根一郎、西條政幸：293T細胞を用いた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19回日本抗ウイルス療法研究会，東京（2009. 6）

西條政幸，網至康，須崎百合子，永田典代，長谷川秀樹，新村靖彦．横手公幸，飯塚愛恵，塩田智之，佐多徹太郎，倉田毅，倉根一郎，森川茂．痘そうワクチンLC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果．第13回日本ワクチン学会学術総会，札幌（2009.09）

飯塚愛恵，塩田智之，西條政幸，福士秀悦，水谷哲也，緒方もも子，倉根一郎，水口雅，森川茂．痘そうワクチンLC16m8株の温度感

受性に関する解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009. 10）

西條政幸，網康至，須崎百合子，塩田智之，飯塚愛恵，永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，緒方もも子，福士秀悦，水谷哲也，倉根一郎，佐多徹太郎，倉田毅，森川茂．コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京（2009. 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

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)

分担者研究報告書

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:ダニ媒介性脳炎(Tick-born encephalitis; TBE)ウイルスは人に対して重篤な脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。今回、日本各地のTBEウイルスの分布を調べるため、野鼠を対象とした血清疫学調査を行った。さらに、北海道で現在流行しているTBEウイルスの性状を解析し、疫学的な危険度を評価することを目的に、道南地域で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。北海道では道南地域の224検体、青森の14検体、富山の381検体、岐阜の89検体、愛知の92検体、島根の58検体、徳島の28検体、対馬の45検体、合計931検体の野鼠血清を検査した。以前当研究室において構築された中空ウイルス様粒子(Subviral Particles; SPs)を抗原として用いたSP-ELISA法により、抗TBEウイルス抗体を保有する野鼠血清をスクリーニングし、その後特異性の高い中和試験により確定診断を行った。スクリーニングでは31検体が陽性と判定され、中和試験を行う検体を3.4%に絞り込むことが出来た。更に中和試験を行った結果、北海道において17検体、北海道以外では島根県において2検体の抗TBEウイルス抗体陽性例が検出され、同地域にTBEウイルスの流行巣が存在する事が示唆された。また、北海道の野鼠検体の脾臓乳剤を哺乳マウスへ脳内接種することでウイルス分離を試みた。その結果、北斗町上磯地区のアカネズミから、蛍光抗体法でダニ媒介性フラビウイルス抗原陽性を示す感染性ウイルスが分離された。分離されたウイルスは塩基配列の解析によりTBEウイルスと同定され、上磯分離株であるOshima株と非常に近縁である事が示された。

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、北海道においてダニ媒介性脳炎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。

本研究では、北海道、及び全国的なTBEウイルスの分布状況を調査することを目的とし、SP-ELISA法によるスクリーニングと中和試験による確定診断を行い、日本全国の野鼠における血清疫学調査を行った。更に、北海道で現在流行しているTBEウイルスの性状を解析し、疫学的な危険度を評価することを目的に、道南地域で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

1) 被検サンプル

北海道、及び全国各地から集められた血清は、56℃で30分加熱し非働化した後、使用まで-40℃で保存した。北海道の北桧山町、北斗町上磯地区にて2008年の10月に疫学調査を行い、捕獲された122匹の野鼠を麻酔下での心採血により安楽殺して解剖し、脾臓、腎臓、肺を採取し、使用まで-80℃で保存した。

2) TBEウイルスの中空ウイルス様粒子(SPs)の産生と回収

TBEウイルスのprM蛋白とE蛋白領域をpCAGGSプラスミドにクローニングしたpTBEprMEを、293T細胞にトランスフェクションし、組み換え蛋白を発現させ、SPsを産生させ、ELISAの抗原に用いた。

3) 抗TBEウイルス抗体陽性の野鼠血清のスクリーニング用SP-ELISA法

抗E蛋白ウサギIgG抗体を捕捉抗体とし、陽性抗原としてSPs溶液、陰性抗原としてポリエチレングリコール沈殿した正常293T細胞培養上清を用い、捕捉抗体と反応させた。PBSTで100倍に希釈した被検血清を50μl加え、37℃で1時間静置した。再度洗浄した後、PBSTで5,000倍に希釈したALP標識抗マウスIgG抗体を50μl加え、37℃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100μlずつ加え、37℃で60分反応させ、405 nmの吸光度から620 nmで測定した吸光度を引いたものを求め、本ELISAのOD値とした。

4) フォーカス減少法による中和試験

被検血清の10倍から始まる2倍階段希釈列をMEM培地で作成し、これに160 ffu/ mlとなるようMEM培地で希釈したウイルス液を等量加えた。上記のプレートを37℃で90分間、5%CO_2インキュベーター内に静置し、ウイルスの中和反応を行った。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、ウイルスと血清の反応液を各ウェル50μl、血清希釈ごとに2ウェルずつ接種した。このプレートを37℃で90分間5%CO_2インキュベーター内に静置し、ウイルスを細胞へ吸着させた。中和抗体価は、血清対照群の各ウェルでフォーカスが約80個形成されたことを確認後、被検血清のフォーカスの平均値が血清対照群における平均値より、50%以上減少した最高血清希釈倍率の逆数で表し、中和抗体価が40倍以上となった血清を中和試験陽性とした。

5) 臓器乳剤の哺乳マウス脳内接種

哺乳マウスへの脳内接種を行う検体は、中和抗体価が80倍のもの及び中和抗体価が無いものから恣意的に選んだ。1～6匹を1プールとして、合計16プールを脳内接種に用いることとした。野鼠臓器からのTBEウイルスRNA抽出の過程で得られた脾臓乳剤を、12,000 rpmで5分間遠心し、上清を回収した。これを1~2日齢のBALB/c哺乳マウス

の脳内に25 μl接種した。乳剤を接種したマウスは接種後14日目まで観察を行った。

6) 分離株の塩基配列決定

得られたPCR産物を用い、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。得られたデータはATGC ver.6 (GENETYX CORPORATION)によって解析し、塩基配列を決定した。

7) 分離株の系統樹解析

E蛋白質の1,488塩基対を元に、近隣接合法(NJ法)を用いて多重解析を行い、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0プログラムパッケージを使用して系統樹を作成した。

8) 分離株と既知のウイルスとのアミノ酸配列の相同性比較

得られた塩基配列から推測されるアミノ酸配列を決定し、GENETYX ver.8 (GENETYX CORPORATION)を用いて既知のウイルスのアミノ酸配列との比較を行った。

(倫理面からの配慮について)

特に無し

C. 研究結果

1)北海道の野鼠における抗体調査成績

1990年代に行われた血清疫学調査により、野鼠が抗TBEウイルス抗体を保有していることが判明している、道南地域の野鼠検体において抗体調査を行った。北海道では2001年、2008年を合わせて224検体が集められ、まずSP-ELISA法によりそれら全ての野鼠血清中の抗TBEウイルス抗体を検査した。その結果、SP-ELISAでは17検体が陽性と判定された。

これら血清について中和試験を行った結果、17検体全てで中和抗体価が40倍以上あり、抗体陽性と判定された。北桧山の2001年の検体では、アカネズミ21検体中5検体、エゾヤチネズミ15検体中2検体が抗体陽性となった。同地域の2008年の検体では、エゾヤチネズミ68検体中1検体、ヒメネズミ6検体中2検体が抗体陽性となった。上ノ国の2001年の検体では、エゾヤチネズミ35検体中2検体が抗体陽性となった。上磯の2008年の検体ではアカネズミ19検体中2検体、エゾヤチネズミ9検体中2検体、ヒメネズミ20検体中1検体が抗体陽性となった。陽性検体の中和抗体価は全て80倍以上あり、640倍以上という高い抗体価を持つものも多く検出された。

以上により、道南地域では10年以上にわたって、抗TBEウイルス抗体を保有する野鼠が存在していることが示された。

2)北海道以外の野鼠における抗体調査成績

北海道以外の地域では、これまでTBEウイルスの存在は確認されていない。そこで、今回は北海道以外の地域においても、野鼠における抗体調査を行った。北海道以外の検体は707検体が集められ、上記のようにまずSP-ELISAを行ったところ、14検体が陽性と判定された。

それら検体について中和試験を行ったところ、多くは抗体陰性と判定されたが、島根県の58検体中2検体で抗体陽性検体が検出された。2検体の野鼠種はどちらもアカネズミであり、TBEウイルスに対する中和抗体価は640倍以上と320倍であった。島根県を含む西日本では、同じフラビウイルス属に属するJEウイルスが流行しており、TBEウイルスと若干の交差反応性を示すことが知られ

ている。そこで、今回の中和抗体価がTBEウイルスによるものであることを確認するために、これら2検体についてはJEウイルスに対する中和試験も行った。その結果、TBEウイルスに対する中和抗体価がJEウイルスに対する中和抗体価よりも4倍以上高かったため、今回の中和抗体価はTBEウイルスによって誘導されていることが示された。

青森、富山、岐阜、愛知、徳島、対馬の検体からは、抗体陽性検体は検出されなかった。

3) 北海道の野鼠からのウイルス分離

北海道の野鼠検体から16プールの脾臓乳剤を作成し、それぞれ哺乳マウスに脳内接種を行った。そのうち、上磯で捕獲されたアカネズミ由来の脾臓乳剤を接種した群で、接種後7日目で1匹の衰弱個体が現れた。衰弱個体1匹分の脳乳剤を作成し、Kamiiso-2008-AS2w(以下AS2w)として以後の実験に使用した。

脳乳剤をBHK細胞に接種し、5日間光学顕微鏡でCPEの有無を観察した。AS2wの脳乳剤を接種したBHK細胞ではCPEは観察されなかった。

IFAにより、細胞内のウイルス抗原の検出を試みた。一次抗体としてTBEウイルスと近縁なLangatウイルス免疫マウス腹水を用いたところ、AS2wを接種した細胞でウイルス抗原が検出された。

4) 感染性の確認とRT-PCRによるウイルスRNAの検出

CPEまたはIFAにてウイルスの存在が疑われたAS2wについて、感染性の確認と、RT-PCRによるウイルスRNAの検出を試みた。

脳乳剤を接種した細胞の培養上清を新たにBHK細胞に接種し、CPEの観察とIFAによるウイルス抗原の検出を行った。その結果、AS2wの細胞培養上清をBHK細胞に接種したものでは、CPEは観察されなかったがIFAにてウイルス蛋白が確認された。

脳乳剤を接種した細胞からRNAを抽出し、TBEウイルス特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。AS2wのレーンに陽性対照と同じ位置のバンドが確認され、TBEウイルスRNAが検出された。以上より、上磯のアカネズミから1株のTBEウイルスが分離された。

5) 分離株の一部RNAにおける系統樹解析

AS2wの塩基配列のうち、E蛋白領域の1,488塩基配列が決定され、既知のウイルス株との系統樹を作成した。系統樹から、AS2wは極東亜型に分類され、中でもOshima株と同じ集団を形成し、ロシアで分離されたSofjin株やKH98株とは明らかに異なるクラスターに属することが示された。

6) 分離株と既知のウイルスとのアミノ酸配列の相同性比較

AS2wと既知のウイルス株とのアミノ酸配列の比較を行った。その結果、Oshima株間で保存されている306番目のバリン、462番目のメチオニンはAS2wでも保存されていることが明らかとなり、更に、AS2wとOshima 5-10、Oshima I-1は完全に同じアミノ酸配列であることが示された。

D. 考察

本研究では、日本国内の野鼠におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査を行うとともに、北海道の野鼠検体からのウイルス分離を試みた。血清疫学調査の結果では、北海道において10年以上にわたり流行巣が維持されていること、北海道以外では今回初めて島根県において流行巣の存在が示唆された。また、北海道の野鼠から試みたウ

イルス分離では、1株のTBEウイルスが分離することが出来た。

今回スクリーニングに用いたSP-ELISA法により、北海道の224検体と北海道以外の707検体の計931検体中31検体をスクリーニング陽性と判定でき、中和試験を行う検体数を全体の3.4%に絞ることが出来た。そのうち北海道では17検体全て、北海道以外では島根県の2検体が中和試験陽性となった。このように、一度に多検体の検査が可能で簡便なSP-ELISA法は、煩雑な中和試験を行う検体を選抜するためのスクリーニング法として、非常に有用であることが示された。

北海道の道南地域では、10年以上に渡ってTBEウイルスの流行巣の存在が示唆された。また、今回の調査では道南地域の野鼠のみを対象に血清疫学調査を行っている。道南地域のマダニは、ヤマトマダニが優占種であるが、道北、道東地域ではTBEウイルス極東亜型の本来の媒介マダニであるシュルツェマダニが優占種である。そのため、北海道において道南地域以外にもTBEウイルスの流行巣が存在している可能性は十分にあり、今後も調査範囲を拡大して野鼠の血清疫学調査を行っていく必要がある。

今回、現在北海道において流行しているTBEウイルスの性状を解析するため、上磯、北桧山の野鼠からのウイルス分離を試みた。その結果、上磯のアカネズミからTBEウイルスを分離することに成功した。しかし、分離株はOshima株やSofjin株と異なり、BHK細胞に対してCPEを示さなかった。CPEを示さないことがウイルスの増殖性や病原性に与える影響については、今後検討する必要がある。分離株の塩基配列を決定した結果、1995年に当研究室で上磯から分離された、Oshima株と非常に近縁であることが示された。TBEウイルスの遺伝子が自然界では安定であることが報告されているが、それを支持する結果だと考えられる。

今日まで、日本においてTBEウイルスの分布は北海道のみとされてきた。しかし、今回の調査において、初めて島根県にTBEウイルスの流行巣が存在していることが示唆された。島根県で野鼠に感染していたTBEウイルスが、どのような経緯で同地域に侵入してきたかということは、今後のTBEウイルスの広がりを予測する上で重要である。

北海道から遠く離れた島根県においてTBEウイルスの存在が示唆されたことから、北海道以外の日本各地においてTBEウイルスの流行巣が存在している可能性も否定できない。今回野鼠の血清中に抗TBEウイルス抗体が検出されなかった地域、及び今回調査を行わなかった地域においてもTBEウイルスの存在を調べるため、野鼠の血清疫学調査範囲を拡大して継続していく必要がある。

今回、北海道の血清疫学調査と野鼠からのウイルス分離により、上磯では10年以上に渡ってTBEウイルスの流行巣が維持されていることを確認し、その他の道南地域でも依然としてTBEウイルスの流行巣が存在することが示唆された。また、日本全国での血清疫学調査により、島根県においてTBEウイルスの流行巣の存在が示唆された。今後も、抗体陽性検体が検出された地域を中心に、より詳細な疫学調査を行い、ウイルスを分離してその性状を解析すること、また、調査範囲を拡大し、新たにTBEウイルスの流行巣が存在する地域を特定することで、TBEウイルス流行地域住

民への危険度を評価するとともに、TBE患者発生の予防に役立てることが重要である。

E. 結論

本研究では、日本国内の野鼠におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査を行うとともに、北海道の野鼠検体からのウイルス分離を試みた。血清疫学調査の結果では、北海道において10年以上にわたり流行巣が維持されていること、北海道以外では今回初めて島根県において流行巣の存在が示唆された。また、北海道の野鼠から試みたウイルス分離では、1株のTBEウイルスが分離することが出来た。

F. 健康危険情報

今回北海道渡島管内北斗町上磯地区でダニ媒介性脳炎ウイルスが分離されたことからウイルス汚染が 10 年以上にわたり持続しており、住民に対する感染予防のための対策が必要と思われた。

G. 研究発表

1.論文発表

1)Yoshii K, Ikawa A, Chiba Y, Omori Y, Maeda J, Murata R, Kariwa H, Takashima I. Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. J Virol Methods. 2009. 161, 173-6.

2)Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, Koike S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. Virology. 2009. 390, 139-50.

2.学会発表

1)村田亮、橋口和明、好井健太朗、野田寛、伊川綾恵、原田祐里、苅和宏明、高島郁夫：極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）

2)持舘景太、好井健太朗、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苅和宏明、高島郁夫：日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）

3)高野絢子、大森優紀、好井健太朗、石塚万理子、村田亮、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）

4)好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫、Holbrook Micael：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取（2009, 9）

5)高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスの生態学：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009,10）

6)好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫：オムスク出血熱ウイルスの感染性 cDNA の構築：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京（2009,10）

7)高野絢子、大森優紀、好井健太朗、石塚万理子、村田亮、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株のレプリコンの構築：第 57 回

日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
8)早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智:ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性:第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
9)持舘景太、好井健太朗、大森優紀、千葉裕美子、村田亮、真田崇弘、前田潤子、苅和宏明、高島郁夫:日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清疫学調査:第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)
10)村田亮、好井健太朗、苅和宏明、高島郁夫:極東ロシアの野鳥におけるウエストナイル熱の血清疫学調査と中和試験の評価:第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京(2009,10)

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

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担者研究報告書

フラビウイルスの疫学

日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法

研究分担者　小西 英二（神戸大学大学院保健学研究科 准教授）

研究要旨　日本脳炎ウイルス（JEV）は東南アジアを中心に分布し、世界的には年間約５万人の患者報告がある。東南アジアには JEV と血清学的交差性の高いデングウイルス（DENV）も存在するため、DENV 流行地における JEV の疫学調査を従来の抗体検査法で行うには制限がある。また、現地ではデング脳炎との鑑別診断の要求もある。本研究では、ヒト血清中の NS1 抗体を対象として、JEV 抗体を DENV 抗体と識別するブロッキング ELISA 法を確立するとともに評価した。JEV に対する過剰免疫マウス血清は高い阻害率を示したのに対して、DENV に対する過剰免疫マウス血清では低い阻害率であった。ヒト血清においても識別可能であり、DENV 抗体陽性の検体は、カットオフ値（30.8%）未満の阻害率を示し、陰性と判定された。潜在的な感度の低さは認められたが、NS1 抗体値を測定するコンベンショナル ELISA により中等度陽性あるいは強陽性である検体は、ブロッキング ELISA でも陽性と判定された。以上の結果から、ブロッキング ELISA により DENV 流行地において JEV 感染が鑑別できることが示された。

A．研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）は、重篤な症状を引き起こし、致死率は約 20%である。東南アジアを中心に分布し、年間約 5 万人の患者を生ずる。東南アジアでは JEV と同じフラビウイルス属のデングウイルス（DENV）も存在する。これらのウイルスは、血清学的交差性が高いために、特異性が高いとされる中和試験においても交差反応により偽陽性の結果を生ずることがある。したがって、DENV 流行地での JEV の活動を血清疫学的に調査するには、従来の抗体検査法では困難なことがある。また、デングウイルスの感染により発症するのはデング熱やデング出血熱が主であるが、まれにデング脳炎も存在し、DENV感染からJEV感染を鑑別する診断法が流行地では必要とされる。

交差性が高いウイルス感染症を鑑別する方法の１つに、ブロッキング ELISA が知られる。フラビウイルス感染症を鑑別する方法としては、これまでにマレー渓谷脳炎ウイルス抗体とクンジンウイルス抗体の鑑別、ウエストナイルウイルス抗体とセントルイス脳炎ウイルス抗体の鑑別、そしてウエストナイルウイルス抗体と日本脳炎ウイルス抗体の鑑別を可能にする３つのブロッキング ELISA が報告されてきた。これらのウイルスは、フラビウイルス属の中でも日本脳炎血清グループに属す

る、特に交差性の高い集団である。いずれも、従来の抗体検査法（中和試験や赤血球凝集抑制試験）で標的とされるウイルス粒子表面蛋白ではなく、非構造蛋白の 1 つである NS1 蛋白が標的とされてきた。NS1 タンパクには特異エピトープがより多く存在するといわれる。

本研究の目的は、JEV-NS1 の特異エピトープに対するモノクローナル抗体を用いて、JEV 抗体を DENV 抗体から識別するブロッキング ELISA 法の確立と評価にある。DENV には、デング 1 型～4 型ウイルス（DENV1－4）の 4 種が存在し、デング血清グループを構成している。JEV 抗体の DENV 抗体からの識別は、血清グループが異なるフラビウイルス属ウイルス間の識別である。

B. 研究方法

ウイルス：本研究で用いたウイルスは、JEV（中山株）、DENV1（望月株）、DENV2（ニューギニア C 株）、DENV3（H87 株）および DENV4（H241 株）であった。

ウサギ血清：アフィニティ精製した JEV-NS1 抗原の複数回接種により作製した過剰免疫ウサギ血清及び対照として正常ウサギ血清を用いた。

マウス血清：JEV、DENV1 - 4 各々の NS1 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組み込み作製した NS1 抗原発現プラスミドをマウスに複数回接種して抗体価の上昇を確認した後、それぞれに対応する感染マウス脳乳剤で追加免疫をして、NS1 過剰免疫血清を得た。対照として正常マウス血清を用いた。

ヒト血清：JEV や DENV に感染していない対照として、黄熱ワクチン未接種米国人健常者血清 20 検体を用いた。これらの米国人は、日本脳炎不活化ワクチンの米国導入に際して実施された安全性・効力評価試験の被験者で、フラビウイルスに対する抗体が陰性であることが試験の前に確認されている。また、フィリピン人から採取したデング陽性血清 27 検体、日本人から採取したデング陰性血清 30 検体を用いた。

ブロッキング ELISA：図 1 に原理と方法を示す。すなわち、特異エピトープに対するモノクローナル抗体と検体中の抗体を競合的に反応させ、阻害率により検体中に存在する特異的な抗体を検出する方法である。具体的には、JEV 感染培養液よりアフィニティ精製した NS1 抗原（50 ng/ml）を感作し、カゼインにより被覆後、被検血清（1:5 希釈）、次いで JEV-NS1 特異的マウスモノクローナル抗体である 2D5 抗体（腹水の 1:1000 希釈）を反応させた。NS1 に結合した 2D5 抗体をアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG（1:2000 希釈）により検出し、最後にパラニトロフェニールリン酸を反応させた。ELISA 希釈液の組成は、0.05 M Tris, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween20, 0.2 %カゼイン（pH 8.0）であった。また、被検血清の代わりに ELISA 希釈液を反応させる対照のウエルも設けた。図 1 に記載した計算式により、2D5 抗体結合阻害率を求めた。また、マウス血清を試験するブロッキング ELISA には、2D5 抗体の代わりにビオチン化 2D5 抗体を用い、その後アルカリホスファターゼ標識アビジンを反応させた。

コンベンショナル ELISA：アフィニティ精製した JEV-NS1 抗原をマイクロプレートに感作し、1:100 希釈の被検血清、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体、パラニトロフェニールリン酸を順次反応させ、吸光度を測定した。非特異反応を除くために、各検体について抗原を感作しないウエルを設け、抗原感作したウエルの吸光度と非感作ウエルの吸光度の差を求めた。プレート間誤差を補正するために、