

200931018A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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

(H20-新興-一般-003)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22 (2010) 年 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦
(国立感染症研究所ウイルス第一部)

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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

(H20－新興－一般－003)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22（2010）年3月

研究代表者 高 崎 智 彦
(国立感染症研究所ウイルス第一部)

目 次

I 総括研究報告

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	1
------------------------------	---

II 分担研究報告

1. ヒト血清中の日本脳炎ウイルス NS1 抗体を測定する ELISA 法：改良 および中和試験との比較	11
研究分担者：小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）	
2. イノシンから分離された日本脳炎ウイルスの性状解析	23
研究代表者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
3. 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	29
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）	
4. 東京都内で発生した脳炎・脳症および髄膜炎等の患者検体における日本脳炎 ウイルス感染調査	37
研究分担者：田部井由紀子（東京都健康安全研究センター）	
5. 我が国における日本脳炎の現状と日本脳炎ウイルス弱毒化メカニズムの解析	42
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）	
6. 日本脳炎ウイルスゲノム 3'非翻訳領域内可変領域の解析	48
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
7. 岡山県の県南および県北部における日本脳炎抗体（HI 法）によるリスク調査	52
研究分担者：寺田喜平（川崎医科大学小児科）	
8. 2009 年に高知県で発生した日本脳炎の 1 歳児例	55
研究分担者：脇口 宏（高知大学小児思春期医学）	
9. 急性脳炎患者への γ -グロブリン製剤投与と日本脳炎血清診断	59
研究代表者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
10. 伴侶動物および野生動物における日本脳炎感染状況の調査	64
研究分担者：前田 健（山口大学農学部獣医微生物学教室）	
11. 沖縄島において 1985～2009 年に実施された日本脳炎ウイルス感染源調査	71
研究分担者：玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所）	
12. 日本脳炎ウイルスの分離とその病原性に関する研究	78
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）	
13. 日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究	81
研究分担者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	91
IV 研究成果の刊行物・別刷	93

I . 総括研究報告書

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

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第 1 部 室長）

研究要旨：日本脳炎は、2005 年 5 月より予防接種の積極的勧奨が中止されている。日本脳炎ワクチンが定期接種からはずれたわけではないが、就学時前の小児の予防接種率は極端に低下している。このような状況下で日本脳炎の現状を解明することが、本研究班の目標である。我が国の日本脳炎ウイルスによる自然感染率を明らかにするため、抗日本脳炎ウイルス NS1 抗体 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法を確立したが、1 歳未満の乳児における非特異反応を防止するためさらに改良を加え、NS1 抗原（非構造たん白抗原）の精製度を高めることにより、ヒト血清中のウシ血清アルブミン（BSA）に対する抗体の影響を受けにくくした。また、勧奨中止により非接種者数が増加したことから、中和抗体陽性率から年間自然感染率を推定した。この方法により、9 歳以下の集団を対象にした場合、熊本県及び東京都では共に 2.6%と推定された。一方、改良 NS1 抗体検出 ELISA により計算された年間自然感染率は、熊本県で 1.8%、東京都で 1.3%であった。また、岡山県の調査では、2009 年も都市部と農村部を比較したが、3 歳未満で抗体陽性者はおらず、3 歳以降の未接種者では 4-8%の不顕性感染者があったが農村部と都市部で有意差はなかった。

日本脳炎患者に関しては、熊本県と高知県で小児例が各 1 例、大阪府で成人例が 1 例あった。熊本県の症例はワクチン未接種の男児（7 歳 10 ヶ月）で、髄膜炎症状を呈し、脳炎までは至らずに回復した。発病日は 8 月 6 日であり、注意報発令日より、20 日以上も前であった。

高知県の症例は、高知県東部に位置する T 町に在住の日本脳炎の予防接種歴のない 1 歳 6 カ月女児であった。患児の家の近所に養豚業者ができて、よく蚊に刺されていたという。日本脳炎ワクチン第一期の標準的な接種年齢は 3 歳であるが、居住地域や住環境によっては生後 6 カ月以降 3 歳未満でのワクチン接種を考慮すべきであることが示唆された。

一方、熊本県（1994 年以降）および東京都（2004 年から 2009 年）で保存されていた原因不明の無菌性髄膜炎・脳炎患者髄液から JEV 遺伝子の検出を行ったが、結果はすべて陰性であった。

日本脳炎症例の血清診断に関しては、 γ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例 2 例を経験した。このような急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、 γ -グロブリン投与による影響を考えなければならない。このような症例で血清診断困難な場合は、髄液中の日本脳炎特異的 IgM 抗体を検出することで診断が確定するので、急性脳炎患者髄液の保存は極めて有用である。

石川県におけるウイルス媒介野外蚊からの JEV の分離を定点（3 地点）、定時期（8 月末）に行ったが、2009 年の結果として RT-PCR 陽性サンプルは例年並みに 5 件あったが、ウイルス分離には至らなかった。Ishikawa-K05 株と JaGAr01 株（遺伝子タイプ 3 型）との生物活性の比較では、細胞における増殖性は JaGAr01 株が高いが、マウスに対する病原性では Ishikawa-K05 株の方が毒性は若干高かった。

増幅動物に関しては、兵庫県西宮市のイノシシから分離された日本脳炎ウイルスに対して、現行の日本脳炎不活化ワクチンは有効であることが確認された。感染源調査では広島県で 1 株、静岡県で 1 株、熊本県で 5 株が分離された。また、長崎県ではブタから 2 株、コガタアカイエカから 1 株が分離された。沖縄県の感染源調査では、近年抗体上昇の時期が遅れ 2008-09 年は 50%以上陽性を示す時期は 7 月中旬以降であった。現在の 8 月までの調査期間の見直しが必要と考えられた。また、2003 年に日本脳炎で死亡した馬からの分離株および北海道で分離されたウイルス 3 株の遺伝子配列を決定した。動物の日本脳炎ウイルス感染状況としては、国内の室外飼育犬で 45%、室内犬で 8%であり、四国・九州で有意に高く東北地方は 9%、北海道は 0%であった。日本脳炎抗体を保有して

いる野生動物としては、コウモリ、シカ、イノシシ、アナグマ、イタチ、テンが確認された。特にシカの抗体保有率は94%であった。

インドシナ半島北部の JEV が、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可能性とともに、インドシナ半島南部に土着し中国方向に転進しない JEV グループが存在することが明らかになった。

分担研究者：

倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部 部長）

小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座 准教授）

脇口 宏（高知大学医学部小児思春期学講座 教授）

寺田喜平（川崎医科大学小児科学講座 准教授）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）

竹上 勉（金沢医大・総合医学研究所 教授）

玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所班長）

多屋馨子（国立感染症研究所感染症情報センター 室長）

原田誠也（熊本県保健環境科学研究所 研究参事）

田部井由紀子（東京都健康安全研究センター 主任研究員）

前田 健（山口大学農学部・獣医ウイルス学 教授）

A. 研究目的

日本脳炎は、2005年5月より予防接種の積極的勧奨が中止されている。日本脳炎ワクチンが定期接種からはずれたわけではないが、就学時前の小児の予防接種率は極端に低下している。このような状況下で日本脳炎の現状を解明することが、本研究班の目標である。具体的には①我が国における日本脳炎の自然感染率、不顕性感染率を調査し、発症率を解析する。②急性ウイルス性脳炎における日本脳炎に関する検査の実施及び発症時の病態（髄膜炎、脊髄炎、熱発）等を明らかにし、サーベイランス法を見直す。③ブタ以外の日本脳炎ウイルス増

幅動物の検討、伴侶動物および野生動物の感染状況の調査、国内で活動する日本脳炎ウイルスの病原性をウイルス学的に解析する。

B. 研究方法

1. 日本脳炎ウイルス自然感染率の解明

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°C で 30 分間ブロッキング後、1:100 希釈のヒト血清を 37°C 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。

熊本県における調査対象

2004年～2008年に、採取したヒト血清 1190 検体について NS1 抗体を測定した。中和抗体は、2005年の 225 検体及び 2009年の 276 検体について、50%ブランク減少法で、JEV に対する中和抗体を測定した。無菌性髄膜炎や脳炎等で検査依頼があり、凍結保存されていた 1994 年以降の原因の特定されなかった 195 検体（髄液）について、リアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法により JEV 遺伝子の検出を行った。

東京都における調査対象

調査対象は、2004年から2009年の6月から11月に感染症発生動向調査事業により病原体検索を目的として東京都内の病院より搬入された脳炎・脳症および髄膜炎等患者の髄液681件(2004年100件、2005年107件、2006年104件、2007年127件、2008年118件および2009年125件)リアルタイムRT-PCR法によりJEV遺伝子の検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、各施設倫理委員会において承認された。

岡山県における調査対象および抗日本脳炎ウイルス抗体検査

川崎医大倫理委員会の承諾を得て、県南部にある川崎医大(川崎)と、県北部にある津山中央病院(津山)において、2008年5~10月頃と2009年5~10月頃の患者残血清を頂き、日本脳炎ウイルス抗体(HI法)を測定した。ワクチン接種歴を母子手帳あるいは予防接種手帳によって確認した。

2. 国内で活動する日本脳炎ウイルス(JEV)について

蚊の調査

捕集した蚊を分類後、雌雄判別及び吸血の有無を確認し、40-60 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細胞あるいは乳のみマウス脳に接種してウイルス分離を行った。分離・同定したJEVはエンベロープタンパクE領域の塩基配列を決定した後、系統樹解析に供した。

ブタの調査

(1) ウイルス分離

夏季のブタ血清のうち、IgM抗体陽性となった週およびその前の週のブタ血清をC6/36細胞あるいはVero細胞に接種してウイルスを分離した。系統樹解析等を実施した。分離・同定したJEVはエンベロープタンパク(E)領域および3' NCR領域の塩基配列を決定した。

(2) 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21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法あるいは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。

ブタ以外の動物の調査

イヌの血清: 2006年から2007年にかけて全国の動物病院に来院した飼育犬合計652頭から血液を採取し血清を回収した。また沖縄県衛生環境研究所より沖縄本島北部の動物病院で集められたイヌ血清72検体用いた。

ユビナガコウモリの血清: 2009年5月に和歌山県田辺市導水路にて、和歌山県知事の許可を得て50頭のユビナガコウモリを捕獲し、血清を回収した。

野生動物の血清: 有害鳥獣、錯誤捕獲、交通事故等で得られた野生動物から血清を回収した。2008年から2009年にかけて捕獲した血清を調査した。すべての血清は56℃で30分非働化した後ウイルス中和試験に供試した。

イノシシからのウイルス分離の解析

2008年12月12日に兵庫県西宮市甲陽園目神山町で捕獲されたイノシシから分離された日本脳炎ウイルスJaNB037株を用いた。日本脳炎ウイルス用のプライマーを用いてダイレクトシーケンシング法により、ABI prism Avant 7100(ABI社)によりウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、ブタからの分離ウイルスと比較した。また、細胞培養日本脳炎不活化ワクチンを4倍、8倍、16倍、32倍希釈し、それぞれ0.5mLを4週令の一群10匹のマウス(DDY)に1週間隔で腹腔内投与により2回免疫したマウスの血清を用いて、チャレンジウイルスをBeijin-1株およびJaNB037株にてプラーク減少法により中和能を解析した。

3. 日本脳炎ウイルスの病原性について
近年日本国内で活動するJEVの病原性が低いのではないかという議論がある。そのため3テーマで病原性に関する研究を実施した。

(1)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。(2) 遺伝子発現の解析：日本脳炎ウイルス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、ウイルスの宿主細胞におよぼす病原性を検討した。(3) 日本脳炎ウイルスゲノム 3' 非翻訳領域内可変領域の解析

JEV の変異体は、以前に構築した感染性分子クローン (rJEV(Mie/41/2002)/pMW 119) を用いて変異体は計 5 種類 (d5、d9、d5d9、d27、13a) の変異体を作製した。これらの変異体の株化細胞でのウイルス増殖能を検討した。

4. 日本脳炎患者の実験室診断および臨床症例

日本脳炎の疑われる急性脳炎患者、髄膜炎患者の血清中、髄液中の日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体を、IgM 抗体捕捉 ELISA 法により測定した。また、 γ -グロブリン製剤の投与された症例では、同一ロットの製剤の日本脳炎抗体価を測定し、抗体価への影響を評価した。

C. 研究結果

NS1 抗体測定 ELISA 法

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、非特異反応が高かった。カゼインを用いてブロッキングすることで非特異反応を抑えることに成功した。しかし、ELISA において生じた血清中 BSA 抗体による擬陽性反応は、ELISA 希釈液に BSA を用いずにカゼインを用いることによる問題点が生じた。解決策として、NS1 抗原中の BSA 量をさらに低下させ、抗原非感作ウエルに、NS1 抗原に混入した BSA 量

と同じ量の BSA を感作させ、感作ウエルとの吸光度の差を求める方法で擬陽性反応を抑えた。

年間の自然感染率＝

$$\frac{(1 \text{ 時点における抗体陽性率})}{(\text{NS1 抗体の持続期間})}$$

で昨年同様算出した。

熊本県における日本脳炎 NS1 抗体の保有状況と自然感染率

2004～2008 年に収集された熊本県住民の血清 1190 検体の、各年度の NS1 抗体陽性率を年齢群別に求めた。全体の陽性率としては、7.6% (1190 検体中 90 検体) であった。年齢の上昇と共に NS1 抗体陽性率は上昇した。NS1 抗体保持期間を 4.2 年として、年間自然感染率を求めると、2004～2008 年の平均年間自然感染率は、男で 1.9%、女で 1.7%、全体で 1.8% であり、有意な男女差は無かった。2005 年～2007 年の年間自然感染率は、2004 年と 2008 年より有意に高かった。0～9 歳のワクチン非接種者 145 名の中で、中和抗体陽性者は 15 名 (10.3%) であった。ワクチン非接種者であるので、中和抗体の存在は自然感染の既往を示す。145 名の平均生存期間は 4.0 年であったので年間自然感染率は 2.6% (10.3/4.0) と計算された。同様の方法で、男の年間自然感染率は 2.4%、女は 2.9% と計算された。

原因の特定されなかった 195 検体 (髄液) について JEV 遺伝子の検出を行ったがいずれも陰性であった。

東京都における日本脳炎 NS1 抗体の保有状況と自然感染率

2004～2006 年に収集された熊本県住民の血清 955 検体のうち 578 検体を NS1 抗体試験に供した。全体の陽性率は 5.5% (578 検体中 32 検体) で、NS1 抗体陽性率は年齢の上昇と共に上昇する傾向にあった。NS1 抗体陽性率から計算された平均年間自然感染率は、男で 1.0%、女で 1.6%、全体で 1.3% であり、有意な男女差は無かった。男の 2004 年の年間自然感染率は 2006 年より高かったが、それ以外の年度間の違いは認められなかった。0～9 歳のワクチン非接種者の中

和抗体陽性率から年間自然感染率を計算した。その結果、男で3.2%、女で1.5%、全体で2.6%であった。

脳炎・脳症および髄膜炎等患者の髄液 681件について JEV 遺伝子検出を実施したがいずれも陰性であった。

岡山県における小児の日本脳炎抗体保有率

2009 年も都市部と農村部を比較したが、3歳未満で抗体陽性者はおらず、3歳以降の未接種者では4-8%の不顕性感染者があったが農村部と都市部で有意差はなかった。

2009 年の小児日本脳炎例の詳細

高知県の症例は、高知県東部に位置する T 町に在住の日本脳炎の予防接種歴のない 1歳6カ月女児であった。患児の家の近所に養豚業者ができ、よく蚊に刺されていたという。髄液単純ヘルペスウイルス DNA-PCR は陰性であった。8月27日(第9病日)の頭部 MRI 拡散強調画像で大脳前頭葉皮質に高信号域を認めた。本症例は後遺症を残さず回復した。

熊本県の症例はワクチン未接種の男児(7歳10ヶ月)で、髄膜炎症状を呈し、脳炎までは至らずに回復した。発病日は8月6日であり、注意報発令日より、20日以上も前であった。

γ-グロブリンの投与のあった急性脳炎症例 2 例

(症例1) 患者は6歳女児、2008年11月3日に嘔吐・下痢で発病し、11月10日に痙攣等神経症状を呈し、反応が低下し救急搬送後入院となった。意識障害が持続し急性脳症として治療開始、11月11日から13日まで3日間γ-グロブリン計7.5gが投与された。中和抗体が<10xから40倍に上昇し、IgG 抗体は陽性となった発病約半年後の2009年5月27日の血清では、中和抗体およびIgG抗体、IgM抗体いずれもが陰性となった。本症例に関して日本脳炎は否定され、日本脳炎抗体陽性のγ-グロブリン投与による抗体上昇と考えられた。本症例に投与されたγ-グロブリン製剤の同一ロットは、IgG 抗体価1280倍以上、中和抗体価640倍であった。

(症例2) 2008年5月下旬に発病し、8月に日本脳炎抗体(HIおよびCF)上昇を確

認した。γ-グロブリン投与前はCF法にて4倍が8月には16倍となった。5月29日から7月23日まで6回にわたり経時的に保存されていた髄液に関してウイルス遺伝子検査(リアルタイムRT-PCR法)は陰性であったが、日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体が5月29日から6月19日までが陽性であり、6月27日の髄液で陰性となった。髄液中の日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系における増殖を意味することから日本脳炎と結論された。なお、本症例に投与されたγ-グロブリン製剤の同一ロットの日本脳炎抗体価は、IgG 抗体価640倍、中和抗体価160倍であった。

東南アジアと日本の日脳ウイルス分子疫学解析

インドシナ半島北部の JEV が、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可能性とともに、インドシナ半島南部に土着し中国方向に転進しない JEV グループが存在することが明らかになった。

長崎県五島列島の蚊から分離された日本脳炎ウイルス (JEV)

124 プール中の *Culex tritaeniorhynchus* の1 プールから1株のみ JEV ウイルス株 (JaNAr01G-09) が分離された。

沖縄県において 1985~2009 年に実施された日本脳炎ウイルス感染源調査の傾向

沖縄県の感染源調査では、近年抗体上昇の時期が遅れ 2008-09 年は 50%以上陽性を示す時期は7月中旬以降となっている。

日本イノシシから分離した日本脳炎ウイルスの解析

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ウイルス (JaNBo37) は、2008-09 年のブタからの分離株と比較すると E 領域 142 番目のアミノ酸が、セリンであり他のブタ由来の株ではフェニアラニンであったところが異なっていた。また、日本脳炎ウイルスで遺伝子欠損がよく認められる 3'NCR の領域については、上流

域の近い部位に欠損が存在したが、ブタからの分離株では、22-30番目の9塩基が欠損していたが、JaNB037株では31-37番目の異なる部位の7塩基が欠損していた。免疫学的解析を行った結果、現行細胞培養日本脳炎ワクチン（北京株）により免疫されたマウスの血清は、JaNB037株に対して感染防御効果としては十分な力価を示した。

動物の日本脳炎ウイルス感染状況

動物の日本脳炎ウイルス感染状況としては、国内の室外飼育犬で45%、室内犬で8%であり、四国・九州で有意に高く東北地方は9%、北海道は0%であった。日本脳炎抗体を保有している野生動物としては、コウモリ、シカ、イノシシ、アナグマ、イタチ、テンが確認された。シカの抗体保有率は94%であった。

ブタ用弱毒生ワクチン株の解析

ワクチン株3種と親株2種の全塩基配列を決定した。それぞれ、変異部位は異なり、一定の頻度で常に変異を繰り返していることが示唆された。また、北海道で1980年代後半に分離されたウイルスの遺伝子配列を決定した。いずれも遺伝子型3型であった。

日本脳炎ウイルスの3'NCR領域の遺伝子欠損に関する解析

近年分離される日本脳炎ウイルスの大部分は、遺伝子1型ウイルスであり、その多くが3'NTRに遺伝子欠損を昨年度は確認した。感染性クローンを用いてその欠損を作製した組換え日本脳炎ウイルスを作成し、細胞での増殖を検討した結果、神経細胞での増殖能低下およびマウスの病原性が低下することが示唆された。

石川県の日本脳炎分離株の病原性

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。

D. 考 察

熊本県、東京都の日本脳炎NS1抗体検査の結果からは、どちらにおいても自然感染が存在することが確認された。NS1抗体ELISA法がさらに改良され、本年度はさらに中和抗体からも自然感染率を推計したところ東京都、熊本県で1.3%~2.6%であった。ヒトの年間自然感染率は日本脳炎ウイルスの自然界での活動を証明した。岡山県の調査でも、3歳以降の未接種者では4-8%の不顕性感染者があった。さらにイヌの抗体陽性率が25%であり四国では61%であったことから、ヒトへの感染リスクが存在することが裏付けられた。

また、コウモリ、アナグマ、イタチ、テン、シカなどの野生動物でも日本脳炎抗体が陽性であり、シカでは94%の抗体保有率であり、JEV感染が野生動物でもかなり発生していると考えられ、ウイルスの越冬と関係する可能性が示唆された。また、兵庫県で12月に捕獲されたイノシシから分離されたウイルスは遺伝子型1型ウイルスであるが、ブタから分離されたウイルスとは、遺伝子配列が異なる部分も存在した。一方、遺伝子3型ウイルスで造られた日脳ワクチンで防御され、製造株を変更の必要性はないことが確認された。

日本脳炎ウイルスの性状解析に関しては、3'NTR領域の欠損に関して、その生物学的意義の解明は、日本脳炎ウイルスの活動の抑制に結びつく可能性もある。また、日本脳炎ウイルス感染細胞の遺伝子発現量の解析は、今後ウイルスの病原性に結びつく可能性もある。また、家畜のワクチン株の性状解析によるウイルス弱毒化機構の解明も重要である。

高知県で発生した1歳6ヶ月の日本脳炎症例が発生したことから、定期接種第一期の標準的年齢は3歳であるが、侵淫地域では1歳過ぎからのワクチン接種も推薦されるべきと考えられる。熊本県の症例はワクチン未接種の男児（7歳10ヶ月）で発病日は8月6日であり、注意報発令日より、20日以上も前であったことから、注意報の発令基準の見直しも必要かもしれない。

また、 γ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、 γ -グロブリン投与による影響を考えなければならない。このような場合、髄液中の

日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系における増殖により誘導されるものであり、実験室診断として非常に重要である。東京都と熊本県で病因の特定されなかった検体についてウイルス遺伝子検出を実施したが、いずれも陰性であったが、日本脳炎の患者の髄液からウイルス遺伝子を検出できるのは脳炎発症後、1-2日以内であることから、本検体に関しても日本脳炎特異的 IgM 抗体を検査する必要があり、次年度実施する予定である。

E. 結論

1. 抗 NS1 抗体 ELISA 法をさらに改良し乳児の BSA 抗体による非特異反応を抑えた。
2. 熊本県、東京都の健常人から NS1 抗体 (1.3~1.8%) が検出された。ワクチン未接種者の 2.6% に中和抗体が確認された。
3. 兵庫県西宮市のイノシシから分離された日本脳炎ウイルス (JaNB037 株) は、現行ワクチンにより防御される可能性が高い。
4. 日本脳炎抗体は飼い犬で 25% であった。室外犬では 45% であった。
5. 蚊から分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析の結果、東南アジアから日本列島に飛来する可能性がある。しかし、インドシナ半島南部には中国方向に移動しないウイルス株も存在する。
6. γ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、 γ -グロブリン投与による影響を考えなければならない。
7. 日本脳炎の診断には、髄液中の IgM 抗体検査が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

2. 学会発表

- 1) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3'NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成 21 年 6 月)
- 2) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3'NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 21 年 10 月)
- 3) 田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 21 年 10 月)
- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS4A の N 末端側領域の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 21 年 10 月)
- 5) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松勉、林昌宏、倉根一郎：イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 21 年 10 月)
- 6) 山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における血清中の総補体価 CH50 の測定。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月
- 7) 北井陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西英二：NS1 抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月
- 8) 山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008 年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第 16 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009 年 10 月

- 9) 小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキング ELISA 法の確立。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月
- 10) 原田誠也、西村浩一、北井陽子、小西英二、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎：熊本県における日本脳炎ウイルスの疫学調査、第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2009 年 6 月北海道千歳市
- 11) 田部井由紀子、長谷川道弥、岩崎則子、岡崎輝江、仲真晶子、矢野一好：デング熱診断における NS1 抗原検査の有用性について、地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会、2008 年 9 月。
- 12) 多屋馨子：ワクチンで予防可能疾患：徹底討論 小児ワクチンの現状と課題。第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会。平成 21 年 10 月。東京
- 13) 多屋馨子：ワクチン戦略をめぐる諸問題 日本のワクチン戦略。第 57 回日本化学療法学会総会。東京
- 14) 下田 宙、奥田 優、岩田祐之、望月雅美、前田 健「イヌにおける日本脳炎ウイルス感染状況（全国調査）」第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月（北海道）
- 15) 下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの抗体保有状況から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」第 46 回山口県獣医学会、2009 年 8 月（山口）
- 16) 下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの全国調査から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月（鳥取）
- 17) 下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの抗体保有状況から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」平成 21 年度日本獣医公衆衛生学会〔中国〕、2009 年 10 月（鳥根）
- 18) 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, Kouichi Morita : Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia to Japan. International Joint Forum on Infectious Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand、2009 年 9 月 16 - 17 日 . (Oral Presentation II)
- 19) 左一八、在原雅貴、加藤大介、渡邊一平、森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルス感染における硫酸化糖鎖分子の構造と機能。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009 年 6 月 19 日 - 20 日
- 20) 吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査（第 2 報）。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009 年 6 月 19 日 - 20 日
- 21) 吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況。第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25 - 27 日
- 22) 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(Ishikawa-K05)の細胞と実験動物での毒性 第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、小樽（2009、6）
- 23) 村上 学、及川陽三郎、上村 清、竹上 勉：石川県内の水田近辺で行った CDC 型トラップによる蚊の採集結果、第 16 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京（2009、10）
- 24) 村上 学、竹上 勉：Ishikawa-K05（2005 年石川県分離日本脳炎ウイルス）感染時の細胞毒性と細胞応答、第 57 回日本ウイルス学会、東京（2009、10）
- 25) 寺田喜平、梶俊作、内田立志、ほか。岡山県県南および県北部における抗体による日本脳炎のリスク調査。第 41 回日本小児感染症学会学術集会（福井市）2009 年 11/14~15

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

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
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：
改良及び中和試験との比較

研究分担者 小西 英二（国立大学法人神戸大学）

研究協力者 原田 誠也、西村 浩一（熊本県保健環境科学研究所）

田部井 由紀子（東京都健康安全研究センター）

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。昨年度、ヒト血清中の日本脳炎ウイルス NS1 抗体を測定する ELISA 法の基礎的条件を確立して評価した。今年度は、この第 1 バージョンの ELISA 法を改良し、さらにワクチン非接種の 9 歳以下の集団について中和抗体陽性率から求められる年間自然感染率と比較した。ELISA 法の改良は、NS1 抗原の精製度を高めることにより、ヒト血清中のウシ血清アルブミン（BSA）に対する抗体の影響を受けにくくしたことである。ELISA 法に用いる抗原は、アフィニティクロマトグラフィーにより NS1 発現細胞培養液から精製したものであるが、混入 BSA 量が、NS1 量の 1% 以下であれば ELISA 法に影響しないことを明らかにした。一方、中和試験との比較は、近年のワクチン接種率の低減から、ワクチン非接種者が増加したことにより可能となった。すなわち、ワクチン非接種者の中和抗体陽性率から年間自然感染率を推定できる。この方法により、9 歳以下の集団を対象にした場合、熊本県及び東京都では共に 2.6% と推定された。NS1 抗体陽性率から求められた年間自然感染率（それぞれ平均として 1.8%、1.3%）は、同等あるいはやや低い値を示した。両試験法によるこれらの結果は、現在でもヒトが JEV の暴露を受けていることを示す。

A. 研究目的

日本脳炎は致死率（約 20%）が高く、生残者の半数に精神神経学的後遺症を残す重篤な疾患である。日本における年間患者数は、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 例未満にまでコントロールされてきた。しかし、ワクチン接種後に見られた重篤な急性散在性脊髄膜炎（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。その後、小児のワクチン接種率は低下し、日本

脳炎の再興が危惧されるまでに至った。このような状況下で、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。

自然感染率の調査には自然感染個体の検出が必要であるが、6 歳児以下の小児を除く多くの集団は過去にワクチンを接種しているため、従来の抗体測定法ではワクチン接種者から自然感染者を識別することは困難である。これを可能とする 1 つの方法は、非構造蛋白に対する抗体の測定である。不活

化ワクチンが構造蛋白に対する抗体のみを誘導するのに対して、感染を受けた場合は構造蛋白とともに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。

我々は、JEVの非構造蛋白の1つであるNS1 (nonstructural protein 1) を標的として抗体測定法の確立を検討してきた。ELISA法は、客観的かつ多数検体処理可能な方法であるため、その確立が望まれてきたが、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。昨年度は、ELISA希釈液にカゼインを用いることにより、非特異反応の低減に成功し、ELISA法によるNS1抗体測定の基礎的条件を確立した。

今年度は、このELISA法を改良するとともに、NS1抗体陽性率から求められる年間自然感染率を中和試験から求められる年間自然感染率と比較した。現在はワクチン接種率が低くなり、小児については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ため、NS1抗体測定の意義が評価可能である。

B. 研究方法

ヒト血清：厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環として収集された熊本県住民の血清 (2004~2008年に1190検体) および東京都住民の血清 (2004~2006年に955検体) を用いた。年齢は、0歳から98歳 (熊本県) あるいは76歳 (東京都) であり、10歳ごとの年齢群に分けた。ただし、60歳以上は1つの群とした。また、6ヶ月齢以下の検体は、移行抗体が含まれる可能性があるために対象から除いた。ウエスタンブロットにおけるJEV感染陽性対照として、タイ国人JE患者血清を用いた。

抗体：JEVのNS1抗原特異的マウスモノクローナル抗体JE-6H4は、ウエスタン

ブロットにおける陽性対照に、JE-2D5はNS1抗原のアフィニティ精製およびNS1抗原測定ELISAに用いた。

抗原：NS1抗体測定ELISAの抗原として、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精製したNS1を用いた。アフィニティ精製には、JE-2D5抗体を結合したセファロース4Bビーズ (NHS-activated Sepharose 4B Fast Flow : GEヘルスケア) を用いた。ウシ血清アルブミン (BSA) の吸収には、ウサギ抗BSA (Alpha Diagnostic International社) を結合したセファロース4Bビーズを用いた。

NS1抗原測定ELISA法：ウサギ抗NS1抗体を感作したウエルに、階段希釈した検体、JE-2D5抗体、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体、パラニトロフェニルリン酸を順次反応させた。吸光度を、標準抗原で得られた吸光度と比較して、NS1抗原量を求めた。標準抗原のNS1量は、ポリアクリルアミド電気泳動後の銀染色で現れたバンドの濃さを標準BSA抗原のそれと比較して求めた。

NS1抗体測定ELISA法：ウエルあたり10ngのNS1抗原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°Cで30分間ブロッキングした。その後、1:100希釈のヒト血清、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 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、ヒト血清あるいはマウスモノクローナル抗体、アルカリホスファターゼ標識抗ヒトあるいはマウス IgG 抗体、ニトロブルーテトラゾリウムを順次反応させた。

BSA 抗原測定 ELISA 法:検体(精製 NS1 抗原)をコーティングバッファに階段希釈してウエルに感作する直接 ELISA 法により BSA 抗原量を測定した。すなわち、感作されたウエルをアルカリホスファターゼ標識抗 BSA 抗体、次いでパラニトロフェニルリン酸と反応させて吸光度を測定した。市販の BSA で得られた標準曲線から、検体中の BSA 量を求めた。

中和試験:50%プラーク減少法を用いた標準法により、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医学倫理委員会において承認された。

C. 研究結果

第 1 バージョンの ELISA 法の問題点:熊本県住民血清の NS1 抗体を測定した結果、ワクチン接種歴が無く、また中和抗体も陰性である 1~5 歳の小児の 102 検体中 21 検体(21%)が陽性となった。この ELISA により検出される NS1 抗体は、中和試験が捉えるエンベロープ蛋白に対する抗体とは必ずしも相関するものではないが、これほど高い NS1 抗体陽性率のみが小児の集団に認められる理由は不明であった。

ヒト血清中 BSA 抗体:NS1 抗体陽性となった 21 検体をウエスタンブロットで解析した。上記の NS1 抗体測定に用いた抗原ロットは残存していなかったため、別のロットをウエスタンブロットの抗原として用いた。その結果、21 検体のうち 19 検体

(91%) にバンドが認められたが、NS1 に相当するものではなく、BSA の分子量に相当する位置であった。例を図 1 に示す。血清#1 には NS1 抗原に対する反応が認められたが、血清#2~#4 には認められず、逆に BSA に相当する位置にバンドが認められた。血清#2~#4 の BSA に対する反応を確かめるために、濃度を変えて ELISA プレートに感作した BSA に対する反応性を調べた(図 2)。その結果、いずれの検体も濃度依存的に BSA に反応することが明らかにされた。以上の結果は、血清中に BSA 抗体が含まれるヒト検体が存在することを示す。

精製 NS1 抗原中の残存 BSA:上記の実験は、ウエスタンブロットに用いた NS1 抗原ロットに BSA が含まれていたことも示す。ELISA により BSA 抗原量を測定した結果、この NS1 抗原ロットには、1 ウエル(100ul)に相当する 10 ng の NS1 抗原あたり 1.25 ng の BSA が含まれていた。培養液に含まれる BSA の濃度である 0.75 mg/ml は、アフィニティ精製により 12.5 ng/ml となり、6 万分の 1 にまで低下したが、それでも精製 NS1 抗原中に BSA が残存したことが考えられる。

ELISA 法の改良:第 1 バージョンの ELISA において生じた血清中 BSA 抗体による偽陽性反応は、ELISA 希釈液に BSA を用いずにカゼインを用いることによる問題点である。解決法の 1 つは、NS1 抗原中の BSA 量をさらに低下させることである。図 2 に示した結果から、1 ng/ml 以下(NS1 抗原量の 1%以下)に低下させると、BSA 抗体の反応性は検知レベル以下になることが予想される。混入 BSA 量を低下させるために、アフィニティ精製を繰り返すことが考えられるが、NS1 抗原の回収量の低下に比して、BSA を除去することはできなかった(表 1)。検討の結果、ウサギ抗 BSA を結合したセファロース 4B ビーズを用いた吸収操作が、最も有効な方法であった。こ

の方法により、NS1 抗原の損失なしに混入 BSA 量を NS1 抗原量の約 1%以下に低下させることができた (表 1)。

もう 1 つの解決法は、抗原非感作ウエルに、NS1 抗原に混入した BSA 量と同じ量の BSA を感作させ、感作ウエルとの吸光度の差を求める方法である。そこで、10 ng の NS1 抗原あたり 1.25 ng の BSA が含まれた上記のロットを用いて検討した (図 3)。ウエスタンプロットにおいて BSA に対する反応が認められたが NS1 に対する反応は認められなかった 10 検体は、BSA を抗原非感作ウエルに用いたことにより、ELISA における偽陽性反応はなくなり、すべて陰性となった。一方、ウエスタンプロットにおいて BSA 抗体陰性で NS1 抗体陽性であった 6 検体は、抗原非感作ウエルに BSA を用いたときも用いなかったときも、ほぼ同じ ELISA 値であった。

熊本県住民の NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率：2004～2008 年に収集された熊本県住民の血清 1190 検体の、各年度の NS1 抗体陽性率を年齢群別に求めた (図 4A)。全体の陽性率としては、7.6% (1190 検体中 90 検体) であった。全体では男女に有意差は認められなかったが、各年で解析すると 2004 年の 60 歳代で有意差が認められた。年齢の上昇と共に NS1 抗体陽性率は上昇した。全体として、50 歳代と 60 歳代は、0 歳代、10 歳代、20 歳代 ($P<0.001$) および 30 歳代 ($P<0.01$) より、また 40 歳代は 0 歳代と 10 歳代 ($P<0.01$) より高い陽性率を示した。

NS1 抗体保持期間を 4.2 年として、年間自然感染率を求めた (図 4B)。2004～2008 年の平均年間自然感染率は、男で 1.9%、女で 1.7%、全体で 1.8%であり、有意な男女差は無かった。2005 年～2007 年の年間自然感染率は、2004 年と 2008 年より有意に高かった。

熊本県住民の中和抗体陽性率から推定さ

れた年間自然感染率：0～9 歳のワクチン非接種者 145 名の中で、中和抗体陽性者は 15 名 (10.3%) であった (表 2)。ワクチン非接種者であるので、中和抗体の存在は自然感染を受けたことを示す。145 名の平均生存期間は 4.0 年であったので年間自然感染率は 2.6% (10.3/4.0) と計算された。同様の方法で、男の年間自然感染率は 2.4%、女は 2.9%と計算された。

東京都住民の NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率：2004～2006 年に収集された熊本県住民の血清 955 検体のうち 578 検体を NS1 抗体試験に供した (図 5A)。全体の陽性率は 5.5% (578 検体中 32 検体) であり、男女差は各年のすべての年齢群で認められなかった。熊本県住民で得られた結果と同様に、NS1 抗体陽性率は年齢の上昇と共に上昇する傾向にあった。全体として、50 歳代と 60 歳代は、10 歳代 ($P<0.001$) および 20 歳代 ($P<0.01$) より、また 50 歳代は 0 歳代 ($P<0.05$) より高い陽性率を示した。

NS1 抗体陽性率から計算された 2004～2006 年の平均年間自然感染率は、男で 1.0%、女で 1.6%、全体で 1.3%であり、有意な男女差は無かった。男の 2004 年の年間自然感染率は 2006 年より高かったが、それ以外の年度間の違いは認められなかった。

東京都住民の中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率：熊本県住民と同様に、0～9 歳のワクチン非接種者の中和抗体陽性率から年間自然感染率を計算した。その結果、男で 3.2%、女で 1.5%、全体で 2.6% であった (表 2)。

D. 考察

ELISA に用いられる希釈液には、0.05% Tween20 添加 PBS、またはそれに BSA を添加する場合が多い。JEV の NS1 抗体を測定する ELISA 法においては、BSA を希釈液に含める系では非特異反応が高く、不

頭性感染で生じる低いレベルの NS1 抗体を捉えることができなかつた。昨年度の研究により、希釈液に BSA でなく、カゼインを用いることで非特異反応を低減し、低レベルの NS1 抗体を測定できるようになった。しかし今回、ヒト血清中の BSA 抗体が偽陽性反応を生じることが、新たな問題として浮上した。

ヒト血清中の BSA 抗体は、すでに報告されており、特に小児に多いことが知られている。摂取された食餌に由来して誘導されると考えられている。今年度の研究において、比較的多くの小児が BSA 抗体を保有し、JEV の NS1 抗体を測定する ELISA に影響することが示された。しかし、この ELISA 系だけでなく、一般の抗体測定用 ELISA やウエスタンブロットにも大きく影響することが示唆される。ブロッキングに BSA が使用されることが多いため、血清用の希釈液に BSA が添加されていない場合には、特異的に BSA 抗体が反応して偽陽性の結果を生じる可能性が高いと考えられる。

アフィニティ精製は、一般的に良く用いられる有効な精製法であるが、NS1 抗原中の BSA を除去できる効率はロットごとに異なる。1 回のアフィニティ精製で、NS1 抗原量の 1% 以下にまで精製できる場合もあれば、10% 程度残存する場合もある。今年度の研究において、BSA 残存量が NS1 抗原量の 1% 以下 (1 ng/ml 以下) であれば、ヒト血清中の BSA 抗体が ELISA に影響しないことを明らかにした。また、BSA 残存量を 1 ng/ml 以下にするためには吸収操作が有効であること、さらに BSA を抗原非感作ウエルに用いる解決法があることも示した。

熊本県および東京都住民の血清を用いて、2 種の異なる検査法 (NS1 抗体 ELISA と中和試験) から推定される年間自然感染率を比較した。中和抗体陽性率は 0~9 歳の結果を用いたが、この理由はワクチン非接種者

であるという情報の信頼性が 10 歳以上の年齢層より高いからである。熊本県住民における NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率は、各年度の男女別に見たとき、0.8%~3.0% の範囲にあり、全体の平均としては 1.8% であつた。この値は、中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率 (男で 2.4%、女で 2.9%、全体で 2.6%) と近い値であつた。東京都住民においては、NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率 (0.2%~2.0% の範囲にあり、全体の平均としては 1.3%) は、中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率 (男で 3.2%、女で 1.5%、全体で 2.6%) とほぼ同等かやや低い値であつた。検体数が少ないための誤差とも考えられるが、もし低いとすれば sterile immunity が、この違いを説明できるかもしれない。また、両試験法における陽性と陰性を区別するカットオフ値も大きく影響する因子であろう。確立された方法である中和試験から推定された年間自然感染率と (やや低い傾向は示唆されたが) 同様の値を示したことは、NS1 抗体を測定する ELISA 法が年間自然感染率の推定に使用できることを示す。

NS1 抗体陽性率および中和抗体陽性率から得られた 1.3%~2.6% というヒトの年間自然感染率は、熊本県および東京都における JEV の自然界での活動を証明する。北日本を除く年間自然感染率は、1960 年までの報告では 3~17%、1980~1990 年代では 5~10%、2001~2004 年では 0.2~3.4% である。2004 年以降の調査は無かつたが、今回の西日本と東日本における 1.3%~2.6% という値は、低下傾向にはあるものの、現在でもヒトが JEV の暴露を受けていることを示している。

E. 結論

ヒト血清中の NS1 抗体を測定する ELISA 法を改良した。また、中和試験の結

果と比較することにより、ELISA 法が自然感染率の推定に適することを示した。さらに、熊本県および東京都において、現在でもヒトが JEV の暴露を受けていることを明らかにした。

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

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A.: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 May;80(5):856-61.

Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009 Jun 8;27(28):3735-43.

Konishi E, Kitai Y.: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 2009 Nov 23;27(50):7053-8.

Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 2009 Nov 23;27(50):7129-30.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A.: A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing

antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods.* 2010;163:360-367.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S and Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.

Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine.* 2010; 10.1016/j.vaccine.2010.01.008

2. 学会発表

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西 英二：インドネシアの Dengue 熱・ Dengue 出血熱患者における血清中の総補体価 CH50 の測定。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月

北井 陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西 英二：NS1 抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009 年 6 月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi and Eiji Konishi: A method to measure both