

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

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

研究分担者 田部井 由紀子（東京都健康安全研究センター 主任研究員）
研究協力者 長谷川 道弥、岩崎 則子、岡崎 輝江、
保坂 三継、甲斐 明美（東京都健康安全研究センター）

研究要旨

東京都内における日本脳炎ウイルス（以下 JEV）感染症の発生動向を把握するため、2004 年から 2009 年の 6 月から 11 月の期間に東京都内の病院において採取された脳炎・脳症および髄膜炎等患者の髄液 681 件を調査対象として、リアルタイム PCR 法による JEV 遺伝子検査を行った。その結果、髄液 681 件は全て JEV 遺伝子検査陰性であり、2004 年から 2009 年の東京都においては、日本脳炎の患者発生のみならず、JEV 感染症の患者発生も無かったことが推察された。

A. 研究目的

国内における日本脳炎の患者発生は、ワクチン接種が開始された 1967 年以前には年間 1 千人にも達していたが、これ以降は激減し、近年では年間 10 人未満となっている。しかしながら、2002 年には定型的な脳炎症状までには至らない髄膜炎症状のみを呈した患者から日本脳炎ウイルス（以下 JEV）が検出されたという報告もあり、国内での患者発生は新たな展開を迎えているとも考えられる。また、2005 年よりワクチン定期接種の積極的勧奨が差し控えられていることから、抗体保有率の低下ならびに抗体保有率の低下に伴う日本脳炎の再流行が懸念されている。

このような状況において東京都では、感染症流行予測調査事業によって都内のブタにおける JEV 感染状況の監視及び都民の JEV に対する抗体保有調査を継続して行っている。その結果、近年ではブタにおける JEV 感染は低い感染率ながらも毎年確認され、かつ都民の抗体保有率は低年齢層にお

いて顕著に低下していることが確認されているものの、日本脳炎の患者発生は確認されていない。

そこで本研究では、東京都における日本脳炎ならびに脳炎症状までには至らない症例も含めた JEV 感染症の発生動向を把握することを目的に、脳炎・脳症および髄膜炎等の患者から採取された髄液について、JEV 遺伝子検査を行い、感染状況を調査した。

B. 研究方法

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）である（表 1）。

JEV 遺伝子検査は、リアルタイム PCR 法によって行った。すなわち、JEEn562s-585 プライマー（CTGGAYTGTGARCCAAGGA）、

JEen623c-585 プライマー (GAHCCCACGGTCAT GA) および JEen585pb562s623c プローブ (ACTRAACACTGAAGCGT) を用いて、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システム (ABI 社) により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、感染症発生動向調査事業により、感染症の原因究明を目的として、種々のウイルスについて感染の有無を調査するために採取された検体を使用して行った。

C. 研究結果

2004 年から 2009 年の 6 月から 11 月に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 件について JEV 遺伝子検査を行った結果、調査対象とした髄液検体は全て陰性であった。

この結果から、2004 年から 2009 年の東京都内においては日本脳炎の患者発生だけでなく、JEV 感染症の患者発生も無かったものと推察された。

D. 考察

流行予測調査事業によって測定した近年における都民の JEV に対する中和抗体保有率の結果を図 1 に、ワクチン接種歴別の抗体保有率を図 2 に示した。

図 1 のように、都民における JEV に対する中和抗体の保有率は、2000 年から 2003 年までは 70%~80% 台であったが、2004 年以降に 50% 台に低下しており、2008 年および 2009 年の抗体保有率はさらに低下していた。また、図 2 のようにワクチン接種歴別の抗体保有率では、ワクチン接種歴の有無にかかわらず、抗体保有率は低下傾向にあることが確認された。しかしながら、ワクチン接種歴がある都民における抗体保有率は年々ゆるやかに低下しているのに対して、ワクチン接種歴がない都民の抗体保有率は 2004 年以降で急激に低下しており、

2008 年には 1.0% ならびに 2009 年には 1.7% までに低下していた。ワクチン接種歴の有無によって抗体保有率の低下率に差があることと、ワクチン接種歴がある都民とワクチン接種歴がない都民の抗体保有率の差が年々大きくなることは、都民における JEV 自然感染率が低下していることによるものと推察された。実際に都内で飼育されたブタを調査対象として JEV の感染状況を調査すると、2005 年は高い感染率であったものの、その他の調査年では 10% 台の低い感染率であり、近年の東京都は JEV 低侵淫地域であることが確認されている。

本研究では、JEV 低侵淫地域である東京都における日本脳炎および JEV 感染症の患者発生の有無ならびに JEV 感染状況を確認するために、都内病院から搬入された脳炎・脳症および髄膜炎等患者の髄液を調査対象として JEV 遺伝子検査を実施した。調査対象は、2005 年に一年限りではあったが、ブタにおいて JEV の高い感染率を確認したために、2005 年を含む 2004 年から 2009 年の 6 年間に搬入された患者髄液とした。

今回の JEV 遺伝子検査の結果は全て陰性であったが、近年、国内において発生した日本脳炎患者は、髄液中の JEV に対する IgM 抗体の存在によって JEV 感染が確認されるケースが多くなっていることから、JEV 感染の有無をさらに確実に把握するためには、同じ調査対象について JEV に対する IgM 抗体検査を実施する必要があると思われた。

E. 結論

東京都における日本脳炎および JEV 感染症の患者発生の有無ならびに JEV 感染状況を把握するために、2004 年から 2009 年の 6 月から 11 月に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 件について JEV 遺伝子検査を行った。その結果、調査対象とした髄液検体は全て陰性

であった。2004年から2009年の東京都内においては日本脳炎の患者発生だけでなく、JEV感染症の患者発生も無かったものと推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. Vaccine [Epub ahead of print] 2010.

田部井由紀子, 岩崎則子, 岡崎輝江, 長谷川道弥, 保坂三継, 甲斐明美: 東京都におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイ

ルスを媒介する蚊の生息状況. 東京都健康安全研究センター研究年報, 60, 901-906, 2009.

田部井由紀子, 岩崎則子, 岡崎輝江, 長谷川道弥, 保坂三継, 甲斐明美, 小西英二: 東京都民における日本脳炎ウイルスのNS1抗体保有状況. 病原微生物検出情報, 30(6), 154-155, 2009.

2. 学会発表

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

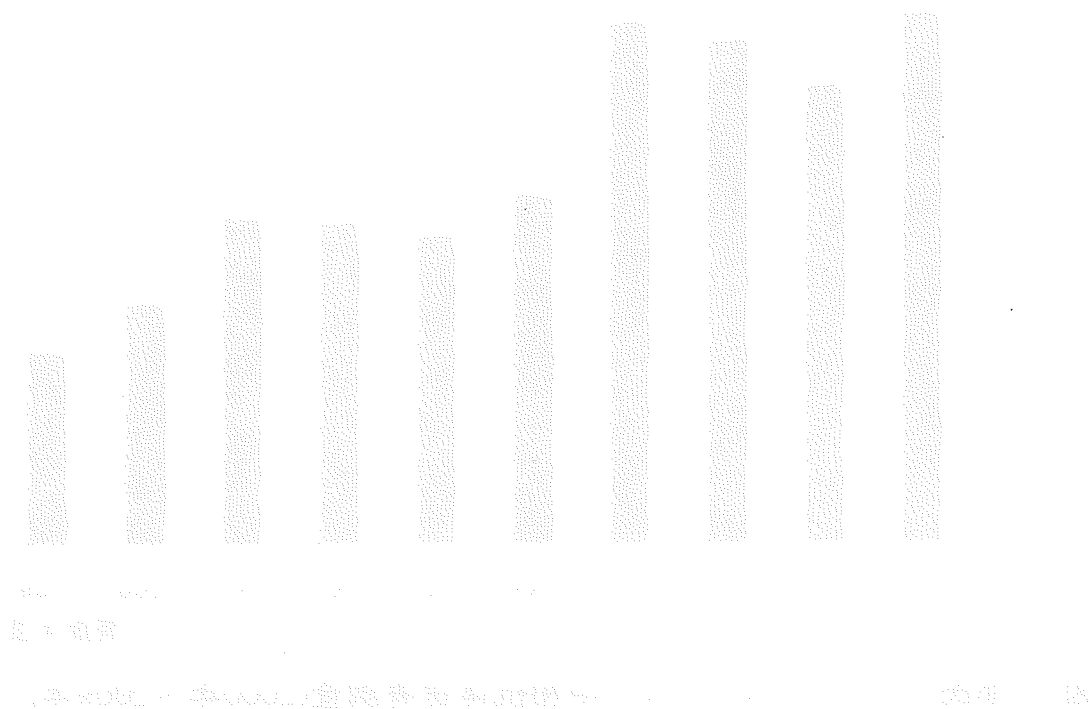


表1. 調査対象とした髄液検体の採取年および疾患名の内訳

検体採取年	供試検体数	疾患名の内訳	
2004年	100	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	25
		髄膜炎	72
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	3
2005年	107	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	9
		髄膜炎	95
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	3
2006年	104	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	16
		髄膜炎	87
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	1
2007年	127	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	23
		髄膜炎	100
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	4
2008年	118	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	18
		髄膜炎	99
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	1
2009年	125	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	25
		髄膜炎	100
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	0
計	681	脳炎・脳症(小脳炎、髄膜脳炎を含む)	116
		髄膜炎	553
		脊髄炎(急性散在性脳脊髄炎を含む)	12

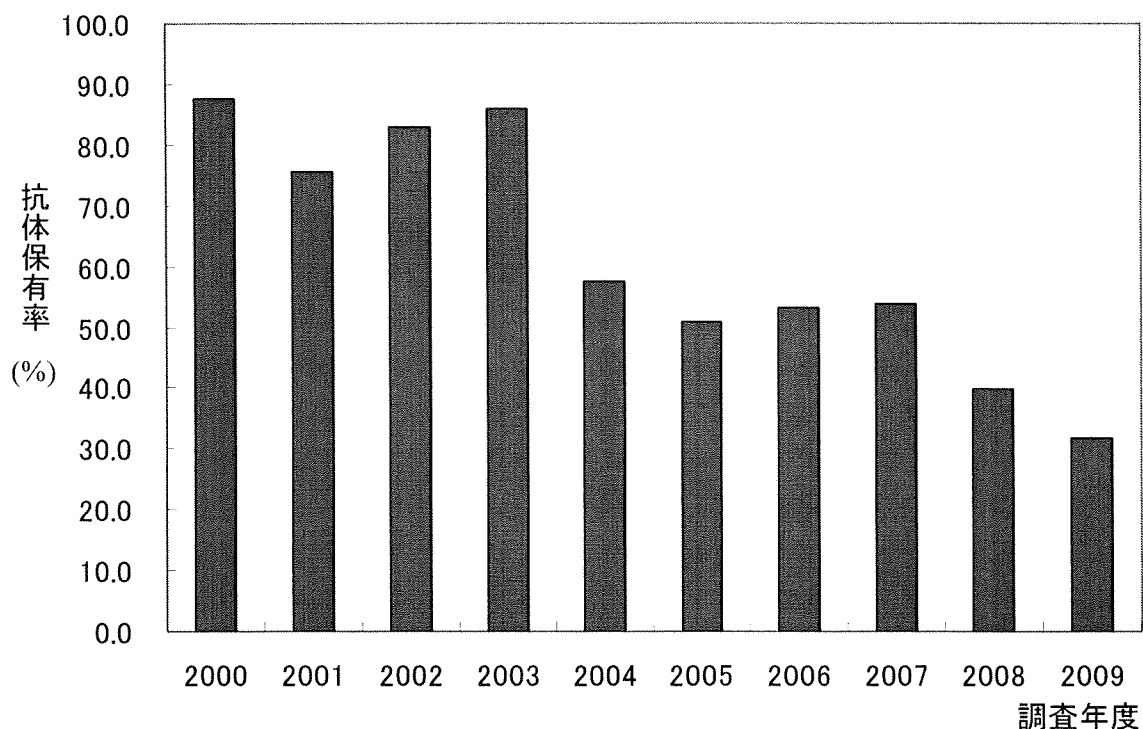


図1. 都民におけるJEVに対する中和抗体保有調査(2000年～2009年)

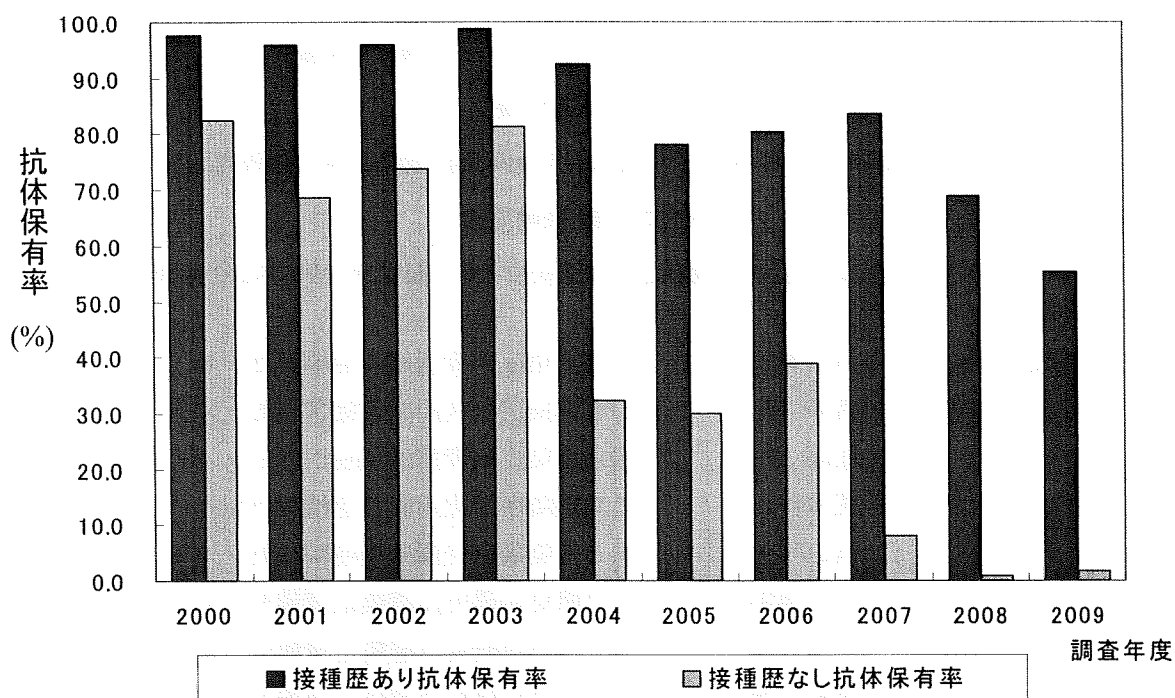


図2. ワクチン接種歴別の都民におけるJEVに対する中和抗体保有調査
(2000年～2009年)

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

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)

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

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	国立感染症研究所感染症情報センター
	佐藤 弘	国立感染症研究所感染症情報センター
	荒木和子	国立感染症研究所感染症情報センター
	浜田雅史	国立感染症研究所感染症情報センター
	戸口翔平	国立感染症研究所感染症情報センター
	山本久美	国立感染症研究所感染症情報センター
	岡部信彦	国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨 日本脳炎は近年患者報告数が減少し、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、患者報告数が 100 名を超えていた過去の我が国の状況と現在の状況の比較が必要となっている。そこで、感染症流行予測調査事業で調査された血清疫学調査の結果を元に、過去の感染状況と現在の感染状況の比較を行った。また、感染症流行予測調査から得られた結果を基に、2005 年に通知された積極的勧奨の差し控えによるヒトの抗体保有率の変化や、予防接種率の現状を把握するとともに、約 30 年間の血清抗体保有状況を生年別に比較したところ、全ての年齢層で 1990 年代後半から日本脳炎ウイルスに対する抗体保有率が低下し、少なくとも 1990 年代からヒトへの自然感染の頻度は低い状態であると推察された。近年、患者報告数は少ない状態で維持されているものの、毎年患者が確認されている点、2009 年は 2 名の小児が発症した点、ひとたび脳炎を発症すると効果的な治療法が無いことから、重篤な後遺症を残したり致死的な経過をたどる場合が多い点、ワクチンによって予防可能な点などを考慮し、引き続き継続した積極的な予防接種が推奨される。今後更に詳細な検討を進めていく予定である。

A 研究目的

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 万人の死者が発生している重篤な感染症である。しかしながら日本では、ワクチン接種の推進、媒介蚊に刺される機会の減少、生活環境の変化等により、その数は著しく減少し、近年では、年間数名程度の発生にとどまっている。

日本脳炎ワクチンは、国内では 1954 年から接種が開始されているが、1994 年の予防接種法改正で小児の定期予防接種に位置づけられた。しかし 2005 年に、ワクチンとの因果関係は明確には証明されていないものの、マウス脳由来の日本脳炎ワクチン接種後に重症の ADEM (急性散在性脳脊髄炎) を発症した 14 歳の症例 (当時は、3 期接種として、14~15 歳で追加接種が行われていた) が発生し、疾

病・障害認定審査会において日本脳炎ワクチンの使用と重症のADEMとの因果関係を肯定する論拠がある旨の答申が出されたことから、厚生労働省は、より慎重を期するため、定期的予防接種において、積極的な勧奨をしないこととする通知を発出し、現在に至っている。同時に2005年7月から、3期接種は中止となった。積極的な勧奨が中止されているだけで、決して定期接種が中止となったわけではないが、接種者は激減し、現在のところ、定期接種対象年齢の者の内、1割程度しか接種を受けておらず、小児、特に7歳未満の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況は極めて低い状況となっている。

そこで本分担研究班では、感染症流行予測調査で実施されている国内の血清疫学調査に感染症発生動向調査による日本脳炎患者発生状況をあわせて検討し、我が国の日本脳炎の現状を検討し、ウイルスに対する抗体保有率調査の結果を元に、生年別抗体保有状況を比較し、過去の自然感染状況と近年の感染状況を比較し、自然感染は減少傾向にあるのかそれとも増加しているのか比較解析することを目的として以下の検討を行った。また、日本脳炎ウイルス弱毒化メカニズムの解析のため昨年度から継続して実施している家畜の日本脳炎生ワクチン株の性状解析を引き続き行った。各ウイルス株に含まれるブラックサイズの大きなウイルスと小さなウイルス株を比較してブラックサイズに影響を与える部位の検索を行った。

各都道府県の感染症流行予測調査担当者については、後述する表に記載した。

B 研究方法

- ① 過去約30年間の抗体保有状況を生年別保有率に変更した。これにより、それぞれの年齢層での30年間の抗体保有率の変

動が比較でき、過去の自然感染状況と現在の感染状況を比較することが出来る。

- ② 過去10年間の日本脳炎患者報告を地域別にまとめ、ブタの抗体保有率調査とあわせて検討する。
- ③ 昨年度から本研究班で進めている、家畜用弱毒生ワクチン株の性状解析を継続して行った。それぞれのウイルス株は、ブラックローニングを行い、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。
- ④ 自然界で流行している日本脳炎ウイルスの性状解析の一環から、過去に分離された日本脳炎ウイルスの全塩基配列を決定し、既知のウイルスとの比較を行った。

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から、生年別抗体保有状況を比較したところ、1945年生まれを除き全ての生年群で最近15年の抗体保有率が低下していた。一方、データのある全ての生年群で20歳前後をピークに一峰性の抗体保有率の高い時期が存在していた。日本では、1954年より日本脳炎ワクチンの接種が実施されているため、これらの抗体上昇は日本脳炎ワクチンの接種に起因する抗体保有率の上昇と推察された。これらの比較から、1990年代を境に自然感染率が低下していると推定された(図1)。
- ② 2000年から2009年までの感染症流行予測調査で実施されたブタの抗体保有率を図2にまとめたところ、ほぼ毎年、関東以西の多くの県でブタの抗体保有率が50%を超えていた。

- ③ 感染症発生動向調査により報告された 2000 年以降の日本脳炎ならびに急性脳炎患者数を、表 1 に示した。日本脳炎患者報告数は毎年 10 名以下であり、2009 年に報告された 3 名中 2 名は小児であり、年齢は 1 歳と 8 歳であった。また成人例の 1 名も 40 代であり、高齢者の疾患とは言えない。一方、急性脳炎は毎年数百名の規模で報告されており、原因不明が多い。2000 年以降に報告された日本脳炎患者を地域別に示した(図 3)。患者報告は西日本から多く、北海道と東北地方からの報告はなかった。
- ④ 感染症流行予測調査によると、2005 年に通知された日本脳炎ワクチンの積極的勧奨の差し控えにより、接種率は激減しており(図 4、図 5)、それに伴って小児の中和抗体保有率が激減している(図 6)。
- ⑤ 家畜用日本脳炎弱毒生ワクチン株 3 種と親株 2 種からそれぞれ、複数のブラッククローンを得て、それぞれの全塩基配列を決定した。これまでのところ、ワクチン株の m 株、at 株、ML17 株から複数のクローンを得て、全塩基配列を決定した。また、現存する親株の AT31 株と JaOH566 株からもそれぞれブラッククローンを得た。このうち、一部クローンについて全塩基配列を決定したが、ダイレクトシーケンスで決定した配列と全く同じ配列の株は得られなかった。
- ⑥ 過去に分離された日本脳炎ウイルスの性状解析では、今回入手できた北海道で分離された株、Kamiiso, Imagane, Abashiri 株について塩基配列を決定した。
- ⑦ 北海道で分離された日本脳炎ウイルスの塩基配列を決定した結果、いずれも遺伝子型 3 であった。

D 考察

- ① 最近の感染症流行予測調査における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有率を年次別に検討すると、2005 年の積極的勧奨の差し控えの影響で、小児の抗体保有率が激減しており、2009 年に報告された 1 歳および 8 歳の小児例を考えると、勧奨の再開が待たれるところである。
- ② 日本脳炎の患者報告数は毎年 10 名までにとどまっているが、急性脳炎の患者は毎年 100~500 名程度報告されており、原因不明も多いことから、夏季、秋季に発症した急性脳炎は、必ず日本脳炎も鑑別に入れた検査診断体制の構築が望まれる。
- ③ 近年のヒトにおける中和抗体保有率をみると、45-54 歳グループで著しく低い。この理由として考えられるのは、日本脳炎ワクチンは 1954 年に勧奨接種として始まったものであるため、日本脳炎ワクチンを過去に受けたことがあるのは 2010 年現在、まさにこの年代から若年層である。接種開始当時の予防接種率は不明であるが、生年別の抗体保有率の推移を比較することで環境中の日本脳炎ウイルスの活動状況を比較できる。今回の我々の比較により、最近 15 年間は、日本脳炎ウイルスの活動状況が 30 年前よりも低い状態で推移していることが明らかになった。すなわち、ワクチンによって獲得された抗体が減衰することに加えて、その後自然感染を受ける機会が少なかったことから、ブースター効果を受ける機会が

少なかったことが推測される。

- ④ 日本脳炎ウイルスの性状とゲノム配列の比較はこれまでも報告がある。しかしながら、その多くはダイレクトシークエンスもしくはブラックローニングによって得られた特定の株の配列を決定して行われたものである。今回我々は、複数の株をブラックローニングし、得られた複数のクローン全てについて全塩基配列の決定を進めた。現在も塩基配列の特定を進めているため、全てのクローンについて塩基配列が特定されているわけではないが、同定したほとんどについて、特徴的な変異部位は明らかに出来なかった。ブラックサイズ、大型、中型、小型に分類してもウイルスの変異部位はランダムに導入されていた。これらの結果は、日本脳炎ウイルスが複製過程で常に、特定の頻度で突然変異を生み出していることを意味しており、ワクチン株など厳格な管理が必要な株では、十分な注意を払う必要があることを示唆していた。
- ⑤ 日本脳炎ウイルスは、培養細胞で増殖させる過程で、ある程度の割合で変異を生じ、複数の配列のウイルスが混在した状態である可能性が示唆された。

E 結論

- ① 過去 30 年間のヒト抗体保有状況調査の結果から、1970 年代に比べ最近 15 年間の自然感染率が低下していると予想された。
- ② 自然感染率は低下しているとは言え、2005 年の積極的勧奨の差し控えに

よって生じた抗体保有率の低い年代層は年々拡大しており、2009 年に 2 名の小児例が報告されたことから特に患者報告の多かった西日本を中心として勧奨の再開が待たれるところである。

- ③ 家畜用弱毒生ワクチン 3 株およびその親株 2 種からブラックサイズの異なる株を分離し、全塩基配列を決定した結果、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。
- ④ 本分担研究班で解析したウイルスに関して言えば、北海道で分離された日本脳炎ウイルスは、いずれも遺伝子型 3 であった。

F 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

G 知的所有権の出願・登録状況

なし

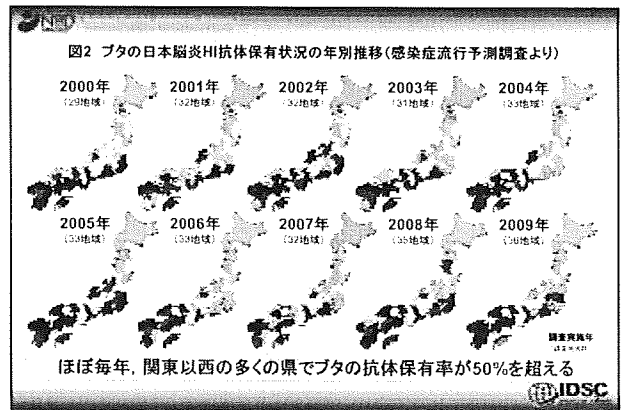
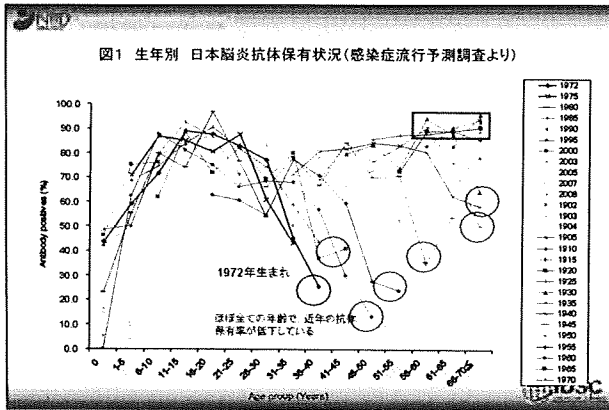
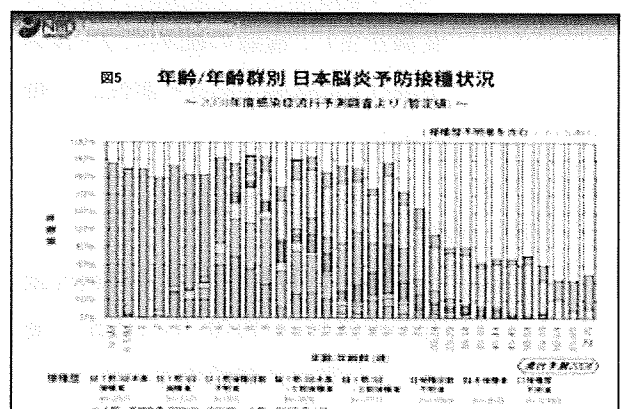
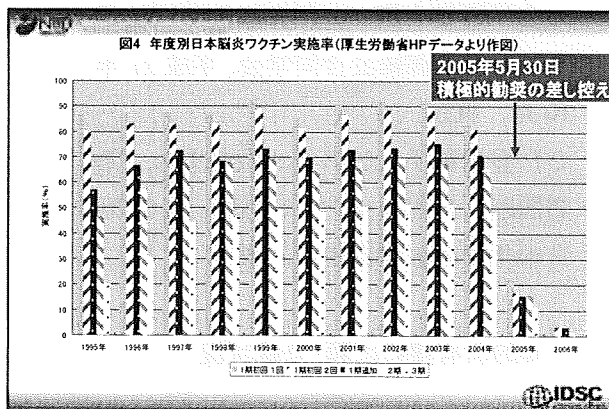
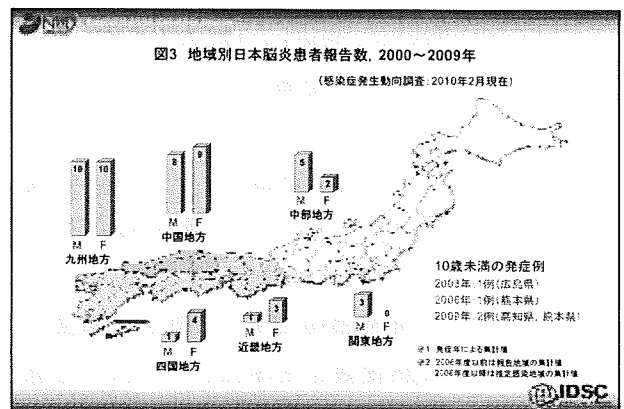


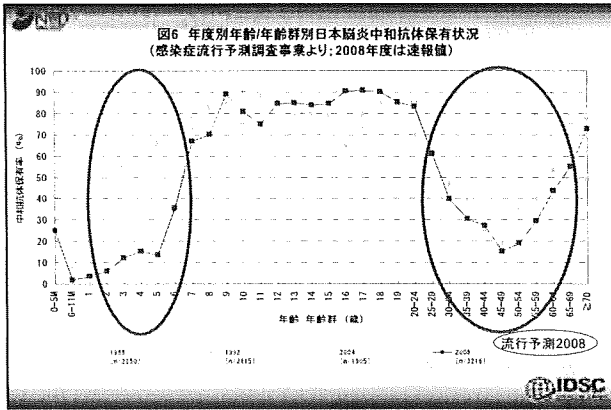
表1 年別日本脳炎ならびに急性脳炎患者報告数 (感染症発生動向調査より)

■ 発生累積報告数 (全数把握対象疾患) 全国の全ての医師に報告が求められている疾患。

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
日本脳炎	7	5	8	1	5	7	7	10	3	3
急性脳炎*	12 (11/5-)	166	188	167	228	182	493

2000～2007年は、2009年8月4日現在報告数。
 2007年に報告があった10名中8名は、2008年の発症で、2007年に報告。
 2008年は、2009年1月6日現在報告数、2009年は、2010年1月7日現在報告数。
 急性脳炎は2003年11月5日から全数把握対象疾患、2003年11月4日以前は、定点把握対象疾患。





感染症流行予測調査事業担当者(感受性調査:ヒト)

敬称略

佐藤 由紀	宮城県保健環境センター	微生物部
田部井由紀子	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科
小原 真弓	富山県衛生研究所	ウイルス部
小林 慎一	愛知県衛生研究所	生物学部
赤地 重宏	三重県保健環境研究所	微生物研究課
石崎 徹	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
青山 幾子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課
松本 知美	山口県環境保健センター	保健科学部ウイルスグループ
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所	微生物試験室
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部
仁平 稔	沖縄県衛生環境研究所	衛生科学班

感染症流行予測調査事業担当者(感染源調査:ブタ)

敬称略

井上 真紀	北海道立衛生研究所	微生物部ウイルス科
藤井 理華	青森県保健環境センター	微生物部
佐藤 由紀	宮城県保健環境センター	微生物部
斎藤 博之	秋田県保健環境センター	保健衛生部微生物班
門島 直太	福島県衛生研究所	微生物部
永田 紀子	茨城県衛生研究所	微生物部
荒川 典果	栃木県保健環境センター	微生物部
長井 綾子	群馬県衛生環境研究所	感染制御センター
鈴木 典子	埼玉県衛生研究所	ウイルス担当
高木 素	千葉県衛生研究所	ウイルス研究室
田部井由紀子	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科
原田 義樹	神奈川県衛生研究所	微生物部
尾 典也子	新潟県保健環境科学研究所	ウイルス科
小原 真弓	富山県衛生研究所	ウイルス部
児玉 洋江	石川県保健環境センター	健康・食品安全科学部
渡川 洋典	山梨県衛生公署研究所	微生物部
渡 千壽	静岡県環境衛生科学研究所	微生物部
小林 慎一	愛知県衛生研究所	生物学部

感染症流行予測調査事業担当者(感染源調査:ブタ)

敬称略

前田 千恵	三重県保健環境研究所	微生物研究課
雨 祐一	滋賀県衛生科学センター	微生物担当
押部 智史	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター	感染症部
白井 達一	鳥取県衛生環境研究所	保健衛生室
田原 研司	島根県保健環境科学研究所	ウイルスグループ
島津 幸佳	広島県総合技術研究所	保健環境センター
嶋田 啓司	徳島県保健環境センター	保健科学担当
黒田 博也	香川県保健環境研究所	微生物担当
青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所	微生物試験室
谷藤 紗	高知県衛生研究所	保健科学課
石橋 智也	福岡県保健環境研究所	ウイルス課
増本 久人	佐賀県衛生事業センター	ウイルス担当
吉川 亮	長崎県保健環境研究所	保健科
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部
加藤 聖紀	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
北野 智一	宮崎県衛生環境研究所	微生物部
渡田 まどか	鹿児島県保健環境センター	微生物部
仁平 稔	沖縄県衛生環境研究所	衛生科学班

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

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

分担研究者 倉根一郎（ウイルス第一部・部長）

協力研究者 田島茂（ウイルス第一部・主任研究官）

加藤文博（ウイルス第一部・研究生）

高崎智彦（ウイルス第一部第二室・室長）

研究要旨 近年国内で検出される日本脳炎ウイルス（JEV）（遺伝子型 1 型）の 3'非翻訳領域可変領域にみられる欠失の意義を探るため、この可変領域内に変異を有する 5 種類の組換え日本脳炎ウイルスを親株（Mie/41/2002 株）より作製し、それらの増殖性および病原性を比較した。Vero、PK-15 および C6/36 細胞での増殖性は親株および各変異体間で差異は認められなかったが、マウス（N18）およびヒト（IMR-32）神経芽細胞腫由来細胞を用いた場合において、27 塩基を欠失させた組換え体（d27）で増殖能の低下がみられた。次に親株と 3 種類の組換え体のマウス病原性を比較した。生存曲線では差異は認められなかったものの、体重増加曲線では、親株および付加変異体 13a に比べ欠失変異体 d5d9 および d27 では体重増加が良好であったことから、d5d9 および d27 変異体の病原性が低下していることが示唆された。2 種類のウイルスを共感染させる競合接種試験を C6/36 で行なった結果、親株は d27 株よりも優位であることが明らかとなった。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）には 5 つの遺伝子型があるが、本国で分離されるウイルスは 90 年代初頭を境に 3 型から 1 型へと変化した（genotype shift）。同様の変化は日本だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近年では中国の一部やタイでも genotype shift がみられるとの報告がある。3 型と 1 型では 3'非翻訳領域の可変領域に特徴的な差異がある。1 型は 3 型に比べ明らかにこの領域が短い。さらに本領域に関する最近の遺伝子解析に

より、1) 同じ 3 型でも 80 年代中期以降は 9 塩基の欠失のあるものが多く分離されたこと（図 1）、2) 最近検出された 1 型の一部において、5、6、7、あるいは 9 塩基の欠失が存在することが明らかとなっている（図 1）。このように国内で検出される日本脳炎ウイルスは、遺伝子型を問わず 3'非翻訳領域内可変領域に次第に欠失が増加する傾向にある。本研究では、この現象がウイルスの増殖性や病原性にどのような変化をもたらすかを探ることを目的とする。

B. 研究方法

本研究で用いる JEV の変異体は、以前に我々が構築した感染性分子クローン (rJEV(Mie/41/2002)pMW119) を用いて作製した。変異体は計 5 種類 (d5、d9、d5d9、d27、13a) 作製した (図 2)。d5 および d9 は実際に確認された欠失を導入したもので、d5d9 および d27 はそれぞれ両方の欠失を同時に有するものおよび両領域をカバーする領域すべてを欠失させたもので、実際には検出されていない欠失である。13a は 1980 年台以前に分離された遺伝子型 3 型の日本脳炎ウイルスで相当する配列 13 塩基を挿入したものである。これらの組換え JEV 感染性粒子は Vero (9013) 細胞を用いて調製した。

各株化細胞でのウイルス増殖能は、感染後経時的に培養上清を回収し、Vero 細胞を用いてその感染力価をプラーク形成法により測定した。本解析には、Vero (9013) 細胞、ブタ腎由来 PK15 細胞、ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞、ウズラ由来 QT-6 細胞、マウス神経芽細胞腫由来 N18 細胞およびヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を使用した。

マウス病原性は以下の通り調べた。生後 3 週齢のマウス (ddY 系統) にウイルス液 (1×10^4 / head あるいは 1×10^5 / head) を腹腔接種し、2～3 週間毎日マウスの状態を観察した。瀕死状態の個体は安楽死させ、当日に死亡したものとしてカウントした。2 回目の実験では各個体について毎日体重を測定した。

ウイルス競合接種試験は以下の通り行なった。親株および変異体ウイルスを等力価となるように希釈後、等量を C6/36 細胞に

同時に接種した。接種後の培養細胞上清を定期的に新たな細胞に接種することにより継代を繰り返した。継代は 10 回まで行なった。また継代時の残りの上清は -80°C で保存した。継代 0 回目 (接種後の上清)、6 回目および 10 回目の上清について、ウイルス力価を測定後、限界希釈法によりウイルスをクローニングした。各上清につき 10 個以上のクローン化ウイルスについて、ウイルス RNA を回収し、定法に従い塩基配列を決定し、ウイルスの種類を特定した。

C. 結果

1) 各種株化培養細胞における日本脳炎ウイルス変異体の増殖特性

3' 非翻訳領域内可変領域に変異を有する組換え日本脳炎ウイルス変異体を各種株化細胞に接種し、その増殖速度およびプラーク形態を比較した。Vero 細胞および PK15 細胞での増殖速度およびプラーク形態に差異は認められなかった (図 3)。C6/36 細胞においては培養温度を 28°C と 35°C で行なったが、いずれにおいても差異は認められなかった (図 4)。QT-6 細胞では培養温度 35°C では差異は認められなかったが、 40°C では変異体の増殖速度の低下が認められたものの、データがばらついた (図 5)。N18 においては、 $\text{MOI}=0.01$ および 0.1 の両方において d27 の増殖能の低下が観察された (図 6)。IMR-32 についても d27 の増殖能の低下が見られたが、N18 の場合ほどははっきりとした差異ではなかった (図 7)。

2) 日本脳炎ウイルス変異体のマウス病原性の比較

始めに親株、d27、13a のマウスに対する病原性を比較した (図 8 上段、実験 1)。16

日までに親株および 13a 接種マウス 10 匹中 3 匹が死亡した。一方 d27 では接種した 10 匹すべてが生き残った。次に上記 3 種類に d5d9 を加え、10 倍ウイルス力価を高くして接種し観察すると共に、毎日体重を測定した (図 8 下段、実験 2)。15 日までに d5d9 および 13a で接種した 10 匹中 2 匹が死亡した。一方親株および d27 では接種した 10 匹すべてが生き残った。しかし各マウスの体重の推移を見ると、死亡した個体を除くと親株と 13a では d27 および d5d9 に比べ増加が鈍い傾向が観察された (図 9)。この傾向は各群で体重の平均を算出した場合にもはっきりと見られた (図 10)。

3) C6/36 細胞での競合接種試験

C6/36 細胞に、あ) 親株と d5d9、い) 親株と d27、う) 親株と 13a の 3 種類の組み合わせで等力価のウイルスを接種し、6 回および 10 回継代後の上清中の各ウイルス種の割合を調べた (図 11)。10 継代後のあ) では、d5d9 が 64%と親株 (36%) よりも多かった。一方い) では、親株が 100%となり、d27 は検出されなかった。う) では親株 55%、13a が 45%とほぼ同等であった。

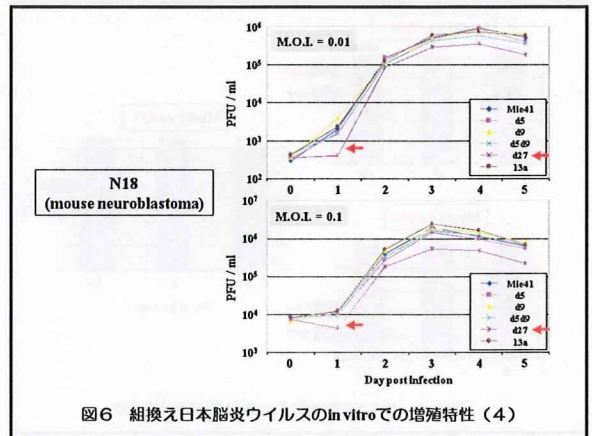
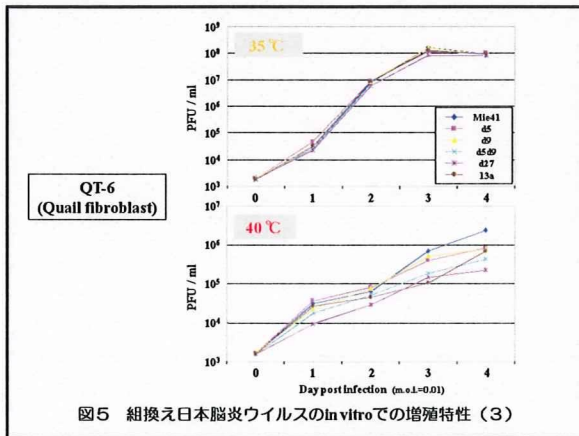
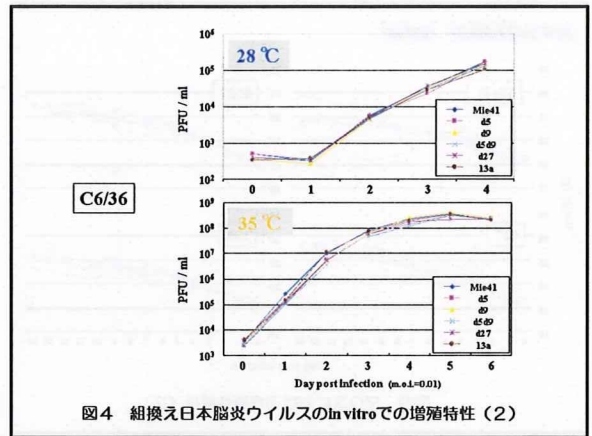
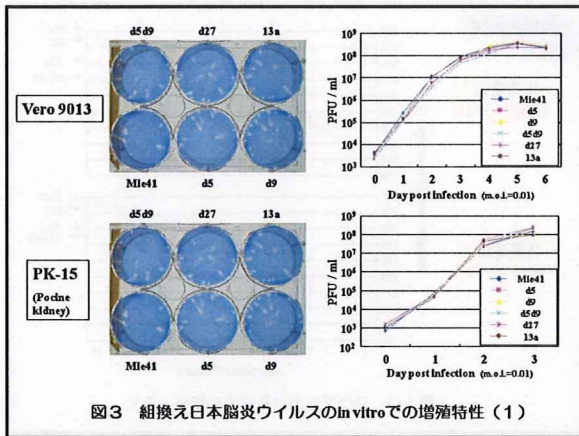
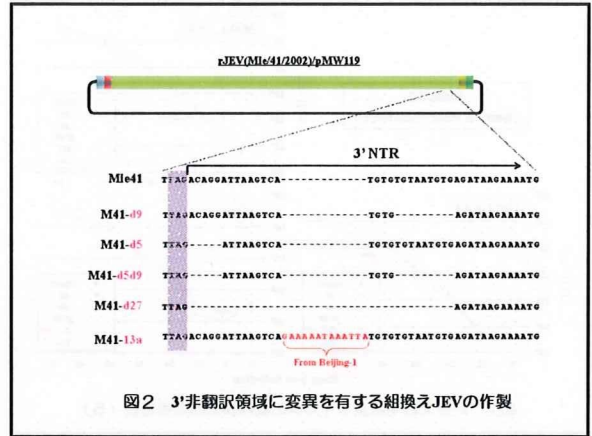
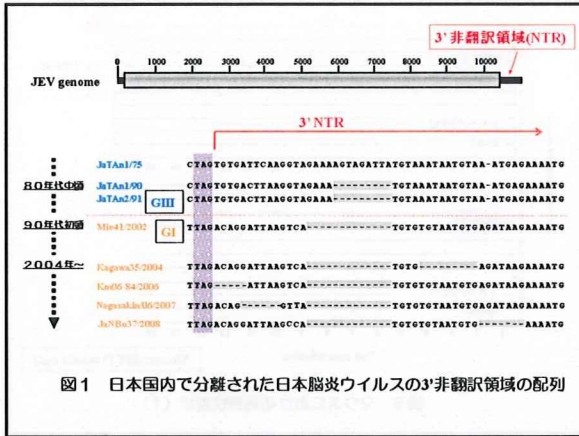
D. 考 察

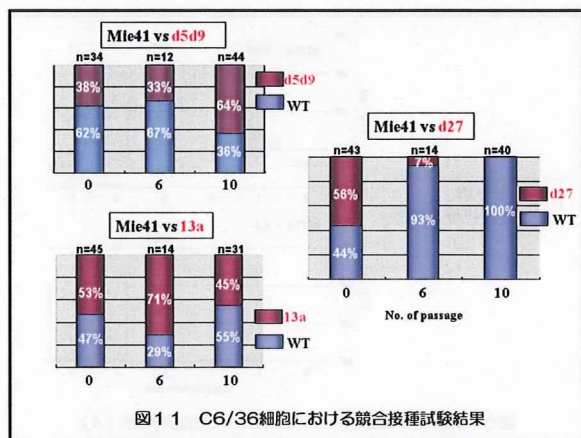
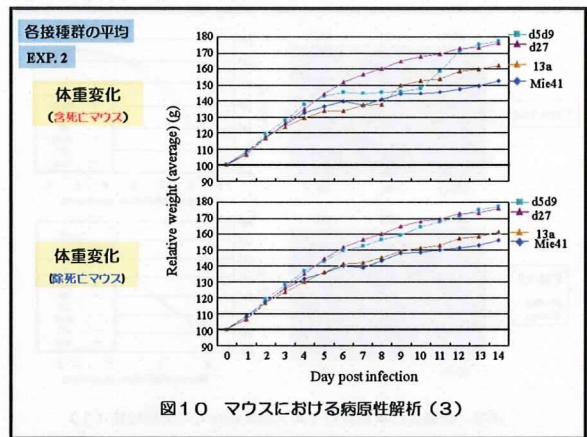
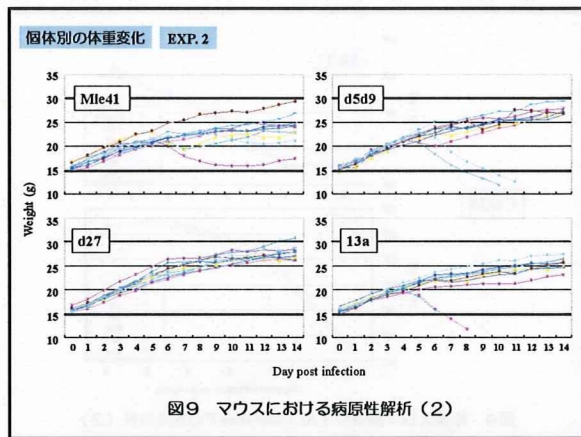
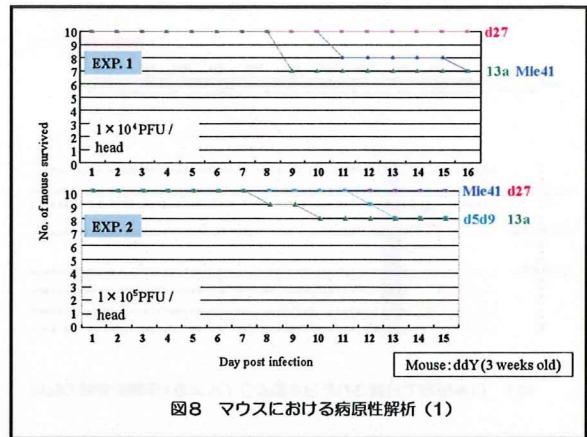
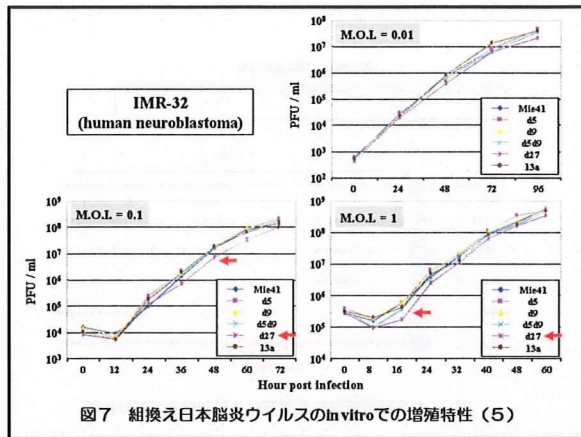
変異体ウイルスの増殖能は、使用した株化細胞ごとに違いが見られた。Vero 細胞、PK15 細胞、C6/36 細胞では差異は観察されなかった。一方神経芽細胞腫由来細胞では、その差異こそ親株よりも数倍低い程度であったが、最も大きな欠失を有する d27 のみ増殖能の低下が見られた。このことはこの領域を欠失させることにより脳内でのウイルス増殖が低下する可能性を示唆する。

実際後で述べるとおり、マウスでの接種実験では、d27 で病原性の低下が観察された。なぜ神経系細胞特異性が現れるのかは全く不明である。QT-6 細胞を用いた実験では、高温 (40℃) で差異が現れてきた。しかしばらつきが大きく、さらに実験を繰り返すことが必要である。ただし、高温で差異がでたことは、温度変化による 3'非翻訳領域の高次構造の変化がウイルス増殖能に関係しているのかもしれない。

本研究ではマウスでの病原性解析を 2 度行なったが、親株および変異体を接種したマウスの多くが生き残った。このことから、今回接種した変異体は親株同様病原性が低く、変異により顕著な強毒化は無いことが明らかとなった。一方、2 回目の実験で行なった体重の推移では、親株に比べ、d5d9 と d27 では体重の増加が良好であったことから、これらの変異体は親株に比べ若干病原性が低下したものと推測される。さきにも述べたが、d27 での結果は神経系細胞での本変異体の増殖特性と関係があるのかもしれない。また 13a 変異体については親株と同様の体重推移を示したことから、付加による影響はなかったものと示唆された。

親株と d27 との競合試験では、継代 10 回目で d27 の増幅が検出できないレベルにまで低下した。このことから、C6/36 細胞において各々の増殖能にはほとんど差が無いものの、d27 よりも親株の方が優勢に増殖できることが明らかとなった。d5d9 についてはやや親株に勝るデータではあるが、更なるデータの蓄積が必要と思われる。一方、13a は親株に対し優勢とも劣勢ともいえないことがわかった。





E. 結 論

日本脳炎ウイルス 3'非翻訳領域内可変領域に変異を有する組換えウイルスを作製し、その増殖性および病原性を解析してきた。その結果、d27 変異では神経系細胞での増殖能低下およびマウス病原性の低下、さらに C6/36 細胞での共存下で親株よりも劣勢となることが明らかとなった。また d5d9 もマウスでの病原性が低下することが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

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)
- 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

な し

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）
平成 21 年度 分担研究報告書
「わが国における日本脳炎の現状と今後の戦略に関する研究」

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

研究分担者 寺田喜平（川崎医科大学小児科）

研究協力者 川畑順子（川崎医科大学小児科）

梶俊策（津山中央病院小児科）

高崎智彦（国立感染症研究所）

要旨

日本脳炎汚染地区である岡山県の県南（都市部）と県北（農村部）における血清抗体（HI 法）の疫学調査から不顕性感染がどの程度あるのかを検討した。2008 年 5～10 月において農村部 57 名、都市部 150 名、2009 年農村部 61 名、都市部 203 名の残血清から収集、HI 法で測定した。3 歳未満での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り、農村部と都市部の間に有意差はなかった。また 3 歳以降のワクチン既接種者における抗体陽性率は、HI 法で農村部 45%、都市部 21%と 2 倍以上の差があった。

A. 研究目的

岡山県は 2005 年成人 2 例の日本脳炎例を認め、汚染地域と思われる。我々は 2006 年岡山県で都市部と農村部における日本脳炎のリスク調査として、脳炎 3 例と無菌性髄膜炎 17 例の髄液を収集し、髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を RT-PCR 法で調べた。都市部である県南部では 0/7 例と陽性例はなかったが、農村部である県北部では無菌性髄膜炎の 3/12 例で陽性を認めた。わが国における日本脳炎ワクチンは 2005 年から 2010 年まで積極的な勧奨の差し控えによって実質上中止の状態である。2009 年 2 名の小児日本脳炎患者が熊本県と高知県で発生しており、今後日本脳炎症例が増加してく

る可能性がある。今回、都市部と農村部の地域における血清抗体の疫学調査から不顕性感染率および既接種者の抗体陽性率を調べたので報告する。

B. 研究方法

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。HI 法はエスアールエルで測定した。また患者の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。ワクチン接種ありの定義は 1 回でも接種し

たことのあるものとした。

C. 研究結果

表1に示すように、2008年は川崎150名、津山57名、2009年は川崎203名、津山61名から残血清を収集できた。大量ガンマグロブリン療法を受けていた患者は対象から除外した。

表2および表3に示すように、日本脳炎ワクチンを接種していない生後36ヶ月以前では、2008年と2009年のどちらもHI抗体は川崎、津山のすべてで陰性であった。一方、生後37ヶ月以降でワクチン未接種者の陽性率は、2008年津山1/18名(5.6%)、川崎4/38名(1名は市外のため、3名(7.9%))、2009年津山1/16名(6.3%)川崎1/24名(4.2%)であった。陽性者のHI抗体価は津山が2008年20倍、2009年80倍、川崎は2008年10倍1名と20倍2名、2009年10倍であった。生後37ヶ月以降の既接種者では、2008年川崎3/13名(23%)、津山6/15名(40%)、2009年津山7/14(50%)、川崎7/24名(29%)であった。合計すると津山が45%、川崎が21%であった。何れも2-MEによる有意な減少はなかった。

D. 考察

日本脳炎ワクチンの主な接種対象者は3歳以降であるので、生後13~36ヶ月と37ヶ月以降のワクチン未接種者における抗体陽性者は、不顕性感染と推定される。今回のHI法では、37ヶ月未満はすべて陰性で、37ヶ月以降未接種者の陽性率は、2008年都市部3/38名(7.9%)、農村部2/41名(4.9%)、2009年都市部1/24名(4.2%)、農村部1/16

名(6.3%)であり、有意な差はなかった。農村部ではHI抗体価が80倍と高い症例もあったが、2-MEによるIgM抗体の判定は陰性であった。これらより、HI法では3歳未満では抗体陽性者がおらず、3歳以降では4~8%の不顕性感染者があり、農村部と都市部に有意差はなかった。

36ヶ月以上で既接種者の抗体陽性率は、都市部21%に比べ、農村部45%と高く、その傾向は2008年と2009年も同様であった。既接種者の定義は、1回以上の接種で、接種回数や接種間隔、採血までの期間など考慮していない。また都市部と農村部でマッチした症例ではないので比較は難しいが、農村部でブースターが多くかかっている可能性が考えられた。

E. 結論

全体の抗体陽性率は、農村部の方が高いが、都市部でもHI法で不顕性感染が認められた。岡山県では農村部だけでなく、都市部でも日本脳炎の発生が予想される。早急に積極的な勧奨の差し控えがなくなり、日本脳炎ワクチンが実施される必要があると考えられた。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

感染症学会学術集会（福井市）2009年11/14
～15

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1.

農村部	津山中央病院
	2008年 57名
	2009年 61名 計 118名
都市部	川崎医大附属病院
	2008年 150名
	2009年 203名 計 353名

表2.

津山中央病院

ワクチン	13～35M		36M～	
	なし	なし	あり	不明
2008年	0/12	1/18 (5.6%)	6/15 (40%)	0/4
2009年	0/19	1/16 (6.3%)	7/14 (50%)	1/2
		2/34 (5.9%)	13/29 (45%)	

表3.

川崎医大附属病院

ワクチン	13～35M		36M～	
	なし	なし	あり	不明
2008年	0/41	3/38 (7.9%)	3/13 (23%)	5/34
2009年	0/64	1/24 (4.2%)	7/24 (29%)	7/54
		4/62 (6.5%)	10/47 (21%)	