

Ⅱ. 分担研究報告書

ヒト血清中の日本脳炎ウイルス NS1 抗体を測定する ELISA 法：
基礎的条件の確立と評価

研究分担者 小西英二（国立大学法人神戸大学・准教授）

研究要旨 ヒトにおける日本脳炎ウイルス（JEV）自然感染率の調査は、JEV の自然界における活動状況の把握及び今後の予防戦略に重要である。JEV の非構造蛋白の 1 つである NS1 に対する抗体は、ワクチン接種集団中の自然感染個体を識別するマーカーとなる。本研究では、ヒト血清中 NS1 抗体を測定する ELISA 法の基礎的条件の確立と評価を目的とした。ELISA 値は、血清希釈度依存性の反応曲線を示し、JE 患者において高く、陰性対照では低かった。陰性対照で得られた ELISA 値の分布から、0.185 をカットオフ値として設定した。従来法である免疫染色法との間に認められた相関係数は 0.764 ($P < 0.001$)、一致率は 82.5 % であった。NS1 抗体陽性の血清はウエスタンブロット解析において、NS1 の分子量の位置にバンドを検出した。以上より、不顕性感染によりヒトに誘導された NS1 抗体が、ELISA 法により測定可能であることが示された。また、連続血清における ELISA 値の経時的変化から、NS1 抗体保持期間は 4.2 年と推定された。客観的かつ簡便な ELISA 法は、JEV の自然感染率の調査に寄与することが期待できる。

A. 研究目的

日本脳炎は蚊媒介性疾患であり、その病原体は日本脳炎ウイルス（JEV）である。高熱、頭痛、意識障害を主徴とし、致死率（約 20 %）が高く、生残者の半数に精神神経学的後遺症を残す。日本における年間患者数は、1960 年代中頃まで 1,000 例以上であったが、日本脳炎不活化ワクチンの普及後は激減し、1992 年以降は年間 10 例未満である。このことはワクチン接種により流行がコントロールされてきたことを示す。しかし、ワクチン接種後に見られた重篤な ADEM 症例から、平成 17 年に厚生労働省は、ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについての緊急勧告を発表した。平成 19 年度の 4 歳児以下におけるワクチン接種率は約 10 % であり、小児における患者の発生が危惧さ

れる。このような状況下で、ヒトにおける JEV 自然感染率の調査は、JEV の自然界における活動状況の把握及び今後の予防戦略に重要である。現在はワクチン接種率が低いために非接種者の中和抗体陽性率から自然感染率を推定できるが、対象は主として 4 ～ 5 歳児以下になることとワクチン接種率が再び高くなってからの調査を考えると、ワクチン接種集団中の自然感染個体を識別する方法が必要となる。

ワクチン接種集団中の自然感染個体を識別する方法として、非構造蛋白に対する抗体を測定する方法がある。不活化ワクチンは、構造蛋白に対する抗体のみを誘導するが、一方感染を受けると構造蛋白に加え、非構造蛋白に対する抗体も誘導されるため、非構造蛋白に対する抗体は感染のマーカー

となる。当研究室では、非構造蛋白の一つである NS1 を対象とし、ヒトおよびウマにおける NS1 抗体を測定する免疫染色法を確立した。しかし、免疫染色法は手技がやや煩雑で結果を肉眼で判定するなどの問題点があった。ウマにおいては、より客観的かつ多数検体処理可能な ELISA 法を確立できたが、ヒト血清では非特異反応が高く、不顕性感染により誘導された低レベルの NS1 抗体を検出することが困難であった。本研究では、疫学調査に有用であるヒト血清中の NS1 抗体を測定する ELISA 法の確立を目的とした。

B. 研究方法

ヒト血清：JEV 感染陽性対照として、タイ国人および韓国人 JE 患者血清 10 検体を用いた。陰性対照として、黄熱ワクチン未接種米国人健康者血清 40 検体を用いた。これらの米国人は、日本脳炎不活化ワクチンの米国導入に際して行われた安全性・効力評価試験の被験者で、フラビウイルスに対する抗体を保有していないことが証明されている。また、免疫染色法により NS1 抗体価が既知である、兵庫県三木市住民血清を 525 検体用いた。

動物血清：過去の実験において動物から採取した血清の残りで 30℃ に保存していたものを使用した。マウス血清は、8 週令の ICR マウス (5 頭) に 10,000 LD₅₀ の北京 P3 株を腹腔内に接種することにより攻撃し、攻撃の 2 日前、及び攻撃後 2, 4, 6, 8, 11, 14, 21 日目に眼窩静脈叢より採血して得た。ブタ血清は、3 ヶ月齢のブタ (クラウンミニ系) に 2×10^6 PFU の JEV 新鮮分離株により攻撃し、1 日間隔で採血して得た。サル血清は、カニクイザル (2 頭) に 1×10^6 PFU の JaTH160 株を経鼻接種することにより攻撃し、攻撃直前、及び攻撃後 6 週目まで毎週採血して得た。

NS1 抗体測定 ELISA 法：日本脳炎ウイ

ルス中山株の NS1/NS2A 遺伝子を CHO 細胞に導入して得られた NS1 連続発現細胞の培養上清よりアフィニティー精製した NS1 を ELISA の抗原に使用した。ウエルあたり 10 ng をマイクロプレートに感作し、希釈液 (0.05 M Tris, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween20, 0.2 % カゼイン, pH 8.0) を用いて 37℃ で 30 分間ブロッキング後、1:100 希釈のヒト血清を 37℃ で 1 時間反応させた。その後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体、パラニトロフェニルリン酸を順次反応させ、吸光度を測定した。非特異反応を除くために、各検体について抗原を感作しないウエルを設け、抗原感作したウエルの吸光度と非感作ウエルの吸光度の差を求めた。プレート間誤差を補正するために、陽性コントロールを同時に測定し、吸光度が 1.0 となるように各検体の吸光度を補正した値を ELISA 値として表した。

ウエスタンブロット：精製 E および NS1 抗原を非還元下において 10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。転写後、ヒト血清、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体、ニトロブルーテトラゾリウムを順次反応させた。

中和試験：Vero 細胞を用いた 90% ブラーク減少法により、血清中の中和抗体価を測定した。

(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倫理委員会において承認された。また、動物血清を採取した実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された後に実施した。

C. 研究結果

測定の基礎的条件：一般的に行われている標準的な術式を踏襲した。ウエルあたりに結合可能な抗原量を調べた結果、10 ng は全て結合したが、20 ng は結合しなかつ

たため、プレート感作に用いる抗原量はウエルあたり 10 ng に決定した。ヒト血清による非特異反応は、希釈液にカゼインを用いることにより低減できた。一点法で使用する血清希釈度は、陰性対照において非特異的反応が見られず、かつ三木市住民血清を用いた予備実験において再現性が最も良かった 1:100 を採用した。

反応曲線：JE 患者、米国人健常者、および三木市住民の血清を対象として NS1 抗体を測定した (図 1)。ELISA 値は、血清希釈度依存性の反応曲線を示し、JE 患者血清において高く、米国人健常者血清では低かった。ここで用いた 2 検体の三木市住民血清は、JE 患者血清より低く米国人健常者血清より高い反応性を示した。

陽性判定のカットオフ値：ELISA 法におけるカットオフ値を決定するため、米国人健常者血清 40 検体を測定した。その結果、ELISA 値の平均は 0.0167、標準偏差は 0.0473 であり、確率水準 0.1 % の信頼限界である 0.185 をカットオフ値として設定した (図 2)。一方、対照として使用した 10 検体の患者血清の ELISA 値は、0.567 から 1.45 であり、明確に区別できた。

免疫染色法との比較：ELISA 法を評価するために、従来の NS1 抗体測定法である免疫染色法による NS1 抗体価が既知の三木市住民血清を用いて、ELISA 法と比較した (図 3)。両測定法間の相関係数は、0.764 ($P < 0.001$) であり、結果の一致率は 82.5 % (表 1) であった。相関係数が期待されるほど高くなかったのは、染色法では肉眼による抗体価の判定にある程度の主観が入り、測定結果においてより大きな変動を生じるためと考えられた。

ウエスタンブロットによる NS1 抗体の確認：ウエスタンブロットは、抗原を分子サイズにより分画した後に抗体と反応させるため、より正確な抗体検出法となる。ELISA 法で NS1 抗体陽性と判定された検

体をウエスタンブロットで調べた結果、NS1 の分子量の位置にバンドを検出した (図 4)。この結果は、ELISA で NS1 抗体陽性と判定される検体中に、NS1 抗体が存在することを示す。また、陰性と判定された検体では、NS1 のバンドは検出できなかった。

JEV 感染した動物血清中の NS1 抗体の測定：NS1 抗体を測定する ELISA 法をさらに評価するために、JEV を実験感染させたマウス、ブタ、サルより経時的に採取した血清を測定した (図 5)。マウスおよびブタでは感染後 6 日目、サルでは感染後 4~5 週目から NS1 抗体の上昇が見られた。従来の NS1 抗体測定法である免疫染色と比較すると、マウスにおいては検出可能となる時期がやや遅かったが、サルにおいては同時期に検出可能であった。ELISA 法による NS1 抗体は、サルの 1 頭において中和抗体と同時期に検出され、別のサル 1 頭、マウスおよびブタにおいては、中和抗体に遅れて検出された。

NS1 抗体保持期間の推定：NS1 抗体保持期間 (ELISA 値が陽転してから陰転するまでの期間) を求めるために、三木市住民から 1 年間隔で採取された血清を測定し、ELISA 値の差から増減の分布を得た。増減の平均値は 0.00571、標準偏差は 0.0750 であり、確率水準 1 % の信頼限界である 0.181 を有意な上昇とした。ELISA 値が陽転し、かつ 0.181 以上の上昇を示した検体は 7 検体であり、その増加幅の平均値は 0.405 であった。初年の ELISA 値が陽性であり、次年に下降した検体は 23 検体であり、その減少幅の平均値は 0.0976 であった。1 回の感染により上昇する抗体量を反映した増加幅 0.405 を、1 年で減少する抗体量を反映した減少幅 0.0976 で割って得られた 4.2 年を NS1 抗体保持期間と推定した。

D. 考察

患者血清中の NS1 抗体を測定する ELISA 法は報告されていたが、不顕性感染を捉える ELISA 法の報告はこれまでなかった。今回、健康診断で採取された三木市住民の血清を用いて ELISA 法を検討した結果、血清希釈度依存性の反応曲線が得られ、従来の NS1 抗体測定法である免疫染色法との間に有意な相関が認められた。また、ELISA 法で NS1 抗体陽性と判定された血清はウエスタンブロット解析において、NS1 の分子量の位置にバンドを検出した。以上より、不顕性感染によりヒトに誘導された NS1 抗体が、ELISA 法により測定可能であることが示された。

免疫染色法では、結果を肉眼で判定するのに対し、ELISA 法では吸光度で客観的な結果を得る。また、免疫染色法と比較して操作が簡便であることから、ELISA 法が疫学調査により適していると考えられる。ヒト血清中 NS1 抗体を測定する ELISA 法の確立により、ワクチン接種の有無に関係なく多くの国民を対象とした JEV の自然感染率の調査が可能となり、わが国における日本脳炎のワクチン行政に寄与することが考えられる。

E. 結論

ヒト血清中の NS1 抗体を測定する ELISA 法の基礎的条件を確立し、患者や一部の住民血清において測定可能であることを示した。

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

Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine

to prevent Japanese encephalitis. Vaccine 26, 2772-2781, 2008.

Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. Pediatric Infectious Disease Journal 27, 769-770, 2008.

Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi Yamanaka: Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions. Japanese Journal of Infectious Diseases 61, 410-411, 2008.

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。臨床と微生物, 36, 41-44, 2009,

小西英二: 日本脳炎 DNA ワクチンの開発。臨床獣医, 27 (3), 22-26, 2009

2. 学会発表

Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, Eiji Konishi: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program. May, 2008

山中敦史、酒井陽平、小西英二: インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008 年 5 月

北井陽子、近藤高志、小西英二: ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法。第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008 年 5 月

Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二：日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中のWNV特異NS1抗体測定：ブロッキングELISA法とCDC法の評価。第15回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会。2008年10月

宮川優子、山中敦史、小西英二：デング2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的NS1抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

桑原三和、小西英二：日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月

Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Eiji Konishi: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Aryati, Puspa Wardhani, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Eiji Konishi: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Peter W. Mason, Douglas Widman, Tomohiro Ishikawa, Nigel Bourne, Ryosuke Suzuki, Evandro Winkelmann, Ilya Frolov, Ricardo Carrion, Eiji Konishi: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, January 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

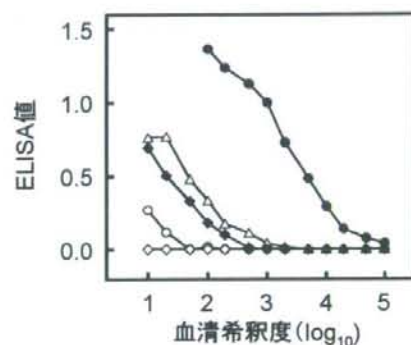


図 1. NS1 抗体測定 ELISA 法におけるヒト血清の血清希釈度依存性の反応曲線。JE 患者血清 (●)、米国人健常者血清 1 (○)、2 (◇)、三木市住民血清 1 (◆)、2 (△) を用いた。

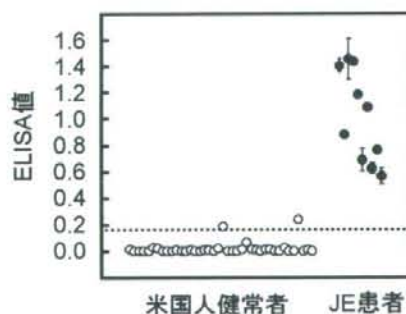


図 2. 米国人健常者血清と JE 患者血清の ELISA 値の比較。米国人健常人血清 40 検体、JE 患者血清 10 検体を用いた。破線は、米国人健常者血清より求めたカットオフ値 (0.185) を示す。プロットは 2 回の測定の平均値を示し、誤差棒は標準偏差を表す。

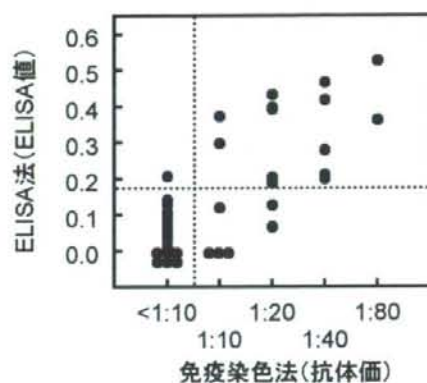


図 3. ELISA 法と免疫染色法の定量的比較。免疫染色法により陽性（20 検体）または陰性（20 検体）と判定された三木市住民血清 40 検体を用いた。破線は、各測定法におけるカットオフ値を示す。ELISA 法では 0.185 以上、免疫染色法では 1:10 以上を NS1 抗体陽性とする。

表 1. ELISA 法と免疫染色法の定性的比較

ELISA法	免疫染色法		合計
	陽性	陰性	
陽性	14	1	15
陰性	6	19	25
合計	20	20	40

一致率 = 82.5 %

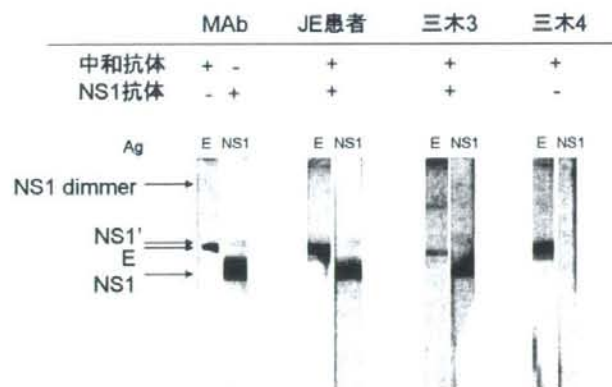


図 4. ヒト血清を用いたウエスタンブロット解析。ELISA 法により NS1 抗体陽性または陰性と判定された三木市住民血清を用いた。精製 E または NS1 抗原は、非還元下において 10 % ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した。陽性対照として、E または NS1 に対するモノクローナル抗体 (MAb) および JE 患者血清を用いた。

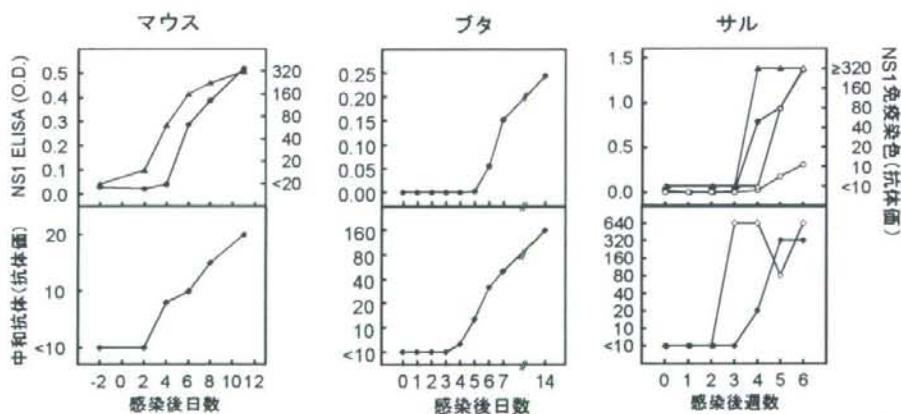


図 5. JEV 実験感染動物における抗体レベルの経時的変化。JEV を実験感染したマウス (5 頭)、ブタ (3 頭)、およびサル (2 頭) の血清を NS1 抗体測定 ELISA 法 (丸)、NS1 抗体測定免疫染色法 (三角)、および中和試験 (菱形) により検査した。マウスおよびブタの NS1 ELISA 値はプール血清を用いて求め、NS1 抗体価および中和抗体価の結果は、個々の血清から得られた値の幾何平均で表した。サルにおいては個々の血清から得られた値を示し、塗りつぶしの有無により個体を識別している。

熊本県における日本脳炎ウイルスの活動とヒトの自然感染率に関する研究

研究分担者 原田 誠也（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部）

研究協力者 西村 浩一（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部）

高崎 智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

小西 英二（神戸大学大学院 保健学研究科国際保健学領域）

研究要旨

熊本県における日本脳炎ウイルス（JEV）の活動状況を把握するため、JEVの主たる増幅動物であるブタについて、2008年7月中旬から毎週20頭ずつ9週間、計180頭の血清を採取し、赤血球凝集抑制（HI）抗体と新鮮感染（2-ME感受性）抗体を測定するとともに、培養細胞によるウイルス分離を行った。その結果、HI抗体の立ち上がり時期は8月中旬で例年より半月ほど遅く、保有率も60%止まりであり、また測定した週によってかなり保有率にバラツキが見られた。日本脳炎（JE）注意報は、HI抗体保有率が50%以上で、かつ2-ME感受性抗体が1頭でも確認された時点で発令されるが、HI抗体の検出時期と保有率は、気候、豚舎の構造、飼育地域等によって差があることが判明し、時宜を得たJE注意報を発令するためには、特に飼育地域を考慮して血清を採取する必要があると思われる。また、JEVが分離されたブタは180頭中1頭のみであり、患者の発生報告も無かったことから、2008年はJEVの活動が不活発であったと推測された。

次に、JEVに対するヒトの抗体保有状況と自然感染率を調査するため、2008年に年齢群別に採取したヒト血清326件について、50%ブランク減少法による中和抗体価を測定した。ヒトの中和抗体保有率はほぼ例年通りであったが、2005年のJEワクチン接種勧奨差し控え以前より、6歳以下で低下傾向にあった。なお、母親からの移行抗体の影響がなく、調査票に記載された予防接種歴の信憑性が高いと思われる1歳～10歳のワクチン未接種者67人中4人（6%）が中和抗体陽性であった。これは自然感染によって抗体を獲得したと考えられることから、年間自然感染率を計算すると1.0%となった。また、2004年～2008年に採取した20歳以上のヒト血清650件について、JEVの非構造蛋白NS1に対する抗体（NS1抗体）を測定した。NS1抗体保有率は11.7%で、年間自然感染率は2.8%と計算された。

A. 研究目的

熊本県は、過去、全国でも有数の日本脳炎（JE）患者多発県であった。そのため、県内では予防接種の励行、蚊の徹底駆除、グッピー、タツミノーの放流によるボウフラ減少作戦、ブタへのJE生ワクチン接種など、さまざまな対策が実施された。こ

のような対策によってか、全国と同様に県内の患者数は激減した。特に1991年以降は1人以下となり、2000年から2003年まで患者の発生報告は無かったが、2004年と2005年に各1人、2006年に3人、2007年に1人の患者が報告され、ここ数年患者発生が続いている。

そこで本研究では、熊本県における JEV ウイルス (JEV) の活動状況を把握するため、JEV の主たる増幅動物であるブタについて、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体と新鮮感染 (2-ME 感受性) 抗体を測定するとともに、培養細胞によるウイルス分離を行った。特に HI 抗体検査では、時宜を得た JE 注意報を発令するため、安定した検査結果が得られるよう、ブタの飼育地域による HI 抗体検出時期と保有率の差を検討した。

また、ヒトの JEV に対する抗体保有状況と自然感染率を求めるため、年齢群別に採取したヒト血清の中和抗体と JEV の非構造蛋白 NS1 に対する抗体 (NS1 抗体) を測定した。なお、中和抗体測定に際し、容易に多検体の検査ができるよう血清の希釈工程に工夫を加えた改良法を考案した。

B. 研究方法

1. ブタ血清の HI 抗体及び 2-ME 感受性抗体検査

2008 年 7 月から 9 月間に、県内の養豚場から、とちく場へ搬入されたブタの放血液を毎週 1 回、飼育地域別に 5 頭ずつ 20 頭分を計 9 回、180 頭分採取し、厚生労働省感染症流行予測調査事業の検査術式 (平成 14 年 6 月) に準じ、HI 抗体と 2-ME 感受性抗体を測定した。

なお、2005 年からブタの飼育地域別に検体を採取し、HI 抗体の保有時期や保有率に地域差があるかどうか検討を行っている。

2. ブタ血清からの JEV 分離

HI 抗体測定に用いたブタの血清を細胞培養用の維持培地で 5 倍に希釈し、24 ウェルプレートに単層培養した Vero 9013 細胞と C6/36 細胞に 200 μ l ずつ接種した。それ

ぞれ至適培養条件下で 3 代継代培養し、細胞変性効果 (CPE) が認められたウェルの培養上清から QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) で JEV-RNA を抽出後、厚生労働省感染症流行予測調査事業の検査術式 (平成 14 年 6 月) による RT-PCR 法で JEV 遺伝子を確認した。

分離された JEV は、エンベロープ (E) 領域 1,500 塩基と 3' 非翻訳領域 (NCR) 約 500 塩基を増幅し、ダイレクトシークエンスによる遺伝子解析を行った。

3. ヒト血清の中和抗体検査

2008 年に年齢群別に採取したヒト血清 326 件について、厚生労働省感染症流行予測調査事業の検査術式 (平成 14 年 6 月) に準じ、50% ブラーク減少法で中和抗体を測定した。検査に際し、多検体の検査が容易にできるよう、検体希釈工程を工夫した。すなわち、血清の希釈に 48 ウェルプレートと 12 チャンネルマイクロピペットを用いて 2 倍階段希釈を行った。希釈後、ウイルス (JaGAr#01 株) 液を加えて混合し、シールしてビニール袋に入れ、37℃ の温浴中で 90 分間中和した。中和終了後は直ちに氷上に置き、従来法同様 6 ウェルプレートに単層培養した Vero9013 細胞に摂取して検査を続行した。

4. ヒト血清の NS1 抗体検査

2004 年～2008 年間に、厚生労働省感染症流行予測調査事業の感受性調査用として集めた血清のうち、20 歳以上のヒト血清 650 件について、平成 16 年度厚生労働科学研究補助金、新興・再興感染症「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」研究報告書「日本における近年の日本脳炎ウイル

ス自然感染状況：8 県の住民を対象とした調査」に記載された小西らの方法に準拠し、NS1 抗体を測定した。

(倫理面の配慮)

ヒト血清は、採取時に各種検査についての同意書を徴収した。また、今回の使用に際し、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会より承認を得た。

5. JE 患者調査

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）の JE 発生届に基づき調査した。患者検体が入手できたものは、抗体検査、培養細胞によるウイルス分離及び RT-PCR 法による JEV 遺伝子の検出を試みた。PCR 陽性検体はシーケンス解析し、遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

1. ブタ血清の HI 抗体及び 2-ME 感受性抗体検査結果

2008 年に採取したブタ血清の HI 抗体と 2-ME 感受性抗体検査結果を表 1 に示した。

最も早く新鮮感染による HI 抗体が確認されたのは 8 月 11 日採取の検体で、20 件中 1 件が HI 抗体価 1:320 を示した。その後 HI 抗体保有率は増加し、8 月 28 日には 50% となり、JE 注意報が発令された。

しかし、9 月 1 日には 10% に減少し、9 月 8 日には再び 60% に増加するなど保有率にバラツキが見られた。

HI 抗体の保有時期と保有率の地域差を見るため、2005 年から市町村（飼育地域）別に 5 頭ずつ検体を採取して検査した。2005 年～2008 年の検査結果の一部を表 2 に示した。HI 抗体検出時期と保有率は市町村によって差があった。特に県下有数の畜

産地帯で出荷頭数が多く、2004 年まで検査対象となる機会の多かった K 村は、HI 抗体の保有時期が遅く、保有率も低かった。

2003 年～2008 年の各年毎の HI 抗体保有率の推移を図 1 に示した。とちく場で無作為に連続した 20 頭を採血して検査した 2003 年と 2004 年に比べ、各市町村から 5 頭ずつ採血して検査した 2005～2007 年は保有率のバラツキが少なくなった。

2. ブタ血清からの JEV 分離結果

2005 年～2008 年におけるブタ血清からの JEV 分離結果を表 2 に併記した。JEV は HI 抗体が陽性となる前後の時期の HI 抗体陰性のブタ血清から、2005 年：3 株、2006 年：9 株、2007 年：2 株、2008 年：1 株分離された。これら 15 株の遺伝子型は、表 3 に示したとおりすべて I 型であった。

3. ヒト血清の中和抗体検査結果

ヒト血清 326 件の年齢群別による中和抗体検査結果を表 4 に示した。また、2003 年～2008 年（2005 年を除く）に測定した中和抗体価 1:10 以上の各年のグラフを併せて図 2 に示した。1:10 以上の中和抗体保有率は、2008 年もほぼ 2007 年と同様の傾向であった。すなわち、抗体保有率は年齢とともに増加し、15 歳～19 歳代でピークとなった。その後は漸減し、40 歳～49 歳代で最低となり、以後再び増加した。1:640 以上の高い抗体価の保有者は 7 歳～9 歳と 15 歳～29 歳群に多かった。しかし、6 歳以下では 2005 年の JE ワクチン接種勧奨差し控え以前より、抗体保有率が低下した。

また、母親からの移行抗体の影響がなく、採血時に徴収した予防接種歴調査結果の信憑性が高いと思われる 1 歳～10 歳のワクチン未摂取者は 67 人であった。このうち 4

人が中和抗体陽性で、自然感染によって抗体を獲得したと考えられることから、自然感染率は6.0%、年間自然感染率は1.0%と計算された。

4. ヒト血清の NS1 抗体検査結果

2004 年～2008 年に採取した 20 歳以上のヒト血清 650 件の NS1 抗体検査結果を表 5 に示した。各年の保有率は、2004 年：9.6% (125 件中 12 件)、2005 年：16.8% (125 件中 21 件)、2006 年：12.1% (124 件中 15 件)、2007 年：16.0% (125 件中 20 件) 及び 2008 年：5.3% (151 件中 8 件) で、平均 11.7%であり、年により保有率に差があった。NS1 抗体の持続期間を 4.2 年とした場合、計算上の年間自然感染率は 2.8%となった。また、NS1 抗体保有者は 50 歳以上の高齢者に多かった。

5. JE 患者調査結果

熊本県では 2004 年以降毎年、JE 患者発生報告が続いていたが、2008 年は 5 年ぶりに報告が無かった。2004 年以降の患者情報と検査情報をまとめて表 6 に示した。この中で 2004 年と 2005 年の各 1 件、2006 年の 2 件及び 2007 年の 1 件は患者検体が入手できたので、確認検査を行った。特に 2006 年は 9 月に 3 人の患者が報告され、この中にはワクチン未接種の 3 歳男児が 1 人含まれていた。この 3 歳男児を含む 2006 年の 2 人と 2007 年の 1 人から PCR 法で JEV 遺伝子が検出され、シーケンスの結果、遺伝子型は I 型と判定された。

D. 考察

厚生労働省感染症流行予測事業の九州地区のブタ情報によると、2008 年、長崎県では 7 月 1 日分で既に HI 抗体保有率 100%

となっていた。その他の県は約 1 ヶ月～1 ヶ月半遅れて HI 抗体が検出され、鹿児島、宮崎、佐賀、大分の各県は保有率が 80%を超えた。しかし、福岡、熊本の両県は 50%前後であり、近隣の県でも HI 抗体の保有時期と保有率にかなり差が見られている。

ブタの HI 抗体調査は間接的に JEV の活動状況を把握し、住民に注意報を発令するための重要な検査であるが、近年、熊本県では HI 抗体保有率が測定した週によって大きく変化し、かつ低下傾向にあった。そこで、安定した検査結果が得られるよう、2005 年から市町村別に検体を採取し、HI 抗体の保有時期と保有率の地域差を検討した。その結果、JEV の分布は均一ではなく、かなりの地域差があることが判明した。このことから、正確な JEV の活動状況と時期を得た JE 注意報を発令するためには、飼育地域を考慮して検査する必要があると思われる。

2008 年はブタの HI 抗体の立ち上がりが 8 月中旬で例年より半月ほど遅く、保有率も 60%止まりであった。5 年ぶりに患者発生もなく、ブタ血清からの JEV 分離も 1 株のみであったことから、JEV の活動が不活発な年であったと考えられた。

今回、1 歳～10 歳のワクチン未接種者の中和抗体保有率から、JEV による年間自然感染率は 1.0%と計算された。検体数が少ないため信頼性は低いが、同様の方法で過去の検査結果を解析すると 2003 年：4.5%、2004 年：0%、2006 年：8.3%、2007 年：0%となり、JEV の活動が活発な年と不活発な年のあることが推測された（データ未掲載）。特に 2006 年は、例年に比べて異常に高かったことから、JEV の活動が非常に

活発であったと思われたが、この年には 9 頭のブタから JEV が検出され、JE 患者が 3 人発生したことから裏づけられた。

最近、ブタやヒトから検出された JEV の遺伝子型はすべて I 型であり、熊本県では I 型が主流であった。I 型 JEV は 1990 年代初期に我が国に侵入したとされ、熊本県では 1991 年には既に I 型が侵入したことが確認されている（データ未掲載）。

50%ブランク減少法による中和抗体検査はフォーカス減少（PAP）法に比べて判定は容易であるが、血清の希釈が煩雑であった。しかし、今回の改良で血清希釈が簡単になり、感染症流行予測事業のような多検体検査に有効であろうと思われた。

今回、ヒト血清 525 件について、中和抗体と NS1 抗体の結果を比較した結果、両者の不一致が数件見られたことから、再検査を含め、さらに検討を進める予定である。

E. 結 論

2008 年、熊本県では例年よりブタの HI 抗体の立ち上がり時期が遅く、かつ抗体保有率も低かった。さらに、測定した週によって抗体保有率にバラツキが見られた。JEV 分布は均一ではなく、ブタの飼育地域によって差があるため、的確な日本脳炎注意報を発令するには、飼育地域を考慮した検体採取を行う必要があると思われた。

また、JEV 分離数も 1 株のみで、患者発生も無かったことから、JEV の活動が不活発であったと推測された。

2008 年に検査したヒト血清の中和抗体

保有率は 6 歳以下で低下傾向にあり、年間自然感染率は 1.0%と計算された。

2004 年～2008 年に採取したヒト血清の NS1 抗体保有率は 5.3%～16.8%で、年により差があった。また、これを基にした計算上の年間自然感染率は 2.8%であった。中和抗体と NS1 抗体の不一致が数件あり、今後さらに検討を進める予定である。

F. 健康危機管理情報

熊本県では依然として JEV が環境中に存在することから、時宜を得た JE 注意報の発令と予防接種の早期再開が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 原田誠也、松尾 繁、中島龍一、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎。肥育ブタの日本脳炎抗体調査の検討と分離ウイルスの遺伝子解析。平成 20 年度日本獣医公衆衛生学会九州地区学会（那覇市）

2) 原田誠也、松尾 繁、中島龍一、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎。肥育ブタの日本脳炎抗体調査の検討と分離ウイルスの遺伝子解析。平成 20 年度日本獣医公衆衛生学会年次大会（岩手）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 プタの HI 抗体及び2ME 感受性抗体検査結果(2008 年)

採血月 日	検査 頭数	HI 抗体価							HI抗体 保有率	2-ME感受性 抗体保有率
		<10	10	20	40	80	160	320	≥640	
7/14	20	20								0%
7/22	20	20								0%
7/28	20	20								0%
8/ 4	20	20								0%
8/11	20	19						1		5%
8/18	20	12	1		2		1	1	3	40%
8/25	20	10			2		5	1	2	50%
9/ 1	20	18				1			1	10%
9/ 8	20	8		1		1	3	7		60%
合計	180	147	1	1	4	2	9	10	6	51%

表2 プタ血清の市町村別 HI 抗体検査結果(各年 HI 抗体検出以降)と JEV が検出されたロット

採血年月日	K村	K市	A市	U町	YK町	Y市	C市	その他	HI抗体 保有率	JEV 分離数
2005/8/1	0/5			0/5	3/5	5/5			40%	3頭
8/8	0/5		3/5		5/5			3/5	55%	
8/22	2/5	5/5	5/5			5/5			85%	
8/29	1/5			5/5		5/5		5/5	80%	
9/5	3/5		5/5		5/5			5/5	90%	
9/12	1/5		5/5	5/5				5/5	80%	
2006/8/21	0/5			0/5	0/5		0/5		0%	9頭
8/28	0/5			4/5	3/5		0/5		35%	
9/4	0/5			5/5	5/5		4/5		70%	
9/11	0/10			5/5	5/5				50%	
9/25	1/5			5/5	5/5		2/5		65%	
2007/7/23	0/5		0/5	0/5	1/5		0/5		4%	2頭
7/30	0/5	1/5		2/5	4/5		0/5		28%	
8/6	0/5	0/5		5/5	4/5		1/5		40%	
8/20	0/5	3/5		5/5		0/5	0/5		32%	
8/27	0/5	5/5		2/5				7/10	56%	
9/3	3/5	5/5		4/5				9/10	84%	
9/10			3/4	5/5			5/6	1/5	56%	
2008/8/11		0/10						1/10	5%	1頭
8/18		2/10		5/5				1/5	45%	
8/25		0/5	5/5			2/5		3/5	50%	
9/1		0/5		0/5				210	10%	
9/8	3/5	0/5		4/5				5/5	60%	

HI 抗体保有頭数/検査頭数、 : 1 頭から JEV 検出、 : 2 頭から JEV 検出

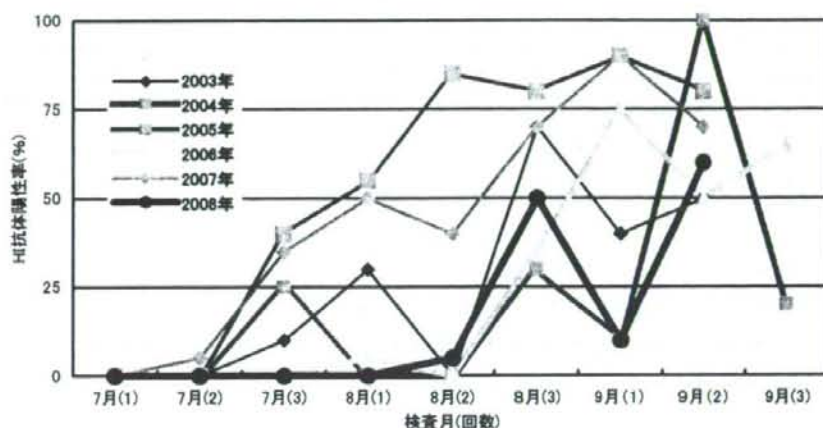


図1 プタ血清中の HI 抗体保有率の推移(2003 年～2008 年)

表3 プタ血清から分離された JEV の遺伝子型

番号	分離ウイルス株	採血年月日	養豚場の住所	遺伝子型
1	SW/Kumamoto/ 54/2005	2005/8/1	U 町(MT 養豚場)	I 型
2	SW/Kumamoto/ 56/2005	"	S 町(T ")	I 型
3	SW/Kumamoto/ 65/2005	2005/8/8	A 市(K ")	I 型
4	SW/Kumamoto/ 81/2006	2006/8/21	S 町(T ")	I 型
5	SW/Kumamoto/ 84/2006	"	"	I 型
6	SW/Kumamoto/ 88/2006	"	U 町(U ")	I 型
7	SW/Kumamoto/ 90/2006	"	"	I 型
8	SW/Kumamoto/104/2006	2006/8/28	S 町(T ")	I 型
9	SW/Kumamoto/116/2006	"	C 市(M ")	I 型
10	SW/Kumamoto/120/2006	"	"	I 型
11	SW/Kumamoto/122/2006	2006/9/4	"	I 型
12	SW/Kumamoto/147/2006	2006/9/11	K 村(S ")	I 型
13	SW/Kumamoto/ 86/2007	2007/8/20	K 市(K ")	I 型
14	SW/Kumamoto/156/2007	2007/9/10	A 市(A ")	I 型
15	SW/Kumamoto/129/2008	2008/8/25	Y 市(G ")	I 型

表4 ヒト血清の年齢群別中和抗体検査結果(2008 年)

年齢区分	中和抗体価								合計
	<1:10	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	≥1:640	
0-4	74	1	1	1	1	1	1	1	81
5-9	17			1	1	3	3	10	35
10-14	12	2	2	1	4	5	2	6	34
15-19	2		1	2	1	3	7	9	25
20-29	7	6	9	7	4	8	3	7	51
30-39	11	2	7	3	1	1			25
40-49	16	6	1		2				25
50-59	8		7	6	2	2			25
≥60	6		2	6	2	7	1	1	25
合計	153	17	30	27	18	30	17	34	326

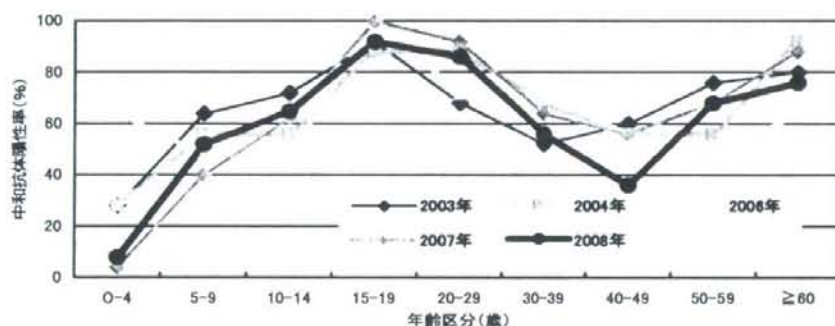


図2 ヒト血清の年齢群別中和抗体保有状況(2003 年、2004 年、2006 年～2008 年)

表5 ヒト血清の年齢群別 NS1 抗体検査結果(2004 年～2008 年)

年齢区分	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	合計
20-29	1		3	2	*	6
30-39		3	1	4		8
40-49	3	4	4	2		13
50-59	3	9	2	5	5	24
≥60	5	5	5	7	3	25
NS1抗体保有者	12	21	15	20	8	76
NS1抗体非保有者	113	104	109	105	143	574
合計	125	125	124	125	151	650
NS1抗体保有率(%)	9.6	16.8	12.1	16	5.3	11.7

* 各年齢群の検体数は各年ともほぼ 25 件であるが、2008 年の 20-29 は 51 件である。

表6 熊本県における JE 患者の発生状況

		2004年	2005年	2006年			2007年
				1例目	2例目	3例目	
患者情報	住所	A市	C市	C市	Y市	C市	K市
	年齢・性別	58歳/男性	72歳/男性	65歳/女性	3歳/男性	48歳/女性	66歳/女性
	海外渡航歴	なし	なし	なし	なし	なし	なし
	発病年月日	2004/8/21	2005/9/19	2006/9/2	2006/9/10	2006/9/10	2007/8/30
	初診月日	2004/8/22	2005/9/19	2006/9/3	2006/9/12	2006/9/10	2007/8/31
	転帰	回復	不明	回復	後遺症	不明	不明
	診断月日	2004/8/25	2005/10/31	2006/9/25	2006/10/6	2006/10/13	2007/9/26
	届出月日	2004/9/3	2005/11/1	2006/9/25	2006/10/6	2006/10/13	2007/9/26
	症状	意識障害、発熱、髄膜炎症状	発熱、意識障害、後部硬直、離体外路症状	発熱、意識障害、痙攣、頸部硬直、筋硬直、不随意運動	頭痛、発熱、全身痙攣、意識障害、頸部硬直	意識障害、発熱、痙攣	発熱、頸部硬直、意識障害、筋硬直、失調、震動症
	養豚場の有無	周辺に家畜等はいない	不明	近隣2km以内に養豚場なし	近隣2km以内に養豚場なし	近隣2km以内に養豚場なし	近隣2km以内に養豚場あり
検査情報	HI抗体価(急性期)	40(8/22)	CF: 8(9/22)	20(9/4)	<10(9/12)	160(9/12)	<10(8/31)
	HI抗体価(回復期)	5120(8/26)	CF: 32(10/14)	320(9/15)	320(9/29)	1280(9/28)	640(9/12)
	JEV分離	—	—	—	—	—	—
	PCR	—	—	+	+	—	+
	JEVの遺伝子型			I型	I型		I型

東京都における日本脳炎ウイルス自然感染率に関する研究
ー日本脳炎ウイルスの NS1 抗体保有状況ー

研究分担者 田部井 由紀子（東京都健康安全研究センター 主任研究員）
研究協力者 長谷川 道弥、岩崎 則子、岡崎 輝江、仲真 晶子、矢野 一好
（東京都健康安全研究センター）

研究要旨

東京都における日本脳炎ウイルスの自然感染率（不顕性感染率）を把握するため、日本脳炎ウイルスに対する中和抗体が陽性であった都民の血清を用いて、ELISA 法により日本脳炎ウイルス NS1 抗体を測定した。その結果、2004 年から 2006 年の中和抗体陽性者における NS1 抗体の陽性率は 6.4% であり、各年の内訳は 2004 年が 9.0%、2005 年が 4.8% 及び 2006 年が 5.1% であった。

A. 研究目的

日本脳炎は、2005 年よりワクチン定期接種の積極的勧奨が差し控えられており、抗体保有率の低下ならびに再流行が懸念されている。このような背景の中、東京都では都民の日本脳炎ウイルス（以下 JEV）に対する抗体保有調査を流行予測調査事業により継続して実施している。しかしながら、本調査によって測定される抗体は、ワクチンによる獲得であるのか、自然感染による獲得であるのかを判別することはできない。そこで、東京都における JEV の自然感染率（不顕性感染率）を推察することを目的に、都民の血清を用いて、JEV の NS1 に対する抗体保有調査を行った。

B. 研究方法

調査対象は、ワクチン接種の状況が大きく変化した 2005 年とその前後の年である 2004 年～2006 年に流行予測調査事業によって採取された都民の血清 964 件（2004 年：319 件、2005 年：311 件、2006 年：334 件）のうちで、JEV（JaGAr#01 株）に対する中和抗体が陽性であり、かつ血清検体が

残存していた 497 件（2004 年：177 件、2005 年：145 件、2006 年：175 件）である。また、中和抗体が陰性であった 82 件（2004 年：28 件、2005 年：25 件、2006 年：29 件）を陰性対照として用いた。

JEV の NS1 に対する抗体検査は、小西らの方法によって行った。すなわち、JEV-NS1 発現細胞由来の精製 NS1 抗原（3G8-NS1）に対する抗体を ELISA 法によって測定した。

（倫理面への配慮）

本研究を行うにあたり、研究の実施前に東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において審査を受け、本研究が倫理的に問題のないことが承認されている。

C. 研究結果

流行予測調査事業によって測定した JEV に対する中和抗体の検査結果は、表 1 のように血清 964 件中 519 件が陽性であり、陽性率は 53.8% であった。中和抗体陽性数の年次内訳は、2004 年が 319 件中 183 件、2005 年が 311 件中 158 件及び 2006 年が 334 件中 178 件であり、各年における中和抗体の陽性率は 2004 年が 57.4%、2005 年が 50.8%

及び 2006 年が 53.3%であった。また、中和抗体陽性者の平均抗体価は 127 倍であり、各年においては 2004 年が 84 倍、2005 年が 162 倍及び 2006 年が 154 倍であった(表 1)。

これら中和抗体が陽性であった血清 519 件のうち血清検体が残存していた 497 件を調査対象及び中和抗体が陰性であった 82 件を陰性対照として、JEVNS1 に対する抗体測定を行った結果、表 2 のように、NS1 抗体は 497 件中 32 件で陽性であった。NS1 抗体陽性数の年次内訳は、2004 年が 177 件中 16 件、2005 年が 145 件中 7 件及び 2006 年が 175 件中 9 件であり、中和抗体陽性者の中で NS1 抗体の陽性率は 6.4%であり、各年では 2004 年が 9.0%、2005 年が 4.8%及び 2006 年が 5.1%であった(表 2)。また、陰性対照 82 件については、全てで NS1 抗体陰性であった。

NS1 抗体が陽性であった 32 件の結果を表 3 に示した。NS1 抗体陽性者の年齢、ワクチン接種歴、中和抗体価及び NS1 抗体の index 値に関連はみられなかった。

D. 考察

本研究は、2004 年から 2006 年に採取された都民の血清を調査対象として実施した。これらの年に採取された血清を調査対象とした理由として、まず、日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられたのが 2005 年であったため、その前後の年で何らかの変化がみられるのではないかと思われること、次に、従来から調査している都内で飼育されたブタにおける JEV 感染状況調査において、2005 年には過去 10 数年間に例を見ない高い感染率を経験したことがあげられる(図 1)。

これら調査対象についての JEV に対する中和抗体保有調査の結果を年齢階層別にみると、図 2 のように抗体を保有していない

低年齢層が年々拡大しており、2005 年からの事実上のワクチン停止に関連した結果であるものと推察された。また、その他の年齢階層における抗体保有率については、血清の採取年による変化はみられなかったものの、年齢階層別の平均抗体価については、図 3 のように 5 歳から 19 歳において 2005 年、2006 年と上昇しており、自然感染の影響によるものと懸念された。しかしながら、JEV 感染によって上昇するという NS1 抗体検査を行った結果、抗体陽性率については年次及び年齢階層における変化はみられなかった。

E. 結論

東京都における JEV の自然感染率(不顕性感染率)を把握するため、都民の血清を用いて、中和抗体及び NS1 抗体を測定し、中和抗体陽率ならびに中和抗体陽性者の NS1 抗体陽性率を求めた。その結果、中和抗体陽性率は 53.8%であり、各年の中和抗体陽性率は 2004 年が 57.4%、2005 年が 50.8%及び 2006 年が 53.3%であった。また、中和抗体陽性者における NS1 抗体の陽性率、すなわち JEV の自然感染率は 6.4%であり、各年の中和抗体陽性者における NS1 抗体の陽性率は 2004 年が 9.0%、2005 年が 4.8%及び 2006 年が 5.1%であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし