

じ年月内の調査でも回毎で結果に差があった期間であり、調査対象となったブタ飼養農家によって JEV 活動状況が異なっていたと考えられた。沖縄島のブタ飼養農家は 1985 年以降減少を続けているが、一農家当たりの平均ブタ飼養頭数は増加していることから、少数大規模化が進み、農家により周囲の環境が異なるようになり、さらに 2000～2005 年に沖縄島のブタ飼養頭数が大きく減少したことから、近年はある程度の規模の農家においても廃業や規模縮小などが起こったことでこの傾向が顕著となったことが要因として考えられた。農家や地域で JEV 活動が異なるのか、沖縄島全体で低下しているのかを明らかにするためにも、今後は採血時に農家やより狭い地域を指定することが必要である。

月ごとの平均 JEV 抗体陽性率および HI 価は 1985～1999 年および 2000～2009 年ともに北部が中南部よりも高い値を示した。コガタアカイエカの主要な発生地である水田が主に中部から北部にかけて分布していることが、一つの要因として考えられた。沖縄県では日本脳炎注意報を IgM 抗体が確認され、かつ、北部と中南部の平均 JEV 抗体陽性率が 50%以上を示した週をもって発令しているが、今後は北部の調査結果が基準を満たした場合においても注意報を発令するべきであると考えられた。また、2000～2009 年 5 月の平均 JEV 抗体陽性率は中南部が北部よりも高い値を示した。これは中南部の 2004 年 5 月の JEV 抗体陽性率が 50%以上を示したことによると考えられるが(図 3)、このように年や地域によっては中南部が北部よりも JEV 活動が活発になる可能性もある。2008、2009 年は中南部における調査は行われなかったが、中南部においても各農家や地域を指定した検討が必要である。

E. 結論

- 1) 近年、沖縄島の JEV 活動が活発になる時期が遅れ、現在の調査期間では JEV 抗体陽性率が最も高くなる時期に調査が行われていない可能性があることから、今後は調査期間を延長

する必要がある。

- 2) 沖縄島内の各農家で JEV 活動が異なることが考えられ、要因として農家により周囲の環境が異なるようになったことが考えられた。農家や地域で JEV 活動が異なるのか、沖縄島全体で低下しているのかを明らかにするためにも、今後は採血時に農家やより狭い地域を指定することが必要である。
- 3) 水田が主に中部から北部にかけて分布していることが一つの要因と考えられるが、沖縄島の JEV 活動は北部が中南部よりも活発であることから、これまで北部と中南部の結果の平均をもって発令していた沖縄県の日本脳炎注意報は、北部の調査結果が基準を満たした場合においても発令するべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表 :

- (1) Nidaira, M., Taira, K., Okano, S., Shinzato, T., Morikawa, T., Tokumine, M., Asato, Y., Tada, Y., Miyagi, K., Matsuda, S., Itokazu, K., Kudaka, J., Nakamura, M., Tamanaha, K. Survey of Japanese Encephalitis Virus in Pigs on Miyako, Ishigaki, Kume, and Yonaguni Islands in Okinawa, Japan. *Jp. J. Infect. Dis.*, 62, 220-224, 2009
- (2) 仁平稔、平良勝也、岡野祥、松田聖子、糸数清正、久高潤、中村正治、玉那覇康二、宮城国太郎、多田雪宏. 沖縄県石垣島のブタからの日本脳炎ウイルス抗体および遺伝子型Ⅲ型の日本脳炎ウイルス遺伝子の検出. *病原微生物検出情報 (IASR)*, 30, 9-10, 2009

2. 学会発表 : なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし

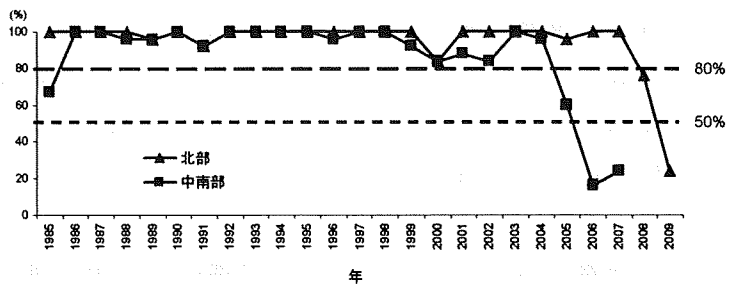


図1. 1985～2009年のJEV抗体陽性率の年間最高値

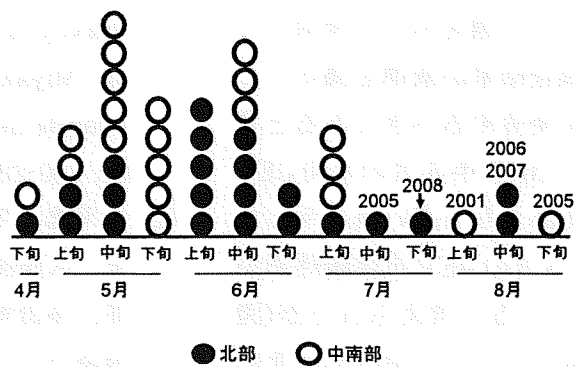


図2. 1985～2009年のJEV抗体陽性率が最初に50%以上を示した時期

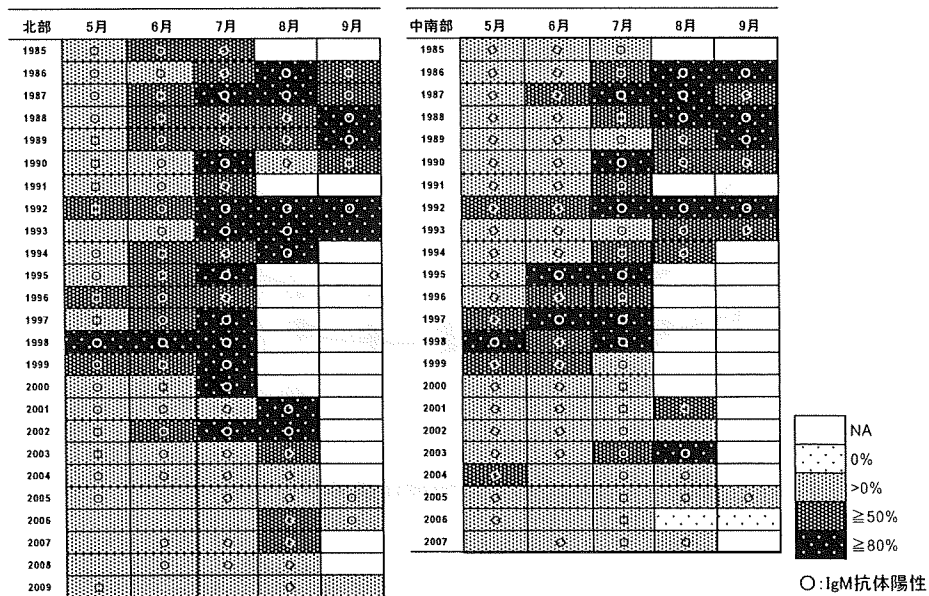


図3. 1985～2009年の5～9月各月の平均JEV抗体陽性率

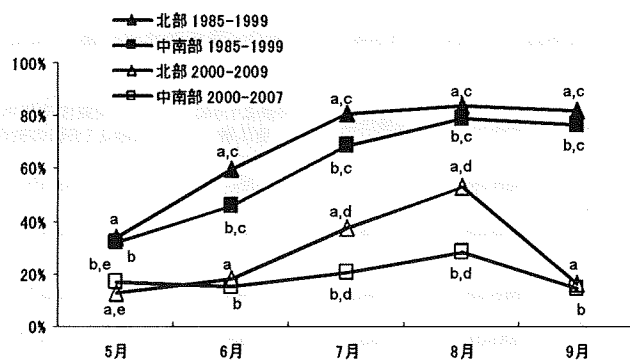


図4. 1985～1999年および2000～2009年、5～9月の平均JEV抗体陽性率

a,b: 北部、中南部の各月で1985～1999年と2000～2009年間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.001$)
 c: 1985～1999年の6～9月で北部と中南部間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.05$)
 d: 2000～2009年の7、8月で北部と中南部間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.01$)
 e: 2000～2009年の5月で北部と中南部間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.01$)

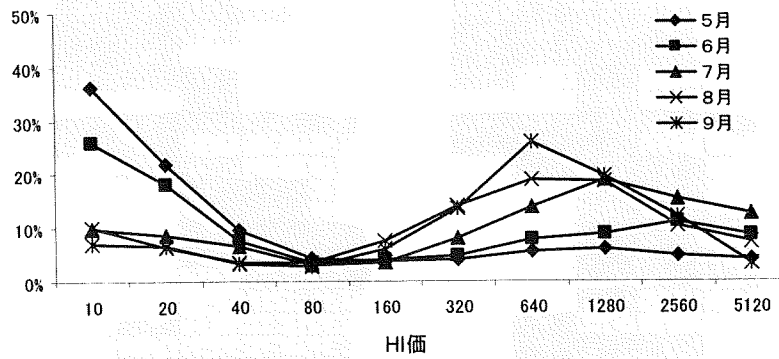


図5. 1985～2009年のHI陽性検体中各HI値の割合

表1. 1985～1999年および2000～2009年、7～9月のHI陽性検体中HI値1:640以上の検体の割合

採血地	採血年	HI陽性数	HI値 \geq 1:640 検体数	HI陽性検体中 HI値 \geq 1:640の割合(%)
北部	1985-99	2173	1368	63.0 ^{a,c}
	2000-09	873	481	55.1 ^{a,d}
中南部	1985-99	1942	1146	59.0 ^{b,c}
	2000-07	383	158	41.3 ^{b,d}

a,b: 北部、中南部共に1985～1999年と2000～2009年間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.01$)
 c,d: 1985～1999年、2000～2009年共に北部と中南部間に有意差あり(χ^2 検定、 $p < 0.01$)

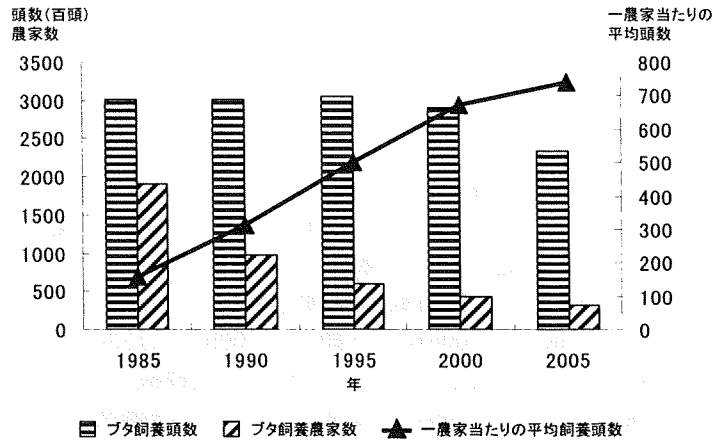


図6. 1985～2005年のブタ飼養状況の変化

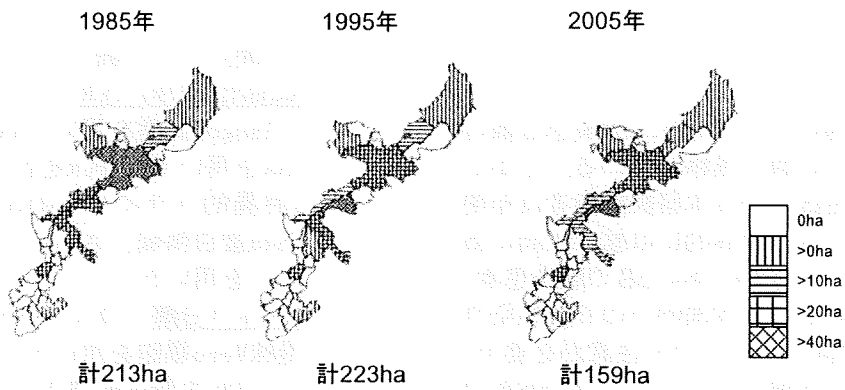


図7. 1985、1995、2005年の沖縄島内各市町村の水田面積
市町村の区分けは2005年時点の30市町村による。各地図下の数値は
沖縄島の水田面積の総計

分担研究報告書

－日本脳炎ウイルスの分離とその病原性に関する研究－

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）

研究要旨： 近年にあつては本邦における日本脳炎患者数は年間10名に満たない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点は強調したい。分布ウイルス自身の遺伝子タイプの変遷や変異を考えると、JEVの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。我々は毎年石川県におけるウイルス媒介野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点（3地点）、定時期（8月末）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。過去数年の採集蚊の推移をみると、1,759匹（2005年）、1,458匹（2006年）、885匹（2007年）、990匹（2008年）と続き、2009年は1336匹であったことから、蚊の生息数に大きな変化は無いことを示唆している。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た。2009年の結果としてRT-PCR陽性サンプルは例年並みに5件あったが、ウイルス分離には至らなかった。遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べるために2005年分離のIshikawa-K05株（遺伝子タイプ1型）に注目している。Ishikawa-K05株とJaGAR01株（遺伝子タイプ3型）との生物活性の比較では、細胞における増殖性はJaGAR01株が高いが、マウスに対する病原性ではIshikawa-K05株の方が毒性は若干高かった。FACSによる詳細な解析では両株共に細胞のアポトーシスを起こしていることが確認された。JEV感染における宿主応答を遺伝子レベルから解析することも必要と思われ、我々は引き続き宿主応答の解析を行っている。感染病態の詳細な解析は将来的にJE感染に対する有効治療法開発に向けての有用な基礎データとなるであろう。

A. 研究目的

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間10名に満たない数で推移している。しかしながら、アジア地区での日本脳炎感染者は年間数万人になるとされ、世界的には拡大傾向にある。石川県においても2007年に2名の脳炎患者がでていた事実等から日本国内での日脳感染ウイルス(JEV)の動向についてより注意が必要であろう。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、

(1) 日本の北部地区石川県におけるJEV分布状況の実態把握、および(2) ウイルス病原性発現機構の解明を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水田で行っている。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。

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：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、BHK細胞を用いてウイルス力価を計測した。

遺伝子配列解析：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・細胞解析：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)を用いて宿主細胞遺伝

子の発現量を調べた。細胞解析はフローサイトメトリー(FACS)によって行った。

マウス実験：ウイルスのマウスに対する病原性を調べるためにマウスICRにウイルスを接種(ip)し、生死を観察した。なお、倫理的な側面については金沢医大動物委員会での承認を受けて実験を進めている。

C. 研究結果

例年、1,000匹台の野外蚊(1,759匹(2005年)、1,458匹(2006年)、885匹(2007年)、990匹(2008年))を採取しているが、2009年には1,336匹の野外蚊を採取した。蚊から得られた抽出RNAについてJEV特異的プライマーを用いたRT-PCR法によって5件の陽性サンプルを得たが、Vero細胞を利用してのウイルス分離は成功しなかった。この5年間での分離ウイルスは2005年サンプルからの分離ウイルス、Ishikawa-K05株(遺伝子タイプ1型)のみであった。Ishikawa-K05株は比較的用いた遺伝子タイプ1型のIshikawa株(94年分離)あるいは、遺伝子タイプ3型のJaGAR01株に比べ、細胞における増殖性は低いものであったが、マウスに対する病原性に差異は無く、むしろ若干強いものであった。ウイルス感染細胞への作用について調べたところ、FACS解析の面からは両ウイルス株による細胞のアポトーシス誘導性は同等のレベルであった。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が、ウイルス感染に伴うIFN関連遺伝子発現誘導についてもほぼ同等の作用が認められた。

D. 考察

2009年採取野外蚊からのRNAサンプルではRT-PCR、スクレオチド解析の陽性が5プール認められたが、ウイルス分離には至らなかった。しかし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(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、マウスに対する病原性等は必ずしも低くない。またウイルス感染細胞における全遺伝子発現の網羅的解析では、IFN経路遺伝子発現への影響性も同等レベルと判断された。

現在の日本国内において分布している遺伝子タイプ1型のJEウイルスの毒性がどの程度かについてはさらに検討・解析が必要と考えられる。2007年に日本脳炎患者が石川県において発生していることも重要視すべきである。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、特に幼児において近い将来に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

要がある。引き続き野外蚊からのウイルスの分離、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。

E. 結論

石川県での野外蚊(媒介蚊)においてJEV分布は変わりなく存在すること、またマウス実験から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より注目すべきであること、さらにDNAマイクロアレイやFACSによる解析で、細胞レベルでのJEV病原性解析も重要であることが再認識された。

F. 健康危険情報

北陸においても、病原性のある日本脳炎ウイルスを野外蚊が保有し、病原ウイルスが近辺に存在しているという事実に注意が必要であろう。

(関連事項：月刊誌『アクタス』(北国新聞)(2009年6月号)に日本脳炎ウイルス注意に関する記事掲載)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T: Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. *Microbiol Immunol* 53: 496-501, 2009
- (2) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T: Archetype JC virus efficiently propagates in kidney-derived cells stably expressing HIV-1 Tat. *Microbiol Immunol* 53: 621-628, 2009

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 太田隆英、前田雅代、村上 学、竹上 勉、達家雅明：ヒト上皮系細胞株においてRhoGDI β は中心体および頂端側細胞間接着部位に存在する、
第68回日本癌学会総会、横浜(2009, 10)
- 3) 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)

- 4) 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）
- 5) 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）
- 6) 奴久妻聡一、亀岡正典、杉浦重樹、中道一生、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉：HIV-1 Tat によるArchetype JCウイルスの増殖促進、第57回日本ウイルス学会、東京（2009, 10）
- 7) 蔡傑、石垣靖人、太田隆英、村上 学、竹上 勉：HCV蛋白NS3は宿主遺伝子の安定性に影響しうる、第32回日本分子生物学会、横浜、（2009, 12）

特に無し

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」

分担者研究報告書

日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究

分担研究者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：近年、日本において日本脳炎は超低流行状況にあり年間の患者発生は10名をきっている。しかしながら夏季には関東以南の地域で継続的に日本脳炎ウイルスの活動が確認されており、野外採取のコガタアカイエアから日本脳炎ウイルスが分離されている。さらに小西らの調査では一般市民の不顕性感染が存在することが証明されており、我が国においては日本脳炎の感染リスクは依然として存在する。一方隣国の中国ではワクチンの普及とともに患者数は激減しているが、いまだ数千人単位の日脳患者が発生しており、東南アジアやインドでは以前より大きな流行が報告されている。このような状況のなかで日本において活動しているウイルスとアジアの日本脳炎流行地域のウイルスの差異を比較研究することは日本における今後の日本脳炎対策を考えるうえで重要である。本年度の研究では平成20年度に引き続き、ベトナム、中国、日本で過去に分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子を分子疫学解析する一方で、タイ国など東南アジアに生息している日本脳炎ウイルスを比較しアジア全域の日本脳炎ウイルス分子疫学解析を実施した。その結果、前年度と同じくインドシナ半島北部に生息する日本脳炎ウイルスが比較的頻繁に中国を經由して日本に到達していることを確認する一方でインドシナ半島南部に生息し中国、日本方向へは転進しないウイルスグループが存在することを明らかにした。さらに前年度に引き続き、中国から日本に日本脳炎ウイルスが飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島における日本脳炎ウイルスの採取と解析も継続実施するとともに五島列島を含む長崎県全域のブタおよび野生イノシシの血清疫学調査を実施し野生イノシシにおける抗体陽性率を明らかにした。

A. 研究目的

中国、日本、東南アジアで分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子を分子疫学解析し、東南アジアと日本に生息している日本脳炎ウイルスの生態をより詳細に解析すること。および、中国から日本に日本脳炎ウイルスが飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島を想定し、ブタと蚊

における調査を開始して、東南アジアから日本までの日本脳炎ウイルスの移動状況を詳細に明らかにすること、さらにウイルス保有あるいは増幅動物として野生イノシシの役割を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 日本脳炎ウイルスの分子疫学

我々が日本やアジア各国で分離したウイルス株、および GenBank に登録されている日本脳炎ウイルス遺伝子の情報 (Genotype I:119 株、Genotype II: 10 株、Genotype III:183 株、Genotype IV: 3 株) 315 系統の日脳ウイルス株について E 蛋白質領域のアラインメントを行った後、遺伝子型 I 型と III 型に分けてネイバージョイニング法を用いて系統樹解析を実施した。

2) 蚊の採取

平成 21 年 8 月 24 日～26 日、五島列島 (五島市、新上五島町) においてライトトラップ及び吸血管により捕集した蚊 1911 匹を分類後、雌雄判別及び吸血の有無を確認し、124pool (最大 20 匹 / pool) を作製した。媒介蚊の各 pool はホモジナイズした後、C6/36 細胞に接種してウイルス分離を行った。分離・同定した JEV はエンベロープタンパク (E) 領域の塩基配列を決定した。

3) ブタとイノシシ調査

長崎県内各所 (五島列島と対馬を含む) で捕獲されたイノシシと屠場のブタから採血し、日本脳炎ウイルスに対する JEV 抗体価 (IgG, IgM) を ELISA 法により測定するとともに蚊培養細胞クローン C6/36 細胞を用いてウイルス分離を実施した。

C. 研究結果

1) 東南アジアの日脳ウイルス分子疫学解析

昨年の解析により遺伝子型 I 型のウイルスは比較的頻繁に東南アジアから中国を経て日本に飛来している事実を明らかにした。本年の解析においてはタイ国で分離されたウイルスを加えて解析した。その結果、遺伝子型 I 型のウイルスの一部のグループ (図 1 で 1-B と定義される) はタイ国を中心に生息しているが、他の 1-A (1-A-1 ～1-A-8) に分類されるグループのように東アジアを西から東に移動することはなく東南アジアに局限して生息していることが明らかになった。このことは日本脳炎

ウイルスの生態学を考える上で極めて重要な所見である。すなわち、1-A グループに見られる長距離の移動はウイルスがもつ何らかの生物学的性状によって規定されるのか、あるいは 1-A が多く生息する地域 (ベトナム北部から中国雲南省) にウイルスを効率よく運ぶ手段が存在するののかのいずれかの可能性が考えられる。また、今回新たに実施した日本脳炎ウイルス遺伝子型 III 型の解析 (図 2) では III 型ウイルスは 7 つのグループに分類できた。このうち 3-A-1, 3-A-2, 3-B-1, 3-D と定義したグループでは同時期に中国、日本、韓国、ベトナムにおいて分離されており 1990 年以前、即ち日本に I 型ウイルスが侵入する以前にも III 型ウイルスが比較的頻繁にアジアを移動していることが推測できた。興味深いのは、3-E のグループは近年中国でのみ分離されており 2000 年以降中国で独自の進化 (変化) を遂げているグループである。このグループがどうして日本に侵入しないのかについては今のところ全くわからない。

2) 五島列島で蚊からの日本脳炎ウイルス分離
124 プール中の *Culex tritaeniorhynchus* の 1 プールから 1 株のみ JEV ウイルス株 (JaNAr01G-09) が分離された。現在遺伝子解析を実施している。

3) ブタとイノシシの調査

屠場で採取したブタ血液のなかで日本脳炎抗体陰性であったブタ 80 頭からウイルス分離を試みた。その結果 2 頭から 2 株の日本脳炎ウイルス (JaNP-22-09, JaNp-25-09) を分離した (表 1)。現在ウイルス遺伝子の解析を実施している。また捕獲したイノシシ 192 頭からはウイルスは分離できなかった (表 2)
捕獲イノシシの抗体検査においては長崎本土と五島列島、対馬において抗体陽性個体が確認された (図 2)。抗体保有率は 44%～71%であった。離島調査地域の上五島と対馬ではブタ

は飼育されておらず、この地域ではブタを介しない日本脳炎ウイルスの伝搬が存在することが明らかになった。

D. 考察

日本脳炎ウイルスが長距離を移動していることは我々が昨年、本年と実施した分子疫学解析により明らかである。しかしながら、本年の研究では一部の遺伝子型グループが東南アジア、あるいは中国に局限して生息し進化(変化)をつづけていることも明らかになりつつある。この生態学的な差異はウイルスの生物学的性状に起因するのか、ウイルスの運び屋となる同動物との関連において規定さえるのか今のところ不明である。日本脳炎ウイルスの生態を解明し感染予防に役立てるために今後この点を明らかにすることが必要である。

日本脳炎ウイルスの増幅動物であるブタのいない離島において野生のイノシシが日本脳炎に感染していることが明らかになった。これらの離島では冬には完全に媒介蚊が消失していることがわかっており、ウイルスが島で越冬することは考えにくい。おそらく毎年中国本土あるいは日本本土から何らかのルートでウイルスが侵入していると考えるのが妥当であろう。幸い本年も昨年に引き続き五島列島では蚊から日本脳炎ウイルスの分離に成功した。今後この五島列島で分離した日本脳炎ウイルスの遺伝子解析から分子疫学分析を実施することでウイルス侵入(移動)経路が明らかになるものと期待される。

E. 結論

- 1) 日本脳炎ウイルス遺伝子型 III 型のウイルスは 1990 年以前に東南アジアから東に向かって移動し日本列島に飛来していた可能性が高い。
- 2) 遺伝子型 I 型のウイルスの一部はベトナム、雲南省から中国を経由して日本に移動している。しかしタイ国を中心として東南ア

ジアに生息している他の I 型ウイルスにはそのような兆候は見られず地域に局限している。

- 3) 遺伝子型 III 型のウイルスのうち一部のグループは中国で継続的に進化(変化)をしているが、日本に侵入した形跡がない。
- 4) 2008 年につづき 2009 年にも五島列島で日本脳炎ウイルスを分離した。
- 5) 2009 年に長崎の屠場で採取したブタ血液から日本脳炎ウイルスを分離した。
- 6) 2009 年に五島列島、対馬で捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルス抗体を検出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* Vol. 47(3): 645-51. 2009

Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. *J Gen Virol.* Vol. 90: 827-832. 2009

Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K.,

Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009

Kinoshita H, Mathenge EG, Hung NT, Huong VT, Kumatori A, Yu F, Parquet MC, Inoue S, Matias RR, Natividad FF, Morita K, Hasebe F. Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic Fever patient. *Jpn J Infect Dis.* Vol. 62(5):343-50. 2009

Kouichi Morita. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in East Asia. *Vaccine.* Vol. 27:7131-7132, 2009

森田公一；「日本脳炎、その他の脳炎」、in 新臨床内科学第九版、高久史磨・尾形悦郎・黒川清・矢崎義雄 監修、医学書院、2009

森田公一；蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患—デング出血熱の発症機序をめぐって—；最新医学 (The Medical Frontline) , Vol 64(4), 919-923, 2009.

森田公一、木下一美；デング熱研究の最前線；医学のあゆみ (J. Clin. Exp. Med.) Vol. 229(4), 241-245, 2009

森田公一；日本脳炎ワクチン、化学療法の領域、Vol. 25:1459-1465. 2009

2) 学会発表

国際会議における発表

Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan,

Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita : Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia to Japan. International Joint Forum on Infectious Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, 2009年9月16-17日. (Oral Presentation II)

Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Co Thach, Vuong Duc Cuong, Ngo Khanh Phuong, Shingo Inoue, Yu Fuxun, Pham Cong Tien, Dang Tuan Dat, Phan Thi Nga, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita : 2009 Bats Survey in Vietnam – Bats are important reservoir hosts of arboviruses . . International Joint Forum on Infectious Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, 2009年9月16-17日. (Poster Session)

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Kenta Okamoto, Tomoshirou Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang,

Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Filipinas F. Natividad, Phan Thi Nga, Futoshi Hasebe: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Phan Thi Nga, Do Phuong Loan, Nguyen Viet Hoang, Bui Minh Trang, Le Thi Hien Thu, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Arnaud Fontanet, Paul Brey, Nguyen Tran Hien: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Phan Thi Nga: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia: The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki City, Japan, 26-28 December, 2009.

Kazuya I.P.J. HIDARI, Kouichi MORITA, Takashi SUZUKI : ANTI-DENGUE VIRUS ACTIVITY OF SULFATED

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

Yasunami M, Nguyen TPL, Horie H, Kurata S, Yamazaki A, Shibata H, Vu TQH, Tran TT, Ha MT, Vo VT, Tran VD, Kikuchi M, Morita K, Hirayama K : SUSCEPTIBILITY TO SEVERE DENGUE VIRUS INFECTION CONFERRED BY LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE 3 (LAG3) POLYMORPHISM. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

M. A. Islam, Choudhury, M.A.H.Z., Banu, S., Solaiman, H., Moula, K., and Morita, K. : ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THREE SERO-TYPES OF DENGUE VIRUSES FROM THE OUTBREAK YEAR 2007 AND 2008 IN BANGLADESH. 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 TERAJ REGION OF NEPAL. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

国内会議における発表

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

早坂大輔: ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で摂取した際の発症・致死性の比較. 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

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.

上地玄一郎、山城哲: ファージディスプレイ法を用いたインフルエンザウイルス H5N1 亜型に中和活性を示すヒト単クローン性抗体の分離. 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。

吾郷昌信、平野学、山口顕徳、吉川亮、Umami Qifqiyar Nur、西村順裕、清水博之：上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出同定法。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

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

堀田こずえ、高桑弘樹、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、山城哲：ハノイ市郊外で飼育されるアヒルおよびブタにおけるA型インフルエンザウイルス分布調査。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

余福薫、木下一美、井上真吾、長谷部太、森田公一：Sero-diagnosis of SARS infection using recombinant N protein expressed by baculovirus expression system。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 Dengue 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

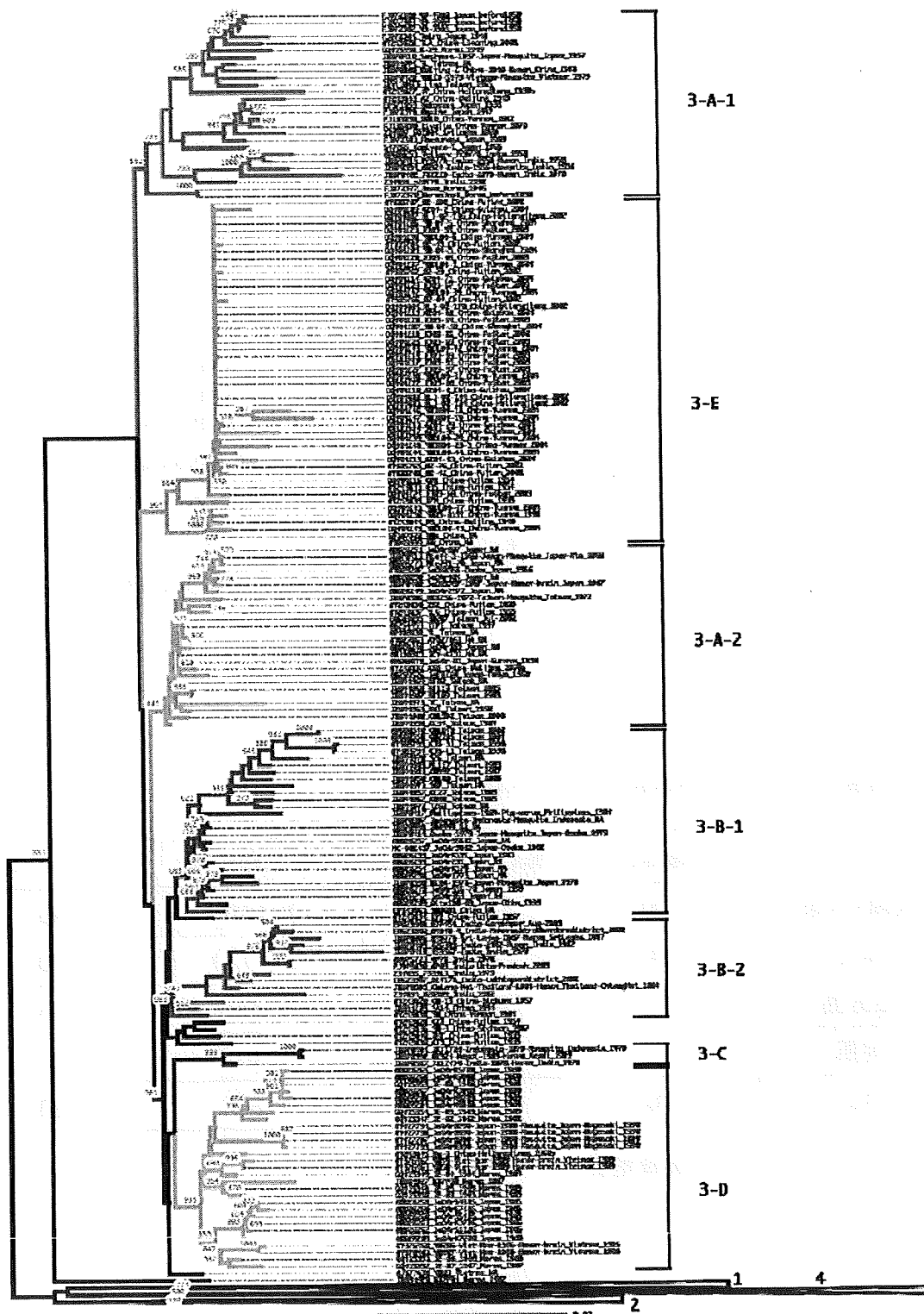
早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(図2) 日本脳炎ウイルス遺伝子型 III 型ウイルスの系統樹




(表. 1) 屠場ブタからの日本脳炎ウイルス分離成績

No.	Collection Year	Number of Sera	No. of JEV Sero-negative Sera	Number of JEV Isolates	Strain
1	2001	144	60	9	JaNP-26-01, JaNP-32-01, JaNP-43-01, JaNP-45-01, JaNP-48-01, JaNP-53-01, JaNP-55-01, JaNP-59-01, JaNP-60-01
2	2002	160	20	0	
3	2003	155	107	3	JaNP-59-03, JaNP-76-03, JaNP-84-03
4	2004	133	57	2	JaNP-52-04, JaNP-77-04
5	2005	160	57	5	JaNP-42-05, JaNP-57-05, JaNP-62-05, JaNP-65-05, JaNP-100-05
6	2006	152	67	2	JaNP-69-06, JaNP-70-06
7	2007	80	23	1	JaNP-12-07
8	2008	80	0	0	
9	2009	80	0	2	JaNP-22-09, JaNP-25-09
Total				24	

(表2 捕獲イノシシの抗体検査とウイルス分離の結果)

	調査頭数	抗JEV IgG陽性 (%)	抗JEV IgM陽性 (%)	ウイルス分離
長崎・西彼	100	57 (57.0)	10 (10.0)	0/43
県北	54	24 (44.4)	6 (11.1)	0/30
上五島	31	16 (51.6)	0 (0.0)	0/15
対馬	7	5 (71.4)	0 (0.0)	0/2
合計	192	102 (53.1)	16 (8.3)	0/90

 : ブタの非飼育地区

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tajima, S., Nerome, R., Nukui, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I	A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice.	Virology	396	298-304	2010
Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A.	Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population.	Am J Trop Med Hyg.	80(5)	856-861	2009
Konishi E, Kitai Y.	Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans.	Vaccine	27	7053-7058	2009
Konishi E.	Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses.	Vaccine	27	7129-7130	2009
Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S and Konishi E	Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008	Jpn. J. Infect. Dis.	63	58-60	2010