

表5 飼育犬における日本脳炎抗体保有率の全国調査（途中経過）

地域	全体		室内飼育犬		室外飼育犬		両方 or 不明	
	検査頭数	陽性率	検査頭数	陽性率	検査頭数	陽性率	検査頭数	陽性率
北海道	11	0.0%	2	0.0%	4	0.0%	5	0.0%
東北	81	9.9%	40	10.0%	18	0.0%	23	17.4%
関東	55	18.2%	14	14.3%	17	17.6%	24	20.8%
中部	148	18.2%	63	4.8%	48	37.5%	37	16.2%
近畿	102	23.5%	42	2.4%	31	48.4%	29	27.6%
中国	54	25.9%	16	18.8%	23	34.8%	15	20.0%
四国	31	61.3%	3	0.0%	23	73.9%	5	40.0%
九州	104	47.1%	26	19.2%	44	77.3%	34	29.4%
沖縄	17	5.9%	4	0.0%	4	25.0%	9	0.0%
計	603	25.2%	210	8.6%	212	45.3%	181	21.0%

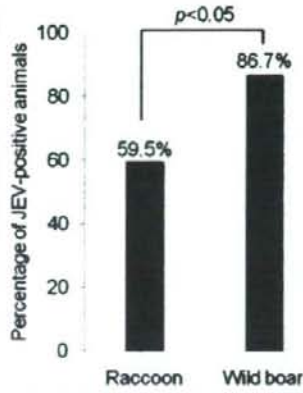


図1 同時期に和歌山県で捕獲された  
アライグマとイノシシの JEV 抗体保有率の比較

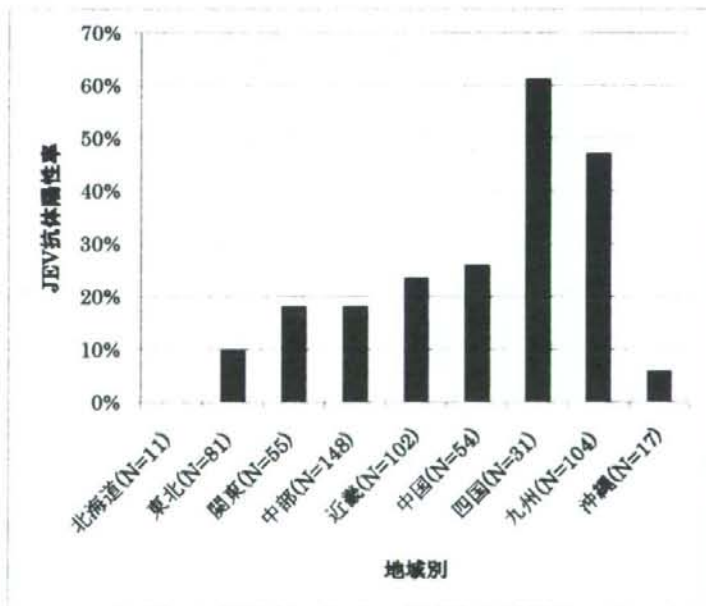


図2 飼育犬における JEV 抗体陽性率

厚生労働省科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）  
「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」  
分担者研究報告書

日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究

分担研究者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：日本脳炎は近年日本においては低流行状況にあり年間の患者発生は10名をきっている。一方、毎年夏になると関東以南で採取される野外蚊やブタの血液からは継続的に日本脳炎ウイルスが分離されている。したがって、日本国内では依然として日本脳炎ウイルスは活動している。この傾向は日本に隣接し、日本脳炎ワクチンが導入された韓国、台湾でも同様であるが中国では患者数は激減したものの数千人単位の日脳患者がいまでも発生し、東南アジアやインドでは未だに大きな流行が報告されている。このような状況のなかで日本において活動しているウイルスと他の地域において活動しているウイルスの差異を比較することは日本における今後の日本脳炎対策を考えるうえで重要であると思われる。本年度の研究で我々はベトナム、中国、日本で過去に分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子を分子疫学解析し、東南アジアに生息している日本脳炎ウイルスが比較的頻繁に中国を経由して日本に到達していることを示す一方、日本においても独自に進化（変化）を続けているウイルスグループが存在することを明らかにした。また中国から日本に日本脳炎ウイルスが飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島が想定される。ここでブタと蚊の調査を2008年8月から実施した。その結果、分離されたウイルスは中国で過去に分離されたグループに属していることが明らかになった。

A. 研究目的

中国、日本、東南アジアで過去に分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子を分子疫学解析し、東南アジアと日本に生息している日本脳炎ウイルスの生態をより詳細に解析すること。および、中国から日本に日本脳炎ウイルスが飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島を想定し、ブタと蚊における調査を開始して、東南アジアから日本までの日本脳炎ウイルスの移動状況を詳細に明らかにする一助とする。

B. 研究方法

1) 日本脳炎ウイルスの遺伝子塩基配列

ベトナムと長崎において我々が分離したウイルス株については独自に塩基配列を解析し

GenBankに登録する一方で、同システムに登録済みの500株の東南アジア、中国、日本の日本脳炎ウイルスの情報を用いた。

2) 分子疫学解析

すべてのウイルスについてE蛋白質領域のアラインメントを行った後、ネイバージョイニング法により解析し樹状解析図を作成した。

3) 蚊の採取

平成20年8月20日～21日、五島列島（五島市、新上五島町）においてライトトラップ及び吸虫管により捕集した蚊933匹を分類後、雌雄判別及び吸血の有無を確認し、60 pool（20匹 / pool）を作製した。媒介蚊の各poolはホモジナイズした後、C6/36細胞に接種してウイルス分離を行った。分離・同定したJEVはエ

ンペロープタンパク (E) 領域の塩基配列を決定した後、系統樹解析に供した。

#### 4) オトリ豚の設置と抗体検査

調査開始前に JEV 未感染を確認した仔豚(生後 5 週齢) 4 頭について平成 20 年 9 月～10 月まで経時的 (毎週 1 回) に採血して得られた血漿中の抗 JEV 抗体価 (IgG, IgM) を ELISA 法により測定した。また、抗体価の上昇が認められたオトリ豚の抗体陽転前の血漿を C6/36 細胞及び Vero 9013 細胞に接種してウイルス分離を試みた。

### C. 結果

#### 1) 東南アジアと日本の日脳ウイルス分子疫学解析

近年、日本において分離される日本脳炎ウイルスはほとんどが遺伝子型 I 型である。500 株におよぶ I 型日本脳炎ウイルスを詳細に解析したところ図 1 のように 7 つの亜型に分けられることが分かった。このうち亜型 I は 2000 年の初めにベトナムで初めて分離されたが、その後 2004 年には中国大陸中部で 2004 年、2007 年には日本で分離されている。これに比べて亜型 II, III, V は 1980 年代に中国の雲南地方で分離されているが、その後 2000 年代には中国南部で分離され、やがて日本でも分離されるようになった。一方亜型 IV は日本国内でのみ分離されており、これに属する型は中国、東南アジアの株には見られなかった。

#### 2) 五島列島で蚊からの日本脳炎ウイルス分離

媒介蚊 60 プール中 7 プールから JEV が分離された。分離された JEV 7 株は *Culex tritaeniorhynchus* から 3 株、*Culex* (亜属不明) から 4 株で、いずれも同一日の同一場所から捕集されたものであった。この 7 株の E 領域の塩基配列を NJ 法により系統樹解析すると

2001 年及び 2003 年に雲南省、2004 年に香川県で分離された JEV (Genotype 1) と近縁な株であり、2007 年に長崎県本土 (諫早市) で分離された JEV (Genotype 1) とは異なった系統であることが明らかとなった。

#### 3) 五島列島のオトリ豚結果

9 月初旬から野外で飼育され始めたオトリ豚では、4 週目から 7 週目に IgM の上昇が認められ、JEV に感染したことが確認された (図 5)。陽転前の血清からウイルス分離を試みているが、今のところいずれの個体からも分離できていない。

### D. 結論

- 1) 日本脳炎ウイルスは東南アジアから比較的頻繁にかつ高速に東に向かって移動しており、日本列島に飛来する。
- 2) 日本に飛来した一部のウイルスは日本で越冬して、土着している可能性がある。
- 3) 2008 年の五島列島では 9 月にはいっても日本脳炎ウイルスの活発な活動が確認された。
- 4) 2008 年に五島列島の蚊から分離された日本脳炎ウイルスは中国で近年に分離された株と近い関係にあった。

### E. 考察

日本において患者が減少している原因について、患者が多発している東南アジアと日本とはウイルスの病原性がことなるのではないかという意見もある。これについては、今回の疫学解析でみる限り、患者が多発している中国からウイルスが日本に飛来している事実から、日本で夏季に分離される日本脳炎ウイルスが特に病原性が低いものが選択的に飛来しているとは考えられないので、低病原性を支持する結果ではないと考える。日本で越冬しているらしいウイルスのグループ (遺伝子型 I の亜型 IV) が明らかになった。これは冬季の動物ある

いは蚊から直接ウイルスを分離することにより最終的に結論づけられると考える。

今回の調査で、中国に最も近い日本西端の離島という五島列島で媒介蚊の捕獲やオトリ豚を用いた調査を確立できたことから、今後は、冬季や黄砂が飛来する春先での調査を継続して行い、この地域における中国からの飛来状況ならびに冬季の JEV の動向について解明を図りたい。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas Guillermo, Maria del Carmen Parquet, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita.

Isolation and Molecular Characterization of Banna Virus from Mosquitoes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(8), 1276-1279; 2008

Basu Dev Pandey, Kouichi Morita, Santa Raj Khanal, Tomohiko Takasaki, Isao Miyazaki, Tetsuro Ogawa, Shingo Inoue, Ichiro Kurane. Dengue virus, Nepal. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(3), 514-515; 2008

Manmohan Parida, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao and Kouichi Morita: Loop mediated isothermal amplification(LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* Vol.18: 407-422:2008

Kazuya Hidari, Naonori Takahashi, Masataka Arihara, Masato Nagaoka, Kouichi Morita,

Takashi Suzuki.: Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol.376, 91- 95: 2008

Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong, Do Quang Ha, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Ha Manh Tuan, Vo Van Tuong, Cao Thi Phi Nga, Tran Van Dat, Toshifumi Oyama, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 2. e304, 2008

Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. *J Immunol*. Vol. 181(9):6337-48. 2008

Characterization and application of monoclonal antibodies specific to West Nile virus envelope protein. Liu J, Liu B, Cao Z, Inoue S, Morita K, Tian K, Zhu Q, Gao GF. *J Virol Methods*. Vol. 154(1-2):20-6. 2008

Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan,

Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. *J Gen Virol*. Vol.90: 827-832. 2009

森田公一:「日本脳炎ウイルス」、*Drug Delivery System* 23(2):159-161, 2008.

森田公一:「西ナイル熱」、*Medical Practice* 25(5):799-801, 2008

森田公一:「ウエストナイルウイルス」、「日本脳炎ウイルス」、*ウイルスハンドブック*、32-35 河野茂 編集、日本医学館 2008

## 2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arbovirus situation in Vietnam. Third AREVA-Pasteur Forum, "Mosquito and tick-borne viruses and their environment", Shanghai, China June 12-14, 2008

Morita K Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus from a dengue hemorrhagic fever patient in Vietnam: 1<sup>st</sup> Philippine International Dengue Symposium, Quezon City, Philippines, 27 September, 2008.

Morita K. Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus type 2 from a dengue hemorrhagic fever patient. The 3<sup>rd</sup> Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki Japan. 10-11 October, 2008.

H. Kinoshita, V.T.Q. Huong, E.G. Mathenge,

N.T. Hung, A. Kumatori, S. Inoue, K. Morita and F. Hasebe : CELL TROPISM OF DENGUE VIRUSES: POSSIBLE VIRUS POPULATION SWITCHING BETWEEN PATIENT AND MOSQUITO. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Oral Presentation 1: Molecular virology and diagnosis)

Basu Pandey, Ramesh Pun, Om Shah, Krishina Pant, Kouichi Morita, Shingo Inoue, Yae Kurosawa and Ichiro Kurane : EMERGENCE OF DENGUE VIRUS IN TARIA REGION OF NEPAL. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)

Kyaw-Zin Thant, Mya M. Ngwe-Tun, Yee-Yee Lwin, Sanda Lin, Kay-Thi Aye, Pe-Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Maria D.C. Parquet and Kouichi Morita : MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF DENGUE VIRUSES CO-CIRCULATING IN UPPER MYANMAR IN THE YEAR 2006. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)

Fuxun Yu, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita : The 3' untranslated rejoin of Japanese encephalitis virus genome

inhibits in vitro RNA synthesis of JEV RNA dependent RNA polymerase. 8<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Medical Virology. Hong Kong, China, February 25-28, 2009

国内会議における発表

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長野県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査（1）。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

鍋島武、井上真吾、住吉誠、春田泰弘、Phan Thi Nga、Hyunh Thi Kim Loan、Vu Thi Que Huong、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一：東アジア、東南アジアにおける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

井上真吾、福家功、石川豊数、Guillermo Posadas Herrera、Maria del Carmen Parquet、長谷部太、森田公一：西ナイルウイルス不活化ワクチンの開発と最小有効投与量の評価。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

村木優子、松浦正明、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イスにおける免疫原性について。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

左一八、在原雅貴、杉浦信夫、木全弘治、鈴木康夫、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖分子に対するフラビウイルス結合性の解析：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市

（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

長谷部太、木下一美、VuThiQueHuong、Michael O.Baclig、Ronald R. Matias、Filipinas F.Natividad、井上真吾、森田公一：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日・31日

NGWE TUN MYA MYAT、Kyaw Zin Thant、Parquet Maria del C.、井上真吾、Yee Yee Lwin、Pe Thet Khin、Tin Myint、Khin Htwe、鍋島武、森田公一：ミャンマー北部におけるデングウイルス感染症の分子疫学および血清学的調査。Molecular epidemiological and serological surveillance on dengue virus infection in Upper Myanmar. 第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

鍋島武、Hyunh Thi Kim Loan、井上真吾、住吉誠、春田泰宏、Phan Thi Nga、Vu Thi Que Huong、Parquet Maria del Carmen、長谷部太、森田公一：東アジア、東南アジアにおける日本脳炎ウイルス遺伝子型の遷移。Japanese encephalitis virus travelling from Southeast Asia to East Asia. 第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日

木下一美、Huong Vu Thi Que、Hung Nguyen Thanh、Michael Baclig O、Corazon Buerano C、Ronald Matias R、Filipinas Natividad F、井上真吾、森田公一、長谷部太：デング患者の抹消血中におけるウイルス準種(viral quasispecies)と細胞向性。第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日

左一八、森田公一、鈴木隆：フラビウイルス

—硫酸化糖鎖分子間相互作用の解析. 第 56 回  
日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、  
2008 年 10 月 26-28 日

長谷部太、Mai Le Thi Quynh, Thuy Nguyen  
Thi Thu, Thach Nguyen Co, Cuong Vuong  
Duc, Dinh Bui Thi, Phuong To Thanh, Ba  
Nguyen Van, 井上真吾、余 福勲、Thong Vu  
Dinh, 森田公一：ベトナムに棲息するコウモ  
リにおける新興再興ウイルス感染症の調査. 第  
56 回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡  
山市、2008 年 10 月 26-28 日

鍋島武、井上真吾、Maria del Carmen Parquet,  
長谷部太、森田公一：日本脳炎ウイルスの東南  
アジアから日本への移動経路について. 第 56  
回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、  
2008 年 10 月 26-28 日

久保亨、井上真吾、鍋島武、森田公一：デング  
ウイルスの 4 血清型の全てを同時に検出可能  
なデングウイルス共通 RT-LAMP 法の確立.  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡  
山市、2008 年 10 月 26-28 日

久保亨、森田公一：黄熱病ウイルスに対する  
RT-LAMP 法の確立. 第 56 回日本ウイルス学  
会学術集会・岡山県岡山市、2008 年 10 月 26  
-28 日

久保亨、井上真吾、岡本健太、森田公一：精製  
黄熱病ウイルスを用いた間接 ELISA 法による  
黄熱病血清疫学診断系の確立と、そのケニア共  
和国における応用. 第 56 回日本ウイルス学会  
学術集会・岡山県岡山市、2008 年 10 月 26-  
28 日

余福勲、長谷部太、井上真吾、森田公一：JEV  
NS3 protein inhibit RNA polymerase  
activity of JEV NS5 protein in vitro. 第 56 回  
日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、  
2008 年 10 月 26-28 日

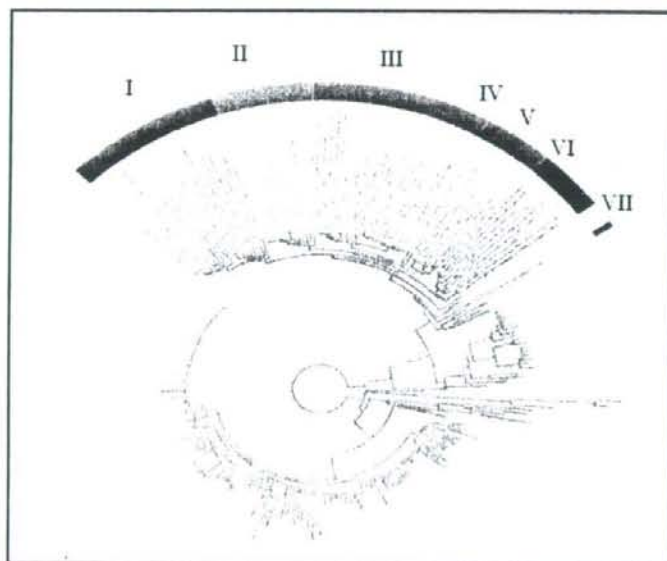
森田公一：アジアにおける疫学. 第 12 回日本  
ワクチン学会学術集会・熊本市、2008 年 11  
月 8-9 日

村木優子、松浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川  
豊数、奥野良信、東雍、森田公一：培養細胞を  
用いた不活化ウエストナイルワクチンの開発.  
第 12 回日本ワクチン学会学術集会・熊本市、  
2008 年 11 月 8-9 日

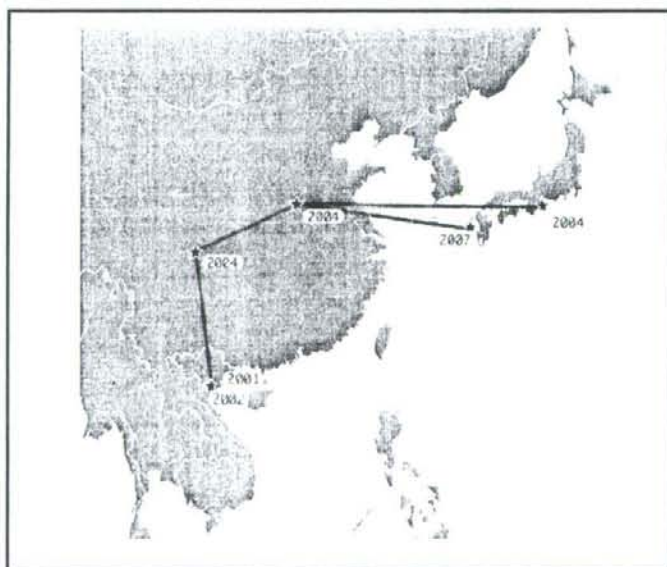
H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



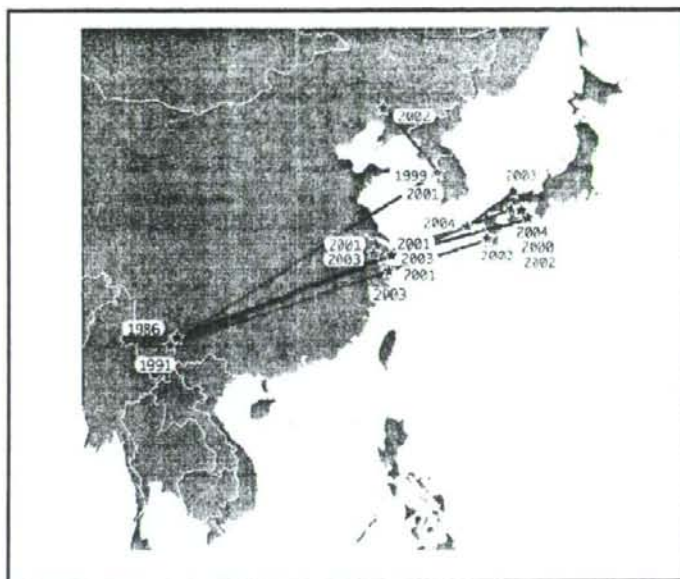
(図1) 日本、中国、ベトナムで分離された遺伝子型I型日本脳炎ウイルスのEタンパク遺伝子の系統樹解析



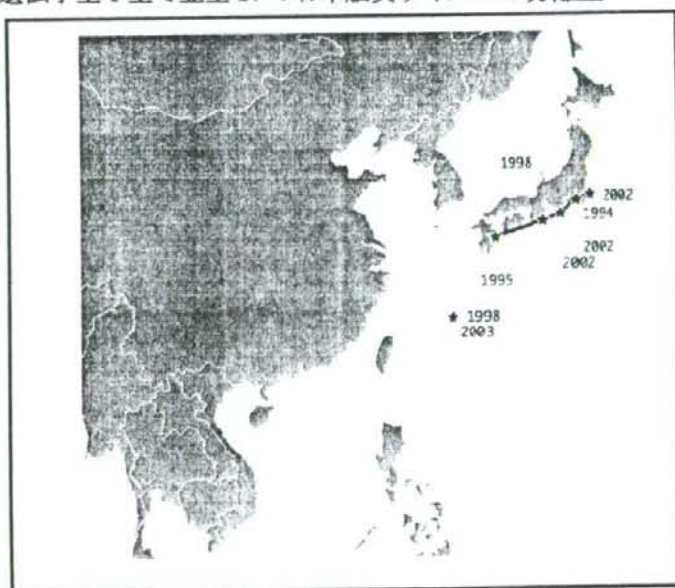
(図2) 遺伝子型I型で亜型Iの日本脳炎ウイルスの分離歴



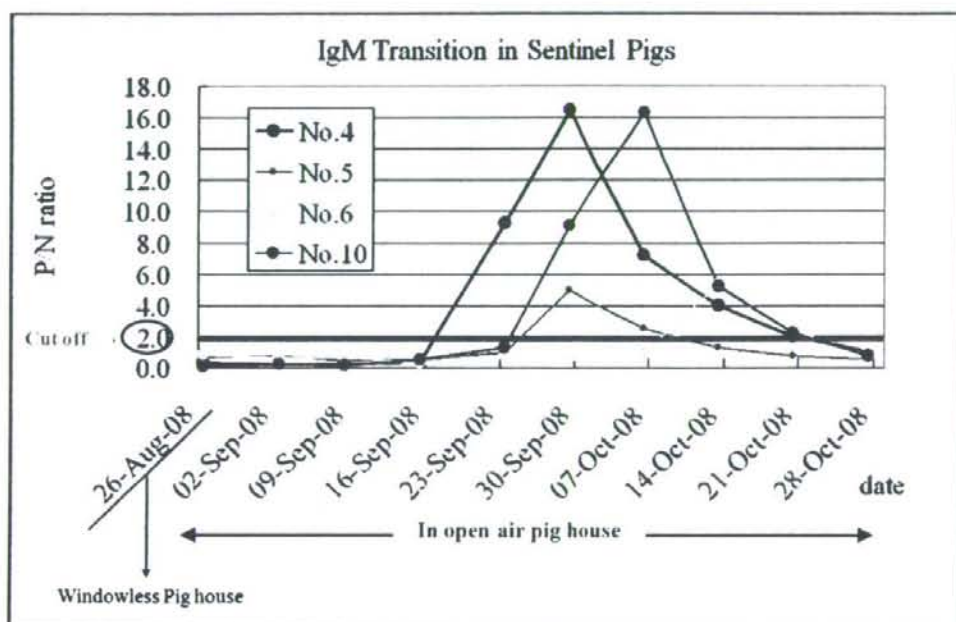
(図 3) 遺伝子型 1 型で亜型 II, III, V の日本脳炎ウイルスの分離歴



(図 4) 遺伝子型 1 型で亜型 IV の日本脳炎ウイルスの分離歴



(図. 5) 五島列島におけるオトリ豚の抗日本脳炎ウイルス IgM の推移



—日本脳炎ウイルスの分離とその病原性に関する研究—

研究分担者 竹上 勉

(金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門)

**研究要旨：** 本邦における日本脳炎患者数は年間10名前後の数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。ウイルス変異の可能性を考えると、JEVの分布状況およびそれら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。我々は石川県における野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点、定時期に行い、さらにウイルス病原性についての解析を行っている。近年では毎年1,000匹台の野外蚊(1,759匹(2005年)、1,458匹(2006年)、885匹(2007年))を採取し、2008年にも990匹の野外蚊を採取した。蚊の破砕液を用いてRT-PCR法及び培養Vero細胞によるウイルス分離を行った。本年のRT-PCR陽性サンプルは7件あったが、ウイルス分離には至っていない。最近の分離株としてはIshikawa-K05株(2005年)(遺伝子タイプ1型)がある。細胞におけるIshikawa-K05株の増殖性については、以前の分離株(石川株(遺伝子タイプ1型)、JaGAR01株(遺伝子タイプ3型))との比較では相対的に低いものであったが、マウスに対する病原性には株間に差異はなかった。他方で、JEVによる病原性の解析を目的としてウイルス感染時における宿主遺伝子の発現動態をDNAマイクロアレイを用いて調べたところ、インターフェロン(IFN)経路遺伝子の発現量のレベルがウイルス増殖速度、増殖量の高低に関わることが明らかになった。こうした手法はJEV感染時のみならず、組織特異性、脳炎発症との関わり等についてより詳細な遺伝子発現解析が可能であり、感染病態の理解がさらに進むであろう。

A. 研究目的

近年の日本国内における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。しかしながら、アジア地区での日本脳炎感染者は年間数万人になるとされ、拡大傾向にある。石川県において2007年に2名の脳炎患者がでている事実等から日本国内での日脳感染ウイルス(JEV)の動向についてより注意が必要であろう。こうした状況の中で、我々は1998年以来、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。本研究では、(1)日本の北部地区におけるJEV分布状況の把握、および(2)ウイルス病原性発現機構の解明を研究目的としている。

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によるCO<sub>2</sub>採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田で行っている。蚊40匹を1プールとして乳鉢にてPBSを入れ、破砕した。破砕液は遠心(10,000 x g、10分間)にて分画した。

**RNA抽出及びRT-PCR：**蚊破砕液を材料として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JEV特異的プライマーのエンベロープ(E)蛋白、NS4a蛋白領域、さらに3'末端領域のプライマーを用いた。

**ウイルス分離：**ウイルス分離のために培養細胞株Vero細胞を用いた。24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

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、BHK細胞を用いてウイルス力価を計測した。

**遺伝子配列解析:** 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産物をテン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。

**遺伝子発現の解析:** 感染細胞から抽出されたRNAを増幅・標識し、DNAマイクロアレイシステム(Affymetrix)を用いて宿主細胞遺伝子の発現量を調べた。

**マウス実験:** ウイルスのマウスに対する病原性を調べるためにマウスICRにウイルスを接種(ip)し、生死を観察した。なお、倫理的な側面については金沢医大動物委員会での承認を受けて実験を進めている。

### C. 研究結果

例年、1,000匹位の野外蚊(1,759匹(2005年)、1,458匹(2006年)、885匹(2007年))を採取しているが、2008年には990匹の野外蚊を採取した。抽出RNAについてJEV特異的プライマーを用いたRT-PCR法によって7件の陽性サンプルを得たが、Vero細胞を利用したウイルス分離は成功していない。2005年サンプルからの分離ウイルス、Ishikawa-K05株(遺伝子タイプ1型)についてマウスに対する毒性を調べた。Ishikawa-K05株は比較的用いたIshikawa株(94年分離)(遺伝子タイプ1型)、JaGAR01株(遺伝子タイプ3型)に比べ、細胞における増殖性は低いものであったが、マウスに対する病原性に差異は無く、強いものであった。遺伝子解析を含め他の生物活性を調べている。ウイルス感染細胞における遺伝子発現についてDNAマイクロアレイを用いて調べた。細胞におけるウイルス増殖レベルはIFN経路遺伝子発現量(OASL、GIP2、IFI44、IFIT1等)の高低に依存していることが分かった。

### D. 考察

2008年採取野外蚊からのRNAサンプルではRT-PCR、ヌクレオチド解析の陽性が7プール認められたが、ウイルス分離には至らなかった。しかしJEVが北陸地域に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。2005年に我々の分離したウイルス(Ishikawa-K05)については引き続き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、マウスに対する病原性等は必ずしも低くはない。またウイルス感染に伴う宿主細胞における全遺伝

子発現の網羅的解析では、IFN経路遺伝子発現の差異がウイルス増殖性に大きく影響することを明らかにすることができた。

ここに示した結果は、現在の日本国内におい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。現に2007年には日本脳炎患者が石川県において発生している。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、近い将来に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、引き続き分布ウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。

### E. 結論

マウス実験から2005年分離のJEV株(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ1型)の病原性は必ずしも低いものではなく、近年の国内分布ウイルスの病原性変動に注目すべきである。DNAマイクロアレイによる解析で、JEV増殖性にIFN経路遺伝子発現量の差異が大きく影響することが再認識された。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Yamakawa J, Ishigaki Y, Takao F, Takahashi T, Yoshida J, Moriya J, Takata T, Tatsuno T, Sasaki K, Ohta T, Takegami T, Yoshizaki F: The Kampo Oregedokuto, Bofutsushosan and Boiogito have different activities to regulate gene expression in differentiated rat white adipocytes: Comprehensive analysis of genetic profiles. *Bio Pharm Bull* 31: 2083-2089, 2008
- (2) Sun W, Dong L, Takegami T et al.: Bacterial diversity in synovial fluids of patients with RMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio* 1 Endod 105:566-571, 2008
- (3) Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T: Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229:232-238, 2008
- (4) Nagao A, Takegami T, Nakagawa H, Matsui S, Matsunaga T, Ishigaki Y: Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene. *Biochem. Biophys. Res Commun* 370: 301-305, 2008

## 2. 学会発表

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、太田隆英、石垣靖人、竹上 勉：石川県での分離JEVの生物活性  
第43回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、観音寺 (2008, 5)
- 2) 竹上 勉、村上 学、佐藤杏子、太田隆英、石垣靖人：日本脳炎ウイルス感染に伴う宿主遺伝子 発現の網羅的解析、第 12 回神経ウイルス研究会、屋久島 (2008, 7)
- 3) 太田隆英、前田雅代、村上 学、竹上 勉、遠家雅明：B16メラノーマ細胞の実験転移に対する l a p a c h o l の二面的な作用、第67回日本癌学会総会、名古屋 (2008, 10)
- 4) 竹上 勉、村上 学、佐藤杏子、太田隆英、石垣靖人：日本脳炎ウイルス感染による宿主遺伝子発現およびmiRNA動態への影響、第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、岡山 (2008, 10)
- 5) 村上 学、佐藤杏子、竹上 勉：石川県(1998年—2008年)での野外蚊からの日本脳炎ウイルス分離と生物活性、第56回日本ウイルス学会、岡山 (2008, 10)
- 6) 佐藤杏子、村上 学、竹上 勉：HCV-NS3発現細胞における宿主遺伝子発現の解析、第56回日本ウ

イルス学会、岡山 (2008, 10)

- 7) 佐藤杏子、村上 学、太田隆英、石垣靖人、竹上 勉：HCV-NS3導入による宿主遺伝子の発現誘導、第31回日本分子生物学会、神戸、(2008, 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

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

### 分担研究報告書

#### わが国における日本脳炎の現状と、日本脳炎ウイルスに関する検討

研究分担者 多屋馨子(国立感染症研究所 感染症情報センター)

研究協力者 新井 智、佐藤 弘、荒木和子(国立感染症研究所 感染症情報センター)

#### 要約

日本脳炎は近年患者報告数が減少し、西日本を中心に年間 10 例未満の報告にとどまっている。しかしながら、環境中には日本脳炎ウイルス陽性蚊の存在やブタの抗体価の上昇などウイルスの存在を示す状況証拠が示されている。本年の研究では、近年のヒトにおける感染状況の把握と流行株の検索に重点を置いて検討した。2008 年度感染症流行予測調査（速報：暫定値）における日本脳炎ウイルスに対するヒト抗体陽性率は、日本脳炎の定期予防接種が 2005 年 5 月に積極的勧奨の差し控えとなったことから、接種者が激減し、3～5 歳群の抗体保有率は 10%台と極めて低く、6 歳でも 30%台の抗体保有率となっている。7 歳以降、10-14 歳群まで上昇しその後 15-19 歳群までは高い割合で維持され、その後低下を始め 45-49 歳群が最低となり再度上昇する。この形は近年変化がないが、最近の 40 代の抗体陽性率の低下は著しく、2008 年度の結果では 40 代後半は 10%代にまで低下している。若年群を主にワクチンによる抗体価の上昇と考えると、ワクチンによる免疫効果は、最近第二期もしくは三期（2005 年に中止）の追加接種を受けた年齢群である 10 代では比較的高い値で維持されているが、20 代後半以降から低下している。患者報告が 40 代以上に集中している事実を考慮すると、中高年層への対策としてワクチンの追加接種が必要かもしれない。フラビウイルス科のウエストナイルウイルスやデングウイルスでは、エンデミック地域においても、2000 年のイスラエルでのウエストナイルウイルスや、東南アジアでのデングウイルスの流行等が報告されており、引き続き日本における日本脳炎ウイルス対策を講じる必要がある。一方、2003 年と 2008 年のブタ血清から分離したウイルスの遺伝子性状より、近年報告のある 3 末端の欠失が 2003 年と 2008 年の 5 年間の間に発生したことが明らかになった。更に欠失部位が延長するのか、今後の解析が望まれる。また、家畜用に用いられている生ワクチン株の全塩基配列を決定した。既に報告されている情報と一部配列が異なるため、次年度早急に検証する予定である。

#### A 目的

日本脳炎は、東アジアから東南アジア及び南アジアに広く発生が認められ、年間約 1 万人の死者が生じている重篤な感染症である。しかしながら日本では、近年患者報告数が年間 10 例を下回るようになり、また、2005 年には、予防接種の積極的勧奨の差し控えがなされ、感染リスクの実態把握が急

務となっている。

今回我々は、感染症流行予測調査による日本脳炎ウイルスに対する抗体保有率調査の結果を元に、ヒトにおける日本脳炎ウイルス感染の実態把握と、島根県のブタから日本脳炎ウイルスの分離を同時に進めウイルス性状とヒトにおける感染状況の把握に努めた。

また、日本脳炎ワクチンの病原性に重要な部位を検索するために日本で使用されている家畜用弱毒生ワクチン株と親株の全塩基配列を明らかにし、両者の比較から病原性や弱毒化に重要な領域の検索を行った。

## B 研究方法

- ① 現在の日本脳炎感染状況の把握—感染症流行予測調査で用いているヒト血清抗体保有状況調査の結果を用いて比較した。
- ② 流行ウイルス株の解析—島根県で2003年および2008年に採血されたブタ血清を用いてVero細胞によって日本脳炎ウイルスの分離を行った。得られたウイルスは、培養液からVirus RNAを抽出し、Reverse transcriptionを行い、PCRを用いて全領域を増幅してダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。
- ③ 日本脳炎ウイルスの弱毒化影響部位の検索—日本でブタに用いられている弱毒生ワクチン株、3株(m株：京都微生物研究所、at株：日本生物研究所およびML-17株：阪大微生物研究会)と親株2種類(AT31株：at株の親株、およびJaOH0566株：ML-17株の親株)を用いた。ワクチン株mの親株mukai株は現存しておらず、入手することはできなかった。ウイルスはVero細胞に感染させた後、培養液からVirus RNAを抽出し、上記同様の方法で塩基配列を決定した。

## C 研究成果

- ① 感染症流行予測調査における抗体保有状況(速報:暫定値)から、2008年度

の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有率は10代で最も高く、その後右肩下がりに減少し、45-49歳群で最も低くなり、その後再び上昇する二峰性であった。過去の調査結果と比較すると、40代の抗体保有率の低下が著しい。また、3-5歳群の抗体保有率は10%台と極めて低く、50%以上の人が1:10以上の中和抗体を保有しているのは7歳~20代までと70歳以上群のみであった。10代は予防接種による抗体保有率の上昇と考えられるため、その後の抗体保有率の低下は、予防接種効果の持続時間を示していると予想される。日本脳炎ワクチンの効果は生涯持続するものではなく、追加接種後約30年を経過する40代後半になると中和抗体保有率は10%台にまで低下していた。

- ② 2003年及び2008年の島根県のブタ血清検体から、それぞれ6株と1株のウイルスを分離することに成功した。現在まで確定した部分塩基配列から、遺伝子型はGenotype 1のウイルスであった。2008年の分離株は、2003年の分離株に比べ3' UTRが9-bp短くなっており、2003年から2008年の間にウイルスゲノムRNAが変化していることが明らかになった。暫定配列を用いた2003年のウイルス株との相同性は、98.4-98.7%でウイルス遺伝子全体に違いが確認され、特定の部位に変異が集積しているような結果は得られなかった。
- ③ ワクチン株3種と親株2種の全塩基配列を決定した。全長はいずれの株も10977 nt、推定されたアミノ酸は3432 aaで、ワクチン株に共通で親株と異な



るアミノ酸配列は Envelope の一アミノ酸のみであった。このワクチン株にのみ共通のアミノ酸は、中国でヒトに対して使用されている弱毒生ワクチン株においても保存されていた。本アミノ酸変異部位は既に弱毒化に影響のある部位として報告されているものであったが、病原性において極めて重要な部位である可能性が改めて示唆された。

#### D 考察

- ① 感染症流行予測調査における抗体保有率は 5 歳以下群と、45-49 歳群で著しく低い。日本脳炎ワクチンは 1954 年に勧奨接種として始まったことから、日本脳炎ワクチンを過去に受けたことのあるポピュレーションは 2008 年現在 54 歳よりも若年例のグループである。接種開始時のワクチン接種量が明らかでないためどの程度の人数に接種されたか不明であるが、定期予防接種ではないこともあり限られたポピュレーションと予想される。一方、それ以上の年齢層では予防接種による抗体保有ではなく自然感染の状況を示しているものと予想される。今後日本脳炎ワクチン及び自然感染による免疫効果がどの程度維持されるのか明らかにする必要がある。
- ② 2008 年に分離された日本脳炎ウイルスの 3' 末端に欠失部位が確認された。この欠失部位は、2003 年のブタ血清から分離したウイルス株には認められていないことから、2003 年から 2008 年の 5 年間の間

に何らかの影響によって欠失したものと予想される。この欠失が、ウイルス増殖過程で発生したものなのか、それとも欠失したウイルスとの組換えによって発生したものなのか明らかではないが、今後更に欠失領域が拡大するのか興味深い結果である。

- ③ ワクチン株との比較であるが、既にいくつかの論文が報告されている。Zhao らは、日本生物化学研究所の AT31 および at 株の比較を行っている。我々の結果と似通った結果であった。一方、Shah らが報告した結果との間にも全長及び、変異部位が異なっているため再度全シーケンスを行い検証する必要がある。次年度の早い時期に再確認する予定である。また、ワクチン株間にも塩基配列だけでなく増殖スピードやブラックの染色に若干の違いが認められた。これらについても解析を進め、ワクチン株間での性状の違いについて明らかにする予定である。

#### E 結論

- ① ヒト抗体保有状況から、日本脳炎ワクチンの効果は 30 年未満であると予想された。
- ② 抗体保有率が特に低い 5 歳以下群と 40 代後半群の対策が急務である。
- ③ 2003 年と 2008 年に島根県のブタから分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子性状から、5 年間の間に同一地域のウイルスの 3' 末端の特徴的な欠失が発生したことが明らか

かになった。

- ④ 家畜用日本脳炎ワクチンの全長配列を決定することができた。

#### F 健康危機管理情報

5歳以下と40代後半の日本脳炎中和抗体保有率が著明に低い。

#### G 研究発表

1. 多屋馨子. ワークショップ「日本脳炎ワクチンの展望」日本脳炎の国内における疫学. 第12回日本ワクチン学会. 2008
2. 新井 智、多屋馨子、岡部信彦. 家畜用日本脳炎生ワクチン株に認められたアミノ酸変異. 第12回日本ワクチン学会 2008.
3. 新井 智、多屋馨子、岡部信彦. 日本脳炎生ワクチン株に認められたアミノ酸変異. 日本獣医学会. 2008年10月

#### H 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1 2008年度感染症流行予測調査事業 日本脳炎感受性調査（速報）  
（2009年3月12日時点集計値）

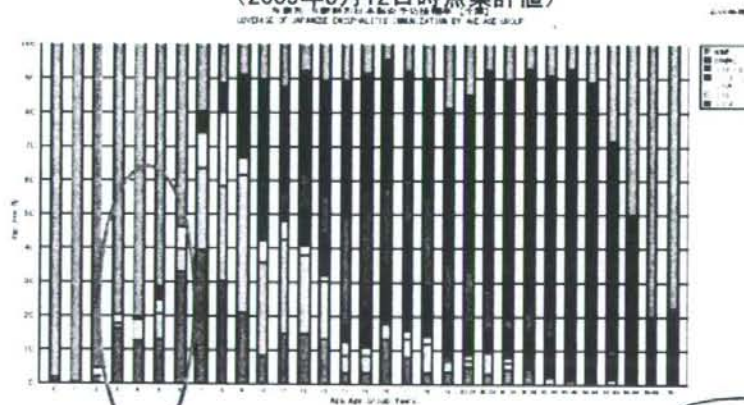
都道府県別年齢群別日本脳炎感受性調査数 2008年度  
NUMBER OF EXAMINEES FOR JAPANESE ENCEPHALITIS SUSCEPTIBILITY INVESTIGATION BY PREFECTURE AND AGE GROUP

都道府県 PREFECTURE	合計 TOTAL	年齢群（歳） AGE GROUP (YEARS)								
		0-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-
合計 TOTAL	2983	468	296	315	262	395	526	313	287	119
山形 Yamagata	252	56	35	32	6	30	30	30	30	3
東京 Tokyo	350	82	43	37	39	42	32	28	35	12
新潟 Niigata	438	40	34	40	28	24	199	90	29	4
富山 Toyama	218	25	17	33	24	46	42	31	44	26
愛知 Aichi	225	29	29	29	29	25	25	25	25	9
三重 Mie	289	53	29	28	33	78	39	17	10	2
大分 Ooka	308	58	30	19	41	62	44	19	26	9
愛媛 Ehime	266	25	36	44	25	28	29	27	25	25
熊本 Kumamoto	225	25	25	25	25	25	25	25	25	25
沖縄 Okinawa	292	85	18	28	12	35	41	21	28	4

※ 政令指定都市 (PO: MANDATE-DESIGNATED CITY)

実行予測2008

図1 2008年度感染症流行予測調査事業 日本脳炎感受性調査（速報）  
（2009年3月12日時点集計値）



実行予測2008

