

村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上 勉：石川県内でのドライアイストラップによるコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離、第 46 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢 (2011. 5)

村上 学、竹上 勉：石川県内豚舎周辺で採取したコガタアカイエカからの JEV 分離 (2009~2011)、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京 (2011, 12)

村木優子、杉浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川豊教、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サルにおける免疫原性・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢 2011 年 5 月 20-21 日

中込 治、Doan YH、中込とよ子：地球規模で見たロタウイルス G2 株の 34 年間にわたる分子進化学的変遷：第 65 回 日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成 23 年 8 月 18-19 日

中込とよ子、長内理大、Doan YH、中込 治、中根明夫：ロタウイルスのマウス脳内接種による増殖：第 65 回日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成 23 年 8 月 18-19 日

奴久妻聡一、竹上 勉：HIV-1 Tat は JC ウイルスの増殖を促進する、第 15 回 日本神経ウイルス研究会、金沢 (2011, 5)

島崎猛夫、石垣靖人、高田尊信、中村有

香、川上和之、竹上 勉、友杉直久、源利成、元雄良治：膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase (GSK) 3 β ：化学療法戦略の新展開、第 70 回 日本癌学会学術総会、名古屋、(2011, 10)

日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太朗、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛：フラビウイルスにおける宿主 DNA 修復機構を用いた新規リバーシジェネティクス系の開発：第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2011, 11)

尾崎由佳、萩谷友洋、真田崇弘、瀬戸隆弘、Taylor Kyle、吉川佳佑、Ivanov Leonid、好井健太朗、坪田敏男、池中良徳、石塚真由美、吉松組子、有川二郎、苺和宏明：日本のげっ歯類のハンタウイルス感染状況に関する血清疫学調査とエゾヤチネズミが保有する Hokkaido ウイルスの遺伝的多様性：第 152 回日本獣医学会、大阪 (2011, 9)

柳原なつみ、好井健太朗、石塚万里子、苺和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルスの E 蛋白糖鎖は哺乳動物細胞におけるウイルス粒子分泌に影響する：第 152 回日本獣医学会、大阪 (2011, 9)

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

II. 分担研究報告

分担研究報告書

フラビウイルス感染症の診断、疫学及び予防に関する研究

FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗体依存性感染増強及び中和試験法に関する研究

研究分担者 倉根一郎 国立感染症研究所副所長

研究協力者 高崎智彦 国立感染症研究所 ウイルス第一部室長

研究協力者 モイメンリン 国立感染症研究所 ウイルス第一部研究員

研究要旨

本研究ではこれまでに確立したデングウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強(ADE)アッセイ法、中和試験法)が渡航者および流行地の住民に使用可能であることを、デングウイルス再感染や初感染患者血清を用いて検討した。デングウイルス再感染患者では、ウイルスに対する感染増強活性が FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞にて検出された。デング熱流行地住民 80 人中、デング熱患者と確定された 25 人中の検体のうち、18 検体はデングウイルスに対する中和抗体、IgG 抗体を有することが確認された。このうち再感染患者では感染ウイルスに対する中和活性が FcγRIIA 非発現 BHK-21 細胞にて検出されたが、FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞にては検出されなかった。FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた、ADE アッセイ法や中和法は、ワクチン開発のための基盤となる防御メカニズムの解明とともに、致死性の高いデング出血熱の発症機序の一要因とされている感染増強メカニズムを *in vitro* において把握できる有用な方法であることが示された。

A. 研究目的

アルボウイルス感染症、特にデング熱、チクングンヤ熱は熱帯・亜熱帯地域のアジア、中南米、中東、アフリカ大陸および南太平洋諸島に多数発しており、日本への侵入も危惧されている。デング熱・出血熱は患者数が他のアルボウイルス感染症より著しく多く、年間約 1 億人がデング熱を発症し、25 万人が致死性の高いデング出血熱を発症と推定されて

いる。デングワクチンが実用化されていない要因の一つは、ワクチンにより誘導された抗体が、感染を増強させ症状の重症化につながる可能性があることである。デング熱および致死性の高いデング出血熱の病態ならびに感染防御のメカニズム解明は、ワクチン開発のための基盤的な研究となる。本研究では、FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた血清学的

検査法 (ADE アッセイや中和法) が日本の渡航者および流行地域の患者血清に使用可能であるかを検討した。

B. 研究方法

ウイルスと細胞培養: デングウイルス中和試験および ADE 試験においては DENV-1(NIID01-44 株), DENV-2(TLC30 株), DENV-3 (CH53649 株), DENV-4(TVP360 株)を用いた。ウイルス中和試験および ADE 試験にはヒト Fcγ 受容体 (FcγRIIA, CD32a) 発現 BHK-21 細胞および BHK-21 細胞を用いた。患者血中のウイルス分離は、BHK-21 細胞を用いて行った。

中和価試験および感染増強アッセイ: デングウイルスの中和試験は FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞および BHK-21 を用いた 50%ブランク減少法ならびに感染増強(ADE)アッセイにて検討した。渡航者およびデング熱流行地の住民から得られた検体を非動化し、10 倍希釈後 2 倍階段希釈(1:10-1:2560)を行った。非希釈血清および希釈した血清とウイルスを混合後、37°C、1 時間反応を行った。各ウイルス-反応液を FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞および FcγRIIA 非発現 BHK-21 に接種し、37°C、1 時間吸着後、1.2%メチルセルロースを加え、37°C で 5 日間培養した。ホルマリンにて固定 1 時間後、メチレンブルーにて細胞を 1 時間染色し、ウイルス中和抗体価およびウイルス力価を算出した。デングウイルス遺伝子は RT-PCR 法にて検出した。

C. 研究結果

海外渡航者における再感染デング熱患者から選択した、デングウイルス 1 型(DENV-1)感

染患者血清 2 検体、デングウイルス 2 型(DENV-2)感染患者血清 1 検体、デングウイルス 3 型(DENV-3)感染患者血清 2 検体およびデングウイルス 4 型(DENV-4)感染患者血清 1 検体の非希釈における ADE 活性を測定した。DENV-1、DENV-2、DENV-3 感染患者血清が、感染ウイルス型に対する感染増強活性を示した。また、患者から分離されたウイルス株に対しても感染増強活性が認められた。

次に、デング熱流行地の住民から採取した 80 検体を検討した。25 検体においてはデングウイルス遺伝子が検出され急性期のデングウイルス感染が示唆された。うち 18 検体では同時にデングウイルス IgG 抗体および中和抗体も検出され再感染のデングウイルス感染が示唆された。これら流行地の住民は、数回にわたりデングウイルスに感染された可能性が高いことから、デングウイルスに対する感染増強抗体の存在も検討した。FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた ADE アッセイ法により 75%は中和活性とともに感染増強抗体を有することが示された。特に、再感染の患者では、感染を起こしたウイルス型に対する中和抗体が FcγRIIA 非発現 BHK-21 細胞にて検出されたが、FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞にては検出されなかった。

D. 考察

FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いて、中和活性および感染増強活性を同時に測定する抗体アッセイ法を確立した。この検査法を用いて渡航者および流行地の住民の血清を検討した。その結果、非希釈血清において感染ウイルス型に対する感染増強活性が認められた。興味深いことに、2 例は実験室で継代されたウイルス株より、分離された感染ウイルスに

対して、高い感染増強活性を示した。急性期の再感染患者血清では、感染ウイルスに対する中和活性を示したが、この中和活性は FcγRIIA 発現細胞にては検出されなかった。通常、中和抗体が検出されれば、感染に対する防御能があるとされている。しかし、非 FcγRIIA 発現細胞によって測定された中和抗体価は感染増強活性が考慮されない状態で測定されていることから、生体におけるデングウイルスのターゲット細胞である FcγR 陽性細胞に対する抗体の機能を反映していない可能性がある。

E. 結論

渡航者およびデング熱流行地の住民の血清を用いて、これまでに確立した FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いて樹立した ADE アッセイおよび中和法の有用性を検討した。現在広く用いられている、FcγRIIA 非発現細胞によって測定された中和抗体価は感染増強活性が考慮されない状態で測定されていることから、生体におけるデングウイルス抗体の機能を十分に反映していない可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. Journal of Infectious Diseases, 203(10):1405-14 (2011)

2. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. : Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. Journal of Clinical Virology 52(3):225-30 (2011).

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年8月

2) 国内学会

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

フラビウイルスの疫学に関する研究

ウマを対象とした 2009 年及び 2010 年におけるウエストナイルウイルス国内侵入の監視

研究分担者 小西 英二 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門教授

研究要旨 ウエストナイルウイルス (WNV) はウマやヒトに致死性の脳炎を引き起こす。現在のところ、日本における国内感染の報告はないが、アジア以外の広範囲に分布しており、日本への侵入が危惧されている。本研究では、日本中央競馬会に所属する競走馬を対象とし、2009 年及び 2010 年における WNV 感染の調査を、当教室で確立した補体依存性細胞障害を利用した抗体測定法 (CDC 法) 及びブロッキング ELISA 法を用いて行った。競走馬は競馬場とトレーニングセンター間等を移動しており、全国規模の WNV 感染調査を行うために適したおとり動物であると考えられる。対象とした血清 1600 検体のうち、CDC 法により 34 検体が陽性となった。これらの検体について、血清学的に近縁である日本脳炎ウイルス (JEV) 感染との鑑別診断をブロッキング ELISA 法により行った結果、22 検体が JEV 感染による交差反応であった。残り 12 検体は WNV 特異的な抗体が認められたが、全て外国産馬であったため、輸入前の WNV 感染あるいはワクチン接種の可能性が考えられた。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス (WNV) は、急性熱性疾患から致死的な脳炎に至る幅広い病気を引き起こす蚊媒介性フラビウイルスである。1999 年以降、西半球において感染地域を急速に拡大し、日本脳炎ウイルス (JEV) が分布するアジア以外のほとんど全ての地域には WNV が存在する。現在のわが国には WNV は存在しないが、渡り鳥が往来するロシアやオーストラリアには存在しているため、日本へ侵入し土着する可能性が危惧される。ところが日本には JEV がすでに存在しており、WNV 感染によるヒトの症状は JEV 感染による症状と類似するため、臨床的に鑑別することは困難である。

我々は、WNV 侵入前の準備として、そ

の感染症診断や浸潤状況監視のために、WNV 感染を JEV 感染と識別するブロッキング ELISA 法を確立した。これは、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。一方、特異度高く WNV 抗体を測定できる補体依存性細胞傷害を利用した抗体測定法 (CDC 法) も確立した。これは、NS1 発現細胞を被検血清と反応後、ウサギ補体を加え、放出された乳酸脱水素酵素活性により細胞傷害率を測定する方法である。

本研究では、日本中央競馬会に所属する競走馬を対象とし、2009 年及び 2010 年における WNV 感染の調査を行った。これらのウマは、競馬場とトレーニングセンタ

一聞等を移動しており、全国規模の WNV 感染調査を行うために適したおとり動物であると考えられる。

B. 研究方法

CDC法： WNV (Eg101株) の NS1 遺伝子発現 CHO 細胞 (2G2 細胞) に非働化被検血清、次いでウサギ補体を加えた。遠心後、上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量をロシュ社の Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) を用いて測定した。細胞傷害率 (% cytolysis) は、 $100 \times (A-C)/(B-C)$ により計算した。ただし、A は被検血清を用いて得られた吸光度、B は 1% Triton X-100 で細胞を全て壊したときの吸光度、また C は血清を加えないで細胞から自然に放出される LDH を反映した吸光度である。

ブロッキング ELISA 法： WNV (Eg101 株) の NS1 に対するウサギポリクローナル抗体で感作したプレートに、WNV (Eg101 株) の NS1 遺伝子発現 CHO 細胞 (2G12 細胞) 培養液を反応させて NS1 抗原 (10 ng/ウエル) を捕捉する。カゼインにより被覆後、被検血清 (1:5 希釈)、次いで WNV-NS1 特異的マウスモノクローナル抗体である WN-2H4 抗体 (腹水の 1:1000 希釈) を反応させた。NS1 に結合した WN-2H4 抗体をアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG (1:1000 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。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。検体と WN-2H4 の組み合わせで得られた吸光度を A、同様に検体と IgG1、ELISA 希釈液と WN-2H4、ELISA 希釈液と IgG1 により得られた吸光度をそれぞれ B、C、D とした時、WN-2H4 結合阻害率 (%) を $100 - \{(A-B)/(C-D)\} \times 100$ で表した。

ウマ血清： 2009 年及び 2010 年に栗東お

よび美浦のトレーニングセンターで 2 歳から 5 歳までのサラブレッドから採取された 1600 検体の血清を用いた (表 1)。これらの血清は、日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所の近藤高志博士から分与された。

(倫理面への配慮)

本研究における動物血清の使用は、神戸大学動物実験委員会及び競走馬総合研究所動物実験委員会のガイドラインに基づいて行われた。

C. 研究結果

CDC 法による陽性検体数： 栗東および美浦のトレーニングセンターにおける、各年齢毎の陽性検体数を表 2 に示す。2009 年は 23 頭、また 2010 年は 11 頭が陽性であった。栗東と美浦では大きな差は認められなかった。また 2 歳に陽性検体が多く、5 歳では少なかった。

ブロッキング ELISA 法による陽性検体数： CDC 法で陽性であった検体を対象としてブロッキング ELISA 法により検査した結果、2009 年及び 2010 年共に 6 頭 (合計 12 頭) が陽性であった。栗東と美浦では大きな差は認められず、年齢間でも 2~4 検体とほぼ同数であった。

D. 考察

ウイルス感染の一般的な診断法として、急性期ではウイルス核酸と抗原及び IgM クラスの抗体、一方回復期では IgG クラスの抗体の検出が用いられている。この中で最も信頼性が高いのは、核酸検出法である。ウイルス血症の期間とほぼ一致して検出可能であり、感度が高く、WNV 感染と JEV 感染を正確に識別できる。しかし、発症時点はウイルス血症のピークの時期であり、それ以降の検査でウイルス分離や核酸検出はあまり成功しないことが報告

されている。一方で、WNVの非構造蛋白の1種であるNS1 (WNV-NS1) 抗原の診断的価値がハムスターのWNV感染モデルで示されている。

抗体検出は、ウイルス核酸や抗原が血中から消失した後、長期間利用できる診断法である。しかし、従来の赤血球凝集抑制試験や中和試験などの抗体検査法では確実にWNV感染を証明することが困難と考えられる。それは、わが国のウマの多くは、WNVと血清学的交差性が高いJEVに対する免疫をすでに有するためである。すなわち、自然感染やワクチンによってJEVに対する免疫をもった個体がWNVに感染した場合、交差性のJEV抗体レベルが二次免疫応答のため高く上昇し、一次免疫応答として誘導される特異的なWNV抗体レベルと量的比較が困難となることが予想される。そこで本研究では、新しい方法であるCDC法とブロッキングELISA法を用いた。

本研究において両方の試験で陽性となった12頭は、WNVに対する特異抗体を保有すると考えられる。しかし、これらのウマはすべて外国産であり、外国で感染を受けたことが示唆された。

E. 結論

2009年及び2010年に競走馬1600頭から採取された血清を対象としてWNVに対する特異抗体を調べた結果、12検体が陽性となったが、いずれも外国産であり、現在のところ、国内へのWNV侵入を示す証拠は無かった。

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

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.* 1, 1000102, 2011, (DOI 10.4172/2157-7560.1000102)

Eiji Konishi, Yuko Miyagawa: Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes and Infection.* 13(12-13):1091-8, 2011

Eiji Konishi and Mayu Konishi: Nonstructural Protein 1 Antibody-Based Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate Japanese Encephalitis Virus from Dengue Virus Infections in Humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 64(4):284-91, 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health.* Advance Publication Article, 6 Aug 2011

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soengeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the Predominant Dengue Virus from Type 2 to Type 1 with a Subsequent Genotype Shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. *PLoS One.* 2011;6(11): e27322. Epub 2011 Nov 7.

2. 学会発表

桑原三和、窪田衣里子、斎藤直輝、永菅尚、高橋裕輔、中村匡崇、山地秀樹、小西英二：JEV抗原を高発現する昆虫細胞の樹立と産生抗原のワクチンへの適用。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会

小瀧将裕、武田祥子、小西英二：デング1型および3型マウスモノクローナル抗体の中和活性および増強活性を規定する因子の解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the predominant dengue virus in Surabaya, Indonesia: status in 2008-2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus in inhabitants of Kumamoto Prefecture, Japan, from 2004 through 2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Masahiro Kotaki, Shoko Takeda, Eiji Konishi: Monoclonal antibodies to dengue virus types 1 and 3 exhibit neutralizing and enhancing activities depending on epitopes on envelope protein and subclass of IgG. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa

Kuwahara, and Eiji Konishi: Efficient production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by recombinant insect cells. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji and Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Atsushi Yamanaka, Helen Susilowati, Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: Isolation of chikungunya virus from patients clinically diagnosed as dengue fever in Surabaya, Indonesia, 2010. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati, Eiji Konishi: Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia 2008 – 2009. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

桑原三和、北井陽子、近藤高志、小西英二：ウマを対象とした2006-2010年におけるウエストナイルウイルス国内侵入の監視。第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 対象ウマ検体数

採取年	場所	年齢				合計
		2	3	4	5	
2009	栗東	100	100	100	100	400
	美浦	100	100	100	100	400
2010	栗東	100	100	100	100	400
	美浦	100	100	100	100	400
合計		400	400	400	400	1600

表2. CDC法によるWNV抗体陽性ウマ頭数

採取年	場所	年齢				合計
		2	3	4	5	
2009	栗東	5	6	2	1	14
	美浦	2	1	4	2	9
2010	栗東	2	1	2	0	5
	美浦	2	1	1	2	6
合計		11	9	9	5	34

表3. ブロッキングELISA法によるWNV抗体陽性ウマ頭数

採取年	場所	年齢				合計
		2	3	4	5	
2009	栗東	0	3	1	0	4
	美浦	0	0	0	2	2
2010	栗東	0	1	1	0	2
	美浦	2	0	0	2	4
合計		2	4	2	4	12

フラビウイルス感染の治療法に関する研究

フラビウイルスによる細胞障害機構の解析

研究分担者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域 教授

研究要旨: フラビウイルス、特に日本脳炎ウイルス(JEV)について解析を行った。本邦の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、国内において感染源のウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。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(コガタアカイエカ)からの JEV の分離を定点(3 地点)、定時期(8 月末~9 月初)に行い、さらにウイルス病原性について非構造蛋白 NS4a を中心に性状解析を行っている。野外での採集蚊数(毎年 1000 匹程)の推移をみると、ある程度の差異はあるが、全般的に能登地域での蚊の生息数に大きな変化は無いことを示唆している。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った。RT-PCR 陽性サンプルは毎年 5~6 件あり、ウイルス分離を行った結果、2 株(Ishikawa-K05 株(2005 年分離)、Ishikawa-10(G6)(2010 年分離))のウイルス分離に成功している。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。遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べるために分離 JEV 2 株(遺伝子タイプ 1 型)と JaGAR01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較を行った。プラークサイズ及び細胞における増殖性は 3 型 JaGAR01 株の方が 1 型 Ishikawa 株より大きく、高いが、細胞障害性、IFN 誘導性はほぼ同程度であった。JEV の病原性、細胞障害機構解析は治療法にも通じるものであるが、感染に対する宿主応答の差異を遺伝子レベルから解析することが必須であるので引き続き宿主応答の解析を行っている。

A. 研究目的

本邦における日本脳炎患者数は最近では年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、国外での日本脳炎感染者は年間数万人になることから、その流行拡大の潜在的可能性をみるまでもなく、日本国内での日脳感染動向に注意すべきであろう。実際、石川県において 2007 年に 2 名の脳炎患者が出ている。こうした状況の中で、我々は 1998 年以來、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。こうした北陸地域における JEV のウイルス分布状況の把握並びにウイルス病原性発現機構の解明はウイルス感染の予防と治療法の開発につながるものであり、重要な課題と考えている。

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 CO₂ による採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田(3 地点)で行っている。採集蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎し、その破碎液は遠心法(10,000 × g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊分画液を材料として 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、エンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域の JEV 特異的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。6 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カ価を計測した。

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・細胞障害解析: 感染細胞 (Vero, IMR) 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。細胞・遺伝子・蛋白解析には免疫染色・ウェスタンブロット解析等を行った。

マウス実験: 病原性を調べるためにマウス ICR にウイルスを接種 (ip)、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

過去数年間の定点、定時期 (1 日のみ) での野外蚊 (コガタアカイエカ) 採集結果を見ると、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)、1,336 匹 (2009 年)、591 匹 (2010 年)、275 匹 (2011 年)) を採集している。2011 年における採集野外蚊は若干少なめに見えるが、研究協力者 (村上) による長期間調査 (6~10 月) では採集蚊数は必ずしも少ないことはなく、例年と同等であった。RT-PCR における陽性サンプル (毎年 5~6 件) を得、Vero 細胞を用いたウイルス分離では少なくとも 2 株 (Ishikawa-K05 株 (2005 年分離)、Ishikawa-10 (C6) (2010 年分離)) の新ウイルス株を分離できた。遺伝子解析の結果、分離ウイルスの遺伝子タイプは 1 型であった。新分離ウイルス 2 株 (遺伝子タイプ 1 型) の生物活性を調べるために JaGAR01 株 (遺伝子タイプ 3 型) との比較を行った。プラークサイズ及び細胞における増殖性は JaGAR01 株の方が Ishikawa-10 (C6) あるいは Ishikawa-K05 株より大きく、高かった。マウスに対する毒性において JaGAR01 株との比較の結果、Ishikawa-K05 株で

は差異はないが、Ishikawa-10 (C6) 株では毒性の低下がみられた。細胞 (Vero) へのウイルス感染の作用については、増殖性の差異および DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、1 型と 3 型による感染細胞のアポトーシス誘導および IFN 関連遺伝子発現誘導についてはほぼ同等の作用が認められたが、IFN に対する感受性では Ishikawa-10 (C6) 株で高まっていた。また細胞間での増殖性の差異は Ishikawa-10 (C6) 株で顕著であり、異なる細胞 (IMR) だとウイルス増殖性は極端に低かった。

C. 考察

これまでの Vero 細胞を用いた分離法で採集コガタアカイエカから少なくとも 2 株ウイルス (JEV) 分離に成功した。JEV が北陸地域に広く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。分離株 Ishikawa10 (C6) と Ishikawa-K05 株について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が、2010 年分離の Ishikawa10 (C6) 株で若干の病原性低下がみられた。細胞 (Vero) への障害作用についても両遺伝子タイプの JEV 株に差は見られず、またウイルス感染に伴う細胞における IFN 経路遺伝子発現誘導への影響に大きな差異はみられなかった。しかし、その性状においては Ishikawa10 (C6) 株では感染細胞が異なると増殖性に低下があり、これらの性状はマウスに対する毒性において同じ遺伝子タイプの JEV 株での差異に通じる現象と推定される。

しかしながら、ここに示した結果は、現在の日本国内において多数派として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。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、引き続き北陸地域分布ウイルスの分離の試み、遺伝子・細胞レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。低年齢児における JEV 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、ウイルス病原性解析はウイルス感染防御の目標につながるものと考えられる。

E. 結論

Vero 細胞利用分離法による採集野外蚊からのウイルス分離の結果、2 株(Ishikawa-K05 株及び Ishikawa-10(C6))のウイルス分離に成功した。遺伝子解析によっていずれの新分離 JEV 株も 1 型タイプであることが明らかとなった。感染による細胞障害はタイプ3型 JEV 株(JaGAr01)と同様にあり、病原性は必ずしも低いものではなかったが、タイプ1型ウイルスでは分離年による性状差異がみられた。IFN 経路遺伝子発現誘導も顕著で、こうした宿主応答がウイルス病原性に大きく影響することが再認識された。近年の国内分布 JEV の病原性変動に注意すべきと考ええる。

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が必要であろう。

G. 研究発表

1.論文発表

- (1) Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T: Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS ONE*, 6: e20718. 2011
- (2) Guo JF, Higashi K, Ueda Y, Ishigaki Y, Sakuma T, Oguchi M, Takegami T, Ota Y, Zhang L, Xu K, Nishida H, Tonami H: VEGF-A and its isoform VEGF121 mRNA expression measured by quantitative real-time RT-PCR: correlation with F-18 FDG uptake and aggressiveness of lung adenocarcinoma: preliminary study. *Ann Nucl Med* 25: 29-36, 2011
- (3) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Kurihara T, Koga H, Takegami T, Nakagawa H, Nemoto N, Tomosugi N, Kuwabata S, Miyazawa S: Comparative study of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids for observing cultured human cells by scanning electron microscopy. *Microscopy Res Tech* 74: 1104-1108. 2011
- (4) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Shimasaki T, Tatsuno T, Takano F, Ueda Y, Motoo Y, Takegami T, Nakagawa H, Kuwabata S, Nemoto N, Tomosugi N, Miyazawa S: Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial-mesenchymal transition.

Microscopy Res Tech 74: 1024-1031, 2011

- (5) Xia Q, Ishigaki Y, Ahaio X, Shimasaki T, Nakajima H, Nakagawa H, Takegami T, Chen Z, Motoo Y: Human SMG-1 is involved in Gemcitabine-induced primary micro-RNA-155/BIC up-regulation in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Pancreas* 40: 55-60, 2011

2. 学会発表

国際学会

- 1) Takegami T, Murakami M, Nukuzuma S, Ishigaki Y: Physiological function of Japanese encephalitis virus protein NS4a. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)
- 2) Murakami M, Kamimura K, Oikawa Y, Takegami T: Isolation and characterization of Japanese encephalitis virus from mosquitoes in Ishikawa, Japan in 2010. XV International Congress of Virology, Sapporo (2011, 9)

国内学会

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上 勉: 石川県内でのドライアイスストラップによるコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離、第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会、金沢 (2011, 5)
- 2) 奴久妻聡一、竹上 勉: HIV-1 Tat は JC ウイルスの増殖を促進する、第15回日本神経ウイルス研究会、金沢 (2011, 5)
- 3) 島崎猛夫、石垣靖人、高田尊信、中村有香、川上和之、竹上 勉、友杉直久、源 利成、元雄良治: 膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase(GSK) 3β: 化学療法戦略の新展開、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、(2011, 10)
- 4) 村上 学、竹上 勉: 石川県内豚舎周辺で採取したコガタアカイエカからの JEV 分離 (2009~2011)、第18回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会、東京 (2011, 12)
- 5) 石垣靖人、中村有香、島崎猛夫、元雄良治、中川秀昭、宮沢七郎、桑畑進、友杉直久、竹上 勉: Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial-mesenchymal transition. 第34回日本分子生物学会、横浜、(2011, 12)
- 6) 竹上 勉、蔡開琳、張琚、石垣靖人、村上 学: Biological significance of interaction of HCV protein NS3 and host proteins. 第34回日本分子生物学会、横浜、(2011, 12)

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

アルボウイルスの病原性に関する研究

日本脳炎重症化のウイルス側因子に関する研究

研究分担者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：日本脳炎ウイルスはアジアで年間数万人のウイルス性脳炎患者を発生させているアルボウイルスである。その有効な治療・予防法開発のために病原発現に関係するウイルス側要因と宿主側要因の分子レベルでの詳細な解析が必要である。日本脳炎ウイルスをマウスに接種した場合、ヒトに似た脳炎の病態を再現することは可能であるが、通常の日
本脳炎ウイルスでは末梢からウイルスをマウスに接種した場合、いかに接種ウイルス量を
増やしてもすべてのマウスに脳炎を発症させることはできず、一部のマウスは何らかの機
序により発症を免れている。この発症と発症回避のメカニズムを明らかにするために、本
研究においては、末梢から接種しても100%脳炎を発症させることの出来る特殊な日本
脳炎ウイルス株(JaTH160)と通常
のウイルス株(Ja0ArS982)から遺伝子工学的手法でキメラ
ウイルスを作製し、その生物学的性状を解析することによりウイルス側の発症回避（ある
いは100%発症可能因子）を分子レベルで同定することを試みた。その結果、マウス神
経細胞における増殖性ではウイルスタンパク質の1つNS2a タンパクの1アミノ酸の差異に
よって、増殖性が異なっていることが明らかになった。今後、個体レベルでの検証を実施
する予定である。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）による脳炎発症のメカニズムを解明するために、マウスにたいして末梢接種により100%の致死率を再現できるJaTH160株と接種量をいかに上げても30%程度の致命率にしかないJa0ArS982株の2つのウイルス株間で種々のキメラウイルスを作製しその病原性を比較することで病原性に関与するウイルス側要因を分子レベルで突き止めることが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) ウイルス株

1960年に東京で発生した患者から分離されたJaTH160株と、1982年に大阪のコガタアカイエカから分離されたJa0ArS982株を用いた。

2) キメラウイルスの作製

各ウイルス株を蚊培養細胞C6/36細胞に感染させ、その培養上清からRNAを抽出し、long-RT-PCR法を用いて各ウイルス遺伝子のcDNA断片を作成し制限酵素で処理したのち、クローニングベクターであるプラスミドpMW119に挿入し種々のキメラウイルスプラスミドを構築した。挿入したcDNAの遺伝子配列

を確認したのち、試験管内で各プラスミドからキメラウイルス RNA を転写し、エレクトロポレーション法により培養細胞へ導入して数日間培養したのち上清中に放出されるキメラウイルスを回収して -80°C に保存しその後の実験に使用した。また、必要により pMW119 に挿入したウイルス遺伝子に常法により点突然変異を導入した変異ウイルスも作成した。

3) 感染実験

マウスへの感染実験には C57BL/B6j を用いた。また、細胞感染実験には、マウス神経細胞由来の培養細胞株 N2a 細胞を用いてウイルスの増殖性を評価した。

4) ウイルスの定量

ウイルスの定量は BHK 細胞を用いたプラーク形成法を実施した。

C. 結果

1) JaTH160 株と Ja0ArS982 株のマウスに対する病原性、培養細胞増殖性の比較

JaTH160 株と Ja0ArS982 株を末梢からと脳内接種の 2 つの接種ルートでマウスに感染させた後、3 週間観察し生残率を比較した。両ウイルス株ともに脳内に直接接種した実験においてはウイルス量に比例して死亡率は上昇し、 10^4PFU では 100% のマウスが死亡した。一方末梢からウイルスを接種した場合、(Fig. 1) に示すように JaTH160 株では接種量に比例して死亡率が上昇し、 10^4PFU で 100% のマウスが死亡したのに対し、Ja0ArS982 株では 70% のマウスが生残り生残率はさらに接種ウイルス量を 100 倍に増量しても変化はなかった。両者には末梢からの接種であきらかな病原性の差異が確認できた。Ja0ArS982 株で観察されたマウスの生残現象は他の日本脳炎ウイルス株でも観察される現象であり JaTH160 株の性状は特殊である。さらに、マウスの培養神経細胞株 (N2a) での増殖性を比較したところ JaTH160 株は Ja0ArS98 株に比較して高い (10~100 倍) の増殖性を示すことが明らかになった。(Fig. 6)

2) JaTH160 株と Ja0ArS982 株の遺伝子の比較

JaTH160 株と Ja0ArS982 株の遺伝子の全塩基配列を決定し比較した。ウイルス構造、非構造タンパク質に 17 個のアミノ酸変異が存在した (Fig. 2)。内訳は C, M, NS1, NS2a, NS2b タンパクにそれぞれ 1 個所、E, NS3 タンパクにそれぞれ 3 個所、NS4a タンパクに 2 個所、NS5 タンパクに 4 個所であった。

3) キメラウイルスの構築と性状解析

JaTH160 株と Ja0ArS982 株の種々のキメラウイルスを (Fig. 3) の手順で作製した。作製したキメラウイルスは親株を含めて (Fig. 4) にあるような 8 種類である。このキメラウイルスを N2a 細胞に感染させたところ、Ja0ArS982 株の NS2a, b 遺伝子を JaTH160 株のそれと置換したキメラウイルスは JaTH160 株と同レベルの増殖性をしめし、高い増殖性には NS2a, b が関与していることが明らかになった (Fig. 5)。

4) 点突然変異株の増殖性

NS2a と NS2b 上のアミノ酸変異のうちどちらか、あるいは双方が高い増殖性に必要か否かを結論するために、(Fig. 6) のように JaTH160 株と Ja0ArS982 株の NS2a, b にそれぞれ相手側のアミノ酸を点突然変異の手技で導入したウイルスを作製してマウス N2a 細胞における増殖性を比較した。その結果 JaTH160 株の NS2a 細胞のアミノ酸変異をもった Ja0ArS982 株が高い増殖性を示し、逆に Ja0ArS982 株のアミノ酸変異をもった JaTH160 株は低い増殖性を示した。

D. 結論

- 1) JaTH160 株はマウスにおいて高い中枢神経病原性を示す株であり、Ja0ArS982 株はこれまでに報告された日本脳炎ウイルスのような中程度の病原性を示す株であった。
- 2) 上記 2 つのウイルスは培養マウス神経細胞で増殖性の差が顕著であった。

- 3) 上記2つのウイルスのウイルス蛋白には17か所の変異があった。
- 4) 上記2つのウイルス株の安定な感染性cDNAを持つプラスミドの構築に成功した。
- 5) この増殖性の差異はNS2aタンパクの1アミノ酸の差異により発現する。

E. 考察

今回、マウスで高病原性を示す日本脳炎ウイルスの細胞レベルでの高増殖性の分子基盤が明らかとなった。しかし実際に細胞内でNS2aタンパクがどのようにウイルス増殖性の増加に寄与しているのかは今後の研究課題といえる。また、今回構築した種々のキメラウイルスのマウス個体レベルでの病原性の差異については今後の研究で検討する必要がある。今のところ、NS2aタンパクの機能は不明である。今回の研究成果により、今まで抗ウイルス薬開発においてあまり顧みられなかったNS2aタンパクを薬開発の標的分子とする可能性が示唆された。今回の成果はヒトにおけるJEV感染の制御にも応用できるものと期待される。

F. 研究発表

1) 論文発表

Wichit S, Jittmittraphap A, Hidari KI, Thaisomboonsuk B, Petmitr S, Ubol S, Aoki C, Itonori S, Morita K, Suzuki T, Suzuki Y, Jampangern W. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol Immunol*. Vol.55(2):135-140,2011

Lyre Anni Espada-Murao and Kouichi Morita. Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA impedes interferon activation and enhances viral dissemination in porcine cells. *Journal of Virology*, Vol. 85 (13) : 6736-6749, 2011

Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Chris Lauber, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kenta Okamoto, Akitoyo Ichinose, Eric J. Snijder, Kouichi Morita, Alexander E. Gorbalenya. Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002215. 2011

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Tran Thi Thuy, Ha Manh Tuan, Cao Thi Phi Nga, Vo Van Tuong, Tran Van Dat, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Vu Thi Que Huong, Kenji Hirayama. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6(10):e25969. 2011

森田公一、岡本健太：ウイルスの今日的意義・11 アルボウイルス．化学療法の領域、Vol.27:3-10, 2011

森田公一：日本脳炎、最近の知見．佐賀県小児科医報、Vol.24:2-6. 2011

2) 学会発表

国際会議における発表

Kenta Okamoto, Muhareva Rawekiensya, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Mohammed Alimul Islam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: DEN2 strain derived from DHF patient utilizes SDC2 for infection in erythroid cells International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Lyre Anni Espada-Murao, Kouichi Morita: The tripartite relationship between cytosolic exposure of double-stranded RNA interferon activation, and dissemination of Japanese encephalitis virus in cultured cells, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Alexander E Gorbalenya, Chris Lauber, Jelle J Goeman, Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Takashi Ito, Eric J Snijder, Kouichi Morita: The largest RNA virus genomes evolved by wavelike expansions of three major coding regions International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Basu Dev Pandey, Yogendra Shah, Kishor Pandey, Takeshi Nabeshima, Ichiro Kurane, Kouichi Morita: Emergence of dengue in Kathmandu, Nepal, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Fuxun Yu, Kenta Okamoto, Kouichi Morita: Establishment of a cell line stably expressing Japanese encephalitis virus PRM-E protein and application for IGM capture ELISA, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Toru Kubo, Hidekazu Nishimura, Hiroyuki Moriuchi, Kouichi Morita: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for

comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Kouichi Morita: Clearance of SARS-COV by cooperation of antibodies and phagocytes, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Noriyo Nagata, Dihn Tuan Duc, Yuki Takamatsu, Kazutaka Kitaura, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: Multiple mechanisms of severe disease following Japanese encephalitis virus infection, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Shota Era, Kazuya I.P.J Hidari, Ippei Watanabe, Kiyoshi Ikeda, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Small carbohydrate inhibitor targeting dengue virus E protein, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Katsuki Ekawa, Kazuya I.P.J Hidari, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Biochemical properties of N-linked Glycosylation of dengue virus NS1 protein (Poster2:VI-PO45-19 Flaviviruses, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Yae Kurosawa, Yee Yee Lwin, Sanda Lin, Kay Thi Aye, Pe Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Kouichi Morita: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Takashi Tsunoda, Guillermo Posadas Herrera, Thuy Thi Thu Nguyen, Yen Thi Nguyen, Mai Thi Quynh Le, Kouichi Morita: Characterization of dengue 1 epidemic strains proliferated in Hanoi, Vietnam in 2009, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo Convention Center/Sapporo Business Innovation Center, Hokkaido, September 11-16, 2011)

国内会議における発表

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、堀 朋子、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一・日本脳炎ウイルス感染後の重症化に関わる IL-10 応答・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢、2011 年 5 月 20-21 日

江良翔太、左 一八、渡邊一平、池田 潔、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木 隆： Dengue ウイルス E タンパク質機能を阻害する低分子誘導体・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢、2011 年 5 月 20-21 日

左 一八、田島 茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木 隆・病原性の異なる日本脳炎ウイル

ス株の硫酸化糖鎖認識・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢 2011 年 5 月 20-21 日

村木優子、杉浦正明、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サルにおける免疫原性・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢 2011 年 5 月 20-21 日

吉川 亮、井上真吾、岡本健太、鍋島 武、比嘉由紀子、前川芳秀、森田公一、吾郷昌信・長崎県下のブタ、イノシシにおける日本脳炎ウイルスの侵淫状況・第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・金沢 2011 年 5 月 20-21 日

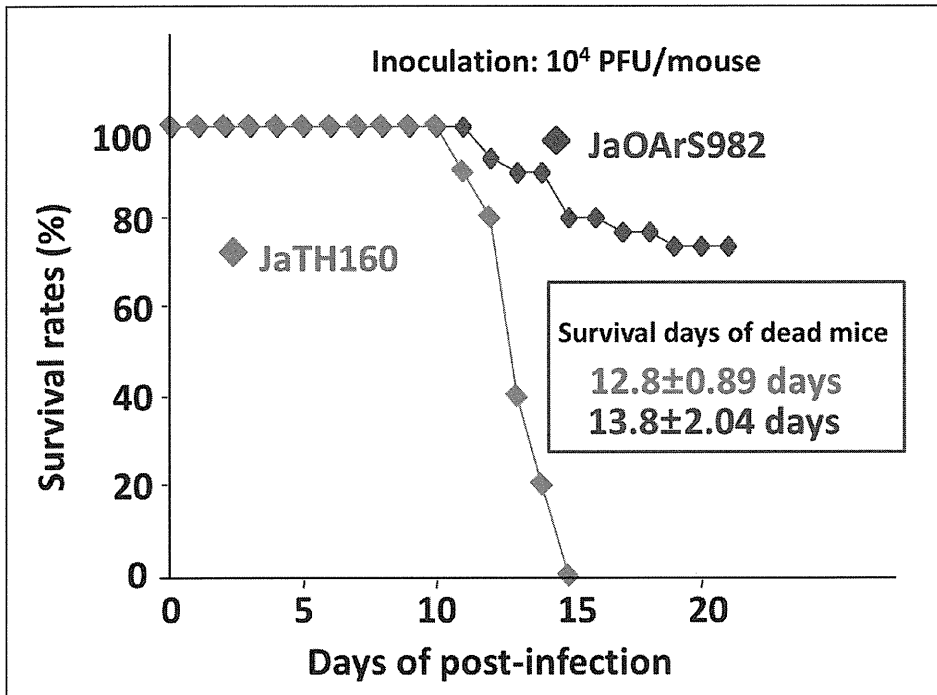
早坂大輔、北浦一考、永田典代、青木康太郎、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染後の免疫病原性による重症化・第 52 回日本熱帯医学会大会 第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京 2011 年 11 月 4 日～6 日

NGWETUN MYAMYAT、早坂大輔、森田公一：The Pathogenic mechanisms of Tick-Borne Encephalitis Virus by using IL-10 knock-out mice・第 52 回日本熱帯医学会大会 第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京 2011 年 11 月 4 日～6 日

井上真吾、Mwau Matilu、Kimotho James、一瀬休生、森田公一：ケニアにおける重要アルボウイルスの迅速診断テストの開発とアウトブレイク対応警戒システムの強化・第 52 回日本医学会大会 第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京 2011 年 11 月 4 日～6 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(Fig. 1) JaTH160 株と JaOArS982 株を C57BL/6j マウスに末梢感染させた場合の生残曲線



(Fig. 2) JaTH160 株と JaOArS982 株の遺伝子の差異から予想されるウイルス蛋白のアミノ酸の差

