

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

沖縄県の宮古島、石垣島、久米島、与那国島のブタおよび  
西表島の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルス感染状況調査

研究分担者 玉那覇 康二 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班班長

研究要旨：沖縄県沖縄本島以外の島の日本脳炎ウイルス（JEV）活動状況を把握する目的で、宮古島、石垣島、久米島、与那国島のブタおよび西表島のイノシシの血清中 JEV 抗体保有状況を赤血球凝集抑制（HI）試験により調査した。ブタ血清は 5～10 ヶ月齢のブタから、2005～2007 年に宮古島 125 検体、石垣島 112 検体、久米島 42 検体、2006～2007 年に与那国島 54 検体を集めた。イノシシ血清は 2008 年 11 月～2009 年 2 月に西表島 20 検体を集めた。結果、石垣島の 5 検体（4.5%）および西表島の 15 検体（75.0%）が HI 抗体陽性を示し、石垣島の 5 検体中 4 検体が 2-メルカプトエタノール感受性抗体（IgM 抗体）陽性を示した。宮古島、久米島、与那国島の検体は全て HI 抗体陰性を示した。沖縄本島を含めた西日本のブタの HI 抗体陽性率が、毎年、夏季には 80% を越えることからすると、宮古島、石垣島、久米島、与那国島の JEV 活動状況は極めて低いと考えられた。しかし、西表島の JEV 活動状況は、我々の以前の調査と比べて、活発になったことが考えられた。また、石垣島と西表島の全検体について、E 領域を標的とした RT-PCR による JEV 遺伝子の検出を行った結果、石垣島の 1 検体が陽性を示した。この JEV 遺伝子の E 領域の一部 151nt の塩基配列を解析し、既知の JEV 株との系統解析を行った結果、genotype 3 に属し、1985～1996 年に台湾で分離された株と同一のクラスターを形成した。近年、日本国内や沖縄本島から検出される JEV は genotype 3 から genotype 1 となっていることから、石垣島では過去に台湾から侵入した JEV が依然として維持されている可能性が考えられた。今回、石垣島の JEV 活動状況は極めて低いことが示されたが、IgM 抗体および JEV 遺伝子が検出された。石垣島では養豚および稲作が行われていることから、今後、JEV 活動が活発になる可能性が考えられる。また、石垣島の JEV の維持および西表島の JEV 活動が活発になった要因として、石垣島のブタの JEV 抗体陽性率が極めて低いことや西表島では養豚は行われていないことから、ブタ以外の家畜やイノシシなどの野生動物が関与している可能性が考えられた。これらのことから、JEV の動向把握と生態的解明のためにも、沖縄本島以外の島においても JEV 調査は引き続き重要であると考えられた。

#### A. 研究目的

厚生労働省、国立感染症研究所、都道府県および都道府県衛生研究所等が協力して実施している感染症流行予測調査事業では、我が国における日本脳炎ウイルス（JEV）活動状況の把握のため、赤血球凝集抑制（HI）試験によるブタの JEV 抗体保有状況の調査が行われている。沖縄県も当事業には参加しているが、調査は沖縄本島のみで行

っているため、これ以外の島の JEV 活動状況については多くが不明である。そこで今回、沖縄県宮古島、石垣島、久米島、与那国島のブタについて JEV 感染状況調査を行った。また、養豚が行われていない西表島においては、JEV の増幅動物としての可能性が示唆されている野生イノシシについて調査を行った。

## B. 研究方法

ブタ血液は 2005～2007 年に宮古島、石垣島、久米島、2006～2007 年に与那国島において、5～10 ヶ月齢のブタから採血を行った。それぞれの検体数を表 1 に示す。イノシシ血液は 2008 年 11 月～2009 年 2 月に西表島において、ハンターの協力により 20 検体を集めた。集められた血液は 3,000rpm、10 分間遠心して血清を分離し、血清を試験に供するまで -80℃ で保存した。

血清からの JEV 抗体の検出は JaGAR #01 株 (Denka Seiken, Tokyo, Japan) を 4 単位に調整し抗原とした HI 試験により行った。血清は 1:10 から 1:5120 まで 2 倍階段希釈し、HI 抗体価が 1:40 以上を示した検体は 2-メルカプトエタノール (2-ME) で処理し、2-ME 感受性抗体 (IgM 抗体) の検出を行った。

HI 抗体陽性検体が確認された島の全検体について、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) により血清 140  $\mu$ l からウイルス RNA を検出し、E 領域を標的とした RT-PCR およびその PCR 産物を用いた nested-PCR により JEV 遺伝子を検出した (プライマーセット: JEen37s-first、JEen329c-first および JEen98s-second、JEen301c-second [Kuwayama ら、2005])。検出された JEV 遺伝子については、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing with TOP10 *E. coli* (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いてクローニング後、ABI PRISM BigDye Terminator version 3.1 system および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) を用いて E 領域の一部 151nt の塩基配列を解析し、MEGA version 4.0 により既知の JEV 株との系統解析を行った。

(倫理面への配慮)

ブタ血液検体については、と畜場に搬入されたブタからと殺時に採血したものであり、イノシシ血液検体については狩猟期間中にハンターらにより捕獲され、解体時に採血を行ったものであるこ

とから、倫理面の問題は無いと判断した。

JEV 遺伝子のクローニングについては、当所の遺伝子組換え実験委員会に実験計画を届出、承認後に実施した。

## C. 研究結果

石垣島のブタ 112 検体中 5 検体 (4.5%) と西表島のイノシシ 20 検体中 15 検体 (75.0%) が HI 抗体陽性を示し、そのうち石垣島の 5 検体中 4 検体が IgM 抗体陽性を示した。宮古島、久米島、与那国島のブタは全て HI 抗体陰性であった。HI 抗体陽性検体の HI 抗体価を表 2 に示す。石垣島の HI 抗体陽性検体はいずれも 2005 年 8 月に集められた 39 検体に含まれていた。よって、石垣島の 2005 年 8 月の HI 抗体陽性率は 12.8% (5/39) であった。

石垣島のブタ 112 検体中 1 検体から JEV 遺伝子が検出された。この検体は 2005 年 8 月に集められた検体で、HI 抗体は陰性であった。この検体を Vero および C6/36 細胞を用いたウイルス分離に供したが、JEV は分離されなかった。検出された JEV 遺伝子の塩基配列を既知の JEV 株と比較した結果 (図 1)、genotype 3 に属し、1998～2008 年に日本国内や沖縄本島で分離された株とは異なる genotype に分類された。また、1982～1991 年に日本や韓国、中国で分離された株や、2002～2004 年に中国で分離された株とは異なるクラスターに分類され、1985～1996 年に台湾で分離された株と同一のクラスターを形成した。

## D. 考察

流行予測調査において沖縄本島を含めた西日本のブタの JEV 抗体陽性率が毎年、夏季には 80% を越えることからすると、宮古島、石垣島、久米島、与那国島における JEV 活動状況は極めて低いことが考えられた。宮古島および久米島の JEV 活動が低い要因として、これらの島は水田がない、もしくは極めて少ないことから、水田を主な発生地とするコガタアカイエカの数が少ない可能性があり、これが関与していると考えられた。一方、

石垣島と与那国島は水田が豊富にあるが、過去に大規模な蚊の駆除作業や島内のブタの全頭と殺を行っており、これが関与していると考えられた。

一方、西表島のイノシシの HI 抗体陽性率は 75.0%を示した。我々が 1997～2005 年に行った ELISA による沖縄本島および西表島の野生イノシシ血清中 JEV 抗体調査の結果では、沖縄本島の JEV 抗体陽性率が 64.6% (64/99)、西表島は 3.7% (1/27) を示したことからすると (Nidaira ら、2007)、今回の調査までの間に西表島の JEV 活動が活発になったと考えられた。西表島では稲作が行われているが養豚は行われていないことから、JEV 活動が活発になった要因として、JEV 増幅動物としての可能性が示唆されているイノシシが関与していることが考えられた。また、渡り鳥により一時的に多くの JEV が持ち込まれた可能性や、以前の調査ではイノシシ血清が島の東部を中心に集められたのに対して、今回は西部を中心に集められたことから、西表島では以前から JEV 活動は活発であったが、地区によって活動に差がある可能性も考えられた。

近年、日本国内や沖縄本島から検出される JEV は genotype 3 から genotype 1 となっているが、今回、石垣島のブタから検出された JEV 遺伝子は genotype 3 であり、1985～1996 年に台湾で分離された株と近縁であった。石垣島では過去に台湾から侵入した JEV が依然として維持されている可能性が考えられた。さらにブタの JEV 抗体陽性率が極めて低いことから、石垣島の JEV 感染環にブタ以外の家畜やイノシシなどの野生動物が関与している可能性が考えられた。

今回の調査の結果、宮古島、石垣島、久米島、与那国島における JEV 活動状況は、沖縄本島と比較すると極めて低いことが示された。しかし、石垣島では IgM 抗体および JEV 遺伝子が検出された。石垣島は養豚、稲作が行われ、JEV が感染環を形成しやすい環境にあることから、今後、JEV 活動がより活発になる可能性がある。また、西表島の JEV 活動は我々の以前の調査以降、活発になり、これには渡り鳥やイノシシが関与しているこ

とが考えられた。石垣島の JEV の維持についても、ブタ以外の家畜やイノシシなどの野生動物が関与している可能性があり、JEV の動向把握と生態的解明のためにも、沖縄県沖縄本島以外の島における JEV 調査は引き続き重要であると考えられた。

#### E. 結論

- 1) 宮古島、石垣島、久米島、与那国島における HI 試験によるブタ血清中 JEV 抗体保有状況調査の結果、これらの島の JEV 活動状況は、沖縄本島や西日本と比べて極めて低いことが示された。
- 2) 西表島の HI 試験によるイノシシ血清中 JEV 抗体保有状況調査の結果、西表島の JEV 活動は、我々の以前の調査以降、活発になったことが考えられた。その要因として JEV 増幅動物としての可能性が示唆されているイノシシや渡り鳥の関与などが考えられた。
- 3) 石垣島のブタから genotype 3 の JEV 遺伝子が検出され、この株は 1985～1996 年に台湾で分離された株と同一のクラスターを形成した。石垣島では過去に台湾から侵入した JEV が依然として維持されており、これにはブタ以外の家畜やイノシシなどの野生動物が関与している可能性が考えられた。

#### G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：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

表 1. 宮古島、石垣島、久米島、与那国島の各月毎の合計ブタ血液検体数

島名	月												合計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
宮古島	-	-	-	-	-	31	0	89	5	-	-	-	125
石垣島	-	-	-	-	-	7	10	52	43	-	-	-	112
久米島	-	-	-	-	-	4	10	15	1	2	1	9	42
与那国島	1	1	2	7	8	5	3	11	7	4	3	2	54

-: 未実施

表 2. 石垣島のブタおよび西表島のイノシシの HI 抗体陽性検体の HI 抗体価

島名	検体 No.	採血年月	体重(kg)	性別	HI 抗体価	2-ME 処理 抗体価	IgM*
石垣島	1	2005.8			1280	160	+
	2	2005.8			640	160	-
	3	2005.8			40	<10	+
	4	2005.8			640	80	+
	5	2005.8			2560	80	+
西表島	1	2008.11	36	オス	80	20	-
	2	2008.11	20	メス	10		
	3	2008.12	37	オス	320	80	-
	4	2008.12	30	オス	20		
	5	2008.12	37	オス	160	80	-
	6	2008.12	18	オス	80	40	-
	7	2008.12	40	オス	40	10	-
	8	2008.12	30	オス	20		
	9	2009.1	23	メス	40	20	-
	10	2009.1	27	メス	10		
	11	2009.1	22	メス	40	10	-
	12	2009.1	20	メス	20		
	13	2009.1	30	オス	20		
	14	2009.1	20	メス	40	10	-
	15	2009.2	24	メス	40	20	-

\*: IgM は HI 抗体価と 2-ME 処理抗体価の差が 8 倍以上で陽性とした

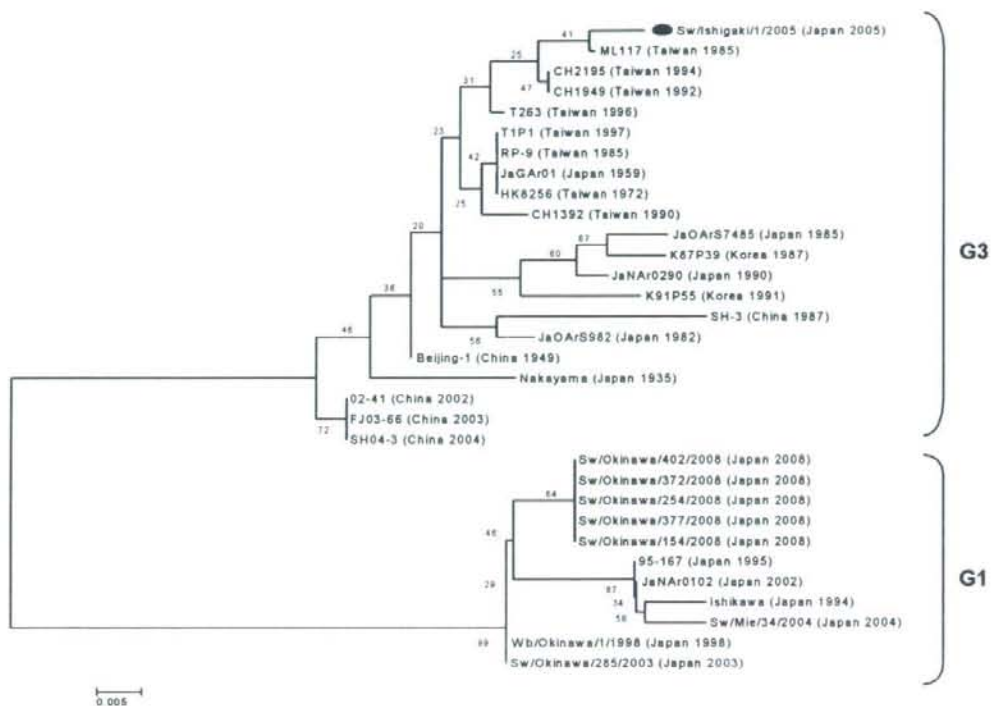


図 1. E 領域の一部 15nt をもとに作製された系統樹

● : 本研究で分離された JEV 株

## イノシシから分離された日本脳炎ウイルス

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者 倉根一郎、小滝 徹、田島 茂  
（国立感染症研究所ウイルス第一部）

### 研究要旨：

日本脳炎ウイルスの研究は、1960年代の年間数千人の患者の発生があった当時、日本脳炎の研究も活発にすすめられた。しかしながら、日本脳炎ウイルスの越冬に関する謎は解明にいたらなかった。日本脳炎ウイルスの増幅動物としては、ブタが最も効率の良い動物である。しかし最近、西日本を中心に人の住環境に野生のイノシシが出現する機会が増えている。一方、近年ブタの近縁動物であるイノシシが日本脳炎ウイルス抗体を有していると報告されるようになってきた。そこでイノシシがブタ同様、日本脳炎ウイルスの増幅動物であり、感染源となりうるのかという点から、兵庫県西宮市を中心に住環境に出現し、有害鳥獣として捕獲されたニホンイノシシ (*S. scrofa leucomystax*) の血液から日本脳炎ウイルスの分離を試みた。その結果、12月上旬に捕獲されたイノシシから日本脳炎ウイルスを分離できた。遺伝子解析の結果、分離ウイルスは近年日本国内のブタから分離されるウイルスに近似であった。野生のイノシシが日本脳炎ウイルスの保有動物であることが確認され、増幅動物である可能性も示唆された。

### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスの研究は、1960年代の年間数千人の患者の発生があった当時、日本脳炎の研究も活発にすすめられた。しかしながら、日本脳炎ウイルスの越冬に関する謎は解明にいたらなかった。日本脳炎ウイルスの増幅動物としては、ブタが最も効率の良い動物である。しかし最近、西日本を中心に人の住環境に野生のイノシシが出現する機会が増えている。イノシシの日本脳炎ウイルスに対する感受性および増殖性が、ブタと同等であった場合、ヒトへの新たな感染リスクの一つとなる。そのため、捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルスの分離を検討した。

### B. 研究方法

#### イノシシおよび血清

イノシシの捕獲場所は、兵庫県下、西宮市を中心とした市街地である。当該イノシシは兵庫県西宮市甲陽園目神山町で、平成20年12月12日に捕獲された。ただちに採血し15日に血清を分離した。

#### ウイルス遺伝子検出：

イノシシの血清200 $\mu$ lからRNAを抽出し、リアルタイム RT-PCR (TaqMan法)により、ウイルス遺伝子を検出した。プライマー・プローブセットは遺伝子1型用、3型用および共通プライマー・プローブセットの3種類(表1)のものを、リアルタイム RT-PCR (TaqMan法) は伊藤ら

(J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,

2004) の方法により、Step One Plus-1リアルタイムPCRシステム(ABI社)により実施した。

ウイルス分離:ウイルス分離にはサル腎由来のVero細胞を用いた。また、血清中感染性粒子数は、Vero細胞を用いたブランク形成法により実施した。

ウイルス遺伝子配列の決定:

日本脳炎ウイルス1型遺伝子用のプライマーを用いてダイレクトシークエンスにより、ABI prism Avant 7100(ABI社)によりプロトコールに従い塩基配列を決定した。

#### C. 研究結果

捕獲されたイノシシは、オスで体重25Kg、推定年齢1歳であった。抗日本脳炎ウイルスIgM抗体、IgG抗体はともに陰性であった。

イノシシから分離されたウイルスは、遺伝子1型ウイルスであり、近年日本国内のブタから分離されるウイルスと極めて近似であり、2004年に三重県のブタから分離されたウイルス(Mie40株、GenBank#AB231463)との相同性は99.4%であった(図1)。また血清中のウイルス遺伝子配列と分離ウイルスの遺伝子配列は100%一致した(図2)

血清中のウイルス量は、ウイルス遺伝子数として $4.4 \times 10^5$  copies/mL、感染性粒子数として $2 \times 10^3$  pfu/mLであった。ただし、上記の結果は、捕獲採血後4℃の条件で1週間経過した時点でのウイルス力価である。

#### D. 考察

ブタに近縁のイノシシが日本脳炎ウイルスに感染することはある程度予想されることである。実際にイノシシにおける抗日本脳炎抗体保有に関する報告

(Hamano M. *et al.* Epidemiol Infect.2007, 135:974-977.)を行っている。しかし、今回の日本脳炎ウイルスの分離から、日本イノシシが日本脳炎ウイルスに感染し、ウイルス血症をきたすことが証明された。ウイルス血症の力価はそれほど高くなかったが、採血から遺伝子検出まで7日間、ブランク法による感染性粒子測定まで10日間4℃で保存されていたことを考えるとイノシシの生体内でのウイルス力価はそれ以上に高く感染蚊が成立するのに十分なウイルス血症であった可能性がある。また、イノシシに付着しているダニが吸血し春先に別のイノシシ特に子イノシシ(ウリ坊)などを吸血することで日本脳炎ウイルス越冬の一つの機序となっている可能性がある。今後、3月以降の春先の捕獲イノシシの血液から日本脳炎ウイルス遺伝子の検出およびウイルス分離を進める必要がありその予定である。

#### E. 結論

平成20年12月上旬に、兵庫県西宮市で捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルスが分離された。イノシシは近年、国内のブタから分離されたウイルスと近縁なウイルスであった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

## 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

Takasaki Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Hirayama, Y. Mizuno, N. Takeshita, I. Kuran. Diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue virus genome in urine and saliva. The second international conference on dengue and dengue haemorrhagic fever (Phuket, Thailand) 2008. October.

貫井陽子、小滝徹、田島茂、林昌宏、加藤文博、大松勉、小杉伊三夫、高崎智彦、倉根一郎。2007年度国内日本脳炎患者髄液より分離したウイルスの分子疫学的解析および過去3年間における日本脳炎症例のまとめ。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日(観音寺市)

林昌宏、根路銘令子、小山田敏文、清水良太、田島茂、貫井陽子、水野俊秀、大松勉、小滝徹、モイメンリン、池田真紀子、倉根一郎、高崎智彦。三重県の同一農場から分離された日本脳炎1型ウイルスのマウスにおける病原性解析。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日(観音寺市)

大松勉、渡辺俊平、上田直也、伊波興一郎、Joseph S. Masangkay、明石博臣、吉川泰弘、高崎智彦、倉根一郎。フィリピンのコウモリにおけるアルボウイルスの暴露について。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日(観音寺市)

藤井克樹、早坂大輔、小池智、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎。フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28. 2009(岡山市)

北浦一孝、藤井克樹、林昌宏、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎。ウエストナイルウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28. 2009(岡山市)

江下優樹、牧野芳大、湯偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎。アカイエカにおける日本脳炎ウイルスの増殖について。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日(観音寺市)

高崎智彦。昆虫媒介感染症～ Dengue熱を中心に～。第23回 Transfusion Medicine Conference。2009年1月31日(神奈川県葉山町)

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



表 1 日本脳炎ウイルス用 TaqMan RT-PCR primer, probe セット

JEV primer & probes		
Genotype 1&3	JEen585pb562s623c	ACTRAACACTGAAGCGT
	JEen562s-585	CTGGAYTGTGARCCAAGGA
	JEen623c-585	GAHCCCACGGTCATGA
Genotype 1	JE1en1082pb	CTCAAGCAGCAAA
	JE1&3en1052s-1082	ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT
	JE1en1119c-1082	GGGAGCGTTTGGAGTTACAGTAA
Genotype 3	JE3en1082pb	CCCAGGCGGCAAA
	JE1&3en1052s-1082	ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT
	JE3en1119c-1082	AGGAGCATTGGGTGTTACTGTAAA

日本では従来遺伝子 3 型の日本脳炎ウイルスが流行していたが、現在は 1 型が活動しているため 1 型と 3 型を共通に検出するセットと、それぞれを区別するセットを合計 3 セット開発した。反応液組成と反応条件は文献(J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004)と同様である。



## 日本国内でブタおよび蚊から分離された日本脳炎ウイルスの解析

研究分担者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者 小滝 徹、田島 茂、高崎智彦  
（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
小川知子（千葉県衛生研究所）  
田部井由紀子（東京都健康安全研究センター）  
足立 聡（静岡県環境衛生科学研究所）  
古田裕子（静岡県西部食肉衛生検査所）  
赤地重宏（三重県保健環境研究所）  
島津幸枝（広島県保健環境センター）  
池野宏彦（高知県衛生研究所）  
原田誠也、西村浩一（熊本県保健環境研究所）  
仁平 稔、玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所）

### 研究要旨：

近年、ブタから分離される日本脳炎ウイルスは、3' NCR 領域に遺伝子欠損が認められる株が多い。この欠損がどのような生物学的意味を持っているかは不明である。近年の分離株は遺伝子 1 型ウイルスであるが、今回 1980 年代に京都で蚊から分離された日本脳炎ウイルスは遺伝子 3 型ウイルスであったが、これらの 3 型ウイルスに関しても、1980 年代後半の分離株に関しては 3' NCR 領域に欠損があった。しかし、1981 年のウイルス株 (3 型) では欠損が認められなかった。これらの解析から、3' NCR 領域の欠損は遺伝子型 1 型、3 型にかかわらず、この 30 年ほどの間に認められるようになってきたものであり、蚊におけるものであるかあるいは増幅動物におけるものであるか不明であるが、何らかの生物学的な利点があって欠損しだしている可能性がある。ヒトに対する病原性も含めて今後解明する必要がある。

### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスの日本脳炎国内分離株は、1990 年代の初頭に遺伝子 3 型ウイルスから 1 型ウイルスにジェノタイプシフトが生じたと考えられている。遺伝子 1 型を解析していくと 3' NCR 領域に遺伝子欠損が存在することが明らかになってきた。そこでこの遺伝子欠損が遺伝子 1 型

に特有のものであるのか、1980 年代の日本脳炎ウイルスにも存在したのかを解明するため 1980 年代に京都で蚊から分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析を実施した。

### B. 研究方法

ウイルス遺伝子検出：

夏季に採集しプールした蚊をすり潰したものを乳のみマウスに脳内接種し、発病したマウス脳を 10%乳剤としその乳剤 200 $\mu$ l から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) により、ウイルス遺伝子を検出した。プライマー・プローブセットは遺伝子 1 型用、3 型用および共通プライマー・プローブセットの 3 種類 (表 1) のものを用いた、リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937, 2004) の方法により、Step One Plus-1 アルタイム PCR システム (ABI 社) により実施した。

#### ウイルス遺伝子配列の決定:

日本脳炎ウイルス遺伝子用のプライマーを用いてダイレクトシークエンスにより、ABI prism Avant 7100 (ABI 社) によりプロトコールに従い塩基配列を決定した。

#### C. 研究結果

近年国内のブタから分離された日本脳炎ウイルスはすべて、遺伝子 1 型ウイルスであり、それらのウイルス間で相同性が極めて高い、しかしたとえば 2006 年の熊本の分離株を解析すると 3'NTR に遺伝子欠損が確認され、主たる欠損配列 GAAAAATAAATTA 以外にその上流 (5'側) のストップコドン直下に 5 塩基の欠損がある株群、3'遺伝子側に 9 塩基欠損のある株群が存在することを確認した (図 1)。一方、京都の 1980 年代の株は遺伝子 3 型ウイルスであったが、1987 年の分離株に関して上記 1 型ウイルスの主欠損部位にやはり 9 塩基欠損があることを確認したが、1981 年の分離株では欠損が存

在しなかった (図 2)。

#### D. 考察

我々は 2002 年以降、日本国内のブタから日本脳炎ウイルスの分離および解析を実施している。ブタから分離される日本脳炎ウイルスはすべて遺伝子 1 型ウイルスであった (Nerome R, Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. J Gen Virol. 2007 88:2762-2768.)。これらのウイルスを解析すると 3'NTR 領域の遺伝子配列に認められたわけであるが、今回の京都の 1987 年の分離株 (遺伝子 3 型) においても欠損が存在することが確認された。すなわち 3'NTR の遺伝子欠損はウイルス遺伝子型にかかわらず 1980 年代後半から生じていることが判明した。これらの遺伝子欠損の生物学的意味は不明であり、欠損が生じるのが蚊におけるものであるかあるいは増幅動物におけるものであるか不明であるが、何らかの生物学的な利点があって欠損しだしている可能性が考えられる。ヒトに対する病原性も含めて今後解明する必要がある。

#### E. 結論

遺伝子 3 型ウイルスに関しても最近分離される 1 型ウイルス同様、1980 年代後半の分離株に関しては 3' NCR 領域に欠損があった。しかし、1981 年のウイルス株 (3 型) では欠損が認められなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Takasaki Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Hirayama, Y. Mizuno, N. Takeshita, I. Kuran. Diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue virus genome in urine and saliva. The second international conference on dengue and dengue haemorrhagic fever (Phuket, Thailand) 2008. October.

貫井陽子、小滝徹、田島茂、林昌宏、加藤文博、大松勉、小杉伊三夫、高崎智彦、倉根一郎。2007年度国内日本脳炎患者髄液より分離したウイルスの分子疫学的解析および過去3年間における日本脳炎症例のまとめ。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日（観音寺市）

林昌宏、根路銘令子、小山田敏文、清水良太、田島茂、貫井陽子、水野俊秀、大松勉、小滝徹、モイメンリン、池田真紀子、倉根一郎、高崎智彦。三重県の同一農場から分離された日本脳炎1型ウイルスのマウスにおける病原性解析。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日（観音寺市）

大松勉、渡辺俊平、上田直也、伊波興一郎、Joseph S. Masangkay、明石博臣、吉川泰弘、高崎智彦、倉根一郎。フィリピンのコウモリにおけるアルボウイルスの暴露につ

いて、第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日（観音寺市）

藤井克樹、早坂大輔、小池智、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎。フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28, 2009(岡山市)

北浦一孝、藤井克樹、林昌宏、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎。ウエストナイルウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28, 2009(岡山市)

江下優樹、牧野芳大、湯偉峰、青野裕土、高崎智彦、田島茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎。アカイエカにおける日本脳炎ウイルスの増殖について。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月30-31日（観音寺市）

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1 日本脳炎ウイルス用 TaqMan RT-PCR primer, probe セット

JEV primer & probes		
Genotype 1&3	JEen585pb562s623c	ACTRAACACTGAAGCGT
	JEen562s-585	CTGGAYTGTGARCCAAGGA
	JEen623c-585	GAHCCCACGGTCATGA
Genotype 1	JE1en1082pb	CTCAAGCAGCAAA
	JE1&3en1052s-1082	ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT
	JE1en1119c-1082	GGGAGCGTTTGGAGTTACAGTAA
Genotype 3	JE3en1082pb	CCCAGGCGGCAAA
	JE1&3en1052s-1082	ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT
	JE3en1119c-1082	AGGAGCATTGGGTGTTACTGTAAA

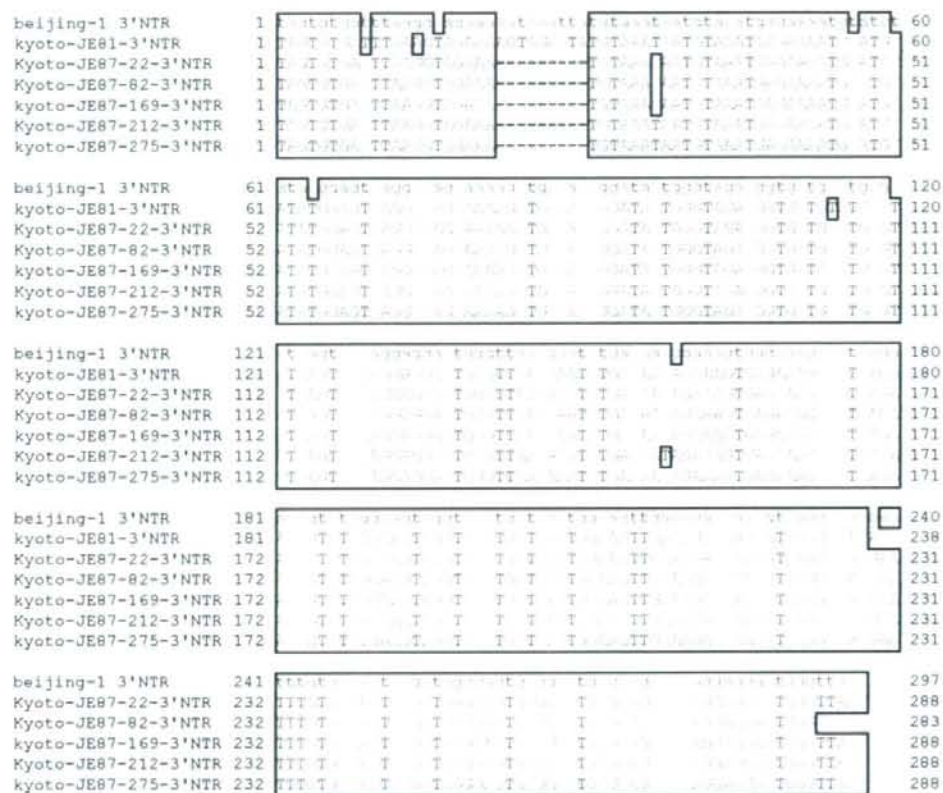
日本では従来遺伝子3型の日本脳炎ウイルスが流行していたが、現在は1型が活動しているため1型と3型を共通に検出するセットと、それぞれを区別するセットを合計3セット開発した。反応液組成と反応条件は文献(J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004)と同様である。

図1. 日本脳炎ウイルス遺伝子1型において確認された3'NTR領域の遺伝子欠損



※主たる欠損配列 GAAAAATAAATTA 以外にその上流(5'側)のストップコドン直下に5塩基の欠損がある株群、3'遺伝子側に9塩基欠損のある株群が存在する。

図2 1980年代、京都における日本脳炎分離ウイルス（遺伝子3型）における3'NTR領域の遺伝子欠損



※京都の1980年代の株は遺伝子3型ウイルスであったが、1987年の分離株に関して上記1型ウイルスの主欠損部位にやはり9塩基欠損があることを確認したが、1981年の分離株では欠損が存在しなかった。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## Short Communication

# Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions

Eiji Konishi<sup>1\*</sup>, Kyoko Yagawa<sup>1</sup> and Atsushi Yamanaka<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences, Kobe 654-0142,

<sup>2</sup>International Center for Medical Research and Treatment, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan, and <sup>3</sup>Indonesia-Japan Collaborative Research Center for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

(Received May 16, 2008. Accepted July 11, 2008)

**SUMMARY:** Flavivirus membranes fuse with cellular membranes by low pH-induced mechanisms. Although Japanese encephalitis virus (JEV) has similar mechanisms, fusion induced under neutral conditions has been observed. We report herein polykaryocyte formation using Vero cells infected with recombinant vaccinia viruses, vP829 expressing JEV pre-membrane (prM) and envelope (E), or vP555 expressing prM, E, and the nonstructural proteins NS1 and NS2A. Polykaryocytes were detected under pH 7.0 as early as 9 h after infection. Higher fusion indices were shown with vP555 than vP829. A monoclonal antibody to E suppressed vP829/vP555-induced polykaryocyte formation. Polykaryocytes were also formed under alkaline conditions (pH 8.0).

Enveloped viruses have a mechanism of membrane fusion to transport their genomes into host cells in the early phase of infection. Flavivirus fusion mechanisms have been extensively studied using tick-borne encephalitis virus (TBEV) (1) and other viruses (2,3). The low pH-induced oligomerization process of the envelope (E) protein is critical to acquiring fusion activity in flaviviruses. Japanese encephalitis virus (JEV), a member of the genus *Flavivirus*, has been considered to have a fusion mechanism similar to those of other flaviviruses. Specifically, polykaryocyte formation is induced by infection with JEV (fusion-from-within [FFWI]) (4-6) or virus adsorption followed by exposure to low pH (fusion-from-without [FFWO]) (6-8). However, electron microscopy studies have indicated that JEV enters cultured cells by fusion with plasma membranes without receptor-mediated endocytosis (9). The present paper reports polykaryocyte formation under neutral conditions, which was observed in Vero cells infected with recombinant vaccinia viruses expressing JEV pre-membrane (prM) and E (designated vP829) or prM, E, and the nonstructural proteins NS1 and NS2A (designated vP555) (10).

Vero cells were infected with vP829 or vP555, as well as their parent vaccinia virus vP410, at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 2 PFU/cell, incubated at pH 7.0 and stained with Giemsa 16 h after infection (Fig. 1A). While infection with vP410 caused rounding and aggregation of cells as a normal cytopathic effect by vaccinia virus, infection with vP829 or vP555 induced formation of relatively large polykaryocytes. The polykaryocytes that developed in vP829-infected Vero cells were round in shape, whereas those in vP555-infected cells were elongated. The time courses of fusion indices for 6-22 h following infection (Fig. 1B) indicated that the increase in fusion indices was initiated 9 h after

infection and continued until 12 or 16 h after infection. vP555 induced higher levels of polykaryocyte formation than did vP829: significant differences were shown between fusion indices obtained from vP555- and vP829-infected cells 12 and 19 h ( $P < 0.05$ ) or 22 h ( $P < 0.001$ ) after infection. The polykaryocyte formation induced by infection with vP829 or vP555 was inhibited by the addition of purified IgG fractions of monoclonal antibodies specific for E (JE-10B4; for both vP829 and vP555) or NS1 (JE-2D5; only for vP555) to the medium at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml (Fig. 1C). JE-10B4, which was generated in a standard protocol from mice immunized with Triton X100-treated virion fractions purified from JEV-infected Vero cell culture fluid, had neutralizing and hemagglutination-inhibiting activities (data not shown). To further investigate polykaryocyte formation under nonacidic conditions, we next investigated whether the induction of Vero cell fusion by infection with vP829 or vP555 would occur under a condition of pH 8.0. For this experiment, Vero cells were maintained at pH 8.0, as well as pH 7.0, for 16 h after infection. As shown in Fig. 1D, pH 8.0 induced even higher levels of polykaryocyte formation than pH 7.0 in both vP829- or vP555-infected cells.

Polykaryocyte formation induced by JEV has been reported using mosquito culture cells in both FFWI and FFWO systems (4-8). The only exception is that FFWI was observed in a particular clone of mammalian BHK cells (BHK-21-528) (5). On the other hand, neither FFWI nor FFWO has been achieved using a mammalian cell line, Vero (6,7). In the present study, Vero cells formed polykaryocytes when prM and E were produced by using a vaccinia virus expression system. It is speculated that a certain alternation in membrane nature triggered by vaccinia virus infection may have allowed polykaryocyte formation in Vero cells. Importantly, although JEV induced cell fusion basically under acidic conditions in mosquito cells, polykaryocyte formation in Vero cells was induced under pH 7.0, representing one particular aspect of the fusion phenomenon caused by JEV E protein. Although details were not investigated in the present study,

\*Corresponding author. Mailing address: Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences, Tomogaoka 7-10-2, Suma-ku, Kobe 654-0142, Japan. Tel & Fax: +81-78-796-4594, E-mail: ekon@kobe-u.ac.jp

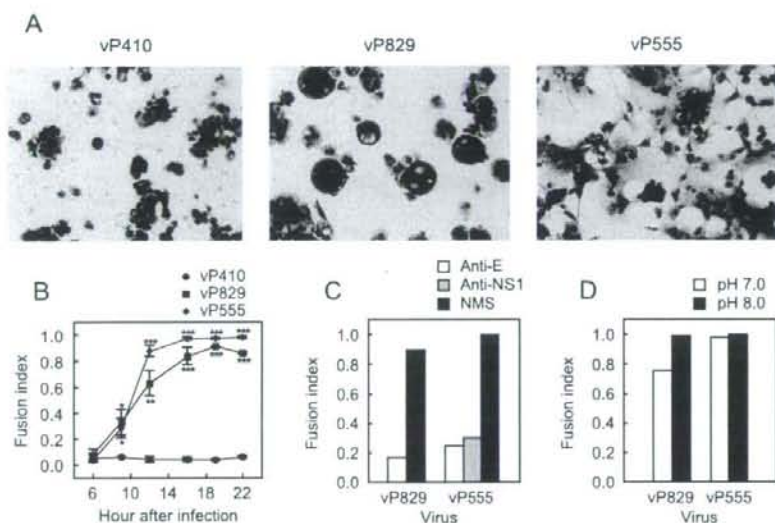


Fig. 1. Polykaryocyte formation induced in vP829- or vP555-infected Vero cells under neutral conditions. Vero cells were infected with vP829 or vP555, as well as vP410 as a control, at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 2 PFU/cell. Cells were then incubated in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 0.1% bovine serum albumin, kanamycin at 60  $\mu$ g/ml, and 10 mM HEPES buffer (pH 7.0), at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>-95% air. Six to 22 h after infection, cells were stained with 5% Giemsa's solution (Merck, Darmstadt, Germany). The numbers of cells and nuclei in 5 different fields per sample were counted under a microscope. Fusion indices were calculated by a formula 1-C/N, where N and C are the numbers of nuclei and cells, respectively (7). (A) Photographs of Vero cells 16 h after infection with vP410, vP829 or vP555. (B) Time courses of fusion indices for Vero cells infected with vP410 (circles), vP829 (squares), and vP555 (diamonds). Vertical bars represent standard deviations of data obtained by two separate experiments. Asterisks indicate significant differences between fusion indices shown by vP410 and vP829 or vP555; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) Inhibition of vP829/vP555-induced Vero cell fusion by monoclonal antibodies to JEV E (Anti-E; JE-10B4; open bars) or NS1 (Anti-NS1; JE-2D5 [11]; gray bars). IgG fractions of mouse ascites containing monoclonal antibodies were added to the medium at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml after infection with vP829 or vP555. As a control, normal mouse serum (NMS; closed bars) was used in place of monoclonal antibodies. Fusion indices obtained 16 h after infections were shown. (D) Fusion indices of Vero cells which were maintained at pH 8.0 (dark gray bars), as well as pH 7.0 (light gray bars), for 16 h after infection with vP829 or vP555. For adjusting the medium to pH 8.0, 10 mM Tris-HCl buffer was used.

NS1 may play some role in polykaryocyte formation of Vero cells under neutral conditions, since vP555 produced higher fusion indices than vP829.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Enzo Paoletti and Stephen Pincus, Virogenetics Corporation, Troy NY, U.S.A., who provided us with vP410, vP829 and vP555.

This work was supported in part by a grant-in-aid through the Program of Founding Research Centers for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

#### REFERENCES

- Stiasny, K. and Heinz, F.X. (2006): Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.*, 87, 2755-2766.
- Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., et al. (2002): Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108, 717-725.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.S., Chipman, P.R., et al. (2003): Structure of West Nile virus. *Science*, 302, 248.
- Butrapet, S., Kimura-Kuroda, J., Zhou, D.S., et al. (1998): Neutralizing mechanism of a monoclonal antibody against Japanese encephalitis virus

glycoprotein E. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58, 389-398.

- Ueba, N., Kimura, T. and Kimoto, T. (1976): Multinucleated giant cell formation in BHK-21-528 cell monolayers infected with Japanese encephalitis viruses. *Jpn. J. Microbiol.*, 20, 1-9.
- Higgs, S. and Gould, E.A. (1991): Differences in fusogenicity and mouse neurovirulence of Japanese encephalitis viruses. *Arch. Virol.*, 119, 119-133.
- Guirakhoo, F., Heinz, F.X., Mandl, C.W., et al. (1991): Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.*, 72, 1323-1329.
- Summers, P.L., Cohen, W.H., Ruiz, M.M., et al. (1989): Flaviviruses can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. *Virus Res.*, 12, 383-392.
- Hase, T., Summers, P.L. and Ray, P. (1990): Entry and replication of Japanese encephalitis virus in cultured neurogenic cells. *J. Virol. Methods*, 30, 205-214.
- Konishi, E., Pincus, S., Fonseca, B.A., et al. (1991): Comparison of protective immunity elicited by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 185, 401-410.
- Konishi, E., Shoda, M., Ajiro, N., et al. (2004): Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5087-5093.