

infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue type 2 virus using K562 cell layers. Forty-third Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, 2009年7月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2009年9月

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

田淵裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いた Dengue 2 型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

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補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

宮川優子、小西英二： Dengue ワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体を Dengue 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

瀧澤山人、小西英二： Dengue 2 型ウイルスによる前免疫が Dengue 4 価 DNA ワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

田淵裕子、山中敦史、小西英二： Dengue 流行地のヒトが保有する Dengue ウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

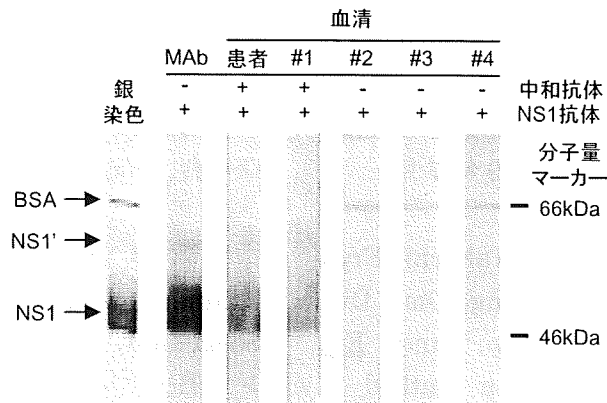


図1. 第1バージョンのELISAにおいて陽性を示した小児の血清を用いたウエスタンブロット解析。精製NS1抗原の1ロットを非還元下において10%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、ポリビニリデン膜に転写した。陽性対照として、NS1に対するモノクローナル抗体JE-6H4 (MAb) およびJE患者血清を用いた。#1の血清は中和抗体もNS1抗体も陽性であったもの、そして#2(女、3歳)、#3(女、4歳)と#4(女、5歳)の血清は中和抗体が陰性でNS1抗体が陽性であったものである。分子量マーカーの64kDaはBSAであり、位置が一致した。また、この位置には電気泳動後の銀染色像においてもバンドが認められた。

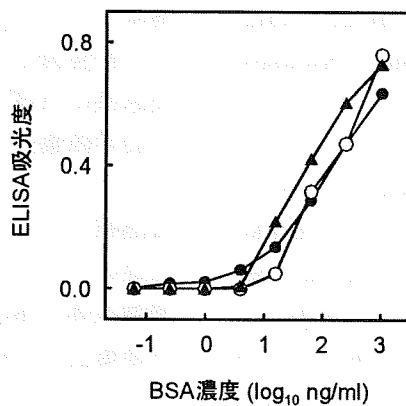


図2. ウエスタンブロットでBSAに相当する位置にバンドが認められた血清の、ELISAにおけるBSAに対する濃度依存性の反応。図1の血清#2(○)、#3(●)、#4(▲)を用いた。

表 1. NS1 抗原の精製過程における BSA 残量の比較

精製過程	BSA 濃度 (ng/ml)	NS1 濃度 (ng/ml)	BSA/NS1 (%)
培養液	750,000	150	500,000
アフィニティ (1回)	125	1,000	12.5
アフィニティ (2回)	13	200	6.5
吸収 ^a	6	1,000	0.6

^a吸収操作は、アフィニティ (1回) の後に行なった。

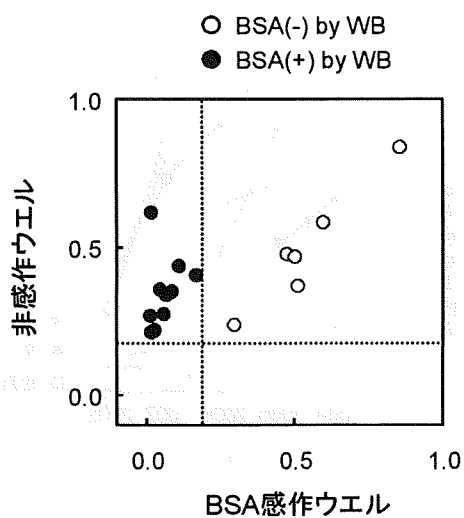


図 3. 抗原非感作ウエルとして BSA 感作ウエルを用いる効果。この ELISA に用いた NS1 抗原 (10 ng/ml) には 1.25 ng/ml の BSA が含まれていた。抗原非感作ウエルとして、まったく感作しないウエル (非感作) と 1.25 ng/ml の BSA を感作したウエル (BSA 感作) を用いて、NS1 抗原感作ウエルとの吸光度の差を求めた。ウエスタンブロットにおいて BSA 抗体陽性で NS1 抗体陰性であった 10 検体 (●) および BSA 抗体陰性で NS1 抗体陽性であった 6 検体 (○) を用いた。破線は、カットオフ値 (0.185) を示す。

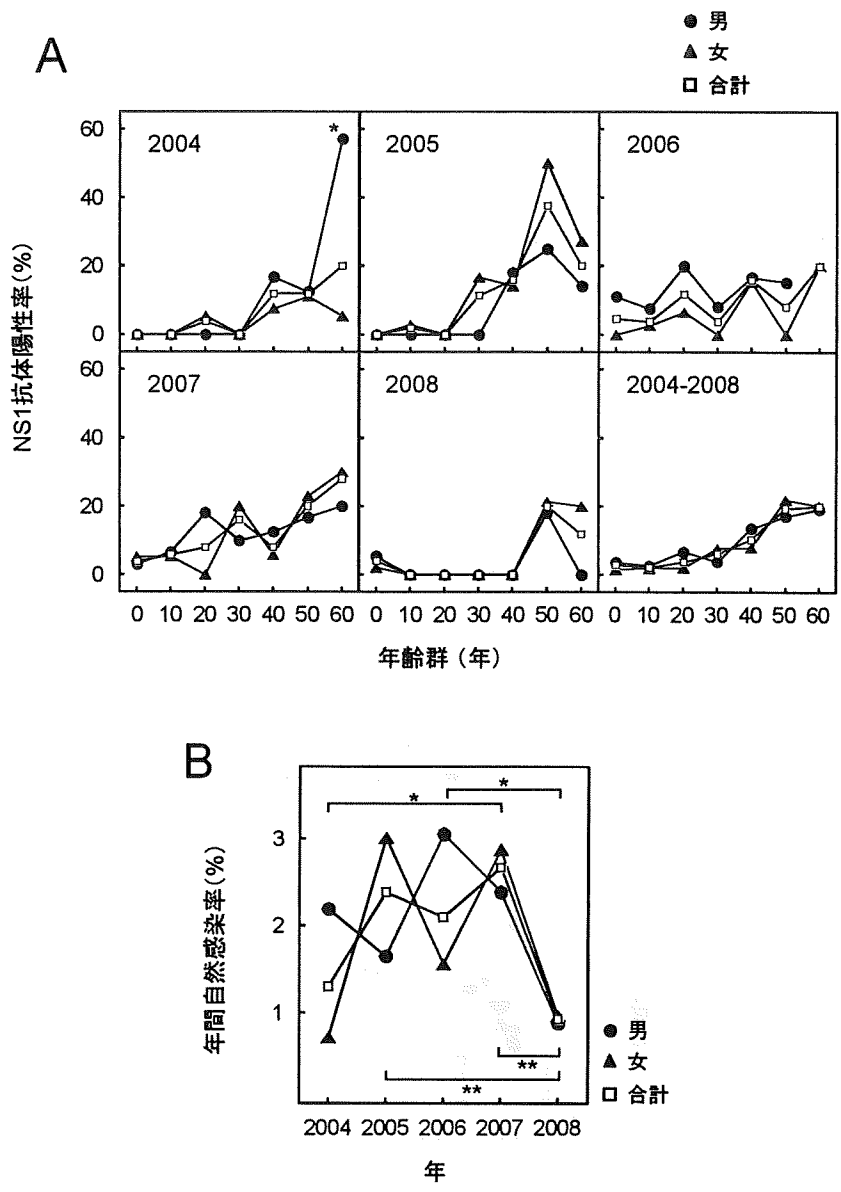


図4. 2004～2008年に収集された熊本県住民血清のNS1抗体陽性率。(A)男(●)、女(▲)および全体の集団(□)における年齢依存曲線。*は有意な男女差(P<0.05)を示す。(B)男(●)、女(▲)および全体の集団(□)における年間自然感染率。全体の集団における年度間の有意差を*(P<0.05)、**(P<0.01)で示す。

表 2. 0～9 歳のワクチン非接種者における中和抗体陽性率から計算した平均年間自然感染率。

地域	性	検体数	陽性数	陽性率 (%)	平均生存期間 (年) ^a	年間自然感 染率 (%) ^b
熊本県 ^a	男	80	7	8.8	3.7	2.4
	女	65	8	12.3	4.3	2.9
	合計	145	15	10.3	4.0	2.6
東京都 ^b	男	127	13	10.2	3.2	3.2
	女	73	3	4.1	2.8	1.5
	合計	200	16	8.0	3.1	2.6

^a 対象となった小児の年齢から計算した。年齢に 0.5 年を加えた値を生存期間とした。例えば、年齢が 1 歳の場合、生存期間を 1.5 年とした。

^b 陽性率を平均生存期間で除して求めた。

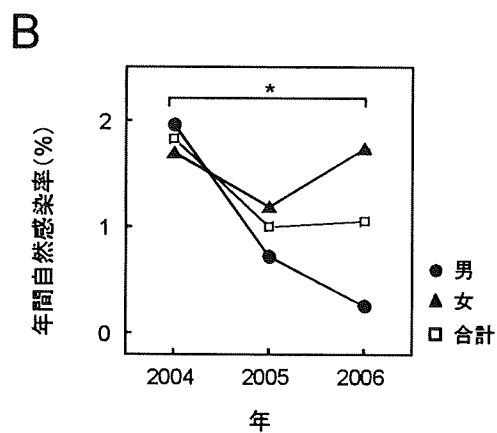
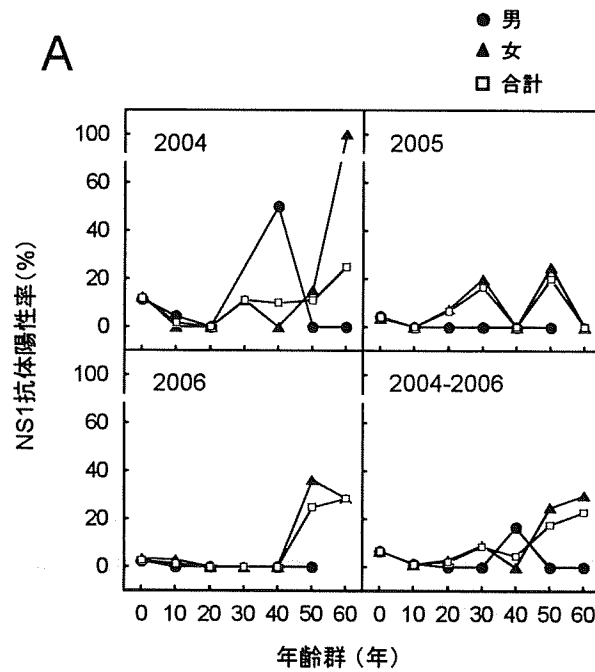


図 5. 2004～2006 年に収集された東京都住民血清の NS1 抗体陽性率。(A) 男 (●)、女 (▲) および全体の集団 (□) における年齢依存曲線。(B) 男 (●)、女 (▲) および全体の集団 (□) における年間自然感染率。全体の集団における年度間の有意差を* ($P < 0.05$) で示す。

イノシシから分離された日本脳炎ウイルスの性状解析

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）
沢辺京子、小林睦生
（国立感染症研究所昆虫医科学部）
島津幸枝
（広島県立総合技術研究所保健環境センター保健研究部）
小川知子（千葉県衛生研究所 ウイルス研究室）
原田誠也（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部）
湊 千壽（静岡県環境衛生科学研究所 微生物部）

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、2008 年 12 月上旬に捕獲されたイノシシから日本脳炎ウイルス (JaNB037 株) を分離できた。2009 年度は分離ウイルスの性状解析を行った結果、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 株を十分に中和した。また、2008 年-2009 年のブタからの分離ウイルスの E 領域のアミノ酸配列を比較したところ 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ルアラニンであったところが異なっていた。また 3' NCR の遺伝子配列においても欠損部位が異なっていることが確認された。

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試み、野生のイノシシから日本脳炎ウイルス JaNBo37 株を分離した。この分離株の遺伝子解析・性状解析を実施し、2008年と2009年にブタから分離された日本脳炎ウイルスと比較した。

B. 研究方法

ウイルス

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 JaNBo37 株を用いた。

ウイルス遺伝子検出：

イノシシの血清 200 μ 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 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：

千葉、静岡、広島、熊本のブタ血清から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 細胞を用いたプラーク形成法により実施した。

ウイルス遺伝子配列の決定：

JaNBo37 株およびブタからの分離ウイルスは日本脳炎ウイルス 1 型遺伝子用のプラ

イマーを用いてダイレクトシーケンスにより、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。

中和試験

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 JaNBo37 株にてプラーク減少法により中和能を解析した。

C. 研究結果

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、近年国内のブタから分離されるウイルスと近似であり、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。2008-2009 年度のブタからの国内分離株とも極めて近似であったが、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ルアラニンであったところが異なっていた (図 1)。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、JaNBo37 株では 31-37 番目の異なる部位の 7 塩基が欠損していた (図 2)。

分離ウイルスの免疫学的性状解析を行った結果、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、JaNBo37 株に対してホモウイルス (Beijing-1) に対する中和力価と比較して相対力価 0.64 であったが、感染防御効果としては十分な力価を示した (図 3)。

D. 考察

野生のイノシシから分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析、性状解析を行った。2008-09 年の千葉、静岡、広島、熊本のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス (genotype 1) と E 領域のアミノ酸配列と 3'NCR の塩基配列を検討したところ、わずかな相違が認められた。この変異が病原性に関与するかどうかは不明である。また、イノシシに感染したことで生じた変異か、もともとこの変異のあるウイルスに感染したのかも不明である。

しかし、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、JaNBo37 株を十分に中和したことから、現行ワクチンの接種が感染防御に有効であることが示唆された。

E. 結論

野生イノシシから分離された日本脳炎ウイルス (JaNBo37 株) に対して、現行日本脳炎ワクチンは有効であることが確認された。また、現在ブタの間で感染している日本脳炎ウイルス (遺伝子 1 型) と近似であるが、E 領域および 3'NCR 領域においては、わずかであるが相違が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (英文)

- 1) Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.
- 2) Tajima, S., Nerome, R., Nukui, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. *Virology*, 396: 298-304, 2010.

論文発表 (和文)

- 1) 田島茂、高崎智彦。日本脳炎。診断と診療、97 (10) 2097-2100, 2009.

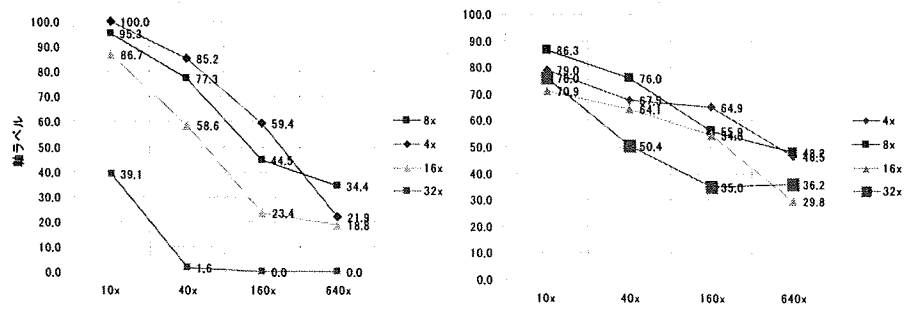
学会発表

- 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)

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>3) 田島茂、加藤文博、<u>高崎智彦</u>、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）</p> <p>4) 田島茂、<u>高崎智彦</u>、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）</p> <p>5) <u>高崎智彦</u>、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</p> | <p>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）</p> <p>H. 知的所有権の取得状況</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

図3

日本脳炎ワクチン(Beijing-1)免疫マウス血清の
JaNBo37に対する中和能



JaNBo37に対する中和力価は、ホモウイルス(Beijing-1)に対する中和力価と比較して、相対力価0.64であったが、感染防御効果としては十分な力価をしめした。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等 新興・再興研究事業）
分担研究報告書

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 部長）
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 研究参事）
清田 直子（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部 研究員）
小西 英二（国立大学法人神戸大学 准教授 研究分担者）
高崎 智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長 研究代表者）

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、主たる増幅動物であるブタについて、2009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、JEVに対する赤血球凝集抑制（HI）抗体と新鮮感染（2-ME感受性）抗体を測定した。HI抗体保有ブタは7月下旬から現れはじめ、徐々に増加して9月初旬の最終回では80%となった。8月初旬から2-ME感受性抗体も検出され始めたことから、2009年は7月中旬からJEVの侵淫が始まったと推測された。しかし、ブタの抗体保有率の増加が緩慢であったため、日本脳炎（JE）注意報発令の基準を超えたのは8月下旬であった。なお、ブタ180頭の血清のうち、HI抗体陰性ブタ5頭の血清から遺伝子I型のJEVが分離された。

2009年はJE患者発生届が1件あった。患者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。このことから、時宜を得たJE注意報を発令するためには、被検ブタの選び方を検討し、かつ注意報発令の基準を見直す必要性が感じられた。

今回の患者は髄膜炎症状の軽症JE患者であったことから、原因不明の無菌性髄膜炎・脳炎患者保存髄液195検体からJEV遺伝子の検出を行ったが、結果はすべて陰性であった。

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、2005年に採取し保存されていたヒト血清225検体と2009年に採取したヒト血清276検体について、50%ブランク減少法により中和抗体価を測定した。予防接種歴の信憑性が高い1歳～9歳のワクチン未接種者について、中和抗体陽性率から年間自然感染率を求めたところ、2005年が2.5%、2009年が2.7%、2003年～2009年の通算でも2.7%と計算された。また、2004年～2008年に採取したヒト血清1190検体中90検体（7.6%）からNS1抗体が検出された。NS1抗体の持続期間を4.2年とすると、計算上の年間自然感染率は1.8%であった。

A. 研究目的

過去、熊本県は全国でも有数の日本脳炎（JE）患者多発県であったが、全国同様の傾向で1960年代半ばをピークに患者数は激減した。特に1991年以降は1人以下となり、2000年～2003年は患者発生報告の

ない年が続いた。しかし、2004年と2005年に各1人、2006年に3人、2007年に1人、2008年はなかったものの、2009年には、また1人の患者が報告された。

そこで本研究は、ブタ血清中の抗体検査とJEウイルス（JEV）分離、ヒト血清中

の抗体検査、患者発生状況調査並びに原因不明無菌性髄膜炎・脳炎患者保存髄液からの JEV 遺伝子検査等を通して、熊本県における JEV の活動とヒトの自然感染率を明らかにし、今後の JE 予防戦略構築の一助とすることを目的とした。

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

2009 年 7 月から 9 月間に、県内各地の養豚場から熊本畜産流通センターに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 頭分採取した。検査法は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)に従い、JaGAR#01 株(デンカ生研)を抗原として HI 抗体と 2-ME 感受性抗体を測定した。

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 細胞及び C6/36 細胞に 200 μ l ずつ接種した。1 時間吸着後、維持培地 2ml を加え、それぞれの至適培養条件下で 2、3 代継代培養し、細胞変性効果(CPE)を観察した。CPE が認められたウェルの培養上清から QIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)で RNA を抽出し、平成 20 年度厚生労働科学研究補助金 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」研究報告書「イノシシから分離された日本脳炎ウイルス」に記載された高崎らのリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法)により 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 塩基について、ダイレクトシーケンによる遺伝子解析を行った。

3. ヒト血清の中和抗体検査

2005 年に年齢群別に採取し保存されて

いたヒト血清 225 検体及び 2009 年に採取した 276 検体について、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)に準じた改良 50%プラーク減少法で、JEV に対する中和抗体を測定した。

4. ヒト血清の NS1 抗体検査

2004 年～2008 年に採取したヒト血清 1190 検体から、平成 20 年度厚生労働科学研究補助金 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」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：基礎条件の確立と評価」に記載された小西らの方法により NS1 抗体を測定した。

(倫理面の配慮)

ヒト血清については、採取時に各種検査についての同意書を頂いた。また、NS1 抗体検査に際し、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会の承認を得た。

5. JE 患者調査

2009 年、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)に基づき JE 発生届が提出された 1 名の患者について、医療機関に保存されていた急性期の患者髄液から、IgM 捕捉 ELISA 法により JEV 及びウエストナイルウイルス(WNV)に対する IgM 抗体を測定した。

また、リアルタイム RT-PCR 法及び Nested RT-PCR 法により JEV 遺伝子の検出を試みた。

6. 保存髄液の JEV 遺伝子検査

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 年以降の髄液のうち、原因の特定されなかった 195 検体について、リアルタイム RT-PCR 法により JEV 遺伝子の検出を行った。

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

2009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HI抗体が確認されたのは7月27日採取の検体で、20検体中2検体が、それぞれHI抗体価1:10と1:20を示した。その後HI抗体保有率は徐々に増加し、8月10日の検体から2-ME感受性抗体も検出され始めた。8月24日にはHI抗体保有率が65%となり、JE注意報が発令された。最高値は9月7日の80%であった。2005年から2009年までの各年におけるHI抗体保有率の推移を図1に示した。

2.ブタ血清からのJEV分離

2009年に実施したブタ血清180検体からのJEV分離結果を表2に併記した。JEVは8月3日に1検体、8月10日に3検体、9月7日に1検体の合計5検体から分離された。このうち、8月3日の1検体と8月10日の2検体は同じ養豚場であった。

また、これら5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

2005年のヒト血清225検体及び2009年のヒト血清276検体の年齢群別による中和抗体検査結果をそれぞれ表4、表5に示した。また、2005年～2009年に測定した年齢・年齢群別中和抗体保有率(抗体価1:10以上)のグラフを併せて図2に示した。

2005年はJEワクチンの定期接種が勧奨差し控えとなった年で、0歳～4歳児の抗体保有率がわずかに低下していた。さらに、この年は通年と異なり、60歳以上の抗体保有率にも低下が見られた。

2009年はJEワクチン接種の再開によってか0歳～4歳児の抗体保有率が勧奨差し控え以前の水準まで回復した。なお、年齢群別の推移は、ほぼ例年同様であった。

また、母親からの移行抗体の影響がなく、採血時に頂いた予防接種歴調査結果の信憑性が高いと思われる1歳～9歳のワクチン未接種者は2005年が20人であった。この

うち2人が中和抗体陽性で、自然感染によって抗体を獲得したものと考えられることから、自然感染率は10.0%、陽性者2名の平均生存年数で割った年間自然感染率は2.5%と計算された。一方、2009年は1歳～9歳のワクチン未接種者45人中4人が中和抗体陽性で、自然感染率は9.6%、年間自然感染率は2.7%と計算された。なお、2003年～2009年の通算による年間自然感染率も計算上2.7%であった。

4.ヒト血清のNS1抗体検査

2004年～2008年に採取したヒト血清1190検体中90検体(7.6%)がNS1抗体陽性であった。NS1抗体保有率は年齢とともに増加の傾向を示し、特に40代以上でその傾向が強かった。

また、NS1抗体の持続期間を4.2年とすると、2004年～2008年の年間自然感染率は1.8%と計算された。年別に見ると2005年～2007年の年間感染率は2%を超え、1%以下であった2004年及び2008年より有意に高かった。

5.JE患者調査

2009年に1名のJE患者発生届出があった。患者は熊本市在住、7歳10ヶ月の男児で既往歴はなく発育良好、JEワクチン未接種であった。患者は8月6日午後軽熱、腹痛の症状にて発症し、翌7日には39℃台の高熱となった。近院を受診し輸液を受けたが改善せず、8日に中核病院へ転院した。活気は低下していたものの意識障害、頭部CT異常は認められず、総合所見により無菌性髄膜炎と診断され入院となった。その後高熱が持続し、12日にやっと38℃台となった。15日に座位可能、17日には歩行可能となり、21日に軽快退院した。その間、13日に実施されたMRI検査でも脳の異常は認められなかった。

なお、血清検査ではJEVに対するHI抗体価が急性期1:10、回復期1:640であった。また、8月10日採取の髄液検査では、リア

リアルタイム RT-PCR 及び Nested RT-PCR はいずれも陰性であったが、IgM 捕捉 ELISA 法にて抗 JEV IgM 抗体が陽性となり、JEV 感染が確認された。抗 WNV IgM 抗体は陰性であった。以上により、本事例は JEV 感染による無菌性髄膜炎であることが確定した。

6. 保存髄液の JEV 遺伝子検査

原因不明無菌性髄膜炎・脳炎患者の髄液 195 検体について、リアルタイム RT-PCR 法により JEV 遺伝子の検出を行ったが、すべて陰性であった。

D. 考察

2009 年、熊本県におけるブタの HI 抗体の立ち上がり時期は 7 月下旬であり、ほぼ例年通りであった。しかし、飼育地域別に 5 頭ずつ 20 頭検査しているためか抗体保有率の上昇はなだらかで、JE 注意報発令の基準を満たしたのは 2008 年と同様の 8 月下旬となった。HI 抗体測定期間の抗体保有率は最高 80% で、遺伝子 I 型の JEV も 5 株分離された。さらに、患者も 1 人発生したことから、2009 年は JEV の活動が比較的活発であったと推測された。

JE 患者の発症日は 8 月 6 日で、この時期はブタから JEV が検出された時期でもあったが、JE 注意報発令日より 20 日以上も前であった。近年、ブタの飼育形態・環境の変化、水田の減少に伴うコガタアカイエカの減少等によりブタの JEV に対する抗体保有時期と保有率が飼育地域や養豚場によって著しく異なっている。このことから、時宜を得た JE 注意報を発令し県民に注意を喚起するためには、JEV 感染率の高い飼育地域や養豚場から搬入されたブタを検査対象とし、かつ「ブタの JE 抗体保有率が 50% 以上、かつ 2-ME 感受性抗体が 1 頭でも検出された時点」という厚生労働省感染症流行予測事業の JE 注意報発令基準を見直す必要性が感じられた。

次に、ヒト血清の JEV に対する中和抗体検査結果をみると、JE ワクチン接種の積極的勧奨差し控えとなった 2005 年では、4 歳以下で若干減少が見られた。一方、2009 年は JE ワクチン接種再開のためか 4 歳以下が 2004 年以前の状態まで回復した。また、検体数が非常に少ないため信頼性は低いものの、ワクチン未接種者の中和抗体保有率から 2003 年～2009 年の年間自然感染率は 2.7% と計算された。この数字は、熊本県民約 180 万人のうち、5 万人近くが毎年感染している計算となり、かなり高すぎるように思われた。一方、NS1 抗体保有率から計算すると、2004 年～2008 年の年間自然感染率は 1.8% であった。

当所保存の原因不明髄液は、すべて JEV 遺伝子陰性であったが、髄液からの JEV 遺伝子検出は患者でも難しいため、来年度は IgM 抗体を測定する予定である。

E. 結論

- 2009 年、HI 抗体陽性ブタは、7 月下旬から現れ始めた。しかし、保有率上昇が緩慢で、JE 注意報発令は 8 月下旬であった。
- 2009 年 8 月 6 日、ワクチン未接種の男児（7 歳 10 ヶ月）が髄膜炎症状の軽度 JE を発症した。
- 時宜を得た JE 注意報を発令するためには、JEV 感染率の高い飼育地域・養豚場から搬入されたブタの検査と JE 注意報発令基準の見直しが必要である。
- ブタ血清から遺伝子 I 型の JEV が 5 株分離され、3 株は同一養豚場由来であった。
- 2009 年の JEV の活動は 2008 年より活発であった推測された。
- ヒト血清の中和抗体検査から、2005 年に 0 歳～4 歳児の保有率低下、2009 年に回復が見られた。ワクチン未接種の 1 歳～9 歳児の中和抗体陽性率から計算した年間自然感染率は、2005 年が 2.5%、2009 年が 2.7% で、2003 年～2009 年の通算でも 2.7%

であった。

7 2004年～2008年に採取したヒト血清1190検体中90検体(7.6%)がNS1抗体陽性で、年間感染率は1.8%であった。

8 原因不明髄液195検体は、すべてJEV遺伝子陰性であった。

F. 健康危機管理情報

熊本県では依然として患者が発生し、ブタからJEVが分離されることから予防接種の勧奨再開と時宜を得たJE注意報発令が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus among humans in west and east Japan: recent situation and needs for continuous vaccination, (Vaccine, 2010 Jan 15. [Epub ahead of print])

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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 北海道千歳市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ブタの HI 抗体及び2ME 感受性抗体検査結果(2009 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
7/13	20	20							0%		
7/21	20	20							0%		
7/27	20	18	1	1					10%		
8/ 3	20	19	1						5%		
8/10	20	12	1				4	3	40%	71%	
8/17	20	14	2		1	1	2		30%	50%	
8/24	20	7			2	7	3	1	65%	15%	
8/31	20	6			3	5	6		70%	29%	
9/ 7	20	4	1				8	5	2	80%	7%

表2 ブタ血清の市町村別 HI 抗体検査結果と JEV が検出されたロット

採血年月日	K村	U町	K市	Y市	G市	O町	A市	HI抗体 保有率	JEV 分離数
2009/7/13		0/10	0/5				0/5	0%	
7/21	0/5		0/5	0/5		0/5		0%	
7/27		1/10	1/10					10%	1株
8/ 3		0/5	1/10				0/5	5%	
8/10		3/5	1/5	4/5		0/5		40%	3株
8/17		5/5	0/5	0/5			1/5	30%	
8/24		5/5	1/5	5/5		2/5		65%	
8/31		8/10		5/5	1/5			70%	
9/ 1		5/5			1/5	10/10		80%	1株

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

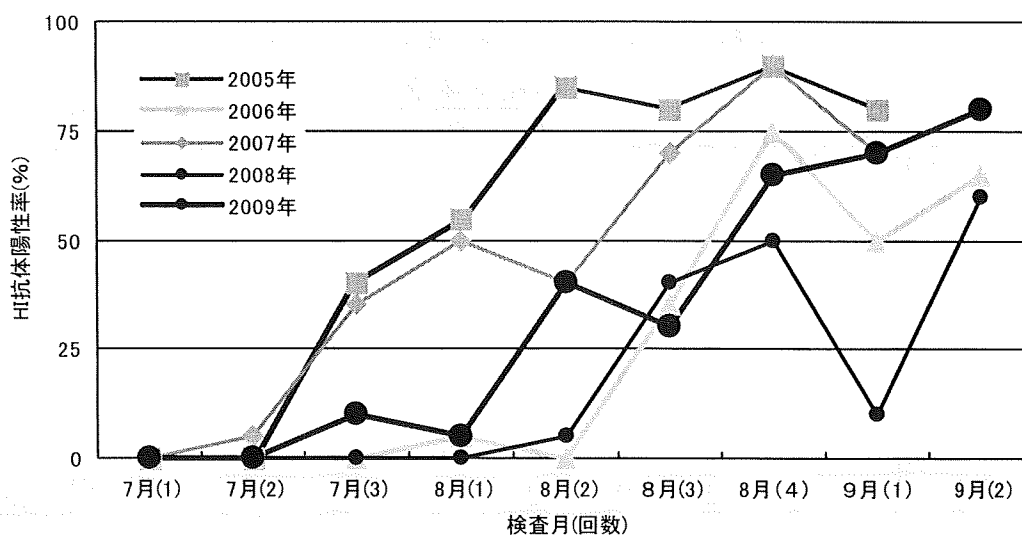


図1 ブタ血清中の HI 抗体保有率の推移(2005 年～2009 年)

表3 ブタ血清から分離された JEV の遺伝子型(2009 年)

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/ 61/2009	2009/8/ 3	U町(U養豚場)	I 型
2	SW/kumamoto/ 94/2009	2009/8/10	O町	I 型
3	SW/kumamoto/ 97/2009	2009/8/10	U町(U養豚場)	I 型
4	SW/kumamoto/ 98/2009	2009/8/10	U町(U養豚場)	I 型
5	SW/kumamoto/163/2009	2009/9/ 7	G市	I 型

表4 ヒト血清の年齢群別中和抗体検査結果(2005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	21					1	1	2	25
5-9	7		2		1	2	2	11	25
10-14	5		2	2	1	4	1	10	25
15-19					1	1	7	16	25
20-29	4	3	3	6	3	3	1	2	25
30-39	4	6	5	6	2	3			26
40-49	13	2	3	4	2		1		25
50-59	5		3	10	2	4			24
≥60	11	1	2	4	1	4	1	1	25
合計	70	12	20	32	13	22	14	42	225

表5 ヒト血清の年齢群別中和抗体検査結果(2009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	39	2	1	1	2	1	4	5	55
5-9	11			1	1	1	3	9	26
10-14	6					1	3	4	14
15-19	2		1	3	1	6	5	7	25
20-29	7	1	4	6	5	9	6	14	52
30-39	7	4	6	5	3	1			26
40-49	15	1	4	5			2	1	28
50-59	14		5	2		3		1	25
≥60	1		5	9	1	4	4	1	25
合計	102	8	26	32	13	26	27	42	276

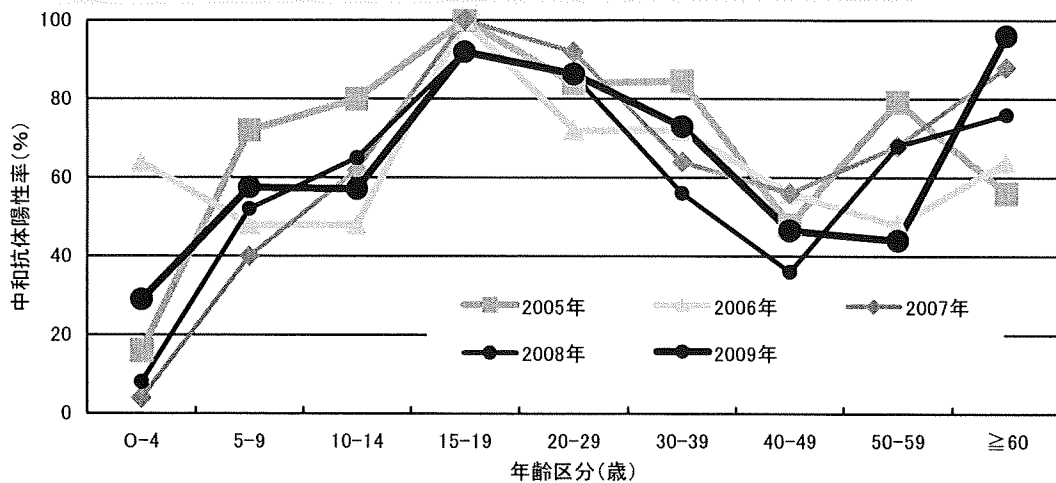


図2 ヒト血清の年別・年齢群別中和抗体保有率の(2005年～2009年)