

19990081

厚生科学研究費補助金

平成 11 年度

厚生科学特別研究事業

西ナイル病を含むフラビウウイルスの疫学・診断治療の

ガイドライン作成のための緊急研究 (H11-特別-038)

研究報告書

平成 12 年 4 月

主任研究者 五十嵐 章

(長崎大学・熱帯医学研究所)

目 次

1. 西ナイルウイルスを含むフラビウイルスの疫学・診断・治療のガイドライン作成のための緊急研究 (提言を含む) 主任研究者：五十嵐 章 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)	1
2. フラビウイルスとくに西ナイルウイルスの自然生態 研究協力者：大谷 明 (国立感染症研究所 名誉所員)	2
3. 1999年にニューヨークで突発的に流行した西ナイルウイルス脳炎の疫学的特徴 研究協力者：大谷 明 (国立感染症研究所 名誉所員)	3
4. 西ナイルウイルスの迅速血清診断法の開発とその評価 研究協力者：倉根 一郎、高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)	6
5. 日本における日本脳炎流行の動向 研究協力者：高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)	12
6. 西ナイルウイルスを含む蚊媒介性フラビウイルスの遺伝子診断法の開発 研究協力者：五十嵐 章、森田 公一 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)	15
7. 日本脳炎ウイルスのウイルス中和エピトープの解析 研究協力者：森田 公一 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)	18
8. 西ナイルウイルスを中心としたフラビウイルスの遺伝子近縁度の解析 研究協力者：マリア・デル・カルメン・パルケット (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)	20
9. 日本において西ナイルウイルス媒介可能な蚊の分布に関する総括研究 研究協力者：高木 正洋、津田 良夫 (長崎大学熱帯医学研究所・生物環境分野)	22
10. 西ナイル病をふくむフラビウイルスの疫学・診断治療のガイドライン (案) の作成 主任研究者：五十嵐 章 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野) 研究協力者：大谷 明 (国立感染症研究所 名誉所員) ：倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)	31
添付資料 - 1	36

1. 西ナイル病を含むフラビウイルスの疫学・診断・治療の
ガイドライン作成のための緊急研究 (H11-特別-038)

主任研究者： 五十嵐 章 長崎大学熱帯医学研究所長

A. 研究目的

近未来において、日本に西ナイルウイルスの感染による急性脳炎が流行する可能性に対処して、準備体制を整備するために、西ナイルウイルス脳炎に対する診断・通報・予防・治療のガイドラインを作成することが本研究の目的である。

B. 研究方法

米国 CDC 動物媒介性感染症部長 Duane J. Gubler 博士、及び同博士の紹介によりニューヨーク市衛生部 Marcelle Layton 博士に依頼して、昨年ニューヨーク市で流押した西ナイルウイルス脳炎に関する資料を収集し、それらの情報を基に流行の実態を把握し、将来想定される日本に本症が発生した場合に対する対処策をとりまとめた。

C. 収集された情報の概要

1) 患者の発生

1999年8月から9月にかけて、米国ニューヨーク市 Queens 区北部において、臨床的に従来の脳炎とは異なり、四肢の脱力感～弛緩性マヒを伴う急性脳炎患者の集団発生が報告された。その後の調査によって、患者は主に45才以上の成人で、ニューヨーク市 Queens 区を中心に、合計62名発生し、7名が死亡した。ニューヨーク市衛生部では、米国疾病疫学予防センター (CDC) などの協力によって、可能性が想定されるいくつかの病原体について検索した結果、下記のごとき驚くべき事実が解明された。

2) 病原体の同定

その第一は、血清反応による抗体検査から、病原体は当初従来米国を含む西半球に存在するセントルイス脳炎 (SLE) ウイルスと推定されたが、その後流行地域で死亡した鳥、媒介蚊、患者から分離されたウイルスの遺伝子解析によって、従来アフリカ・中近東・南アジアには存在するが、西半球には存在しないと考えられていた西ナイル (WN) ウイルスが病原体であることが判明した。ウイルス遺伝子の系統樹解析によって、今回ニューヨーク市で流行したウイルスは、イスラエルの七面鳥で流行したウイルスに類似していた。

3) 媒介蚊及び増幅動物

第二に、この西ナイルウイルスは大都市の下水などで発生するアカイエカないしはチカイエカによって媒介されること。第三に、カラスを含む野鳥・家禽類がウイルスの増幅動物となると同時に、ウイルス感染によって死亡していることであった。

4) 将来日本における流行の可能性

今回ニューヨーク市にどのようにして西ナイルウイルスが持ちこまれたかという経緯は未だ不明であるが、次ぎのような可能性が推定される：(1) ウイルスを保有した渡り鳥が大西洋を横断して持ちこんだ、(2) ウイルスを保有した鳥類を含むペット動物が輸入された、(3) ウイルスを保有した媒介が国際航空機によって運び込まれた、(4) ウイルスに感染したヒトが潜伏期間中に移動して持ちこんだ。

東京をはじめとする日本の大都会にはチカイエカ～アカイエカ群が棲息しており、カラスを含む野鳥も多数存在すること、更に近年の世界的レベルでのヒトと物資の流通状態の拡大を考えれば、西ナイルウイルスが日本の大都市に持ち込まれた場合、ニューヨーク市と同様の急性脳炎が流行する危険性は十分想定される。

D. 将来想定される西ナイルウイルス脳炎に対する準備体制

ニューヨーク市の流行を参考例として、次ぎの項目について日本としての準備体制を確立する必要がある。

1) 患者の発見と通報

日本には西ナイルウイルスと近縁な関係にあつて急性脳炎の病原体である日本脳炎(JE)ウイルスが常在していることが問題を複雑にしている。従来日本脳炎と比べて四肢の脱力感～弛緩性麻痺が顕著な急性脳炎患者が発見された場合には、西ナイルウイルス脳炎の可能性を考慮して、衛生行政当局へ通報すると共に、ウイルス学的検査を行なうよう、医療関係者に周知徹底する必要がある。

2) ウイルス学的検査体制の確立

日本では日本脳炎に対する実験室内検査体制は確立している。これを基本として(1) 遺伝子解析を含むウイルスの分離・同定と、(2) IgM-ELISA を中心とした抗体検査ができるように検査室の能力を向上させる必要がある。ことに遺伝子診断用 RT-PCR プライマーセットと、抗体検査用の標準陽性・陰性血清並びに測定用抗原、検出用酵素標識抗体を常備する必要がある。

3) 野鳥・家禽の異常の通報

野鳥、ことにカラスの異常死亡は一般市

民、ことに野鳥愛好家からの通報が重要な情報源である。したがって西ナイルウイルス脳炎の知識をできるだけ一般市民にも伝達して、その協力によって自然界における異常事態を早期に検出する体制を確立する必要がある。

4) 媒介蚊の調査

日本でかつて日本脳炎が大流行して多数の患者が発生していた時代には、都道府県衛生研究所でも日本脳炎媒介蚊の調査を重要な業務として行なっていた地方自治体も少なくない。その経験が失われてしまう前に、西ナイルウイルス媒介蚊に対する調査・研究能力を、地方自治体の研究機関に与えるための講習会～研修会を、国家レベルでの指導の基に、全国各地において順次開催して、啓蒙活動を展開する必要がある。

5) 本性に対する予防・治療

ウイルス病の一つである西ナイルウイルスに直接有効な抗ウイルス剤は存在しない。したがって、本性に対する治療方針は、患者の様態を基に、対症療法によって生命力の維持・向上に努めることが治療方針である。予防法としては、本性が蚊によって媒介される事実に鑑み、個人防衛の見地から蚊に刺されない努力が必要である。

2. フラビウイルスとくに西ナイルウイルスの自然生態

研究協力者： 大谷 明（国立感染症研究所 名誉所員）

A. フラビウイルスのメンバー

フラビウイルスはウイルス学ではフラビウイルス科 (FLAVIVIRIDAE) に分類されるエンベロープをもつ、プラス鎖 1 本鎖 RNA ウィルスで、フラビウイルス属 (Genus Flavivirus)、ペスチウイルス属 (Genus Pestivirus)、ヘパシウイルス属 (Genus Hepacivirus) の 3 属に分かれる。西ナイルウイルスは黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等と共にフラビウイルス属に分類されるウィルスである。フラビウイルス属にはヒトに感染するウィルスが多く登録されており、不顕性感染者が多いが発病者の症状は大きく 1) 脳・脊髄炎、2) 出血熱、3) 発疹熱、4) 単純な熱性疾患に分けられる。そのうち脳炎を起すことで代表的なのは日本脳炎、セントルイス脳炎、マレー溪谷脳炎、ダニ脳炎である。フラビウイルスには共通抗原があり、共通の祖先から進化したものと考えられている。とくに西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスとの相同性は高く、これらは西ナイル複合体 (West Nile complex) と呼ばれる。西ナイルウイルスが地球上に広く分布し、大陸移動により分離し独自に進化した結果、日本脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスとなったと考えている学者もいる。

B. 西ナイルウイルスのヒトへの病原性

西ナイルウイルスのプロトタイプは West Nile (B 956) 株で、1937 年 Smithburn 等によってウガンダの West Nile 地方で発生した成人女性の有熱患者からマウス脳内接種により

分離された。西ナイルウイルスは発疹性熱性疾患を起すウィルスとしてよく知られているが、筋肉痛、関節痛、脳炎、呼吸器疾患を呈したという報告もある。

C. 西ナイルウイルスの宿主域

西ナイルウイルスの感染宿主域は広く、脊椎動物ではヒト、サル、ウマ、ラクダ、コウモリ、ネズミ等多種の哺乳類、多種の鳥類、無脊椎動物ではイエカ族、ヤブカ族、ハマダラカ族等多種類の蚊に感染することが知られており、エジプトやロシアではダニに感染するという報告もある。

D. 西ナイルウイルスの分布域

世界での分布域は広く、エジプト、ウガンダ、コンゴ、中央アフリカ、モザンビーク、ナイジェリアといったアフリカ諸国、ロシア、フランス、キプロス、ポルトガル、イスラエルといった欧州諸国、インド、ボルネオ (?) といったアジア諸国でウィルスが分離されたという報告がある。さらに抗体存在の報告はマレーシア、タイ、フィリピンといったアジア諸国、トルコ、アルバニアといった欧州からなされているが、共通抗原が存在するため、ウィルスの存在についての確実性はうすい。

3. 1999年にニューヨークで突発的に流行した西ナイルウイルス脳炎の疫学的特徴

研究協力者：大谷 明（国立感染症研究所 名誉所員）

A. 米国大陸で最初の記録

西ナイルウイルスは分布域の広いウイルスとして知られている。その感染の足跡は北アフリカを中心にして、欧州、アジアに及ぶ。しかし、これまでに北、南アメリカ大陸に侵入した証拠はない。1999年のニューヨーク周辺に認められた西ナイルウイルス感染は、南北両アメリカ大陸では最初の記録である。このウイルスが持つ広い宿主域を考えると意外にも思える。

B. どのようにして持ち込まれたのか？

ヒト、カラス、蚊から分離されたウイルス遺伝子の塩基配列は相互に近似しており、これまでの世界の分離株の中ではルーマニア、イスラエルでの分離株に相同性が高いことが示されている。それでは欧州南部のウイルスがどのようにしてニューヨークに持ち込まれたのか。その方式は(1)感染蚊の導入、(2)感染鳥類での導入、(3)感染患者による導入の三つが考えられる。感染蚊での導入は、感染蚊の寿命が約2ヶ月であることを考慮すると可能性はあるが、欧州から米大陸への風による蚊の移動、航空機による蚊の持ち込みの可能性について検討の余地があろう。感染鳥類による移動は、実験的にハトで実証されている感染鳥体内での西ナイルウイルスの持続感染の存在と、渡り鳥の大陸間移動の可能性を考えれば有り得ることである。感染ヒトの潜伏期内的移動は、近年の航空機による頻繁かつ迅速なヒトの旅行を考えて、十分起り得るであろう。しかし、これらの可能な経路を考えても、1999年になって初めて認められたのはなぜか、どこかに大流行の母体があったのか依然謎は残る。

C. 今回の流行に寄与した増幅動物は何か？

今回の流行記録で、最初に感染が認められたのは1999年8月23日、ニューヨーク市北クイーンズの脳炎患者である。患者発生は以後9月末まで62例に及んだ。MMWRによると、この患者の爆発的発生以前に地区衛生担当官がニューヨーク市内で、鳥類とくにカラスの大量死を観察したとあるが明確ではない。ニューヨーク市の西ナイルウイルス流行に寄与した主媒介蚊は、市内に常在するアカイエカと推定されている。約1ヶ月の間に少なくとも62名の感染者を出すにはかなり大量の感染蚊が発生したと予想されるが、これらの蚊にウイルスを与える役をした、いわゆる増幅動物は何だったのか。ウイルス血症期間の長さ、及びアカイエカへの接触頻度の高さを考えると、増幅動物としての鳥類（とくにカラス）の役割が最も重要視されるが今回限りの流行の調査では決定の根拠は弱い。

D. 流行は次年度も継続するか？ ウイルスは越冬するか？

今回の流行の感染者は1999年9月25日をもって終息した。以後気温の低下と共に蚊の吸血行動も低下するから、冬季には西ナイルウイルスの流行は無いと考えられる。しかし、アカイエカには都会で無性生殖によって繁殖する亜種チカイエカの存在が知られている。この蚊は冬季でも吸血行動をとることは周知の事実である。この冬季蚊の存在によりウイルスは限局された伝播サイクルを営みながら、細々と生息することは有りえないであろうか。今

回の調査中に CDC の研究者からニューヨーク年ニューヨークで冬季に採取された蚊からウイルスが分離されたと聞いた。これが事実だとすれば気温の上昇と共にウイルスの活動が再び活発化する可能性は無いとは云えない。また、今回の流行でアカイエカのほかにキンイロヤブカからも西ナイルウイルスが分離されている。一般にアルボウイルスの自然界でのエコロジーの記録では、ヤブカによるアルボウイルスの経卵感染が頻繁に認められている。西ナイルウイルスが蚊の経卵感染によって越冬する可能性はないであろうか。いずれにせよ、これからもニューヨーク市における注意深いウイルス探しが極めて重要な意味を持つと考えられる。とくに夏期における鳥類の死亡例の検索は重要である。

4. 西ナイルウイルスの迅速血清診断法の開発とその評価

分担研究者：倉根一郎（国立感染症研究所）

協力研究者：高崎智彦（国立感染症研究所）

A. 要約

昨年、8月にニューヨークで流行した西ナイルウイルス脳炎の原因ウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。両ウイルス間には抗体の交叉反応がある。西ナイルウイルスに対するIgM捕捉ELISAを作製し、日本脳炎患者血清を用いて検討した結果、比較的ウイルス特異的といわれるIgM抗体においても交叉反応が認められた。しかしながら、日本脳炎に対するIgM捕捉ELISAを同時に実施したところ、すべての血清が日本脳炎に対してより強く反応した。西ナイル脳炎患者血清がどのように反応するかに関しては、今回西ナイル脳炎患者血清が1検体しか無いため検討できなかったが、IgM捕捉ELISA法が鑑別診断に用いる可能性が示唆された。しかし、日本脳炎患者血清が、西ナイルウイルスをかなり中和することも確認された。従って、血清診断が困難である場合も考慮する必要がある。

B. 目的

一般にフラビウイルス属のウイルス間には抗体の交叉反応がある。昨年、8月にニューヨークで流行した西ナイルウイルス脳炎の原因ウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。また近年輸入感染症として日本人の症例数が増加しているデング熱の原因ウ

イルスであるデングウイルスとも類似している。今夏再びニューヨークで西ナイル脳炎が流行するかどうかは現在予測することはできないが、日本人旅行者も多いことから日本に西ナイル脳炎ウイルスが侵入した場合、あるいは海外渡航者による輸入症例が発生した場合は、日本脳炎やデング熱との鑑別を可能とする実験室内診断法の開発が必要となる。

われわれは、日本脳炎およびデング熱と鑑別するための血清学的診断法について検討した。

C. 材料と方法

1. ウイルス：西ナイルウイルス(WNV)Ig2266株、Eg101株（標準株）
2. 細胞：Vero細胞、C6/36細胞
3. 血清：血清学的診断のために西ナイル脳炎患者血清は1サンプル（CDCより分与）のみであるため、日本脳炎患者血清10サンプルについて、西ナイルウイルスに対して、どの程度交叉反応を示すかを検討した。

4. プラーク形成法

西ナイルウイルスを単層培養のVero細胞に接種し、1%メチルセルロースMEM重層培地を加え、プラークの形成を検討し、後述のプラーク減少法による中和活性の測定に用いた。

5. IgM捕捉ELISA法

西ナイルウイルスを Vero 細胞に接種し、CPE が十分出現した 5 日目の培養液を 3000rpm で遠沈し、その上清をウイルス抗原とした。

(1) 抗ヒト IgM 抗体 (μ 鎖特異的) を コ ティングしたプレ ートで西ナイル患者血清中の IgM を捕捉する。

(2) 西ナイルウイルス抗原を反応させる。

(3) ヒト血清中の、西ナイルウイルス抗原と反応した IgM 抗体を、酵素標識した抗フラビウイルス抗体 (IgG 抗体: DI-4G2-4-15) で検出する。

(4) 酵素に対する発色基質を加え、抗体のウイルス抗原との反応を発色により検出する。(抗体の結合量は発色の程度として表現される)。

6. 日本脳炎患者血清を用いた西ナイルウイルスの中和能の測定

西ナイルウイルスに対して、日本脳炎患者血清が示す中和活性をプラーク減少法により用いて検討した。非働化した被検血清を、15 倍希釈より 4 段階希釈した後、攻撃ウイルス (西ナイルウイルス) と 90 分間中和反応させ、単層培養の Vero 細胞に接種し、5 日後にプラーク数を測定した。プラーク数の減少から中和活性を算出した。

C. 結果と考察

1. プラーク形成法とウイルス分離:

C6/36 細胞あるいは Vero 細胞を用いてウイルス増殖が可能である。Vero 細胞を用いたプラーク形成法ではプラークは 4 日目ないし 5 日目に形成された。日本脳炎と比べてややプラークの出現は早いよう

である。但し、CDC の担当者によれば、ニューヨークで分離されたウイルス (WNV-NY1999) を用いた場合、さらに 1 日程度早くプラークは形成されることである。C6/36 細胞は西ナイル脳炎や日本脳炎ウイルスが属するフラビウイルスに対して感受性が高い。しかし、今後西ナイルウイルスが日本に侵入してきた場合、おそらく西ナイル脳炎の擬似症例あるいは原因不明の脳炎として検査依頼があるものと考えられる。従って、ニパウイルス脳炎のような全く他の種類のウイルスによる場合も考えられ、ウイルスに感染した場合 CPE を起こしやすい Vero 細胞も併用すべきである。

2. 西ナイルウイルス IgM 抗体の検出:

昨年ニューヨークで発生した西ナイル脳炎患者血清を用いて IgM 捕捉 ELISA 法を確立した。西ナイル脳炎患者血清・日本脳炎患者血清・デング熱患者血清を 50 倍希釈より 2 倍段階希釈し、西ナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA で測定した。図 1 に示す如く西ナイル脳炎患者の血清は西ナイルウイルス抗原に有意に強く反応した。この IgM 捕捉 ELISA 試験を用いて日本脳炎患者血清およびデング熱患者血清の交叉反応を検討した。その結果は図 2 に示す如くであり、日本脳炎に関しては、10 例中 4 例が陽性と判定しうるレベルであり、デング患者では 10 例中 1 例であった。このことから、デング熱患者よりも日本脳炎患者のほうが西ナイル脳炎患者との鑑別が実験室内診断において困難であると考えられる。

日本脳炎患者血清の日本脳炎 IgM 抗体を日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA により測

定した OD 値とを比較した。図 3 の如く 10 例の日本脳炎患者血清はすべて日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA に対して西ナイル脳炎に対する交叉反応より強く反応した。しかし、西ナイル脳炎患者血清が 1 サンプルしかないため、逆の場合の検討は今回できなかつた。ただし、この西ナイル脳炎患者血清をデングウイルス IgM 捕捉 ELISA (MRL 社製) および日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA により検査した結果は、陰性であった。

3. 日本脳炎患者血清を用いた西ナイルウイルスの中和反応

ウイルス分離・遺伝子の検出が出来ず、IgM 抗体測定によっても判定できなかった場合の最終的な鑑別法としては、迅速診断ではないが中和抗体価を測定する必要がある。そこで、日本脳炎患者血清がどの程度西ナイルウイルスを中和するのかを検討した。その結果図 4 の如く 10 例中 4 例は 240 倍希釈でも 50% 以上の中和能を示した。

従って、西ナイル脳炎と診断するためには、日本で患者の発生しているフラビウイルス感染症すなわち日本脳炎、ロシア春夏脳炎、および輸入感染症であるデング熱それぞれのウイルスに対する中和抗体価を測定し、他に比べて希釈倍数で有意な高値を示す場合に、西ナイル脳炎と診断できると考えられる。西ナイル脳炎の場合は、神経症状が軽く、昨年のニューヨークの症例でデング熱とまぎらわしい症例が 2 例ほどあったようである。従って、患者が海外渡航者であればデング熱との鑑別も考慮に入れる必要がある。

D. 発表論文

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., and Kurane, I. : Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 75-77, 1999.

Ken-Ichiro Yamada, Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, and Ichiro Kurane: Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture ELISA. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52(4): 150-155, 1999.

中山幹男、高崎智彦：広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)－その数値をどう読むか－「日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス」。日本臨床 57(増刊)：294－297, 1999.

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Mikio Nakayama, Yoko Arai, Sadao Yabe, and Ichiro Kurane: The feature of imported dengue fever cases from 1996 to 1999. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52(6): 257-259, 1999.

Kurane, I., and Takasaki, T. : Immunogenicity and protective activity of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, In press, 2000.

E. 学会発表

高崎智彦、山田堅一郎、矢部貞雄、名和優、岩崎恵美子、倉根一郎：デングウイルス感染者に対する検査法の検討。第73回日本感染症学会総会（1999）

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和優、倉根一郎：デングウイルス感染症の診断法について。第34回日本脳炎ウイルス生態学研究会（1999）

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Masaru Nawa, and Ichiro Kurane: Laboratory diagnosis of imported dengue cases in Japan. 第11回国際ウイルス学会議（1999）

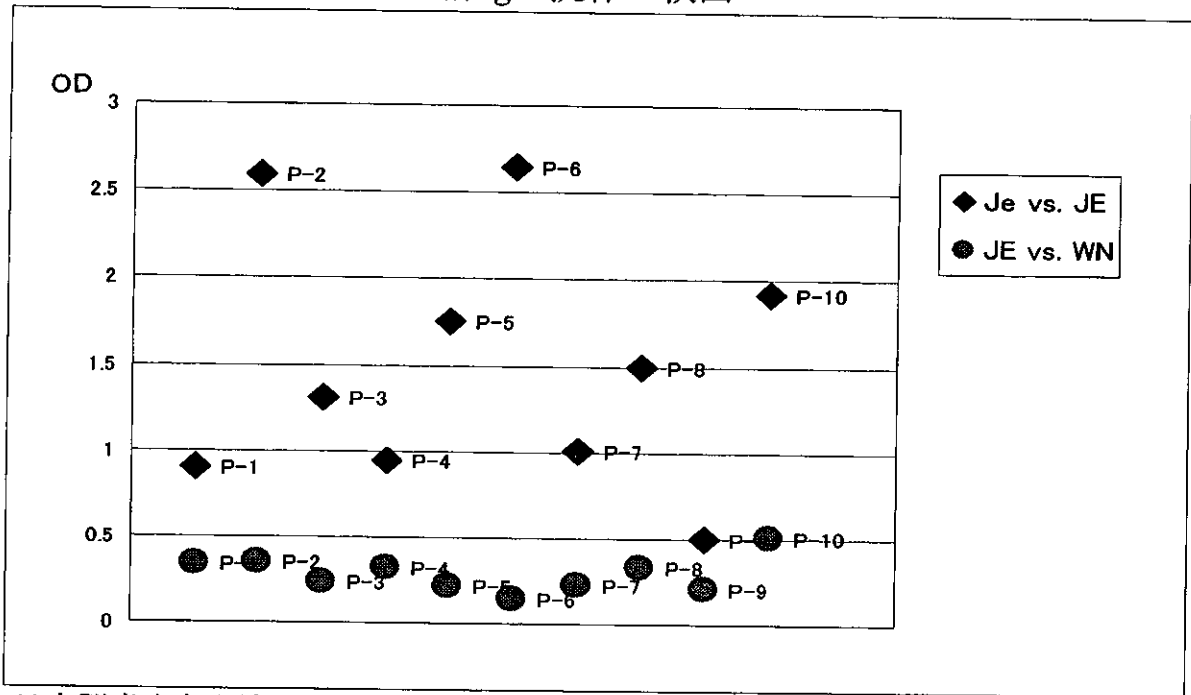
井戸田一郎、増田剛太、味澤篤、今村顕史、根岸昌功、山田堅一郎、矢部貞雄、

高崎智彦、倉根一郎：輸入デングウイルス感染症44例の検討。第40回日本熱帯医学会（1999）

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和優、倉根一郎：デングウイルス感染症の実験室内診断－解熱日と各診断法との関連－。第40回日本熱帯医学会（1999）

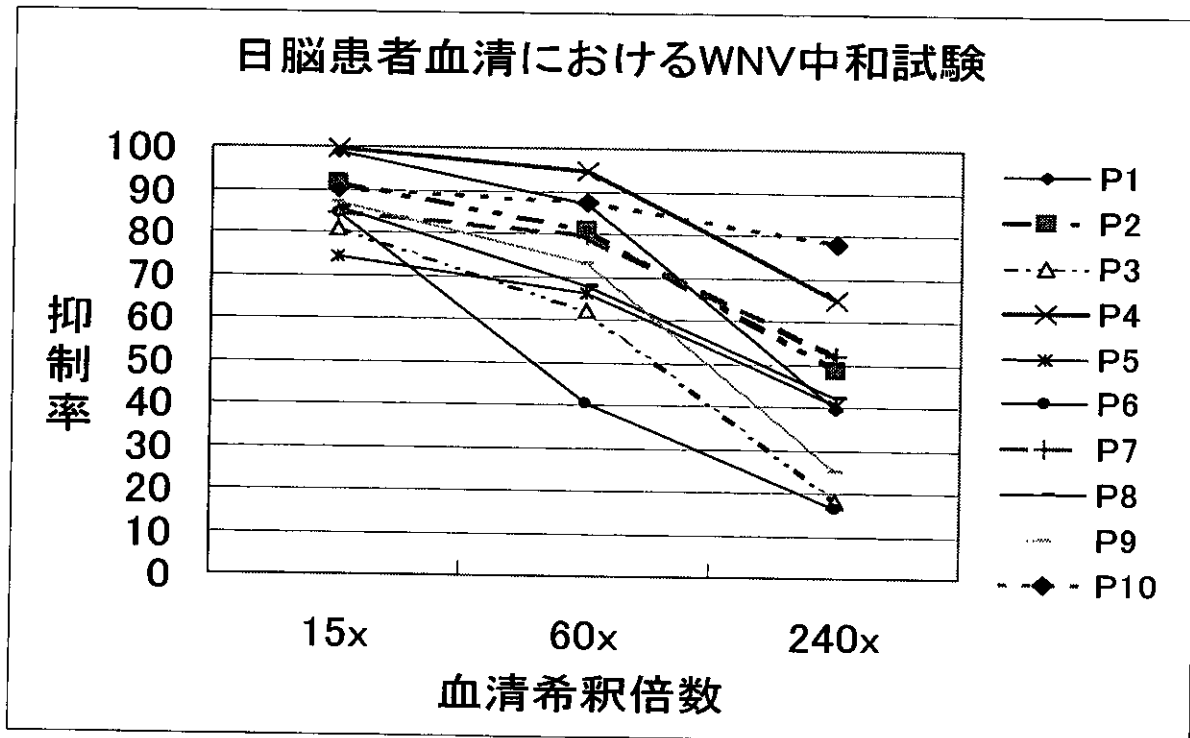
高崎智彦、矢部貞雄、中山幹夫、山田堅一郎、新井陽子、山本紀一、倉根一郎、田島章太郎、原田 誠、飯塚信二、多賀賢一郎、井村俊郎、名和 優：黄熱ワクチン接種日本人における抗体上昇について。第6回トガウイルス研究会（1999）

図3 日本脳炎IgM捕捉ELISAと西ナイルウイルスIgM捕捉ELISAによる日本脳炎患者血清IgM抗体の検出



日本脳炎患者血清はすべて日本脳炎IgM捕捉ELISAに対して西ナイル脳炎に対する交叉反応より強く反応した。

図4 日本脳炎患者血清の西ナイルウイルスに対する中和能



5. 日本における近年の日本脳炎患者の発生状況

分担研究者：倉根一郎（国立感染症研究所）

協力研究者：高崎智彦（国立感染症研究所）

A. 要約

近年の日本脳炎患者の発生状況は、その患者数は年間 10 名以下と少数であるが、その大部分が老人であり、この点では昨年ニューヨークで流行した西ナイル脳炎と類似している。現在日本脳炎の診断には、HI（赤血球凝集抑制）試験や CF（補体結合）試験により診断されている。これらの方法は、西ナイルウイルス感染症の鑑別診断には有用でない。今後、日本脳炎類似疾患の届け出・診断体制の見直しも検討する必要がある。

B. 目的

昨年 8 月に、ニューヨークで流行した西ナイルウイルス脳炎の原因ウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。日本に西ナイル脳炎ウイルスが侵入した場合、あるいは海外渡航者による輸入症例が発生した場合は、日本脳炎との鑑別が重要となる。そこで、近年の日本脳炎発生状況をまとめて、問題点を考察した。

C. 方法

厚生省保険局結核感染症課を通じて集計した全国都道府県からの日本脳炎患者個人表をもとに、1991 年から 1998 年までの患者情報をまとめた。

D. 結果

年間患者発生数は、1991 年の 13 人を最

後に、その後はいずれの年も 10 人以下である。死亡者数は 1994 年以降 0 である。

1994 年以降の患者の平均年齢は 65.3 才であり、小児の発生は 1 例である。全治したのは、4 例（25%）である。予防接種歴は不明または未接種であった。

また、近年では富山・新潟という比較的北部の地域での発生が認められている。またほとんどの症例は、HI・CF 検査により診断されている。

D. 考察

最近の日本脳炎患者の発生状況は、その大部分が老人である。これは死亡者の平均年齢が 81.5 歳、患者の平均年齢 69 歳であるニューヨークの西ナイル脳炎患者の発生状況と酷似した状況である。従って、患者年齢に関しては、なんら鑑別点とはならない。日本脳炎は HI あるいは CF によって日本脳炎ウイルスに対する抗体価上昇で判定しているが、この方法では西ナイルウイルス感染症との鑑別は不可能であり、極めて不都合な状況である。また、1998 年度は、届け出に関しては 2 例であるが、大分において 9 月に日本脳炎患者が発生し、転帰は軽度の後遺症であったとの学会報告があったが、これは法定伝染病（1998 年時点）としての届け出もなされていない。患者の死亡率が高く、後遺症の頻度も高い重篤な疾患である日本脳炎の対策のためには、患者の正確な

把握が欠かせない。日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している西ナイル脳炎ウイルスが日本に侵入した場合、極めて重要となってくる。

E. 研究論文

Yamada, K., Nawa, M., Takasaki, T., Yabe, S., and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture ELISA. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52(4): 150-155, 1999.

中山幹男、高崎智彦：広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)－その数値をどう読むか－「日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス」 *日本臨床*, 57(増刊): 294-297, 1999.

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Nakayama, M., Arai, Y., Yabe, S., and Kurane, I.: The feature of imported dengue fever cases from 1996 to 1999. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52(6): 257-259, 1999.

Kurane, I., and Takasaki, T.: Immunogenicity and protective activity of

the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, In press, 2000.

F. 学会発表

高崎智彦、山田堅一郎、矢部貞雄、名和優、岩崎恵美子、倉根一郎：デングウイルス感染者に対する検査法の検討。第73回日本感染症学会総会, 1999.

Yamada, K., Takasaki, T., Yabe, S., Nawa, M., and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of imported dengue cases in Japan. 第11回国際ウイルス学会議, 1999.

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和優、倉根一郎：デングウイルス感染症の実験室内診断－解熱日と各診断法との関連－。第40回日本熱帯医学会, 1999.

高崎智彦、矢部貞雄、中山幹夫、山田堅一郎、新井陽子、山本紀一、倉根一郎、田島章太郎、原田 誠、飯塚信二、多賀賢一郎、井村俊郎、名和 優：黄熱ワクチン接種日本人における抗体上昇について。第6回フラビウイルス研究会, 1999.

表1.日本脳炎患者確定数(1991年～1998年)
(日本脳炎患者個人票による)

年次	患者数	罹患率	死者数
1991	13	0.01	4
1992	2	-	0
1993	4	-	1
1994	4	-	0
1995	2	-	0
1996	4	-	0
1997	4	-	0
1998	2	-	0

表2. 1994年以降の日本脳炎患者情報のまとめ

年	地域	県名	性	歳	診断根拠	転帰	ワクチン歴	職業
1994	関東	群馬	F	63	HI・CF	軽快	不明	酪農
1994	中部	新潟	F	45	CF	後遺症	不明	会社員
1994	近畿	兵庫	F	79	HI・CF	後遺症	不明	無職
1994	九州	熊本	M	54	HI	全治	不明	農業
1995	四国	香川	F	7	HI・CF	後遺症	未接種	児童
1995	九州	熊本	M	76	HI	後遺症	未接種	無職
1996	九州	熊本	F	65	HI	全治	不明	無職
1996	九州	佐賀	F	86	HI・CF	後遺症	未接種	無職
1996	四国	高知	M	73	HI	後遺症	不明	焼肉業
1996	四国	愛媛	F	64	HI・CF	後遺症	不明	無職
1997	九州	長崎	F	75	HI	後遺症	不明	農業
1997	四国	愛媛	M	70	CF	全治	不明	農業
1997	中国	山口	M	88	HI・CF	全治	不明	農業
1997	中部	富山	F	74	CF	後遺症	不明	無職
1998	四国	愛媛	M	64	CF	後遺症	未接種	無職
1998	関東甲信				HI・CF・IgM・			
1998	越	新潟	F	62	中和	後遺症	不明	農業

6. 西ナイルウイルスを含む蚊媒介性フラビウイルスの遺伝子診断法の開発

研究協力者： 森田 公一、五十嵐 章
 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)

A. 目的

蚊媒介性のフラビウイルスは、互いに多くの共通抗原性を有し、ウイルスの免疫学的方法による同定は煩雑な作業が必要であり、時間も要していた。また臨床診断においては、症状の酷似した西ナイル病や日本脳炎の場合、最終的な鑑別診断に至るまでに長い時間を要していた。とくに近年、交通手段の発達により外来性のフラビウイルスの侵入が危惧されており、迅速で信頼度の高いフラビウイルス鑑別法の開発が必要である。この研究は西ナイルウイルスを含むフラビウイルスの鑑別を、遺伝子増幅法 (PCR) を用いることにより簡便に短時間で行なうことが出来るシステムの構築を目指して行った。

B. 方法

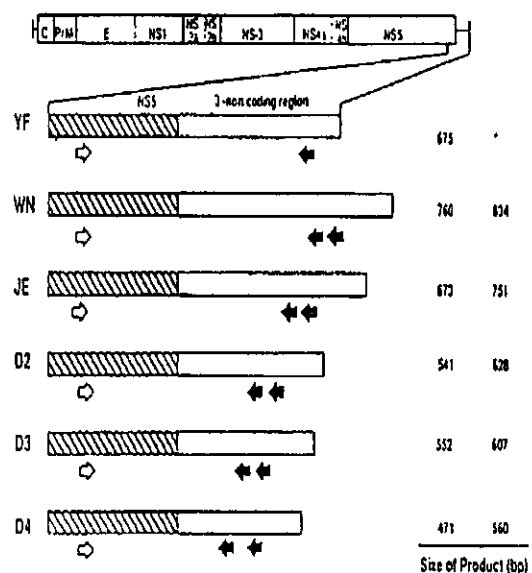
すでに遺伝子塩基配列が発表されている蚊媒介性フラビウイルスについて、20 塩基ごとにホモロジーを検索し、全てのウイルスに共通性の高い領域と、ある 1 種類のウイルスに特異性の高い領域を、コンピューターを用いて検索し、フラビウイルスに共通の PCR プライマーと、個々のフラビウイルスに特異的なプライマーを試作する。これらのプライマーを用いて、実際にそれぞれのウイルス感染培養液からウイルス遺伝子が増幅可能かどうかを実証する。さらに西ナイルウイルスについては、患者材料から直接ウイルスの検出が可能か否かについて検証し、この方法の臨床面での利用価値を考察する。

使用した患者検体は、パキスタンにおいて急性脳炎症状を呈した患者の病因診断を目的として、患者または患者家族の了解のもとに採取

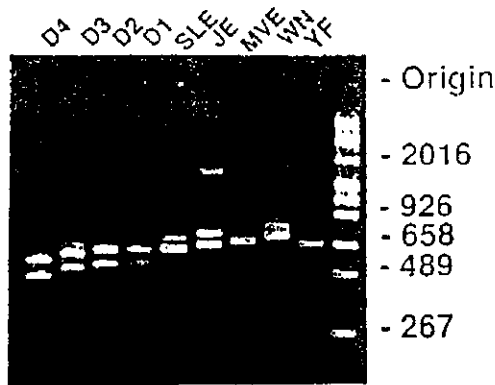
されたものである。

C. 結果

フラビウイルス遺伝子の共通配列を検索した結果、蚊媒介性のフラビウイルス間で共通に保存された領域が確認された。即ち、フラビウイルス遺伝子の NS5 蛋白質遺伝子の 5'末端部分と、3'非翻訳領域には、フラビウイルス間で極めてよく保存された領域が存在することが明らかとなった。図 1 に示した様に、これらの領域の塩基配列を用いたプライマーを使用して PCR を行った場合、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、などのウイルス遺伝子の 400~800 塩基の遺伝子断片が増幅されると推定された。また非翻訳領域の共通配列は、黄熱ウイルス以外では 2 度の繰り返し配列になっており (図 1、黒い矢印)、プライマーがこの 2 つの位置に結合した場合には、遺伝子増幅により、長さの異なる 2 種類の遺伝子断片が増幅される可能性が示唆された。



このプライマー (YF1 と YF3, Table1) を用いて、実際に黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、デングウイルスの遺伝子を増幅した結果、遺伝子解析で予想どおりの遺伝子断片 (黄熱を除く殆どのフラビウイルスで2本の) が増幅された。(図2)



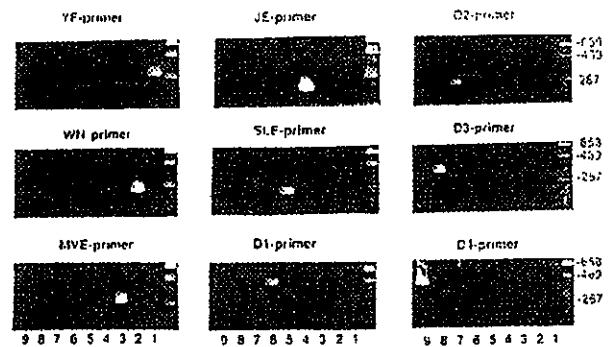
(図2)

また上記の遺伝子解析において、各フラビウイルスにそれぞれ特異的な部分を選び、それぞれのウイルスに特異的かつ遺伝子増幅を行った場合 250~450 塩基の遺伝子断片が増幅されるようなプライマーの組み合わせを設計した (Table 1)。また同時に複数の遺伝子増幅が可能となるように、各プライマーの Tm 値の差が出来るだけ少なくなる様に考慮した。

TABLE 1
Sequence of synthetic oligonucleotide primers.

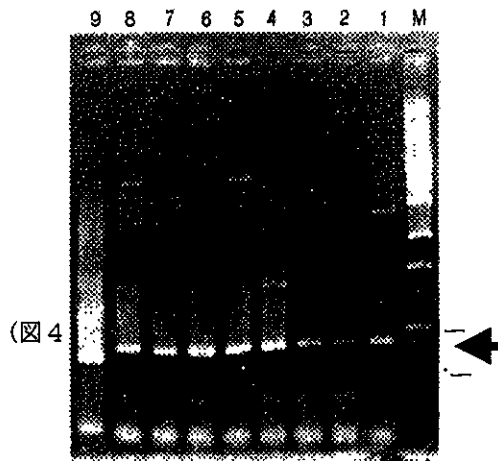
Primer code	Sequence (5' to 3')	Product (bp)	Reference
YF-1	GGTCTCTCTAACCTCTAG		Rice et al., 1987
YF-3	GAGTGGATGACCCAGGAAACATGC		Rice et al., 1987
YF-S10	GTAACAAGTTACATCGCTCAG	278	Rice et al., 1987
YF-C10	AGCAAGAAACATGTCACCA		
WN-S3	CACAGCGGCTTTACTATCT	229	Castle et al., 1985, Wengler et al., 1985
WM-C3	CATTTCCAGCAGCTAGGACC		
MVE-S	GTCCAGACGTTTCTACCGTGT	273	Dalgarno et al., 1986
MVE-C	AGAATAATTTCCATGACTGG		
JE-NS3-1S	AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT	142	Sumiyoshi et al., 1987
JE-NS3-4R	TTTCAAGCTCTTCTACAGT		
SLE-S	GATGTATATCACATACACCG	233	Trent et al., 1987
SLE-C	GAATGAAACCAATGGAATCGT		
D1-S	GGACTCCGATGGAATTTTG	470	Mason et al., 1987
D1-C	ATGGGTTGTGGCCTAATCA		
D3-S	GTTCCTCTGCAAAACCTCCA	210	Hahn et al., 1988, Deubel et al., 1988
D3-C	GTTGTAATTTGATTTCTCTTG		
D3-S1	GTCTTACACAGCCCTATT	300	Oatomi and Sumiyoshi, 1990
D3-C1	TCCATTCTCCAGCGGCTG		
D4-S	CATTATGGCTGTGTGTT	378	Neckow et al., 1987, Zhao et al., 1986
D4-C	CTTCATCTGCTTCACTTCT		

このプライマーを用いてウイルス遺伝子の増幅を行い、特異性について検討した。その結果図3に示すように、各プライマーはそれぞれのウイルスの遺伝子のみ増幅し、他のウイルスの遺伝子からはDNA断片の増幅は認められず、特異性は高いと判断された。この結果からフラビウイルスの鑑別は遺伝子増幅法により簡便に短時間 (およそ3時間) で行なえることが実証された。



(図3)

この遺伝子増幅法によるフラビウイルスの検出・鑑別システムを、西ナイルウイルスについて実際に患者材料からのウイルスの検出 (迅速診断) が可能か否かについて検討した。パキスタンにおいて、西ナイル脳炎 (または日本脳炎) と臨床診断された患者から採取された脊髄液から全 RNA を抽出し、日本脳炎特異的プライマーと西ナイルウイルス特異的プライマーを用いてウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、9 例の日本脳炎/西ナイル脳炎が疑われた患者のうち 1 例が日本脳炎陽性であり 8 例は西ナイルウイルス陽性であった。このことから PCR 法による遺伝子増幅検出法は、日本脳炎と西ナイル病の早期診断に有効であり、かつ同時に両者の鑑別診断も可能であることが証明された。



D. 考察

フラビウイルスは互いに多くの共通抗原を有するため、臨床症状からの鑑別診断は難しくウイルス学的手法による起因ウイルスの特定は、特に西ナイルウイルスなどが本邦に侵入した場合被害を最小限にとどめる為に不可欠である。ニューヨークにおける事例を考え合わせれば、擬似日本脳炎患者全てについて起因ウイルスを同定する努力が必要と考えられる。特に東京などの都市部での日本脳炎擬似患者発生の場合は迅速に病原因子を同定する必要がある。

E. まとめ

遺伝子増幅法によるフラビウイルスの迅速診断・鑑別が可能となった。西ナイルウイルス病などの外来感染症の侵入・土着を防ぐ為、この方法の活用が望まれる。

7. 日本脳炎ウイルスのウイルス中和エピトープの解析

研究協力者： 森田 公一

(長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)

A. 目的

日本脳炎や西ナイルウイルスなどのフラビウイルス感染では、死亡をまぬがれて回復した患者において極めて強固な終生免疫が獲得されることが知られており、安全なワクチンが開発されれば公衆衛生学的にみて極めて有効な予防手段となることが、日本脳炎ワクチンの集団接種により患者数が激減した我が国や韓国の例からも明らかである。しかしながら日本脳炎ウイルスと黄熱ウイルスを除き、西ナイルウイルスやデングウイルスなどその他のフラビウイルスに対してはワクチン開発が遅れているのが現状である。フラビウイルスの抗体による中和機構は未だ十分解明されていないが、日本脳炎ウイルスに対してはウイルスを強力に中和する抗日本脳炎マウスモノクローナル抗体が複数の研究室で確立されている。最も強くウイルスを中和するモノクローナル抗体はほぼ 1ヶ所のエピトープを認識しているらしいと推測されている。この研究ではこの日本脳炎ウイルスを強力に中和できる抗体を産生させるエピトープの、ウイルス外被膜糖蛋白質 (E) 上での 3次元レベルで同定し、将来のフラビウイルスのワクチン開発に応用することを目的としている。

B. 方法

図 1 に示したように、遺伝子工学的手法を用いてウイルス外被膜糖蛋白質 (E) 遺伝子に多くの自然突然変異を導入した日本脳炎ウイルスを作成する。即ち、ウイルス RNA から逆転写酵素により 1 本鎖の cDNA を合成し Long-PCR 技術を用いて完全長の日本脳炎ウイルス cDNA を構築して行く。ただし E 遺伝子部位

は他の領域より多くの回数 (図のかっこ内の数字は増幅回数) 増幅することにより、Taq 酵素のミスによる突然変異を高い確率で E 遺伝子に導入する。このようにして得られた E 遺伝子上にランダムに遺伝子変が導入された完全長の日本脳炎ウイルス cDNA から、T7RNA 合成酵素を用いて感染性のリコンビナントウイルス RNA を合成し、エレクトロポレーション法で BHK 細胞に導入し、増殖してくるウイルスを回収する。回収したウイルスのカクテルに、日本脳炎ウイルスを強力に中和する能力のあるマウスモノクローナル抗体 (mAb503) を添加し、さらに培養する。この培養を 3 度繰り返した後、抗体により中和されなくなったリコンビナントウイルスを限界希釈法によりクローン化し、その E 蛋白質のアミノ酸変異を E 遺伝子の塩基配列を解読することによって確認する。さらにその変異ウイルスについて、モノクローナル抗体の Affinity assay を行い、抗体のと親和性を調べる。

(図 1) リコンビナントウイルスの作成手順

