

201004003A

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
(国際医学協力研究事業)

ウイルス感染症の診断、疫学および 予防に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23 (2011) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎
国立感染症研究所ウイルス第1部

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
(国際医学協力研究事業)

ウイルス感染症の診断、疫学および 予防に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）年3月

研究代表者 倉根 一郎
国立感染症研究所ウイルス第1部

目 次

I	総括研究報告	(ページ)
	ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究	1
	研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）	
II	研究分担報告	
1	フラビウイルスの疫学に関する研究	27
	研究分担者：小西英二（神戸大学大学院保健学研究科）	
2	フラビウイルスの細胞障害機構に関する解析	39
	研究分担者：竹上勉（金沢医科大学総合医学研究所）	
3	アルボウイルスの病原性に関する研究	42
	研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所）	
4	ハンタウイルス感染症の診断法に関する研究	49
	研究分担者：有川二郎（北海道大学大学院医学研究科）	
5	ハンタウイルス感染症の疫学疫学に関する研究	54
	研究分担者：荻和宏明（北海道大学大学院獣医学研究科）	
6	ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究	64
	研究分担者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部）	
7	ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究	68
	研究分担者：中込治（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	
8	ロタウイルスの分子疫学に関する研究	72
	研究分担者：小林宣道（札幌医科大学医学部）	
9	ロタウイルス感染によるタイプIIIインターフェロン産生誘導	76
	研究分担者：浅野正岳（日本大学歯学部）	
10	下痢症ウイルスの病原性解析に関する研究	79
	研究分担者：片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第2部）	
11	狂犬病の治療開発に関する研究	90
	研究分担者：西園晃（大分大学医学部）	
12	狂犬病の診断法確立に関する研究	103
	研究分担者：井上智（国立感染症研究所獣医科学部）	

1 3	狂犬病の疫学と神経病原性に関する研究	110
	研究分担者：伊藤直人(岐阜大学応用生物科学部)	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	115
IV	研究成果の刊行物・別刷	119

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究要旨：

アルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、ウイルス性出血熱、狂犬病を中心に、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症に関し、(1)新たな診断、検査法を確立し普及すること、(2)疫学調査により国内外における流行状況を明らかにし、対策のための基盤を確立すること、(3)病原体の解析をもとに病態形成機序を明らかにし、予防治療法確立のための基盤を確立すること、を目的として研究を進めた。

アルボウイルス研究においては、デング流行地におけるデングウイルス感染増強抗体保有状況を明らかにした。国内で分離した日本脳炎ウイルスが遺伝型1型であることが示された。ブタ細胞において日本脳炎ウイルス感染後インターフェロンの産生が遅れていることが示された。ウイルス性出血熱研究においては、ベトナムにおいてトッタパラヤンウイルスが継続的に維持されていること、ベトナムハノイの港においてラットが持続的にソウルウイルスを保有していることを示した。極東ロシアで捕獲されたハントウアカネズミとセスジネズミから、アムールウイルスとハンタンウイルスを分離した。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスの組換え核蛋白に対する単クローン抗体を作製した。ウイルス性下痢症の研究においては、ロタウイルスワクチンのロタウイルス下痢症の発症予防に対する高い有効性を示した。バングラデシュのヤギロタウイルス G034 株の全遺伝子配列を決定した。ロタウイルス感染により、type III インターフェロン mRNA の発現が増強された。ノロウイルス研究においては、国内発生した胃腸炎事例より検出されたノロウイルス HK299 株がキメラウイルスであることを示した。狂犬病研究においては、狂犬病ウイルス街上毒 1088 株感染マウスがモデル動物として有用であることを示した。狂犬病ウイルスの野生株のマウスへの馴化に伴って起こる塩基置換部位を明らかにした。狂犬病ウイルス西ヶ原株 P 蛋白質に存在する核外輸送シグナルが、本ウイルスの IFN 抵抗性及び病原性に関与していることを示した。

研究分担者：

浅野正岳：日本大学歯学部 准教授

有川二郎：北海道大学大学院医学研究科
教授

伊藤直人：岐阜大学応用生物科学部
准教授

井上 智：国立感染症研究所 室長

莉和宏明：北海道大学大学獣医学研究科
准教授

片山和彦：国立感染症研究所 室長

小西英二：神戸大学大学院保健学研究科
准教授

小林宣道：札幌医科大学 教授

西條政幸：国立感染症研究所 部長

竹上 勉：金沢医科大学総合医学研究所
教授

中込 治：長崎大学大学院医歯薬総合研究
科 教授

西園 晃：大分大学医学部 教授

森田公一：長崎大学熱帯医学研究所 教授

A. 研究目的

近年、世界各地で新興・再興感染症が流行し人類に対する脅威となっている。これらの中にはウイルス性感染症が多く含まれている。アルボウイルス感染症、ウイルス性下痢症、狂犬病および重篤なウイルス性出血熱などが、アジア各地で流行し、多数の患者発生と死亡が報告されている。しかしこれらの感染症の流行地では、診断体制が未整備なため正確な患者数や流行地の特定などの疫学情報が欠如している。またこれらの感染症に対するワクチンや新規治療

法の開発を早急に実施する必要にせまられている。本研究においては、特にアジアにおいて問題となるウイルス感染症を対象として、診断法の開発、アジアにおける疫学状況を明らかにすること、病態形成機序の解明及び予防、診断法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) アルボウイルス感染症

ウイルス血症レベルに関与する中和活性と増強活性のバランスを測定する方法を開発し、より正確に生体内での抗体活性状況を把握するため、フィリピンおよびインドネシア住民血清を対象として、4種のデングウイルスに対する中和・増強抗体を測定し、保有状況を解析した。

石川県におけるウイルス媒介野外蚊（コガタアカイエカ）からの日本脳炎ウイルス（JEV）の分離を定点（3地点）で8月～9月に行った。蚊の破碎液を用いてRT-PCR法及び培養Vero細胞によるウイルス分離を行ない、さらに分離株の遺伝子解析を行った。

日本脳炎ウイルス感染による病原発現機序を細胞感染レベル、特にインターフェロン応答に焦点を当て解析を行った。日本脳炎ウイルスがブタでは高いウイルス血漿が見られるが脳炎を発症することはない。この原因を明らかにする第一段階として、ブタにおける高いウイルス増殖性のメカニズムを細胞レベルで解析した。

2) ウイルス性出血熱

ベトナムハイランド由来スルクス血清はベトナムの共同研究者によって収集された。ベトナムハノイ近郊ハイフォン港由来ラット血清は国立感染症疫学研究所との共同研究を通じてハイフォン港検疫所の協力を得て収集した。組換えトッタパラヤンウイルス (TPMV) 核蛋白抗原を作製し、ベトナムにおいてこれを用いた血清調査を行った。陽性を示した個体は TPMV に対する中和抗体を測定し、確定診断を行った。

極東ロシアでの腎症候性出血熱 (HFRS) の流行状況の詳細を明らかにするため、ハバロフスクの近郊で捕獲されたげっ歯類からハンタウイルスを分離して性状を解析するとともに、極東ロシアの HFRS 患者血清について分離株を含む複数のハンタウイルスに対する中和抗体価を測定し、感染ウイルス型の特定を行った。

バキュロウイルスにより発現・精製されたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMウイルス) の組換え核蛋白 (NP) に対する単クローン抗体を作製し、その抗体を用いて病理組織中の LCMウイルス抗原検出における有用性を検討した。

3) ウイルス性下痢症

ロタワクチンの有効性解析はブラジルにおいて行った。ペルナンブーコ州都レシフェにある中核的小児病院を併設するフィゲイラ教授記念総合医学研究所において、5歳未満の小児下痢症患者から便検体を収集するとともにロタウイルスワクチン接種歴をワクチンカードにより確認した。ロタウイ

ルスの検出は ELISA (Rotacclone) によった。陽性の者をロタウイルス下痢症とし、ロタウイルス陰性の下痢症患者を対照としてワクチンの有効性 (%) を $(1-OR) \times 100$ により算出した。

ヤギロタウイルス研究のためバングラデシュ北部のマイメンシン市郊外において、下痢症状を呈する子ヤギ (3 月未満) より便検体 259 検体を採取した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりロタウイルスの RNA 分節を 8 検体において検出した。MA104 細胞におけるウイルスの組織培養を行なった。経代培養は 5 回まで行ない、さらにブランク純化して得られたウイルスクローンを研究対象として用いた。

ロタウイルス感染による type III インターフェロン産生誘導に関する研究においては、ヒト腸管上皮細胞 HT-29 に、ロタウイルス SA11 を感染させ、経時的に培養上清を回収し、ELISA kit を用いて、type III インターフェロンの定量を行った。

北海道で発生した急性胃腸炎患者より採取された糞便検体を対象とした。検体からの RNA 抽出は、定法によって行った。抽出した RNA は、DNase 処理により混在する DNA を分解除去した後、逆転写に用いた。NoV genome RNA 3' end に存在する poly A tail から 5' end までの cDNA を合成した。COG2F, SKG2R を用いた PCR により、ORF1/2 junction から下流約 300 塩基の Capsid N/S 領域を増幅し、塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した。

4) 狂犬病

1970年代に北米でウッドチャックより分離された街上毒1088株をマウスに感染させモデルとしての評価を行った。1088株の弱毒株を作出するため、1088株をマウス神経芽細胞腫由来であるNA細胞で連続継代を計30代行った。さらに、Gタンパク質においてこの変異のみを持つ変異株 (1088-N4#14株)を限界希釈法によりクローニングし、マウスにおける病原性を検討した。

ブラジルで分離された狂犬病ウイルス (RABV) の野生株 (街上毒 6 株) を、マウスに継代・順化を行って、RABV のゲノム上に誘導された遺伝子変異等について解析を行った。食虫コウモリ分離株は、マウス脳内接種を一度経過して RABV の検査が陽性となったマウス脳を冷凍保存して使用した。また、家畜分離株は感染した宿主の脳組織を冷凍保存したものを本実験に使用した。

狂犬病ウイルス Ni-CE 株の遺伝子操作系を用い P 蛋白質に核外輸送シグナル (NES) を保有する Ni-CE (NES+) 株を作出した。ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞に Ni-CE 株あるいは Ni-CE (NES+) 株を接種した後に、IFN- α 処理を行った。細胞を固定後、抗 STAT1 抗体による蛍光免疫染色を実施し、STAT1 の細胞内局在を検討した。マウスに Ni-CE 株あるいは Ni-CE (NES+) 株を脳内接種した。各株感染マウスの症状ならびに生存数の推移を観察した。

C. 研究結果

1) アルボウイルス感染症

フィリピンおよびインドネシア住民血清を対象として、4 種のデングウイルスに対する中和・増強抗体を測定し、保有状況を解析した。感染初期と推定される中和活性陽性の血清では抗体は補体依存性であったが、感染後期と推定される増強活性陽性の血清では抗体は補体非依存性であった。ヒトにおいては補体が存在しても中和活性に転じない抗体が多く個体に存在した。

石川県におけるウイルス媒介野外蚊 (コガタアカイエカ) からの日本脳炎ウイルス (JEV) の分離を行った。591 匹の蚊が採取された。Vero 細胞によるウイルス分離を行った。RT-PCR 陽性サンプルは 6 件あり、ウイルス分離を行った結果、2 株のウイルス分離に成功した。遺伝子解析の結果、分離 JEV 2 株の遺伝子型はいずれも 1 型であった。

日本脳炎ウイルスのブタ細胞に対する感染においては、感染後インターフェロンの発現がヒトやサル細胞と比較して遅れており、これがブタ細胞でウイルスが高増殖する要因であった。ブタ感染細胞ではインターフェロン刺激のウイルス側要因の 1 つである dsRNA が細胞質に露出する時期が遅れており、細胞のウイルス検出装置から逃れていることが原因であった。

2) ウイルス性出血熱:

組換えトッタパラヤンウイルス (TPMV) 核蛋白抗原を作製し、ベトナムにおいてこれを用いた血清調査を行った。陽性を示した個体は TPMV に対する中和抗体を測定し、確定診断を行った。その結果ハイランドにお

いて継続的に TPMV 維持されていることが明らかとなった。ベトナムハノイの港にてソウルウイルス (SEOV) 感染ラットを捕獲し、ラット持続感染系に関する解析を行った。抗体陽性率はおよそ 30%であり、コロニーとして持続的に SEOV を保有していることが示された。PCR 検査で抗体保有個体の約 7割がゲノムを保有していた。

極東ロシアでの腎症候性出血熱 (HFRS) の流行状況の詳細を明らかにした。ハバロフスクの近郊で捕獲されたハントウアカネズミとセスジネズミから、AP209 株と AA57 株が分離された。これらはそれぞれ Amur virus (AMRV) と Hantaan virus (HTNV) であった。また、ウラジオストック、沿海地方とハバロフスク地方で HFRS 患者血清を採取し、それぞれの血清について AMRV AP209 株、HTNV AA57 株および Seoul virus (SEOV) SR-11 株に対する中和抗体価を求めたところ、それぞれの地域で主要な原因ウイルスが異なっていた。

バキュロウイルスにより発現・精製されたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCM ウイルス) の組換え核蛋白 (NP) に対する単クローン抗体を作製した。作製された単クローン抗体は、NP を発現する組換え蛋白だけでなく、感染動物の実質臓器中のウイルス抗原を特異的に検出することが示された。

3) ウイルス性下痢症：

わが国にロタウイルスワクチンが導入された場合の効果を評価するため、ブラジルにおける単価 G1P[8]ロタウイルスワクチン

の効果を検証した。ブラジルでは、単価 G1P[8]ワクチンは、ワクチン株と異型である G2P[4]に起因するロタウイルス下痢症を含め、ロタウイルス下痢症の発症予防に高い有効性を示したが、ワクチン接種後の期間が長引くにつれ、その有効性が低下していた。この傾向は重症ロタウイルス下痢症に対するワクチンの有効性において顕著に見られた。

ヤギロタウイルスとしては初めて、バングラデシュの G034 株の全遺伝子配列を決定し、各遺伝子分節について系統遺伝学的・分子疫学的に解析した。その結果、G034 株はウシなど反芻動物のロタウイルスに近縁であり、また一部の遺伝子分節は G2, G6, G8, G12 ヒトロタウイルスとも遺伝学的に関連した。

ヒト大腸癌由来細胞 HT-29 において、ロタウイルス感染により、type III インターフェロン mRNA の発現が増強された。ウイルス感染 6 時間後に最も高濃度の type III インターフェロン産生が認められた。他の腸管上皮細胞である T84 および Caco2 細胞を用いて同様に検索したところ、T84 においては type III インターフェロンの産生が認められたが、Caco2 では産生が見られなかった。

国内で発生した胃腸炎事例より検出されたノロウイルス HK299 株は、ゲノム全長塩基配列解析の結果、ORF1/2 junction でゲノム組換えを起こしたキメラウイルスであった。ORF2 の塩基配列は新たな未知の genogroup に由来することが示唆された。

HK299 株は、新しい構造タンパク質領域を有する株であった。

4) 狂犬病：

狂犬病ウイルス街上毒 1088 株をマウスに感染させ、狂犬病モデルとしての評価を行った。1088 株感染マウスは街上毒の病態を反映しており、狂犬病発症モデルマウスとして有用であった。30 代継代株 1088-N30 株は、細胞への馴化が認められ、脳内接種では親株と同様にマウスに致死感染を起こし、その LD₅₀ も 5.0 FFU であったが、筋肉内接種では発症したマウスの約 82% が耐過し(親株の場合では致死率約 91%)、高度に弱毒化していた。1088 株と 1088-N30 株の全塩基配列を決定し両者を比較したところ 7 塩基置換が認められた。これらのうち 2 つは G タンパク質に認められ、1 つは N 型糖鎖の追加をもたらす変異であった。

狂犬病ウイルスの野生株(街上毒6株)とこれの継代株についてゲノム配列を比較して継代によって誘導された塩基置換部位を決定した。14か所の塩基置換が見られた。8か所は構造遺伝子上にあり6か所がノンコーディング領域上に見られた。構造遺伝子上の塩基置換はG遺伝子上の1か所のみが確認された。一方、ノンコーディング領域では全の置換がP遺伝子とG遺伝子のコード領域間(P-M)で見られ、5か所はP-M間の転写停止シグナル領域のポリA配列上であった。

狂犬病ウイルス西ヶ原株 P 蛋白質に存在する核外輸送シグナル(NES)は、Ni-CE 株 P 蛋白質には存在しない。Ni-CE 株 P 蛋白質

に NES を導入したところ、その STAT1 阻害能が復帰したことから、NES 活性により P 蛋白質-STAT1 複合体が細胞質に保持されることが示された。NES を導入した Ni-CE 変異株、Ni-CE(NES+)株を作出した。IFN 存在下の神経系培養細胞におけるウイルス増殖性を比較した結果、Ni-CE(NES+)株は Ni-CE 株よりも効率よく増殖した。また、Ni-CE 株が脳内接種によりマウスの全個体に非致死感染を起こしたのに対し、Ni-CE(NES+)株は 40%のマウスに致死感染を引き起こした。狂犬病ウイルス P 蛋白質上の NES は、本ウイルスの IFN 抵抗性及び病原性に関与していることが示唆された。

D. 考察

日本および他のアジア地域においては依然として多くのウイルス感染症が問題となっている。

アルボウイルス感染症としてデング熱・デング出血熱、日本脳炎(JE)、チクングニア熱等の患者が多発している。デング熱およびその重症型であるデング出血熱は最も重要な感染症の一つといえる。重症化機序の1つとして、抗体依存性感染増強が提唱されているが、デング流行地の住民における感染増強抗体の保有状況は明らかでない。ウイルス血症レベルに関与する中和活性と増強活性のバランスを測定する方法を開発し、より正確に生体内での抗体活性状況を把握することを可能にした。これまで補体の存在により増強抗体が中和抗体に転じる抗体サブクラスのあることがマウスモデル

では示されているが、ヒトにおいては補体が存在しても中和活性に転じない抗体が多くの個体に存在することが明らかにされた。今後、デング出血熱の病態形成における抗体の役割をさらに解析していく必要がある。日本脳炎ウイルス (JEV) のブタ細胞での高い増殖は JEV がブタ細胞においてウイルス検出系を長く逃れ、IFN β の発現を抑制出来ることが重要であることが示された。一方、個体レベルではブタは JEV 感染により高いウイルス血症を示すにもかかわらず、ほとんど病原性を示さず、脳炎を起こすこともない。今後、その理由を解明することで JEV の病原性発現機序を明らかにし、またヒトにおける JEV 感染制御に応用できるものと期待される。

ウイルス性出血熱においては輸入感染症対策が重要であり、げっ歯類媒介性人獣共通感染症の代表でもあるハンタウイルス感染症についてベトナム及び極東ロシアに御おいて調査と研究を行った。トッタパラヤンウイルス (TPMV) はすでにベトナムに定着している。3 年間調査した血清で持続的に陽性があったことから、土着のコロニー内で TPMV が維持されていると考えられる。今後、TPMV の多様性を解明するため、遺伝子配列を明らかにし、プロトタイプであるインド由来株との相違を明らかにする必要がある。極東ロシアのハバロフスクの近郊で捕獲されたハントウアカネズミとセスジネズミから、Amur virus と Hantaan virus を分離した。ウラジオストック、沿海地方とハバロフスク地方で HFRS 患者血清を採

取し、それぞれの血清について AMRV AP209 株、HTNV AA57 株および Seoul virus (SEOV) SR-11 株に対する中和抗体価を求めたところ、それぞれの地域で主要な原因ウイルスが異なっていることが判明した。ハンタウイルスはその宿主によって、ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、新世界ネズミ由来、およびトガリネズミ目 (食虫類) 由来ウイルスの 4 つのグループに分けられ、その多様性からそれぞれに対する検査法が必要である。また、次々と新規ウイルスが報告されつつあり、近い将来より多くのグループが認められるようになる可能性がある。さらに情報を収集し、診断法を迅速に準備していくこと、感染制御を目的として病原巣動物におけるウイルス維持機序を解明することが公衆衛生対策上必要である。

ウイルス胃腸炎の原因となる主要病原体として、ロタウイルス、ノロウイルスに対して研究を進めた。ロタウイルスワクチンを導入している、ブラジルでは、ロタウイルスワクチンの定期接種への導入から 2 年が経過している。平均の接種率は 77% と高く、また、この単価 G1P[8] ロタウイルスワクチンの有効性が高いこと、またこの単価ロタウイルスワクチンが血清型 (遺伝子型) の壁を超えて有効に働いていることが示された。しかし、単価ロタウイルスワクチンによる異型免疫の持続性については検討されていなかった。先進諸国で行われたワクチンの臨床試験の結果は、ワクチン接種後、少なくとも 2 年、あるいは 3 年間にわたり重症化を防止する免疫が高いレベルで持続

することが示されている。しかし、本研究において、ワクチン接種後の時間の経過とともに有効性が低下していく傾向が見られ、その傾向はロタウイルス下痢症の重症度が低い方が顕著であった。わが国では、3歳から5歳のロタウイルス下痢症患者も少なくないことからワクチンによる免疫持続の問題は今後さらに研究を進めていく必要がある。国内で発生した胃腸炎事例より検出されたノロウイルス (NoV) HK299 株は、ゲノム全長塩基配列解析の結果、ORF1/2 junction と ORF2/3 junction でゲノム組換えを起こし、既報の NoV genogroup 以外の第 6 番目の genotype の ORF2 を獲得した GII/GVI キメラウイルスであった。HK299 株はこれまでにヒト NoV で検出されたことのない新しい構造タンパク質領域を有する株であるため、ヒトの免疫学的感染防御を逃れ、おおきな流行を引き起こす可能性がある。今後の流行動向の観察が必要である。

狂犬病はヒトを含む全ての哺乳類が感受性を持つ人獣共通感染症であり、今なお多くの発展途上国において公衆衛生上重大な問題となっている。発症後の致死率は 100% で、発症後の有効な治療法は未だ確立されていない。有効な治療法の確立のためには動物モデルが必須であり、感染マウスモデルはこれまでも研究されてきた。しかし、これまで感染マウスモデルの多くは街上毒 (野外株) を動物の脳や培養細胞等で長期継代して得られた固定毒 (実験室馴化株) が用いられてきた。固定毒は街上毒とは異なり末梢感染が成立しにくい、発症後の経

過が早い等、本来の狂犬病の病態を反映しているとは言い難い側面がある。今回、1970 年代に北米でウッドチャックより分離された街上毒 1088 株をマウスに感染させ、狂犬病モデルとしての評価を行った。1088 株感染マウスは街上毒の病態を反映しており、狂犬病発症モデルマウスとして有用であることが示された。また、ブラジルで採取された 6 株の狂犬病ウイルスをマウスに繰り返し接種して馴化した。構造遺伝子上の塩基置換は、P 遺伝子上では見られず G 遺伝子上に 1 か所のみが確認された。一方、ノンコーディング領域では全ての塩基置換が P 遺伝子と G 遺伝子のコード領域間 (P-M) で見られ、うち 5 か所が P-M 間の転写停止シグナル領域のポリ A 配列上であった。弱毒化機序の解明は狂犬病発症後の治療法確立につながる。狂犬病ウイルスに感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期の特徴的な臨床症状を明らかにできるモデル実験系を確立することで、今後新たなワクチンや治療法開発を進展させることが期待される。

E. 結論

アルボウイルス研究においては、デング流行地におけるデングウイルス感染増強抗体保有状況が明らかにされた。日本脳炎ウイルスの研究においては、我が国において流行している日本脳炎ウイルスが依然として遺伝型 1 型であることが示された。日本脳炎ウイルスはブタ細胞でより大きなフォーカス形成を示すが、ブタ細胞においては日本脳炎ウイルス感染後インターフェロン

の産生が遅れることが要因であった。

ウイルス性出血熱研究においては、ベトナムにおいてトッタパラヤンウイルスが継続的に維持されていることを示した。また、ベトナム、ハノイの港においてラット間でソウルウイルスが維持されていることが示された。極東ロシアのハバロフスクの近郊で捕獲されたハントウアカネズミとセスジネズミから、アムールウイルスとハンタンウイルスが分離された。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスの組換え核蛋白 (NP) に対する単クローン抗体を作製した。作製された単クローン抗体は、同ウイルス感染症の診断に有用であった。

ウイルス性下痢症の研究においては、ブラジルにおける単価 G1P[8] ロタウイルスワクチンがワクチン株とは異型である G2P[4] に起因するロタウイルス下痢症を含め、ロタウイルス下痢症の発症予防に高い有効性を示した。しかし、ワクチン接種後の期間が長引くにつれ、その有効性が低下していた。バングラデシュのヤギロタウイルス G034 株の全遺伝子配列を決定した。G034 株はウシなど反芻動物のロタウイルスに近縁であり、また一部の遺伝子分節は G2, G6, G8, G12 ヒトロタウイルスとも遺伝学的に関連していた。ヒト大腸癌由来細胞 HT-29 において、ロタウイルス感染により、type III インターフェロン mRNA の発現が増強された。ノロウイルス研究においては、国内で発生した胃腸炎事例より検出されたノロウイルス HK299 株がキメラウイルスであることを明らかにした。

狂犬病研究においては、狂犬病ウイルス街上毒 1088 株をマウスに感染させ、狂犬病モデルとしての評価を行った。1088 株感染マウスは街上毒の病態を反映しており、狂犬病発症モデルマウスとして有用であった。狂犬病ウイルスの野生株とこれのマウスにおける継代株についてゲノム配列を比較して継代によってマウスへの馴化に伴って起こる塩基置換部位を明らかにした。狂犬病ウイルス西ヶ原株 P 蛋白質に存在する核外輸送シグナルは、本ウイルスの IFN 抵抗性及び病原性に関与していた。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine*. 28, 2664-2670, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo, Eiji Konishi.: Complement-dependent cytotoxicity assay for differentiating West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in horses. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 875-878, 2010

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Antibodies to bovine serum

albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections. *Jpn J Infect Dis.* 63, 296-298, 2010

Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 1560-1566, 2010

Jun-ichi Imoto, Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka, Misako Konishi, Kenji Murakami, Tomoyuki Shibahara, Masanori Kubo, Chang Kweng Lim, Masataka Hamano, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Haruhide Udagawa, Yoshihiro Mukuta, Eiji Konishi: Needle-free jet injection of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine.* 28, 7373-7380, 2010

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Combating Japanese encephalitis: Vero-cell derived inactivated vaccines and the situation in Japan. *Future Virol.* 5, 785-799, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus

from Japanese encephalitis virus infections in horses: Effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine. *J Virol Meth.* [Epub] 2010

Yoko Kitai, Hiroaki Shirafuji, Katsushi Kanehira, Tsugihiko Kamio, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Specific Antibody Responses to West Nile Virus Infections in Horses Preimmunized with Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine: Evaluation of Blocking ELISA and Complement-Dependent Cytotoxicity Assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* in press 2011

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* in press 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health.* in press 2011

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* Vol.10(2): 143-150, 2010

Nabeshima T and Morita K. Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. *Future Virology*. Vol.5:343-351. 2010

Kenta Okamoto, Yushirou Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Do Phuong Loan, Bui Minh Trang, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. *J.Virol.Meth*. Vol.167:31-36. 2010

Daisuke Kato, Shota Era, Ippei Watanabe, Masataka Arihara, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, Yasuo Suzuki, Kouichi Morita, Kazuya I.P.J. Hidari, Takashi Suzuki. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Research* Vol.88:236-243. 2010

Michael O Baclig, Leonora TS Gervacio, Lady-Anne C Suarez, Corazon C Buerano, Ronald R Matias, Atsushi Kumatori, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Filipinas F Natividad and Futoshi Hasebe, Flow Cytometric Analysis of Dengue Virus-infected Cells in Peripheral Blood. *Southeast Asian Trop Med Public Health*, Vol 41(6): 1352-1358, 2010

Guillermo Posadas Herrera, Shingo Inoue, Isao

Fuke, Yuko Muraki, Cynthia A. Mapua, Afjal Hossain Khan, Maria del Carmen Parquet, Sadao Manabe, Osamu Tanishita, Toyokazu Ishikawa, Filipinas F. Natividad, Yoshinobu Okuno, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate. *Vaccine*. Vol.28:7939-7946, 2010

Tegshduuren, E., Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Endo, R., Shimizu, K., Koma, T., Yasuda, S. P., Kariwa, H., Arikawa, J., and Ishihara, C. 2010. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33:e67-73.

Koma, T., Yoshimatsu, K., Pini, N., Safronetz, D., Taruishi, M., Levis, S., Endo, R., Shimizu, K., Yasuda, S. P., Ebihara, H., Feldmann, H., Enria, D., and Arikawa, J. 2010. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol* 48:1635-1642.

Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M. 2010. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 16:363-365.

- Gamage, D. C., Yasuda, P. S., Nishio, S., Kularatne, S. A., Weerakoon, K., Rajapakse, J., Nwafor-Okoli, C., Lee, R. B., Obayasi, Y., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Tamashiro, H. 2010. Serological evidence of Thailand virus-related hantavirus infection among leptospirosis suspected patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* in press.
- Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Kariwa H, Arikawa J, Ishihara C. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: e67-73. 2010.
- Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5:801-809, 2010
- Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 201: 363-369, 2010.
- Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, Kitchin N, Nakagomi O, Nakagomi T, Hart CA, Regan M. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 16:55-62, 2010
- Ahmed K, Batuwanthudawe R, Chandrasena TG, Mitui MT, Rajindrajith S, Galagoda G, Pun SB, Uchida R, Kunii O, Moji K, Abeysinghe N, Nishizono A, Nakagomi O. Rotavirus infections with multiple emerging genotypes in Sri Lanka. *Arch Virol* 155:71-75, 2010
- Sato T, Nakagomi T, Naghipour M, Nakagomi O. Modeling seasonal variation in rotavirus hospitalizations for use in evaluating the effect of rotavirus vaccine. *J Med Virol* 82(8):1468-1474, 2010
- Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Convalescent phase sera from children infected with G12 rotavirus cross neutralizes rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol.* 91(Pt 7):1794-1799, 2010
- Ahmed K, Ahmed S, Mitui MT, Rahman A, Kabir L, Hannan A, Nishizono A, Nakagomi O. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. *Virus Genes.* 40(3):347-356, 2010
- Matthijssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z,

- Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis* 16(4):625-30, 2010
- Adiku TK, Dove W, Grosjean P, Combe P, Nakagomi T, Nakagomi O, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Madagascar during 2004-2005. *J Infect Dis* 202 (Suppl 1): 175-179, 2010
- Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Ganesh B, Naik T. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. *Virus Genes*, 2010, 40:382-388.
- Nagashima S, Kobayashi N, Paul SK, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Hossain MA, Krishnan T. Identification of P[8]b subtype in OP354-like human rotavirus strains by a modified RT-PCR method. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63:208-211.
- Ghosh S, Alam MM, Ahmed MU, Talukdar RI, Paul SK, Kobayashi N. The complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J Gen Virol.*, 2010, 91:2367-2373.
- Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol.* 2010; 82(4):720-6.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010 ;76(8):2461-7
- Iizuka S , Oka T , Tabara K , Omura T , Katayama K , Takeda N , Noda M . Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1247-54.
- Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol.* 2010 Aug;54(8):483-6.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
- Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly

reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J Virol Methods*. 2010 Nov;169(2):269-73.

Takashi Matsumoto, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Kantou Nakajima, Kenzo Takada, Pakamat Khawplod, Akira Nishizono. Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. *Microbiol Immunol*. 2010 54 (11): 673-683

Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman, Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji, Akira Nishizono. Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. *Vaccine*. (in press) 2011

Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, Akira Nishizono. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch Virol*. (in press) 2011

Masatani, T, Ito, N, Shimizu, K, Ito, Y, Nakagawa, K, Sawaki, Y, Koyama, H, Sugiyama, M. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the

RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol* 2010; 84(8):4002-12.

Ito, N, Moseley, GW, Blondel, D, Shimizu, K, Rowe, CL, Ito, Y, Masatani, T, Nakagawa, K, Jans, DA, Sugiyama, M. Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol*. 2010; 84(13):6699-6710.

Masatani, T, Ito, N, Shimizu, K, Ito, Y, Nakagawa, K, Abe, M, Yamaoka, S, Sugiyama, M. Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity., *Virus Res*. 2010 (in press).

中込治, 中込とよ子: ロタウイルスワクチン: わが国への導入の展望と課題 臨床とウイルス 38(5): in press, 2010

中込とよ子, 中込治: 新時代のワクチン戦略について考える: ロタウイルスワクチン. 臨床検査 54 (11) : 1392-1399, 2010

塩田星児, Kamruddin Ahmed, 三舟求真, 西園晃. 日本製狂犬病ワクチン皮内接種法による曝露前免疫の有効性の検討. 感染症学雑誌, 84(1), 9-13, 2010

2. 学会発表

1) 英文発表

Eiji Konishi: Dengue DNA Vaccine Research under Indonesia-Japan Collaboration. International Seminar on Viral Diseases: Control and Management, 2010. 2010年9月

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. 2010年11月

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Dihn Tuan Duc, Hitomi Kinoshita, Kazuki Kitaura, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection 44th Joint Working Conference on Viral Diseases (Sapporo, Japan. June28-30, 2010)

Kouichi Morita: Rapid and comprehensive arboviruses detection by using nLC-ESI/MS/MS, 14th International Conference on Emerging Infections in the Pacific Rim. Penang, Malaysia October 4-6, 2010

Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Bao Ngoc, Le

Thi Quynh Mai, Nguyen Hoang Quan, Vu Thi Que Huong, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Dengue fever (DF)/Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) situation in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. Hanoi, Vietnam. November 11-12, 2010

Kenta Okamoto, Hitomi Kinoshita, Maria del Carmen Parquet, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Nguyen Thi Thu Thuy, Le Thi Quynh Mail, Futoshi Hasebe, Koichi Morita: Variable susceptibility of erythroid cells to DENV strains in an SDC2-dependent manner. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. Hanoi, Vietnam. November 11-12, 2010)

Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y : Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and biological activity of JEV protein NS4a、44th US-Japan Cooperative Medical Science Program、Sapporo (2010, 7)

Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and physiological role of JEV protein NS4a、1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul (2010, 7)

Arikawa,J. Hantavirus infection as a rodent-borne zoonoses How we learn from nature. VIII International conference on