

間再捕獲を行った。再捕獲は、放逐場所から100、200、400、800、1200m離れた場所(合計41ヶ所)に1kgのドライアイス誘引源とするトラップを設置して行った(図1)。トラップ当たりの捕獲個体数を計算し、各距離の範囲に到達した雌成虫数を推定して、これらの成虫が移動した平均距離を求めた。また、マーク個体の再捕獲個体数と捕獲場所までの距離の関係を対数回帰分析によって分析し、最大飛翔距離を推定した。

コロモジラミは、大阪市N区において、2009年5月から2010年1月までに区内O医療機関を受診した路上生活者(42歳以上)10名からコロモジラミが提供された。一方、フィリピン・マニラ市近郊のLaguna州Los Banos市内の貧困層が居住する地域において、合計9名(女子8名、男子1名)の未成年者(調査時7-18歳)の頭髪に寄生するアタマジラミをそれぞれから8-11頭採取した。国内においては、全国32自治体から得られたアタマジラミの合計579頭(579家庭から各1頭を選んだ)を検査に用いた。アタマジラミの採取に際しては、個別に専用のすき櫛を用い、シラミ寄生者間のコンタミネーションを極力防ぐことに留意した。得られたシラミ類からREDEExtract(シグマ社)を用いてゲノムDNAを抽出し、*Bartonella*属共通プライマーを用いて*gltA*遺伝子およびITS1領域をPCR法で増幅した(Sasaki *et al.* 2006)。得られたPCR産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、塹壕熱起因菌*B. quintana*であることを確認した。また、コロモジラミ提供者に対してはインフォームドコンセントを行い承諾を得て採血した後、血餅を用いて、*Bartonella*属特異的プライマーにてPCRを行った。

(倫理面への配慮)

直接的なヒトの検体は調査対象になって

いないが、外部寄生虫であるコロモジラミは入手している。病院からの検体は、匿名化した形で入手しており、倫理面で配慮している。なお、感染症の疫学調査等はない。

C. 研究結果

インド洋島嶼国、インド、東南アジアでのチクングニア熱の流行状況、輸入症例の推移等を調査し、2005年からどのような広がり方をしてきた、発症患者の確定および推定数をProMed情報、関係国の感染症情報等で収集した。流行の流れからすると、レユニオン島で確認されたウイルスの変異株が東南アジア地域でも確認されていることから、ネッタイシマカよりもヒトスジシマカが関わる広範な流行が起こっていることが示唆された。実際、我が国での輸入症例の患者から分離されたウイルス株においても、一部変異株が確認されている(未発表情報)。

また、チクングニアウイルスは、蚊体内での増殖速度が著しく早く、感染後2日目には唾液腺にウイルスが確認されている。その意味で、デング熱や日本脳炎ウイルスと相当ことなるウイルスであることが示された。チクングニアの媒介蚊は、我が国では青森県以外の東北以南の地域に広く分布するヒトスジシマカである。都市部の公園、墓地、戸建て住宅の庭などで朝方から夕方まで執拗に吸血するヤブカで、生息密度が高い場所では、8分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると20-50頭捕集される環境が存在する。その意味で、チクングニア熱患者の居住環境によっては、容易にウイルスを取り込み、近隣の住人に感染を起こすことが予想される。我が国にチクングニアウイルスが侵入し、患者が複数発生した場合、速やかに成虫防除対策を実

施し、患者の行動調査を的確に行って、防除対象地域を設定する必要がある。媒介蚊の飛翔（行動）範囲が狭い事から、発生時期が夏季の時期である点から献血制限は限られた地域に限局できると考えられる。

アカイエカに関して、4日間のトラップ採集によって、56雌が再捕獲された。成虫の平均移動距離を求めた結果、平均移動距離は1日目470m、2日目287m、3日目326m、4日目517mと推定された。放逐場所からの距離の対数値と平均捕獲個体数+1の対数値を用いて、回帰分析を行ったところ有意な回帰直線が得られた ($R^2=0.861$ 、 $p=0.023$)。回帰直線に基づいて最大飛翔距離を推定したところ、1,217mであった（表1、図2）。

コロモジラミ媒介性感染症である壱塚熱は、1990年代に、先進諸国の路上生活者から採取したコロモジラミから検出され、我が国においても1999年から主に豊島区の路上生活者対策で入手したコロモジラミから壱塚熱の病原体である *Bartonella quintana* の遺伝子が検出された。1999年から2004年までの6年間に採取されたコロモジラミ60コロニーの内6コロニー(10%)から壱塚熱病原体の遺伝子が検出された。コロモジラミに実験的に壱塚熱病原体を感染させ、その後排泄物中の菌数を調べたところ、1週間後には1匹当たり100万以上の菌が排泄されることが明らかとなり、1匹の感染コロモジラミから糞を介して容易に感染が起こることが示唆された。この *B. quintana* は人の赤血球内で増殖することが知られており、輸血によって感染する可能性がある。我が国における壱塚熱の罹患率を全国規模で調査する必要性があり、血清抗体による診断および赤血球や血餅からの *Bartonella* 遺伝子の検出法の確立が急務

と考えられる。大阪市N区の医療機関を受診した路上生活者(42歳以上)10名から採取したコロモジラミのうち、6名から採取されたコロモジラミから *B. quintana* の遺伝子が検出された(表2)。本地域におけるコロモジラミの *B. quintana* 保有率は60%であり、東京都T区で得られた保有率と比べ非常に高い値であった。また、42歳男性の血餅から *B. quintana* 遺伝子が検出されたが、菌の分離には至っていない。

一方、Los Banos 市では、貧困層の居住地に生活する未成年者50名のうち1名から採取されたアタマジラミに *Bartonella* 属共通遺伝子が認められ(1/50名、遺伝子保有率は2.0%)、ITS1領域の塩基配列を解析した結果 *B. quintana* であることが確認された。同様に調査した日本国内32自治体から得られた579頭のアタマジラミからは *B. quintana* 遺伝子は検出されなかった。(表2)

D. 考察

アカイエカの最大飛翔距離は1,217mと推定された。平均移動距離が287m~517mと推定されているので、放逐されたアカイエカは平均して数百メートルの範囲を毎晩探索しながら、結果として1.2kmほどの範囲に拡散していったと考えられる。アカイエカと近縁のネッタイエカの飛翔距離に関する報告と比較すると、ネッタイエカの最大飛翔距離は200から1,270mであり、両種の飛翔能力にはさほど大きな違いがないと考えられる。今回得られたのは吸血動物を探索飛翔している雌個体の移動範囲であり、吸血に成功した個体や産卵のために幼虫の発生水域を探索している個体の飛翔パターンはこれとはまったく異なると考えられる。これらの生理的な状態が異なるアカイエカの移動範囲に関しても、今後の調査研究

が必要である。

アタマジラミが塹壕熱やその他の病原体の媒介・伝搬に関与した報告はこれまでにない。しかし、2002年、ネパールの学童に寄生していたアタマジラミの9.5%(2/21名)から*B. quintana*遺伝子が検出され、アタマジラミが塹壕熱の伝播に関与する可能性が初めて示唆された。その後、米国サンフランシスコ市では、路上生活者由来のアタマジラミの25%(3/12名)に*B. quintana*遺伝子が認められ、本調査において、フィリピン・Los Banos市の女兒1名に寄生していたアタマジラミが*B. quintana*遺伝子を保有(保有率2.0%)していたことは不思議ではない。*B. quintana*はシラミ類によって伝搬するが、輸血による直接的感染の可能性も示唆されている。従って、国内における塹壕熱対策を考える際には、シラミ類の駆除と患者の治療のみならず、保菌者からの輸血による感染防止も考えるべきであろう。また、国内においては、コロモジラミを保有する路上生活者が保健所や医療機関、福祉施設等を利用する機会も多いため、その際に輸血歴等に関する情報を問診によって得ることも感染拡大の防止に役立つと思われる。

E. 結論

ヒトスジシマカの飛翔範囲は、100～150mほどと狭く、ウイルスを持った蚊が広範囲に分散することはない。患者が確認された場合、早急に周辺での成虫防除を行うことが必要で、感染拡大を狭い範囲で封じ込めることが重要である。その意味で、輸血制限範囲も患者の行動範囲を考慮しつつ狭い範囲で設定できると考えられる。

アカイエカの最大飛翔距離が1,217mであることがわかり、本種の移動範囲に関して科学的な根拠が得られた。

塹壕熱に関しては、東京都の路上生活者に寄生しているコロモジラミから

*Bartonella quintana*の遺伝子を検出した(10%, 6/60コロニー)。一方、大阪市N区の医療機関を受診した路上生活者(42歳以上)10名から採取したコロモジラミのうち、6名から採取されたコロモジラミから*B. quintana*の遺伝子が検出された(10%, 6/10コロニー)。*B. quintana*は人の赤血球内で増殖することが知られている。路上生活者等の罹患率を遺伝子の検出または特異的な抗体(IgM, IgG)の保有によって、全国規模で路上生活者等を調査する必要がある、それらの疫学データを元に、輸血によって感染する可能性のある疾患として注視する必要がある。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuda Y, O. Komagata, S. Kasai, T. Hayashi, N. Nihei, K. Saito, M. Mizutani, M. Kunida, M. Yoshida and M. Kobayashi. A mark-release-recapture study on dispersal and flight distance of *Culex pipiens pallens* in an urban area of Japan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 339-343, 2008.

2) 小林睦生, 葛西真治, 佐々木年則, 駒形修, 富田隆史, 関なおみ. シラミと感染症. *感染症.* 38(6): 13-17, 2008.

3) 関なおみ, 小林睦生. インターネットリサーチを利用したアタマジラミ症の実態調査. *Medical entomology and zoology* 60(3) 225-231, 2009

4) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus

from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan..

Virology. 15:391(1):119-29, 2009

5) 富田隆史, 葛西真治, 駒形修, 小林睦生, 石井則久, 上里博, 平良清人, 平良勝也, 岡野祥. わが国におけるアタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性の発達状況. 病原微生物検出情報. 31(12): 352-354 (2010)

6) 佐々木年則, 星野啓太, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 小林睦生, 沢辺京子, 川端寛樹, 佐々木次雄, 久保田眞由美, 荒川宜親, 関なおみ, 矢口昇, 平山幸雄, 吉田英樹. わが国の都市部における路上生活者より採取されたコロモジラミからの *Bartonella quintana* 検出例. 病原微生物検出情報. 31(12): 355-357 (2010)

7) 沢辺京子, 葛西真治, 富田隆史, 佐々木年則, 小林睦生, Arlene G. Bertuso, Poudel Shree Kanta S. 日本と諸外国のアタマジラミにおける *Bartonella quintana* 遺伝子保有状況. 病原微生物検出情報. 31(12): 354-355 (2010)

8) 葛西真治, 関なおみ, 佐々木年則, 駒形修, 富田隆史, 小林睦生. 病原微生物検出情報. 31(12): 357-358 (2010)

2. 学会発表

1) Tsuda Yoshio. 2008. A mark-release-recapture study on flight distance of *Culex pipiens pallens* at an urban area in Japan. 第42回日米寄生虫合同会議、カリフォルニア. 2008年1月16-17日.

2) 津田良夫、駒形修、葛西真治、林利彦、二瓶直子、斉藤一三、水谷正時、国田正忠、吉田政弘、小林睦生. 都市環境におけるアカイエカの飛翔距離. 第60回日本衛生動物学会大会(下野市)、2008年4月17-19日.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 アカイエカの飛翔範囲を標識・再捕獲法で調査した西宮市の四宮浜

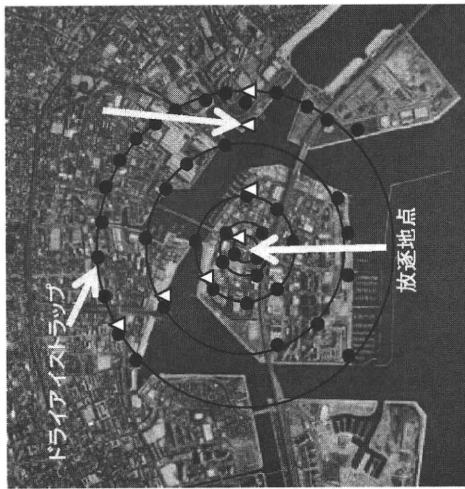


表1 放逐および再捕獲されたアカイエカ

放逐雌総数	10,183
再捕獲雌総数	121
再捕獲数 (トラップ)	56
再捕獲数 (人回採集)	65
再捕獲率(%)	1.18
野外個体群の推定個体数	100,170 ± 8,509

図3 首都圏におけるCDCトラップによるヒトスジシマカの捕集

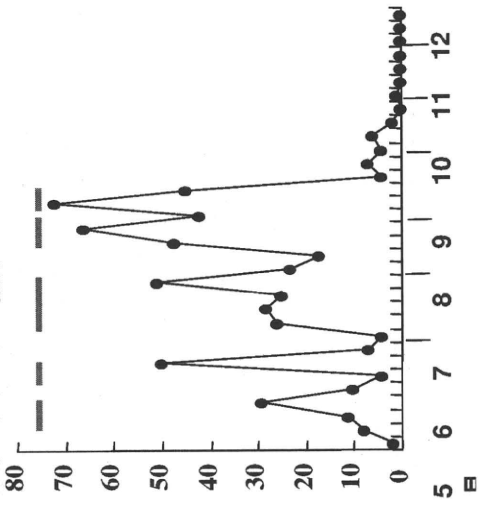


図2 アカイエカの推定飛翔距離

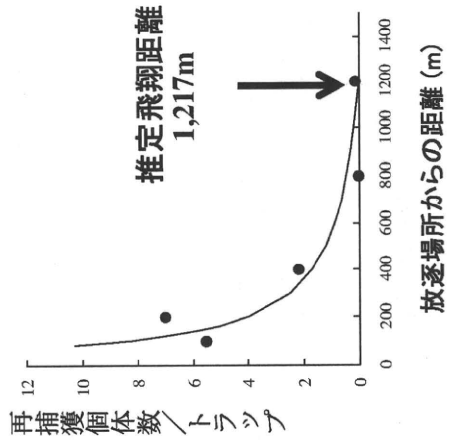


表2 コロモジラミとアタマジラミからの塹壕熱病原体の検出

調査地	年齢層(属性)	<i>B. quintana</i> 陽性率(陽性シラミ保有者数/シラミ保有者総数)		調査年
		コロモジラミ	アタマジラミ	
フランス	成人(路上生活)	13.8% (3/560)	-	1998-2001
ロシア	成人(路上生活)	12.3% (33/268)	-	1998
オランダ	成人(路上生活)	36.0% (9/25)	-	2001
ブルンジ	刑務所・難民キャンプ居住	43.9% (152/346)	-	1997-2001
フランス,ロシア,ポルトガル,ブルンジ 中国,タイ,アルジェリア,オーストラリア (8カ国の集計)	成人(路上生活)	-	0% (0/143)	1998-2001
ネパール	学童(スラム街居住・路上生活)	20.0% (4/20)	9.5% (2/21)	2002
米国	成人(路上生活)	33.3% (11/33)	25.0% (3/12)	2007-2008
日本	成人(路上生活)	9.7% (6/62)	-	1999-2005
	成人(路上生活・簡易宿泊施設居住)	60.0% (6/10)	-	2009-2010
フィリピン	幼児～学童	-	0% (0/579)	2006-2010
	未成年(貧困層居住)	-	2.0% (1/50)	2009-2010

(* NIID調査による)

太字(*)のデータは国立感染症研究所昆虫医学部の調査結果

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
H20-22 年度総合分担研究報告書

「新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究」

分担研究者 田島茂 (国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)
協力研究者 加藤文博 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第二室・研究生)

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムプラスミドおよびミニゲノム RNA の複製を評価するために必要なデングウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築を試みた。3年間で予定されていた両クローンの構築に成功した。デングウイルスレポーターレプリコンを使用してミニゲノム RNA の複製能の評価を試みたが、レプリコンが複製せず評価が出来なかった。一方、レポーターミニゲノムのマイナス鎖からルシフェラーゼ活性を検出することに成功したことから、ミニゲノムが感染性ウイルスのインジケーターとなりうることが示された。デングウイルスレポーターレプリコンが複製しない原因を探る一環として、日本脳炎ウイルスでも同様のレポーターレプリコンを作製した。日本脳炎ウイルスレプリコン RNA を細胞に導入したところ複製が確認された。今後日本脳炎ウイルスレプリコンを改変しより複製効率の良いレプリコンの作出を試みる予定である。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウェストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。患者血清中のフラビウイルスの検出法としては、1) ウイルス感受性細胞への接種、2) ELISA 等によるウイルス抗原の検出、3) PCR 法によるウイルス遺伝子の増幅などが挙げられるが、検出感度および迅速性から PCR 法 (NAT 法) が最も一般的である。しかし、擬陽性や操作時のコンタミネーションの危険性なども指摘されている。さらには核酸検出法ではウイル

スの感染性 (能) を判断することはできない。本研究では、感染力を持つフラビウイルスを簡便、迅速かつ高感度に検出するための基盤技術の開発を目的とし、1) 感染性ウイルスのインジケーターとなるデングウイルスレポーターミニゲノムプラスミド (分子クローン) の構築、2) ミニゲノムの複製を解析するためのデングウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築、3) 上記 1)、2) を使用したレポーターミニゲノムの評価を行った。さらに効率の良いレポーターレプリコン構築のために、4) 日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンプラスミドの

構築を行ってきた (図 1)。

B. 研究方法

我々が以前に構築したデング 1 型ウイルスの感染性分子クローン (rDENV-1(02-20))より、5'非翻訳領域、C 領域の N 端側の一部、および 3'非翻訳領域以外の部位をすべて除去し、代わりに IRES2-ホタルルシフェラーゼ (FLuc) 遺伝子-ポリ A シグナル配列をウイルスの翻訳方向とは逆向きに挿入したレポーターミニゲノムプラスミドを作製した (図 2)。また同じ分子クローンより、C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末側 28 アミノ酸までをウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) 遺伝子および細胞内プロテアーゼによる切断配列 (FMDV2A) に置換した (rD1Rep-RL3/pMW119)、および RLuc 遺伝子と IRES2 配列に置換した (rD1Rep-RL4/pMW119) レポーターレプリコンプラスミドを作製した (図 5)。ミニゲノムプラスミドを鋳型として T3 および T7 プロモーターを利用した *in vitro* 転写法によりプラス鎖およびマイナス鎖ミニゲノム RNA を合成した。合成した RNA は lipofectamine 2000 を用いて Vero 細胞にトランスフェクトした。7 時間および 24 時間で細胞抽出液を調製し FLuc 活性を測定した。また *in vitro* 転写法で合成したマイナス鎖ミニゲノム RNA およびデング 1 型ウイルスレプリコン RNA (RL3 および RL4) を Vero 細胞にトランスフェクトし、8 時間後に細胞抽出液を得、FLuc 活性を測定した。

日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築はデングウイルスレプリコンと

同様に行なった。以前に我々が構築した日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 の C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末側 28 アミノ酸までを RLuc 遺伝子-IRES 配列に置換することにより作製した (rJEVRepRL4/pMW119)。日本脳炎ウイルスレプリコンプラスミドよりレプリコン RNA を *in vitro* で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入した。経時的に細胞を回収し抽出液を得、ルシフェラーゼ解析に供した。得られたレポーター活性が確かにウイルス複製に付随することを確認するため、フラビウイルスの複製を阻害することが知られているリバビリンを添加し、レポーター活性が低下するかを調べた。レプリコンを導入した Vero 細胞にリバビリンの量を変えて添加し、12 および 66 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。リバビリンの細胞毒性については MTT 法により評価した。さらに日本脳炎ウイルスの増殖がリバビリンにより抑制されることを確認するため、ウイルス増殖能試験を行なった。Vero 細胞にウイルスを接種後、リバビリンを添加し 24 時間後に培養上清を回収し、これに含まれる感染性ウイルス数 (力価) をプラーク法により測定した。

C. 研究結果

デング 1 型ウイルスレポーターミニゲノムおよびレポーターレプリコンプラスミドの構築

感染性ウイルスのインジケーターとなるレポーターミニゲノム (5CsLlas3s) をコードするプラスミドを研究方法で示した

方法で作製した (図 2)。本プラスミドクローンより、プラス鎖およびマイナス鎖ミニゲノムを合成し Vero 細胞へ導入したところ、マイナス鎖において 7 時間後で高いルシフェラーゼ (FLuc) 活性が検出された (図 3)。一方プラス鎖では活性は検出されなかった。

レポーターミニゲノムの複製能を評価するための Dengue 1 型ウイルスレプリコンプラスミドを 2 種類 (rD1Rep-RL3 および-RL4) 作製した (図 5)。

Dengue 1 型ウイルスレポーターレプリコン共導入による Dengue 1 型ウイルスレポーターミニゲノム複製能の解析

In vitro で合成したマイナス鎖ミニゲノム RNA とレポーターレプリコン RNA を細胞に共導入し、FLuc 活性を測定した (図 4、6)。しかしレプリコン RNA 量依存的な活性の上昇は観察されなかった。

Dengue 1 型レポーターレプリコン複製能の解析

レプリコン RNA を細胞に導入し、RLuc 活性を測定した (図 7)。導入後 12 時間後に、導入した RNA に由来すると考えられる RLuc 活性が検出された。活性は RL3 よりも RL4 の方が数倍強かった。しかしその後活性は急激に低下し、60 時間後にはほとんど検出されなくなった。その後 96 時間まで観察したが、活性は上昇しなかった。

日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築と複製能の解析

日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 の C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末側 28 アミノ酸までを RLuc 遺伝子-IRES 配列に

置換することにより、日本脳炎ウイルスレポーターレプリコン rJEVRepRL4/pMW119 を作製した。本レプリコンプラスミドよりレプリコン RNA を in vitro で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入し、経時的に細胞を回収し抽出液を得、RLuc 活性を調べた (図 7)。Vero 細胞において、レプリコン複製に伴う RLuc 活性の顕著な増加 (ピーク) が観察された。一方 BHK21 細胞では明らかなピークは観察されなかった。これより以降の実験では Vero 細胞を使用した。複製によると思われるピークが確かにウイルス複製に付随していることを確認するため、フラビウイルスの複製を阻害する活性を有する薬剤リバビリンにより、レポーター活性が低下するかを調べた (図 8)。その結果リバビリンの用量依存的に RLuc 活性の低下が確認できた。この活性低下がリバビリンの細胞毒性を調べるため、リバビリン添加細胞について MTT アッセイを行なった。本アッセイにより細胞毒性は観察されず、リバビリン添加によるレポーター活性の低下は細胞毒性によるものではないことが確認された。レポーター活性の低下が観察されたリバビリン濃度で日本脳炎ウイルスの増殖が低下するかを調べたところ、確かにウイルス増殖の低下が確認された (図 9)。

D. 考察

これまでの 3 年間で、Dengue 1 型ウイルスミニゲノムプラスミドおよび Dengue ウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築に成功した。しかし、これらから合成したミニゲノム RNA およびレポ

ーターレプリコン RNA の複製は確認できなかった。複製に関わる蛋白質が供給できないとミニゲノムの複製は確認できない。よってミニゲノムの機能解析には、その供給元であるレポーターレプリコンがきちんと機能することが必須である。デングウイルスレポーターレプリコンが効率的に複製しない理由は不明である。この原因を探るために、最終年度は同じフラビウイルスに属する日本脳炎ウイルスのレポーターレプリコンクローンを構築し解析を進めた。これまでの経験上、日本脳炎ウイルス分子クローンの方が取り扱いが容易であり、こちらで構築に関する様々な検討を行ないその結果をデングウイルスレプリコンの構築に役立てることを意図してのことである。デングウイルスレプリコンと同様に構築したにもかかわらず、日本脳炎ウイルスレプリコンでは複製産物に由来すると思われるレポーター活性のピークが検出された。またリバビリンを使用した実験結果も、レポーター活性が複製に付随することを示唆した。デングウイルスと日本脳炎ウイルスとで見られた差異が何に起因するかは今のところ不明である。今後は日本脳炎ウイルスレプリコンを用いてさらに高い活性を示すクローンの構築を試みる予定である。

E. 結論

デング 1 型ウイルスレポーターミニゲノムおよびレポーターレプリコンプラスミド、および日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンクローンを構築した。デングウイルスレポーターレプリコンの自立的

複製が認められなかったため、ミニゲノム RNA の複製能を確認するには至らなかった。日本脳炎ウイルスレプリコンの複製は確認されたが、今後更なる改良が必要と考えられる。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表 (英文)

- 1) Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., and Kurane, I. Dengue virus type I isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal. *Journal of Travel Medicine*, 15: 46-49, 2008.
- 2) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.
- 3) Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.
- 4) 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.

- 5) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., dos Santos, F., de Jesus, M.D., Lina B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Drager, R.D., Andjaparidze, A., and Kurane, I. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 181-184, 2010.
- 6) Moi, M.L., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Lim, C.K., Sakamoto, M., Iwagoe, H., Kobayashi, K., and Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1770-1772, 2010.
- 7) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by the additional mutations in the NS4B. *Archives of Virology* 156: 63-69, 2011.

論文発表 (和文)

- 1) 田島茂、高崎智彦。日本脳炎。診断と診療、97 (10) 2097-2100, 2009.

学会発表

- 1) 田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム 3'非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)
- 2) 貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝

徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の1アミノ酸変異は IFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)

- 3) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎: 3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成21年6月)
- 4) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎: 3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 5) 田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎: ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 6) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎: デング1型ウイルス非構造蛋白質 NS4A のN末端側領域の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 7) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松勉、林昌宏、倉根一郎: イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 8) 加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎: 3' NTR 内に変異を有する日本脳

- 炎ウイルス変異体の *in vitro* における増殖性および病原性解析 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010 年 5 月
- 9) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 1 アミノ酸置換 (S123N) がウイルス増殖に及ぼす影響 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010 年 5 月
- 10) Tajima, S., Yamaguchi, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. Effects of single amino acid substitutions at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein on its growth rate *in vitro* and pathogenicity in mice. 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology. Seoul, South Korea. July 15-17, 2010.
- 11) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：*in vitro* におけるデング 1 型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖性および感染細胞側応答の比較 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月
- 12) 加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポーターレプリコンの構築 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月
- 13) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状における日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 1 アミノ酸置換の影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月
- 14) 小滝徹、林昌宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス国内分離株の遺伝子解析 (2005~2009) 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

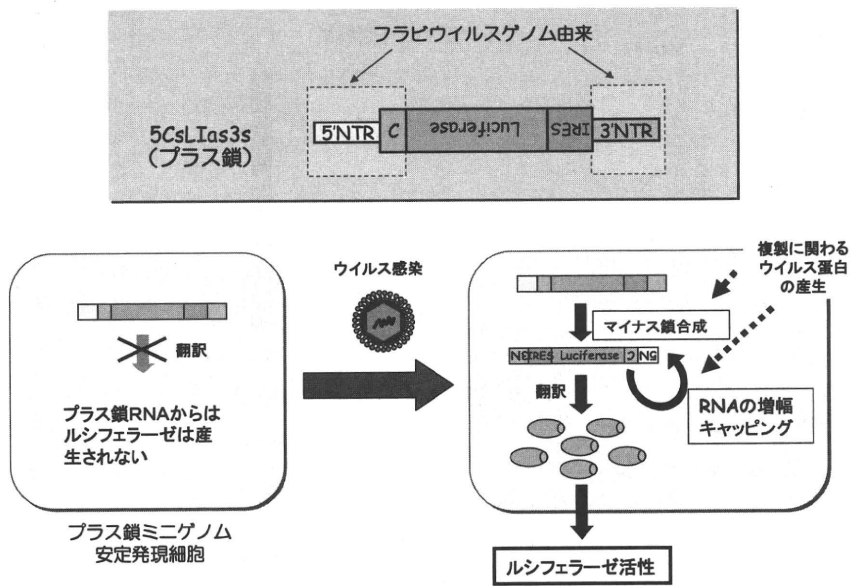


図1 フラビウイルスレポーターミニゲノムの構造

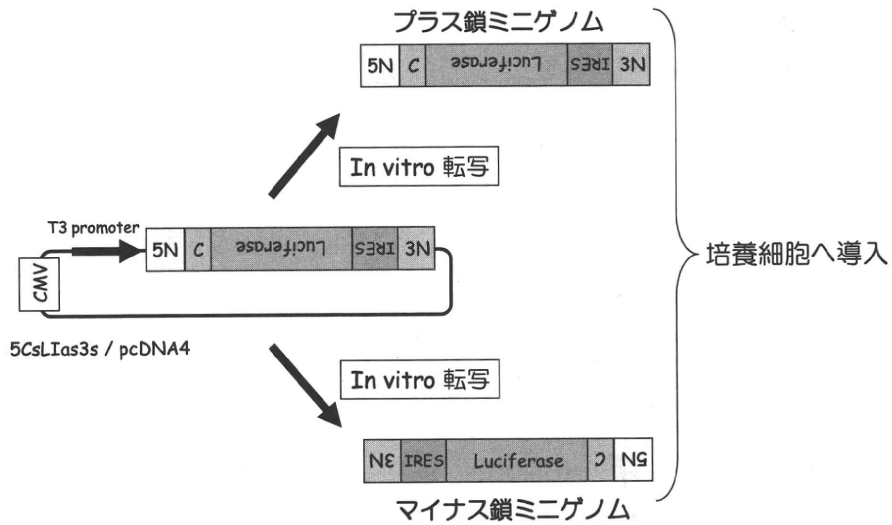


図2 プラス鎖およびマイナス鎖レポーターミニゲノムの合成

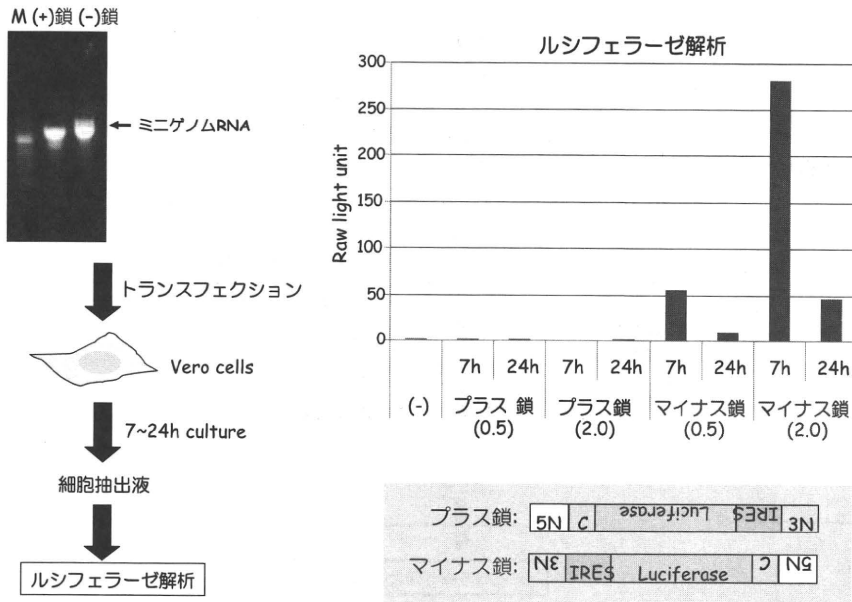


図3 マイナス鎖ミニゲノム導入細胞に特異的なルシフェラーゼ活性の確認

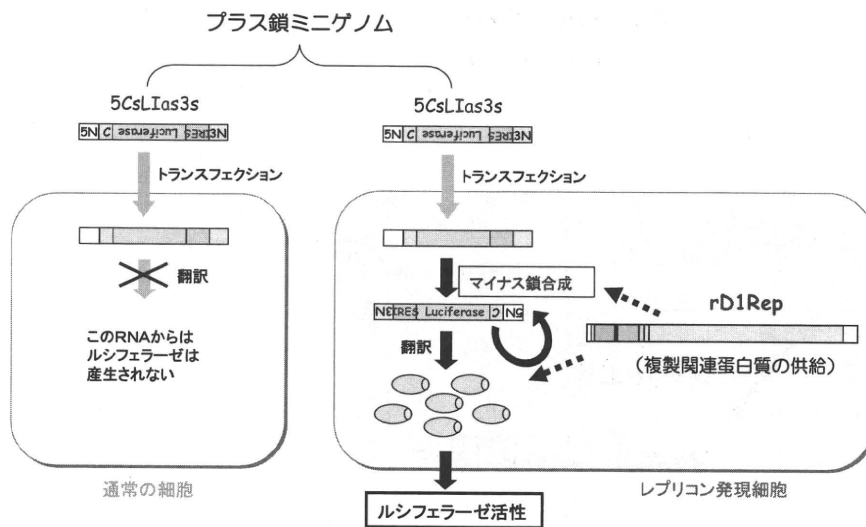


図4 レプリコンを用いたレポーターミニゲノムの評価

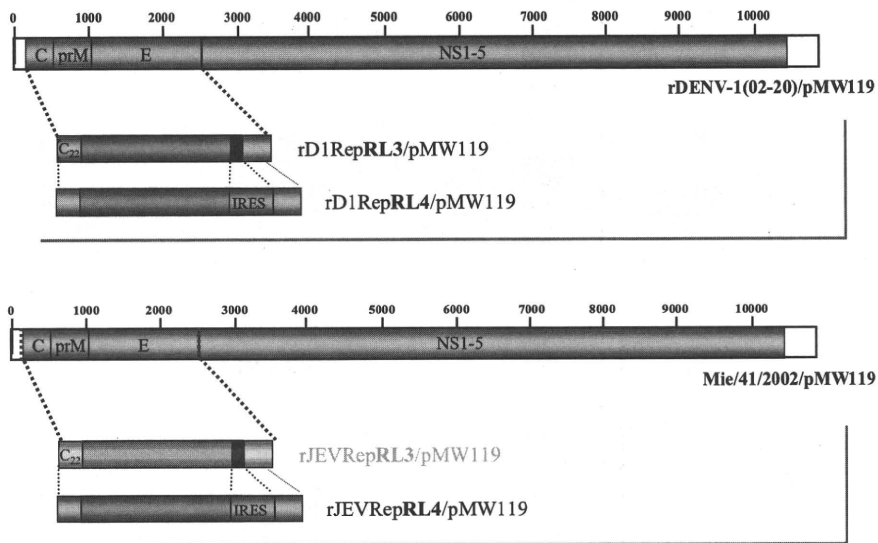


図5 デング1型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築

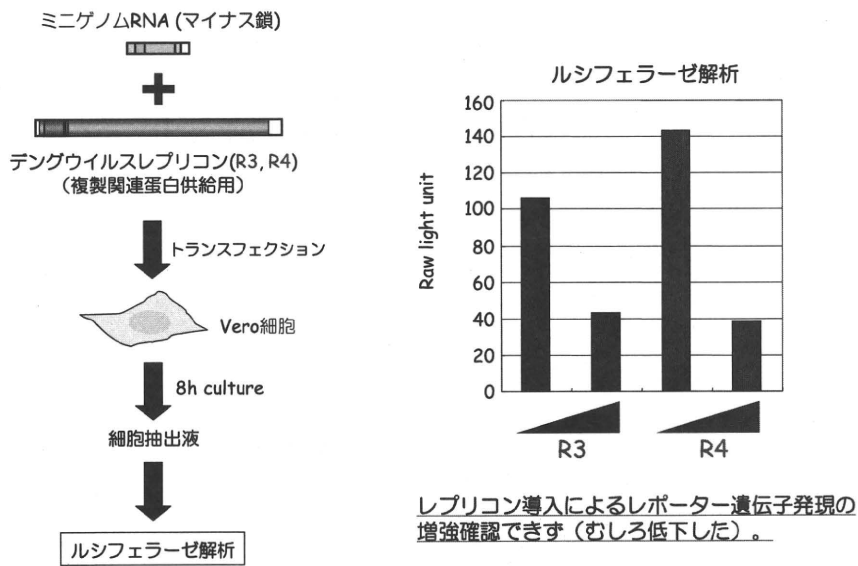


図6 マイナス鎖ミニゲノムとレプリコンを共導入した場合のルシフェラーゼ活性の変動

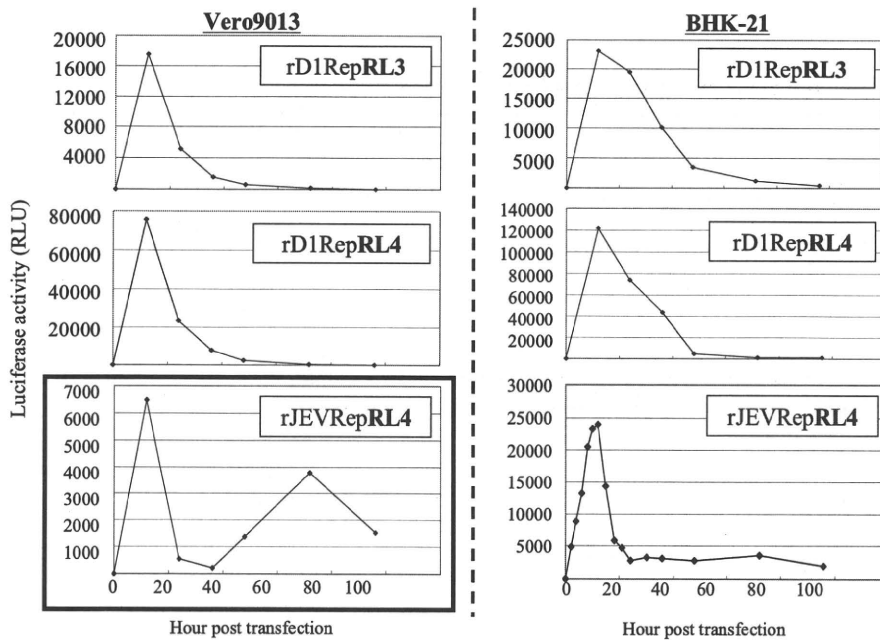


図7 構築したDENV-1およびJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性変化

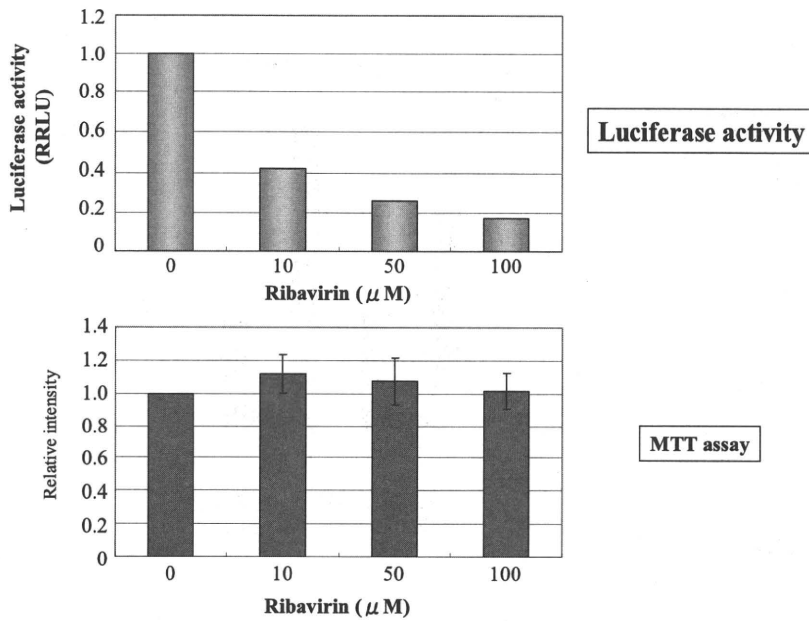


図8 RBV含有培地でのJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性

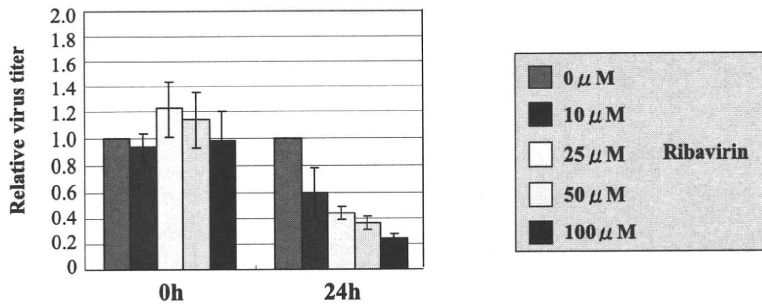
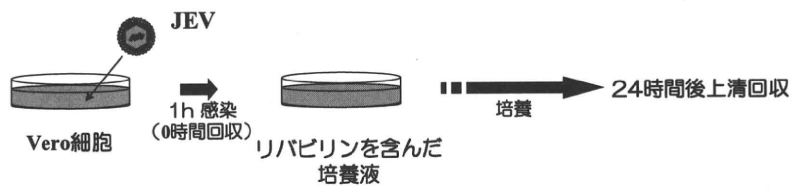


図9 JEVの増殖に対するリバビリンの効果

