

- 1) ウイルスゲノムの検出. 11 検体の血清から PCR(A)または PCR(B)でウイルスゲノムが検出されたのは4検体で、そのうち1検体(検体 4)は PCR(A)および PCR(B)でウイルスゲノム陽性を呈し、1 検体(検体 71)が PCR(A) でのみ陽性を呈し、2 検体(検体 2 および 8)が PCR(B) でのみ陽性を呈した(図 2).
- 2) CCHF ウイルスに対する IgG および IgM 抗体. 各検体における CCHF ウイルスに対する IgG および IgM 抗体の存在状況について、図 2 にまとめた. 検体 1 においては、血清量が少なかったため抗体の有無について検討できなかった. 残りの 10 検体についてまとめると、ウイルスゲノムが検出されたのは 4 検体で、そのうち IgG および IgM ともに陰性であった検体は 1 検体(検体 8)で、その他の 3 検体では、IgM または IgG のどちらか一方が陽性であった. 一方、ウイルスゲノムが検出なかった 6 検体では、IgG および IgM 抗体ともに陽性だったのは 3 検体、IgG のみが陽性であったのは 1 検体、そして、IgG と IgM どちらも陰性だったのが 2 検体であった.
- 3) CCHF 患者におけるウイルスゲノム、IgG および IgM 抗体の推移. 発熱が出現した日を day 0 とし、day 1 の検体はウイルスゲノム陽性を呈し、day 5 以降の血清は陰性を呈した. それとは対照的に、day 5 以降の血清は、IgG および IgM 抗体ともに陽性を呈した(表 2, 図 2).

D. 考察

限られた血清を用いて行われた RT-PCR および nested PCR の CCHF の診断における有用性に関する今回の検討から、以下の重要ないくつかの知見が得られた.

用いられるプライマーの塩基配列の違いにより、RT-PCR および PCR の結果が異なる. プライマーセット A は CCHF ウイルス分離株を広く検出できるものとして設計され、その塩基配列は IbAr10200 株の S-遺伝子の塩基配列に基づいている. しかし、今回の検討

で明らかにされたことは、このプライマーセットでは検出されない CCHF ウイルス野生株が存在することである. PCR(A)でのみウイルスゲノムが増幅される野生株が存在する一方、CCHF ウイルスの中国分離株である 8402 株の S-遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマーセット B を用いた PCR(B)でのみ検出される CCHF ウイルスも存在する. つまり、RT-PCR および PCR による診断の信頼性を高めるためには、プライマーの設計や組み合わせにおいて、更なる工夫が必要であることが示唆された.

RT-PCR および PCR で診断が可能なのは、IgG および IgM 抗体ともに陽性になる前の短い期間である. データは示していないが、IgG および IgM 抗体が陰性の検体 8 は、CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体を用いた抗原検出 ELISA で陽性を呈したが、IgG および IgM 抗体が陰性の検体 3 と 7 の 2 検体は抗原検出 ELISA で陰性を呈した. これらの成績および抗体の状況から、急性期の CCHF 患者から採取されたのは、検体 2, 4, 5, 8, 9, 71, 72 の 7 検体(検体 8, 9, 72 は同一患者から採取された)と考えられる(これらの検体は、IgM 陽性または PCR 陽性を呈している). 検体 3 および 7 が採取された患者は、CCHF 患者ではなく、CCHF ウイルスの既感染者でもないと考えられる. 検体 6 が採取された患者は、CCHF ウイルスに既感染であり、検体 71 が採取された患者は PCR(A) 陽性かつ IgG ELISA も陽性であったことから、CCHF ウイルス再感染による CCHF 患者であったと考えられる. 急性期の CCHF 患者から採取された血清であっても、PCR 陽性になるのは IgG および IgM 抗体が共に陽性になる前に採取された場合だけであった. IgM 抗体が出現する前に採取された血清または IgM 抗体のみ陽性の時期に採取された血清が、PCR 用の検体として用いられることができる.

比較的早期に抗体が出現する. 1 例の CCHF 患者から経時的に採取された血清での検討であり症例に限られているが、この症例では Day 5 の時点で既に CCHF ウイルスに対する IgG および IgM 抗体が陽性になった. これまでの報告でも day 9 の時点の

CCHF 患者では IgG 抗体が陽性であることが確かめられており、発症から抗体出現までの期間は相当短く、この事実は PCR の診断における有用性がこの短い期間にだけ認められることを示唆している。

CCHF ウイルス再感染による CCHF の診断に PCR は有用である。検体 71 が採取された患者は 70 歳の羊飼いで、発熱と出血傾向（点状の紫斑）を呈していた。PCR 陽性の時点で既に CCHF ウイルスに対する IgG 抗体が陽性であったことから、CCHF ウイルスの再感染による CCHF と考えられる。データを示していないが、検体 71 は抗原検出 ELISA で陰性を呈した。しかしながら、PCR(A) で本症例からウイルスゲノムが検出されたことから、CCHF ウイルス再感染によっても CCHF が発症することがあり、PCR がその診断に有用であることが示唆された。

E. 謝辞

本研究は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所唐青博士との共同で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1-7, 2001
- 2) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescent method for detection of Ebola virus immunoglobulin G, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 776-778, 2001
- 3) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Ebola viral antigen-detection enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39:3267-3271, 2001.

- 4) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 感染症免疫 31:240-242, 2001.
 - 5) Ikegami T, Calaor AB, Miranda ME, Niikura M, Saijo M, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. *Archives of Virology* 146:2021-2027, 2001.
 - 6) 森川 茂、西條 政幸、新倉 昌浩、倉根 一郎. ウイルス性出血熱と我国における検査体制. *ウイルス* 51: 215-224, 2001
 - 7) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Prehaud C, Morikawa S. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 40:372-375, 2002.
 - 8) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 化学療法の領域 18:354-358, 2002
 - 9) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology (in press)*
 - 10) Morikawa S, Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane, I. (2002): Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. *Virology (in press)*
- ##### 2. 学会発表
- 1) Morikawa S, Saijo M, Niikura M, Tang Q, Kurane I. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein. 6th International Conference on emerging infectious diseases in the pacific rim (Manila), 2001
 - 2) 前田 秋彦, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 池上 徹郎, 緒方もも子, 倉根 一郎, 森川 茂. ハンタウイルスの核蛋白(NP)とユビキチン様結合酵素 Ubc9 との結合様式. 第 132 回日本獣医学会、岩手、2001
 - 3) 池上 徹郎, Calaor Alan B, Miranda Mary E,

- 新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方もも子, 倉根 一郎, 吉川 泰弘, 森川 茂. 1996 年のフィリピン
のエボラウイルスレストン株流行施設内のサル
における抗体保有状況. 第 132 回日本獣医
学会, 岩手, 2001
- 4) 新倉 昌浩, 西條 政幸, 池上 徹郎, 倉田
毅, 倉根 一郎, 森川 茂. エボラウイルスサブ
タイプを区別できる単クローン性抗体の認識
する核蛋白上のリニアエピトープ. 第 49 回日
本ウイルス学会, 大阪, 2001
- 5) 池上 徹郎, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方も
も子, 倉根 一郎, 吉川 泰弘, 森川 茂. エボ
ラウイルスレストン株の組み換え核蛋白発現
HeLa細胞を用いたIFAの有用性. 第49回日
本ウイルス学会, 大阪, 2001
- 6) 西條 政幸, 新倉 昌浩, 前田 秋彦, 池上
徹郎, 倉根 一郎, 森川 茂. 組換え核蛋白を
用いたクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の診断と
中国における疫学的研究. 第 49 回日本ウイ
ルス学会, 大阪, 2001
- 7) 森川 茂, 西條 政幸, 倉根 一郎, 森川 茂.
クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの M セグメント
RNA の塩基配列. 第 49 回日本ウイルス学会,
大阪, 2001

表 1. CCHF ウイルスゲノム(S-遺伝子)の増幅のための RT-PCR, nested PCR に用いられたプライマーの塩基配列.

プライマーセット	プライマー名	プライマー塩基配列
A	F2	5' -TGGACACCTTCACAAACTC -3'
	F3	5' -GAATGTGCATGGGTTAGCTC -3'
	R2	5' -GACATCACAATTCACCAGG -3'
	R3	5' -GACAAATTCCTGCACCA -3'
B	F2/C	5' -TGGTAACTTTCACAAACTC -3'
	F3/C	5' -GAGTGTGCCTGGGTTAGCTC -3'
	R2/C	5' -GACATTACAATTCGCCAGG -3'
	R3/C*	5' -GACAAATTCCTGCACCA -3'

* :R3/C の塩基配列は, R3 のそれと全く同じである.

表 2. CCHF 患者から経時的に採取された検体の病期および各種検査結果.

発症からの日数(日)	1	5	9
PR-PCR および nested PCR	+	-	-
IgG-ELISA (OD ₄₀₅ at 1:100 dilution)	0.075	0.924	1.882
IgM-capture ELISA (OD ₄₀₅ at 1:100 dilution)	0.020	2.692	2.711

図 1. プライマーセット (F2/C, R3/C) および (F3/C, R2/C) を用いた PCR で増幅される CCHF ウイルスの S-遺伝子部位.

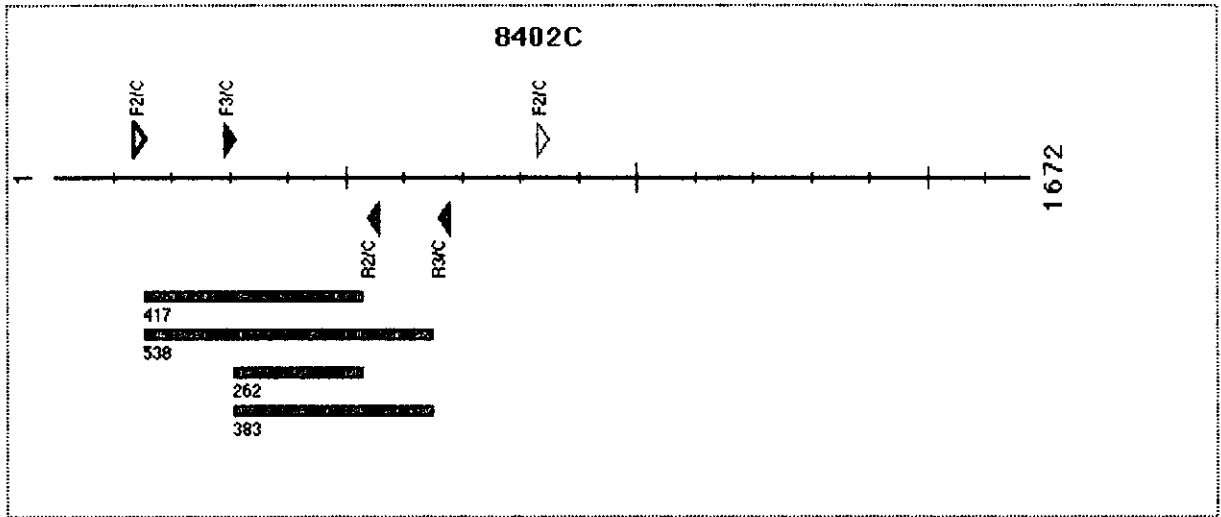
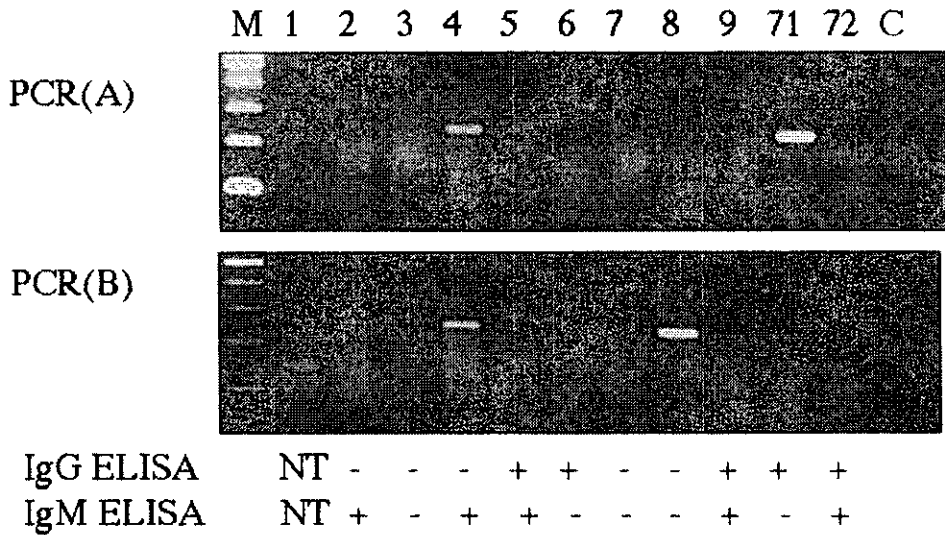


図 2. 各検体からの PCR(A) および PCR(B) によるウイルスゲノムの検出と CCHF ウイルスに対する IgG および IgM 抗体.



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：現在世界の熱帯地域の開発途上国における保健衛生面での最重要な節足動物媒介性ウイルスであるデングウイルスと日本脳炎ウイルス（JE）について、それぞれの病原性を分子レベルで明らかにし新たなワクチンの開発や診断法の開発に貢献することを目的にして上記 2 つのウイルス間で E 蛋白遺伝子を入れ換えたキメラウイルスを作成しその性状を検証した。本年度は初年度作製したデング 2 型と日本脳炎ウイルスのキメラウイルス（D2/JE）についてその生物活性をさらに詳細に解析するとともに、あらたにデング 4 型と日本脳炎ウイルスのキメラウイルス（D4/JE）の作製にも成功した。この 2 つのキメラウイルスは蚊培養細胞でよく増殖し、これらのキメラウイルスが高効率の診断用抗原供給に、あるいは不活化ワクチンへの利用に有用であることが判明した。一方、哺乳類細胞に感染させた場合はそれぞれ異なる増殖特性をしめした。即ち D2/JE 哺乳類細胞では孤児感染を示したが（初年度報告）、D4/JE は JE と同様の感染性をしめした。この原因として E 蛋白（デング由来）と NS1 蛋白（JE 由来）の相互作用の差異によることが示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスやデングウイルス感染症はアジアを含む熱帯の発展途上の国々において近年その患者数・流行地域が増加・拡大しており、わが国においても海外旅行者の増加に伴い輸入伝染病としてデング患者の発生が報告され、国際的な見地から見て公衆衛生上重要な感染症となっている。また地球温暖化に伴い、蚊で媒介されるこれらの疾患が日本を含む世界の温帯地域において拡大する可能性が懸念されている。

本分担研究では蚊媒介性ウイルス感染症のなかでも予防法の確立していないデングウイルス感染に焦点をあて、日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを作製し 1) 既存の培養細胞で増殖性が良く診断用抗原として有用なデングキメラウイルスを得ること、また 2) デングウイルスの治療法を改善するため、デングウイルスの病原性を分子レベルで解析することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

- 1) 回転培養法で大量に培養したヒトスジシマカ培養細胞クローン C6/36 細胞に日本脳炎ウイルスとデングウイルスを感染させ培養液中に産生されたウイルス粒子を CS レジン、蔗糖密度遠心勾配超遠心法などを用いて高純度に精製し、そこからウイルス遺伝子 RNA を抽出する。
- 2) 逆転写酵素を用いてウイルス遺伝子 RNA に相補的な一本鎖 cDNA を合成する。この一本鎖 cDNA から LongPCR 技術を用いてデングウイルスの M-E 遺伝子断片と日本脳炎ウイルスの 3' と 5' 末端の非翻訳領域、C、NS1～NS5 遺伝子部位の遺伝子断片を増幅精製しこれらをつなぎ合わせ完全長（11kb）キメラウイルス cDNA を作製する。
- 4) 上記の完全長のキメラ cDNA から T7 フェージの RNA 合成酵素を用いて試験管内でキメラウイルス RNA を作製し、これを

C6/36 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入し、数日間培養する。

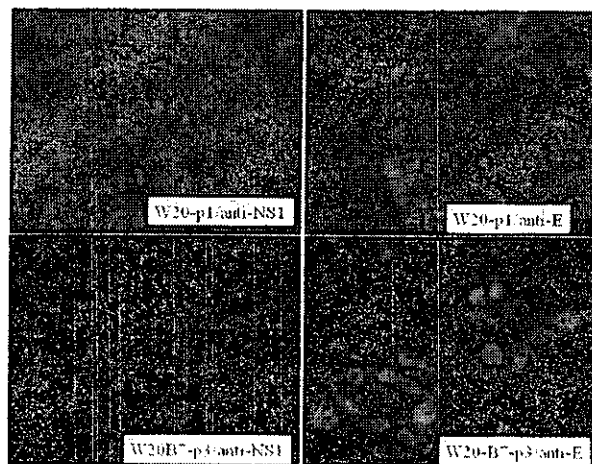
- 5) 培養した細胞を免疫学的に抗日脳、抗デング抗体で染色し、遺伝子 RNA 導入細胞内におけるウイルス関連蛋白の生産の有無を確認するとともに、細胞上清をあらたな培養細胞に接種し連続継代してキメラウイルスの増殖の状況を検証する。

C. 結果

- 1) D2/JE キメラウイルスの哺乳類細胞内での感染性状

初年度の研究で作製に成功した D2/JE キメラウイルスは蚊細胞では増殖するが哺乳類細胞では『みなし児感染』を起し感染細胞の継代を繰り返すことで哺乳類細胞でも感染・増殖をしめす様に変化したことは前年度に報告した。本年度はこれらの初代ウイルス(W20)と哺乳類細胞に適応したウイルス(W20B7)をそれぞれクローニングして、LLC-MK2 細胞でのウイルス蛋白質とくに E 蛋白質と NS1 蛋白質に焦点を当ててその動向を検証した。図 1 に示したように、クローン W20-p1 は LLC-MK2 内で E および NS1 蛋白の産生を開始するが、RER、ER、あるいはゴルジの中で塊になっており正常なウイルス糖タンパクの合成が障害されていた。一方、哺乳類細胞に適応したクローン W20B7-p3 では NS1 は塊のままであるが E 蛋白は親株の日本脳炎ウイルス感染細胞と同じように細胞質全体に広く存在していた。このことは通常 E 蛋白と NS1 蛋白は哺乳類細胞への感染では互いに何らかの相互作用を持っている事実を示すものと考えられる。上記の 2 つのクローンについてその塩基配列を調べたところ W20B7-p3 ではその E 蛋白上にアミノ酸の変異が見られた。おそらくこの変異によりデング E 蛋白は感染細胞内で正常な合成・運搬が行えるようになったものと考えられる。この現象は NS1 蛋白の感染サイクルにおける役割を考える上で極めて興味深い発見と考える。

(図 1) キメラウイルスの蚊細胞での増殖性

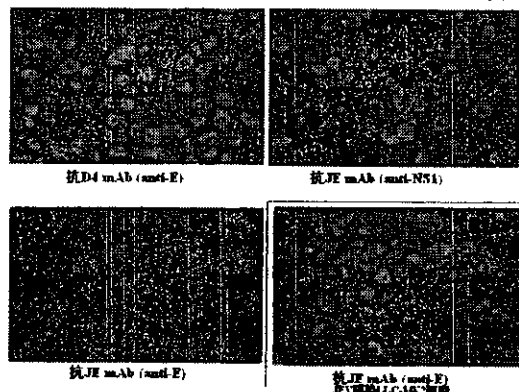


(感染後 12 時間)

- 2) D4/JE キメラウイルスの作製

本年度は昨年の D2 に加えて、D4 と JE のキメラウイルスの作製も行った。キメラウイルス遺伝子の構成は D2/JE の W20 と同じくデング 4 型の M-E 遺伝子領域を JE のそれと入れ換えたキメラウイルスを構築した。これにより得られた D4/JE ウイルスは D2/JE キメラと同じく蚊細胞でよく増殖した。しかし興味深いことにこのウイルスは最初から哺乳類細胞での増殖性を獲得していた。図 2 に示すように D4/JE キメラウイルスは哺乳類細胞 LLC-MK2 においても正常な E 蛋白(D4)と NS1 蛋白 (JE) の分布をしめしていた。

(図 2) D4/JE に感染した LLC-MK2 細胞の免疫染色



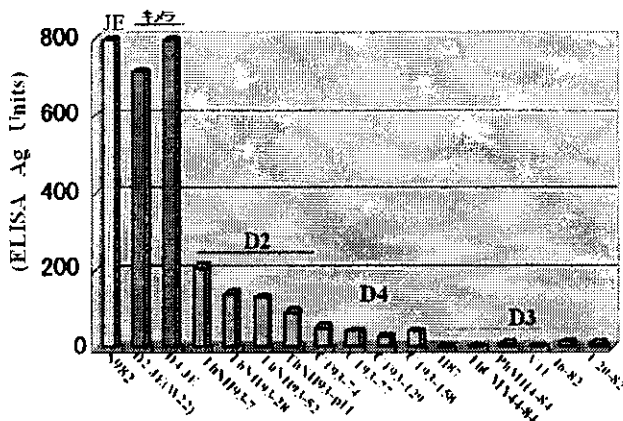
(感染後 12 時間)

この事実はデングウイルスの中でも D4 が最も JE に近いウイルスであることから、デング 4 の E 蛋白と JE の E 蛋白はそれぞれの本来の E と NS1 蛋白がもつ相互作用を維持できているためではないかと推論された。

3) キメラウイルスの抗原産生性

今までに作製したデングと日本脳炎ウイルスのキメラウイルス (D2/JE と D4/JE) について蚊培養細胞 C6/36 でのウイルス抗原産生性に対する評価を行った。その結果を (表 1) に示す。表から明らかな様にどのキメラウイルスも日本脳炎ウイルス親株の S982 株と同レベルの高い抗原産生性を示した。一方アジアの各国で分離されたデングウイルスは表の様に日本脳炎ウイルスやキメラウイルスと比較して 1 ~ 20% の抗原産生性しか示さなかった。とくにデング 3 型のウイルスは増殖性が低かった。これらの結果から日本脳炎ウイルスの遺伝子をベースとしてデングウイルスの M-E 蛋白を入れ換えたキメラウイルスは抗原作製などで有用な抗原供給源となることが示唆された。

(表 1) キメラウイルスとデング野生株の抗原生産量



D. 結論

- 1) デングウイルス 2 型および 4 型と日本脳炎ウイルスのキメラウイルス (D2/JE と D4/JE) を作製した。
- 2) D2/JE および D4/JE はともに蚊細胞でよく増殖したが哺乳類細胞では異なる増殖特性をしめした。
- 3) 両キメラウイルスの増殖性は蚊培養細胞では日本脳炎ウイルスと同じくらい極めて高いことが示された。

E. 考察

表 1 のようにデングウイルス特に 3 型は蚊細胞においても増殖性がわるく、診断抗原の作製やワクチン開発において支障をきたしている。今後は今回用いたのと同じ手法を用いてデング 3 型のキメラウイルスを作製する必要がある。

フラビウイルスの NS1 の機能についてはいまだ不明であるが、デングウイルスでは NS1 に対する抗体がデング感染防御に有効であることが知られている。今回、NS1 と E 蛋白の相互作用とウイルス粒子成熟の関与を示唆する結果が得られたことは今後 NS1 の機能解析とウイルス感染防御法開発への応用への道を開くものと期待される。

F. 健康危険情報

昨年 (平成 13 年) 当研究室にはデング熱・デング出血熱疑いの海外旅行者の血清診断依頼が多く特にアジア・太平洋地域では諸島地区 (フレンチポリネシアなど) も含めてデング 1 型の流行が確認されている。本邦においてデング媒介能力のあるヒトスジシマカが出現する 5 月以降は輸入デング患者からの 2 次感染による日本国国内での患者発生を警戒する必要がある。

G. 研究発表

1) 論文発表

Parquet M.C., Kumatori A., Hasebe F., Morita K. and Igarashi A. West Nile Virus induced bax-dependent apoptosis. FEBS Letters 500:17-24, 2001.

Morita K., Tadano M., Nakaji S., Kosai K., Mathenge E.G.M., Pandey B.D., Hasebe F., Inoue S., and Igarashi A. Locus of a virus neutralization epitope on the Japanese encephalitis virus envelope protein determined by use of Long PCR-based region-specific random mutagenesis. Virology 287:417-426, 2001.

森田 公一:最近 20 年間に出現した感染症と地球マップ. 総合臨床. 50 (3) : 427-430. 2001.

2) 学会発表

森田公一、長谷部 太、五十嵐 章:デングウイルスと日本脳炎ウイルスのキメラウイルスの作製とその性状解析:平成 13 年日本ウイルス学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

研究成果に関する一覧表

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Parquet M.C., Kumatori A., Hasebe F., Morita K. and Igarashi A.	West Nile Virus induced bax-dependent apoptosis.	FEBS Letters	500	17-24	2001
Morita K., Tadano M., Nakaji S., Kosai K., Mathenge E.G.M., Pandey B.D., Hasebe F., Inoue S., and Igarashi A.	Locus of a virus neutralization epitope on the Japanese encephalitis virus envelope protein determined by use of Long PCR-based region-specific random mutagenesis.	Virology	287	417-426	2001
森田 公一	最近 20 年間に 出現した感染症 と地球マップ.	総合臨床	50 (3)	427-430	2001

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

日本における西ナイルウイルスサーベイランス

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)
協力研究者 松本泰治、河合誠義、太田周司、横田勉、増田和茂*、田中義枝
(成田空港検疫所、*現 国立健康・栄養研究所)
櫻井紀夫、篠原栄里子、明石良信*
(千葉県中央家畜保健衛生所、*現 千葉県南部家畜保健衛生所)
倉根一郎 (国立感染症研究所)

研究要旨

西ナイルウイルスは、フラビウイルス科日本脳炎ウイルス血清型群に属し、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。そのため両ウイルス間には抗体の交叉反応がある。本ウイルスはアフリカ・ヨーロッパ・西アジアなど広い範囲で見つかっている。しかし、1999年、ニューヨークに出現するまで、アメリカ大陸での報告は無かった。米国ではその後、西ナイルウイルス(WNV)が定着し2000年、2001年の夏も流行し、東部諸州に拡大した。しかし、その侵入ルートは明らかではない。侵入ルートの特定は感染症対策にとって重要であるが、そのためには侵入前のデータが不可欠である。また、日本脳炎ウイルスの常在する本邦においては、侵入を防止する必要もある。そこで我々の確立した西ナイルウイルスに関する実験室診断法を用いて、日本でのWNVのサーベイランスを実施した。

A. 研究目的

一般にフラビウイルス科のウイルス間では抗体の交叉反応がある。西ナイルウイルス(WNV)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近縁である。

西ナイルウイルスは、フラビウイルス科日本脳炎ウイルス血清型群に属し、アフリカ・ヨーロッパ・西アジアなど広い範囲で見つかっている。しかし、1999年、ニューヨークに出現するまで、アメリカ大陸での報告は無かった。米国ではその後、西ナイルウイルス(WNV)が定着し2000年、2001年の夏も流行した。しかし、その侵入ルートは明らかではない。侵入ルートの特定は感染症対策にとって重要であるが、そのためには侵入前のデータが不可欠である。そこで

我々の確立した診断法を用いて、日本でのヒト・蚊・カラスに関して西ナイルウイルスのサーベイランスを実施した。

B. 研究方法

1. 診断方法

IgM 捕捉 ELISA 法

Vero 細胞に接種し、細胞変性効果が十分出現した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)をコー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) ヒト血清中の黄熱ウイルスに対するIgMと反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗フラビウイルス抗体(IgG抗体:D1-4G2-4-15)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る。

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。)

RT-PCR 法

(1) プライマーの設計

フラミンゴから分離した WNV (NY strain) の配列から、Oligo™ Primer Analysis Software (Molecular Biology Insight, Inc.) を用いて以下のプライマーを設計した。

① WNNY514/904

CggCgCCTTCATACACA/
gCCTTTgAACAgACgCCATA

また、NS3 領域の

- ② Fla - U5004/Fla - L5457 (T. Briese et al. Lancet 354, 1261-1262, 1999)
5' -ggAACDTCMggHTCNCCHAT-3'
5' -gTgAARTgDgCYTCRTCCAT-3' も併用した。

また、ヒトおよびカラスの抗体価測定には、血球凝集抑制試験を用いた。

2. サーベイランス

上記の診断法を用いて米国東海岸からの帰国者および成田空港周辺のサーベイランスを実施した。

2,000 年より夏季に成田空港にて、熱等の症状の有る方や蚊にさされた記憶があり心配な方に血液検査 (ウイルス分離、PCR による遺伝子検出、特異的 IgM 抗体検査、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体検査) を実施する旨を呼びかけ (図 1)、さらに空港施設内およびその周辺の蚊を採集し感染蚊の有無を PCR 法にて検査した。また、千葉県中央家畜保健衛生所で採取したカラスの血清に関して HI 抗体の有無を確認した。

C. 研究結果

1. サーベイランス

① ヒトサーベイランス

米国東海岸からの帰国者に関しては、3名の申し出があり、ウイルス分離、PCR 法による遺伝子診断および IgM 抗体による血清診断を実施したが、いずれも陰性であった。

② 蚊のサーベイランス

蚊については採集したイエ蚊族 124 プール、計 3557 匹を PCR 法によりスクリーニングしたが WNV および日脳ウイルスともに陰性であった (図 2)。

③ カラスの抗体調査

102 羽のカラス (オス 51 羽、メス 51 羽) の血清に関しても、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルスに対して HI 抗体陰性であった。

D. 考察

西ナイルウイルスが日本に侵入した場合、日本には近縁の日本脳炎ウイルスが存在するため診断上混乱が生じることが想定される。そのため、まず実験室診断法を確立した。血清診断法としては、中和抗体測定以外に、IgM 捕捉 ELISA 法が、日本脳炎との鑑別診断として使えることが確認できた。また、病原体診断法として、ウイルス分離以外に遺伝子診断の目的で、エンベロープ領域のプライマーを作製し、すでに報告のある NS3 領域のプライマーと併用することにし、実際に成田空港および周辺のイエ蚊のサーベイランス調査を実施した。その結果、2000 年夏現在で西ナイルウイルスの日本への侵入を疑わせる結果は得られなかった。また、102 羽のカラスの血清に関しても西ナイルウイルスに対する HI 抗体陰性であった。従って、2000 年夏期の時点で成田空港経由で日本に西ナイルウイルスが侵入した可能性は低いと考えられる。

西ナイルウイルスのニューヨークへの侵入ルートは依然として特定されていない。事前に宿主やベクターになりうる動物・昆虫に関する調査があつて、はじめてその侵入ルートが特定でき、侵入を確認した後のより迅速な対応が可能になると考えられる。今回は研究の一環として、限局的ではあるが日本における西ナイルウイルスに対するサーベイランスを実施した。その結果、西ナイルウイルスの侵入は認めなかった。しかしながら、このようなサーベイランスは、バイオエマージェンシーへの対応として、行政レベルで実施されることを要望する。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

西ナイル脳炎ウイルスとは
高崎智彦. 感染症と化学療法 5(8) 39-42 (2001)

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Mikio Nakayama, Yoko T. Arai, Kinjiro Morimoto, Sadao Yabe, Ichiro Kurane: Demographic features of imported dengue fever cases serodiagnosed in Japan during 2000. *Journal: Dengue Bulletin WHO.* 24 42-45, 2001

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Increase in the sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell culture. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* 3 470-471, 2001

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Virus isolation as one of the diagnostic methods

for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24(3):203-209

Itou M, Itou T, Sakai T, Santos MF, Arai YT, Takasaki T, Kurane I, Ito FH: Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 63(12): 1309-1313 (2001)

Mikako Ito, Yohko T. Arai, Takuya Itou, Sakai Takeo, Fumio H. Ito, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane : Genetic Characterization and geographical distribution of rabies virus isolated from Brazil: Identification of two reservoirs *Virology.* 284, 214-222 .2001

2. 学会発表

高崎智彦、根路銘令子、新井陽子、山田堅一郎、森本金次郎、中山幹男、倉根一郎 「日本脳炎ワクチンの西ナイル脳炎発症予防効果」第49回日本ウイルス学会 2001年11月

高崎智彦 「ニューヨークにおける西ナイル脳炎/今なにをすべきか」(第36回日本脳炎生態学研究会(石川県七尾市)2001年5月

倉根一郎、高崎智彦:日本における節足動物媒介性ウイルス感染症の現状と問題点. 第70回日本衛生動物学会(山形)2001年4月

図1

2000-2001年夏季の 成田空港における対策

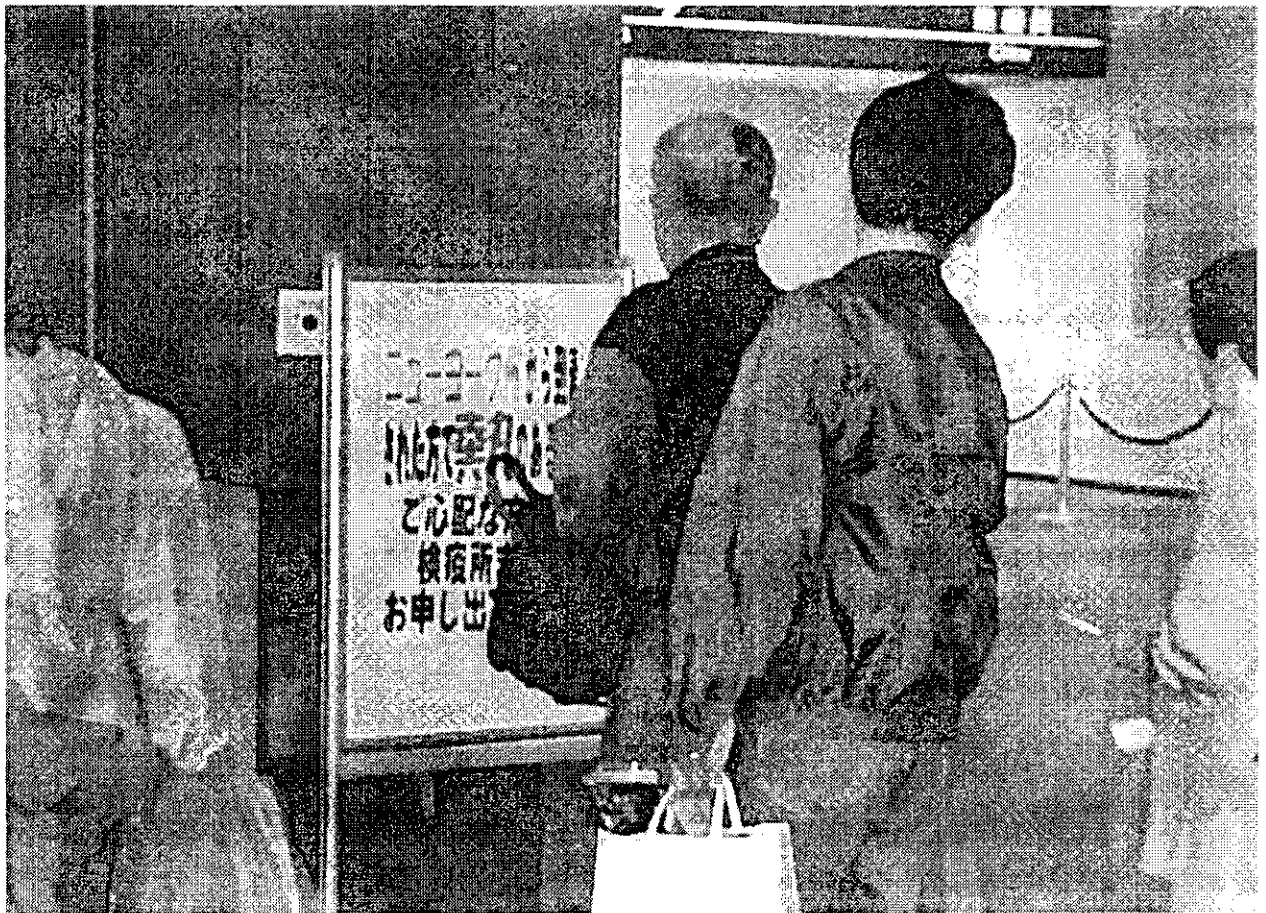
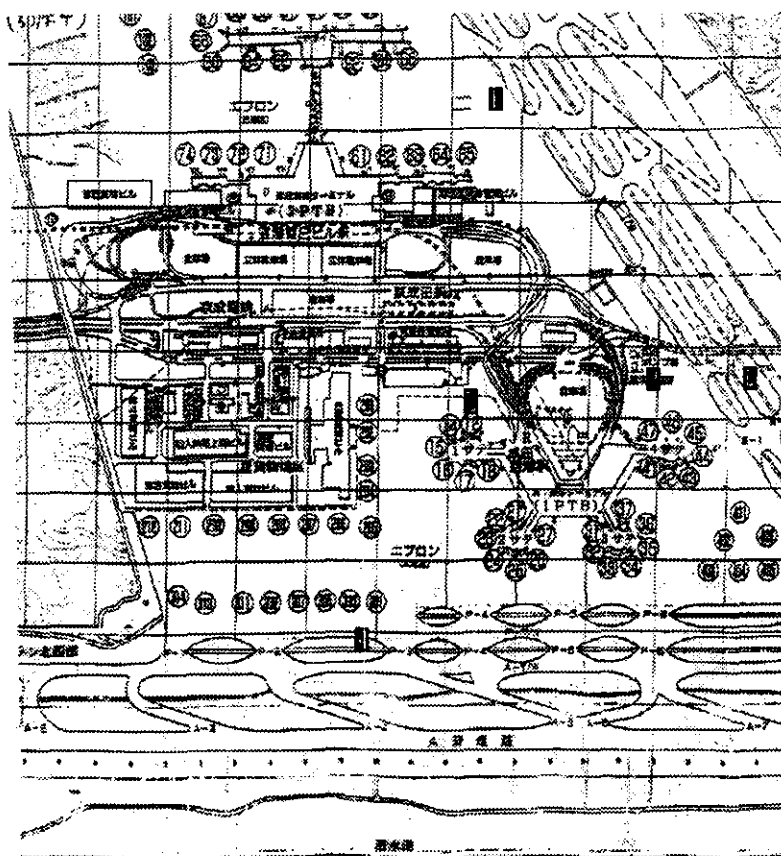


図2. 成田空港およびその周辺における
ウエストナイルウイルスサーベイランス(蚊)

採取場所



- 第2旅客ターミナル
- 貨物地区
- 第4サテライト
- 滞水地
- Aラン北西部
- 措置場
- JAL整備場

採集時期	Pool数	蚊の種類		♀	♂	♀ & ♂
4月～8月	68	アカ、コガタアカイエカ	合計匹数	1554	NT	NT
9月～10月	56	アカ、コガタアカイエカ	合計匹数	1685	318	2003
4月～10月	124			3239	318	3557

日本における日本脳炎ウイルス不顕性感染者の割合 (続報)

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

共同研究者 鈴木智之（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 昨年の疫学調査に引き続き、今回は都市部と農村部住民における日本脳炎ウイルス（JEV）自然感染者の割合を比較するとともに、ペア血清における抗体変動量から陽転後の抗体保有期間、および1年間に受ける自然感染の頻度を推定した。調査対象とした検体は、年間の日本脳炎患者数が20から30人であった1981年から1983年に採取された血清である。NS1抗体を測定した結果、陽性率は9.9%（都市部）及び20.6%（農村部）であり、農村部に高い自然感染者の割合が認められた。1年間隔で採取された314組のペア血清を用いてNS1抗体変動量を解析した結果、抗体陽転から抗体陰転までの期間は、約2年と推定された。NS1抗体陽性率と、NS1抗体保有期間から、1年間に受ける自然感染の頻度は、約5%（都市部）または10%（農村部）と計算された。西日本における自然感染率を平均7.5%と仮定すると、1982年前後の人口と患者数から、不顕性感染：顕性感染の比率は200,000:1と推定された。この比率は、ワクチンを受けていない集団において報告されている比率（25:1から1,000:1）の200から8,000倍であり、現行の日本脳炎不活化ワクチンの効力を示す。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）は、アジアに分布する蚊媒介性フラビウイルスである。感染を受けたヒトの多くは不顕性感染にとどまるが、25から1000人に1人が急性脳炎症状を呈する。わが国が開発した日本脳炎不活化ワクチンは世界的に認められている唯一のワクチンであり、過去に韓国とタイ国で臨床試験された。この試験においては、ワクチン接種群と接種していない対照群が同等の感染を自然界から受けているという前提のもとに効力が評価された。しかし、より正確に効力を求めるためには、自然界からの感染を受けた集団における患者発生頻度を、ワクチン接種群と非接種群において比較しなければならない。

我々は、これまでに不活化ワクチン接種者集団の中で自然感染を受けたヒトを識別するために、JEV非構造蛋白の1つであ

るNS1に対する抗体を測定する方法を開発してきた（平成11年度厚生省科学研究費補助金「デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究」研究報告書『日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1抗体測定系の確立』）。昨年度の疫学調査に引き続き、本年度は都市部と農村部の日本脳炎ウイルス（JEV）自然感染者の割合を比較するとともに、ペア血清を用いた抗体変動量から抗体保有期間を推定し、1年間に受ける自然感染の頻度を推定した。さらに、年間の患者発生数から自然感染を受けた集団における患者発生頻度を求め、過去に報告されているワクチン非接種群における患者発生頻度と比較した。

B. 研究方法

血清： 調査対象の血清は、1981年に神戸大学医学部附属病院中央検査室より分与

を受け当講座に保管してあった 770 検体 (Takahashi et al., *Japanese Journal of Parasitology* 34, 87-92, 1985) および 1982 年と 1983 年に神戸市の北西に位置する兵庫県三木市の 4 地区で採取された血清 530 検体 (Konishi and Takahashi, *International Journal of Epidemiology* 16, 277-281, 1987) である。前者の血清を媒介蚊の少ない都市部住民血清として、また後者の血清を媒介蚊の発生源となる水田の多い農村部住民血清として用いた。三木市の 4 地区において、媒介蚊であるコガタイエカが 1982-1983 年の夏季に多く発生したことは、すでに報告されている (Konishi, *Journal of Medical Entomology* 26, 294-300, 1989)。また、抗体変動量を調べるために、1982 年から 1985 年に兵庫県三木市で 20 歳以上の 137 人から 1 年間隔で採取された 314 組のペア血清 (Konishi, *Microbiology and Immunology* 33, 403-411, 1989) を用いた。

NS1抗体測定法: 平成12年度厚生省科学研究費補助金「デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究」研究報告書『日本における日本脳炎ウイルスの不顕性感染者の割合』に記載した方法に準じて、血清中のNS1抗体価を測定した。

中和試験: 中和抗体価は、Vero細胞を用いて、90%プラーク減少法により測定した。(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会により承認された。(承認番号第81号)

C. 研究結果

NS1抗体保有率: 770検体の都市部住民血清および530検体の農村部住民血清を対象としてNS1抗体を測定した結果、それぞれ9.9%および20.6%であり、農村部に有意に高い抗体保有率が認められた($P < 0.001$)。農村部におけるJEV感染の高い頻度は、コガタイエカの高い発生率と関係すると考えられる。図1は、男女別、年齢別NS1抗体保有率を示す。都市部、農村部住民血清のそれぞれにおいて、年齢、性に関わらず、ほぼ一定したNS1抗体保有率であった。農村部住民の60歳代の集団に抗体保有率の低い

傾向がみられるが、有意ではなかった。各集団において、すべての年齢層が男女ともほぼ同じ率でJEVの自然感染を受けていたことは、蚊媒介性疾患の特徴であると考えられる。

NS1抗体保有期間: 1年間隔で採取された314組のペア血清を用いて、抗体価の1年間の変動量を調べた(図2)。大多数(82%、192/234)の陰性血清は1年後も陰性であったが、18%(42/234)は陽転した。この集団において、18%が1年以内に感染を受けたことを示す。また、陽転したものについて変動量を指数平均(Log₂)すると、上昇値は1.69であった。この結果は、NS1抗体陰性の個体が1年以内にJEVの暴露を受け不顕性感染に終わったとき、NS1抗体価は平均約1:20まで上昇することを示す。一方、すでに陽転した血清における1年後の変動については、抗体価の高い血清ほど翌年に大きな抗体価の低下を示した。1:40、1:20および1:10のNS1抗体価をもつ血清は、指数平均値で、それぞれ2.18、0.80および0.32の減少を示した。すなわち、1:40や1:20の抗体価をもつ血清は1年後に平均1:10に低下することを示す。

NS1抗体価の年間変動量に基づいて、陽転した抗体価の年次変動をシミュレートし、抗体が陰転した血清の割合と陰転までの年数から平均抗体保有期間を算出した。すなわち、図3の抗体価頻度分布に示されるように、陽転した血清のうち1年後には52%、2年後には23%、さらに3年後には12%が陰転した。このようにして求められた各年の新たなNS1抗体陰性者割合と陰転までの年数から、平均抗体保有期間を2.0年と算出した(表1)。

年間自然感染率: NS1抗体保有率をNS1抗体保有期間(2年)で割ることにより、それぞれの年間のJEV自然感染率は、5.0%(都市部)および10.3%(農村部)と推定された。

また、中和抗体の保有期間を204組のペア血清(中和抗体保有率:52.6%)を用いて、NS1抗体保有期間と同様に求めた結果、5.6年と算出された。中和抗体保有率を中和抗体保有期間で割ることにより、年間のJEV自然感染率は農村部住民において9.4%と推定された。

D. 考察

厚生省の日本脳炎流行予測調査の中で報告されているように、西日本におけるブタのJEV抗体保有率は依然として高く、自然界においてJEVの伝播サイクルは回りつづけている。したがって、ウイルス保有蚊の刺咬によりヒトもJEVの曝露を受けていることが考えられる。しかし、日本における患者発生数は近年少なくなり、本研究で対象とした血清が採取された1981年から1983年においては、年間20から30人の状態であった。近年患者数が減少した理由として、ワクチン接種の他、水田の減少、媒介蚊の駆除、養豚場立地条件の改善などによるヒトと媒介蚊の接触頻度の減少が考えられている。本研究で都市部住民においては推定約5%、農村部住民においては約10%の集団がJEVの自然感染を受けていることが明らかにされ、ワクチン接種の意義が再確認された。

抗体保有期間の算出は、多数のペア血清で得られた抗体価の変動データに基づいた。この算出方法は我々の知る限り過去に用いられたことはなく、今回新たに試みた方法であるが、1個人の抗体価を長期追跡する本来の方法に準ずる抗体保有期間算出法と考えている。農村部住民を対象としてNS1抗体から求められた年間自然感染率は、中和抗体から求められた率とほぼ同じであった。中和抗体による推定はワクチンの影響が否めないが、20歳以上はワクチン追加接種を受ける人が少ないと思われ、その影響は少ないと考えられる。

年間の新たな自然感染者の割合を平均7.5%とすると、日本脳炎汚染地域の多い西日本が1982年に約6,000万人であったことから、年間感染者数は450万人存在したことになる。一方、1982年の患者数が全国で21名であったことから、不顕性：顕性感染者は200,000:1と計算される。日本脳炎はワクチンを受けていない集団の内で不顕性感染を受けた25から1,000人に1人の割合で発症するといわれるので、ワクチン接種により不顕性：顕性感染者の比率が200から8,000倍増加したことになる。不顕性：顕性感染者の比率の増加は、日本脳炎不活化ワクチンの効力を示す。

E. 結論

日本脳炎汚染地域において、1981年から1983年には住民は自然界からJEVの曝露を比較的頻繁に受けていたことが明らかにされた。しかし、ワクチンにより発症は防御され、西日本全体で同様の自然感染率を仮定すると、不顕性：顕性感染者の比率が200,000:1となることが推定された。

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

Konishi E. and Fujii A.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine* 20, 1058-1067 (2002)

2. 学会発表

Konishi E. and Fujii A., and Kurane I.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. The 35th Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Cooperative Medical Science Program. Hawaii (2001).

Konishi E.: DNA Vaccines Against Japanese Encephalitis and Dengue. The 10th International Congress on Infectious Diseases. Singapore (2002).

奴久妻智代子、網代直子、小西英二: Vaxfectinによる日本脳炎DNAワクチンの中和抗体誘導能促進。第49回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2001)。

鈴木智之、奴久妻智代子、小西英二: 日本人における日本脳炎ウイルス不顕性感染率の推定。第49回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2001)。

小西英二: 日本脳炎DNAワクチン: はたして実用化されるのか? 第49回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2001)。

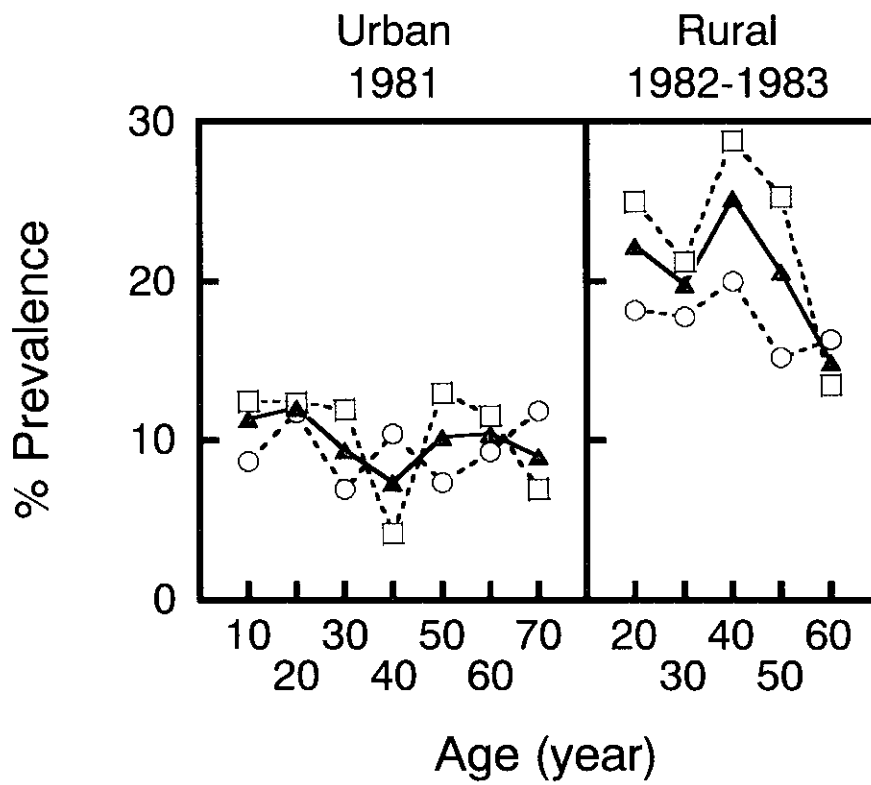


図1. 都市部及び農村部住民におけるNS1抗体陽性率。男（白丸）、女（白四角）及び全体（黒三角）における陽性率を年齢別に示した。

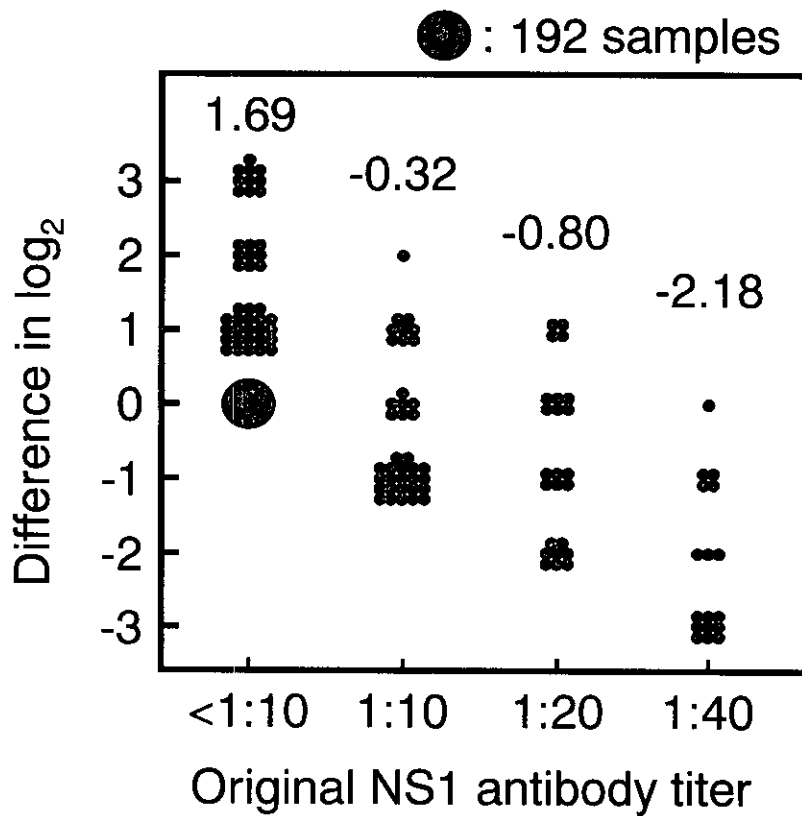


図2. 1年間隔で採取された314組のペア血清における抗体価と変動量の関係を示す散布図。変動量は、 \log_2 で表した。すなわち、1は2倍、2は4倍の変動を示す。また、図内の数字は変動量の指数平均値を示す。陰性血清 (<1:10) については陽転 (1年後に抗体価が上昇)したもののみを対象として平均を求めた。