

201028003A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23 (2011) 年 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦  
(国立感染症研究所)

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

平成23 (2011) 年 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦

(国立感染症研究所)

## 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  
研究代表者 高崎 智彦

### 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：  
プロトコルの作成と地方衛生研究所への技術移転・・・・・・・・・・ 13  
研究分担者：小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）
2. 日本脳炎 IgM 抗体捕捉 ELISA 検査法の標準化・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・ 27  
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. 東京都における日本脳炎ウイルスの活動状況・・・・・・・・・・ 36  
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. わが国の日本脳炎ならびに日本脳炎ワクチンの現状と  
急性脳炎、日本脳炎における日本脳炎ウイルスに関する研究・・・・・・・・・・ 44  
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と  
レポーターレプリコンの構築・・・・・・・・・・ 47  
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. 岡山県の都市部および農村部における日本脳炎のリスク調査・・・・・・・・・・ 56  
研究分担者：寺田喜平（川崎医科大学小児科）
8. 発熱、片麻痺で発症した日本脳炎の 1 女児例・・・・・・・・・・ 60  
研究分担者：寺田喜平（川崎医科大学小児科）
9. 日本脳炎と細胞培養（新）ワクチンに関する意識調査・・・・・・・・・・ 64  
研究分担者 脇口 宏（高知大学小児思春期医学 教授）
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・・・・・・・・・・ 72  
研究分担者：前田 健（山口大学農学部獣医微生物学教室）
11. 沖縄県における日本脳炎ウイルス調査・・・・・・・・・・ 80  
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・・・・・・・・・・ 87  
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・・・・・・・・・・ 90  
研究分担者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）
14. 日本脳炎ウイルス感染のリスク評価指標設定および実施に関する研究

－沖縄本島北部における日本脳炎ウイルス感染リスク評価－

研究分担者：砂川富正（国立感染症研究所 感染症情報センター）・・・・・・・・・・97

III 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・101

# 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、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本年度も推定した。この方法により、本年度も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。また、HI法は感度が低く、EIA-IgG法は感度が高く、両群間に有意差を認めた。NS1抗体検査法を大阪府公衆衛生研究所に技術移転し、今後の普及に際しての障害・問題点を検討した。

日本脳炎患者に関しては、山口県で小児例が1例、長崎県、三重県、高知県で成人例が各1例、計4例の報告があった。山口県の小児例は都市部に住むワクチン未接種の6歳の女児が、片麻痺と発熱を契機として、日本脳炎と確定診断された。また長崎県の症例は、本研究班で標準化し配布した日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA キットにより診断が確定した。また、この日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA キットにより熊本県の原因不明の無菌性髄膜炎・脳炎患者保存髄液225検体を対象に、日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA 法を用いて IgM 抗体の検査を行ったところ、3名が陽性と判定された。一方、東京都の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531件を調査対象として、IgM 補足 ELISA 法による JEV に対する IgM 抗体検査を行った。その結果、髄液531件は全て JEV に対する IgM 抗体検査陰性であり、2004年から2009年の東京都では、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。また、ヒト血清269検体を用いて、中和抗体測定法として採用されている50%ブランク減少法（ブランク法）と50%フォーカス減少法（フォーカス法）を比較した。その結果、フォーカス法の抗体価の方がブランク法より低い傾向が見られたが強い正の相関を示した。

日本脳炎および細胞培養日本脳炎ワクチンに対する保護者の意識調査を実施したところ、日本脳炎の病像やベクターに対する理解は比較的正確であったが、新しいワクチンの存在については73%が知らず、公費で受けられることも広く知られていなかった。今後、積極的な広報活動がなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

日本脳炎ウイルスの病原性、病態解析のために基礎ウイルス学的解析や抗ウイルス剤スクリーニングに有用とされる非感染性自立的複製ゲノム（レプリコン）を日本脳炎ウイルスおよびデング1型ウイルスについて作製し、活用可能であることを確認した。

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、その結果2010年は2株のウイルスが分離された。

増幅動物に関しては、昨年までに犬が優れた歩哨動物となることを本研究班では示してきた。本年度は日本脳炎ウイルスを犬に感染させ、病原性・抗体上昇・ウイルス血症の有無を調べた。その結果、犬において日本脳炎ウイルス感染が成立するが発病せず、ウイルス血症も起こさないことが示された。

沖縄の日本脳炎ウイルス活動状況は近年活発でない状況である。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。そこで2009年5月～2010年11月に採血された、沖縄本島中南部8市町村の JEV ワクチン未使用農

家の繁殖豚血清中の JEV 抗体保有状況から、沖縄本島において、地域により JEV 活動状況が異なるようになったことが考えられた。

本研究班の成果の一つとして、いまだ数千人単位の日脳患者が発生している中国から頻繁に日本脳炎ウイルスが日本本土に飛来していることが明らかになってきた。そこで長崎県では、日本脳炎ウイルスが飛来する場合もっとも早く到達すると考えられる 1 つの場所として長崎県五島列島における日本脳炎ウイルスの採取と解析を重点的に継続実施するとともに五島列島を含む長崎県全域のブタおよび野生イノシシの血清疫学調査を実施し野生イノシシにおける抗体陽性率を調査した。また、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（国立感染症研究所副所長）

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。②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。本法を地方衛生研究所に技術移転する目的で、実際に熊本県と大阪府の技術員 2 名に技術移転を行い、このプロトコルの有用性を評価した。熟練者がデモンストレーションを行った後に、これらの技術員が単独で実施し、その成績（ELISA 抗

体値)を熟練者の得た成績と比較するという方法を用いた。

#### 熊本県における調査対象

ブタ180頭分の血清からRNAを抽出し、リアルタイム RT-PCR 法で JEV 遺伝子を検出した。また、JEV 遺伝子陽性血清を、24 ウェルプレートに単層培養した Vero 9013 細胞に接種し、JEV の分離を試みた。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 塩基のダイレクトシーケンスによる解析を行った。

無菌性髄膜炎や脳炎等で検査依頼があり、原因不明のまま凍結保存されていた 1994 年以降の髄液 225 検体について、リアルタイム PCR 法による JEV 遺伝子検査とともに、Focus 社製 Anti-human IgM plate を反応プレート、Beijing 1 株を抗原とした IgM Capture ELISA 法 (感染研变法) による JEV-IgM 抗体検査を行った

2010 年に採取したヒト血清 269 検体の JEV 中和抗体を、プラーク減少法 (プラーク法) とフォーカス減少法 (フォーカス法) を併用して測定し、両法の比較検討を行った。

#### 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) に関して JEV に対する IgM 抗体検査は、高崎らの IgM 補足 ELISA 法によって行い、P/N 比 2.0 以上を陽性とした。

(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 法および NS1 抗体) 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。

### 媒介蚊：コガタアカイエカの遺伝子的分類

日本および東南アジアのコガタアカイエカおよび近縁イエカおよび同一地域に生息していたヤブカ類を用いた。各蚊からゲノム DNA を抽出後、ミトコンドリア遺伝子の COI 領域を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

3. 日本脳炎ウイルスの病原性について  
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) 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。

(2) 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。これらの変異体の増殖性およびマウス病原性を比較した。

#### 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、 $\gamma$ -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 法の技術移転

2 地方衛生研究所技術員 2 名に作成したプロトコルどおりに、21 検体を用いた試験を実施してもらった結果、これら 2 名の技術員の得た成績は熟練者の得た成績とほぼ同じであり、ELISA 抗体値の相関係数は 0.980~1.000 であった。この結果は、プロトコルが有用であったことを示す。

#### 熊本県における日本脳炎調査

2010 年に実施したブタ血清 180 検体からの JEV の遺伝子検出と分離結果を表 2 に示した。JEV 遺伝子は 7 月に 1 検体、8 月に 26 検体、9 月に 2 検体の合計 29 検体から検出された。このうち、8 月 9 日の 6 検体中 3 検体と 8 月 23 日の 9 検体中 2 検体から JEV が分離された。なお、8 月 9 日の 3 検体中 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 I 型であった。

原因不明の保存髄液 225 検体は、リアルタイム RT-PCR 法による JEV 遺伝子検査ではすべて陰性であったが、IgM Capture ELISA 法では 3 検体が陽性と判定された。

#### 東京都における日本脳炎調

調査対象は、感染症流行予測調査事業における日本脳炎感染源調査を行う目的により採取した都内で飼育されたブタの血清とした。調査対象のブタ血清数は、1 年間あたり 1,000 件 (1 回あたり 50 件×20 回) とし、調査年である 2006 年度~2009 年度の 4 年間に採取された 4,000 件とした。JEV の分離試験は、HI 抗体が検出され、かつ感染初期を示す 2ME 感受性抗体が確認された時期 (流行時期) 及びその前後の週、または 2ME 感受性抗体が確認されなかった調査年度においては夏季から秋季に採取されたブタ血清のうちで、HI 抗体価が 10 倍または 10 倍未満であったものを対象とした。

脳炎・脳症および髄膜炎等患者の髄液 681 件について JEV に対する IgM 抗体検査は、高崎らの IgM 補足 ELISA 法によって行い、P/N 比 2.0 以上を陽性としたが、いずれも陰性であった。なお、これらの検体は昨年度 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

2010 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 年度の都市部 (川崎) で NS1 抗体陽性例はなかった。全体の抗体陽性率は、農村部のほうが高いが、都市部でも HI 法および IgG-EIA 抗体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。

#### 2010 年の小児日本脳炎例の詳細

症例は 6 歳、女兒。主訴は発熱と右上下肢の麻痺であった。現病歴は 9 月 4 日から発熱。翌日も 39 度台の発熱あり。軽度の頭痛に加え、ズボンを上げられない、フォークがうまく持てないなどの訴えがあったが、ふざけているかと思いき経過観察していた。9 月 6 日明け方にトイレに行った際に、「ティ

ッシュが巻けない」と訴え、家族は右上肢がうまく使えていないことに気づき、救急外来を受診した。幼稚園通園中。自宅は山口市内中心部。日本脳炎ワクチンの接種歴はなかった。

### 東南アジアと日本の日本脳炎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。また、長崎県中央地区産ブタ 2 頭、五島産 1 頭の計 3 頭から 3 株の日本脳炎ウイルス (長崎: JaNP-95-10, JaNP-96-10, 五島: JaNP-84G-10) を分離した。

### 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。

### 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。

### コガタアカイエカの遺伝子的分類

日本脳炎ウイルスを媒介する蚊については、ミトコンドリア遺伝子の COI 遺伝子を決定することに成功した。コガタアカイエカの COI 領域の全長配列は、GenBank にも登録されておらず今回初めて明らかにすることができた。日本に生息するコガタア

カイエカと南アジア地域に広く分布するコガタアカイエカには、COI 配列に違いが存在し、COI 遺伝子を用いることで海外のコガタアカイエカと日本国内のコガタアカイエカを正確に分類することが可能となった。

### 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

日本脳炎ウイルス (JEV) (遺伝子型 1 型) 3'非翻訳領域可変領域にみられる欠損の意義を探るため、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作製し、増殖性およびマウス病原性を比較した。これまで病原性解析に用いてきたマウス ddY 系統よりもフラビウイルスに対し感受性を示す C3H/He 系統を使用して病原性解析を行なった。生存曲線および体重変化で判定した結果、野生株と変異株間で有意な差異は認められなかった。

### 日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築

基礎ウイルス学的解析や抗ウイルス剤スクリーニングに有用とされる非感染性自立的複製ゲノム (レプリコン) を日本脳炎ウイルスおよびデング 1 型ウイルスについて作製した。その際、レプリコンの複製を簡便かつ高感度に検出するためのレポーター遺伝子 (ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子) をウイルス構造遺伝子領域に置換挿入した。デング 1 型ウイルスレプリコンの複製が確認できなかったものの、日本脳炎ウイルスレプリコンでは確認された。またこのレプリコンの複製はリバビリンにより阻害された。一層の改良の余地はあるものの、今回作製した日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンが活用可能であることが示された。

### 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。2010 年採取の野外媒介蚊からの RNA サンプルでは RT-PCR 解析の陽性が 6 プール認められ、ウイルス分離では 2 株の分離に成功した。

#### 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。この NS1 抗体検査法の技術移転を 2 地方衛生研究所に対して実施した結果、可能であることが確認された。

高知県における日本脳炎ワクチンに関する保護者の意識調査では、ワクチン不足の懸念から PR を控えた影響が調査時点では根強く残っており、啓発不足が関連していることは明らかと思われる。今後、積極的な広報活動がなければ、2005 年以降の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

昨年度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が、今年度は、実際に犬に対する感染実験を実施した結果、感染は成立したがウイルス血漿は確認されなかった。したがって犬は都市部や室内における JEV 媒介蚊の存在を知るための安全で優れた指標となることが分かった。

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。

2010 年の小児症例は麻痺から始まり、その後髄膜炎症状が発症し、多くの症例とパターンが異なる。しかしながら、MRI において基底核、両視床へ病変が特徴的であった。この症例では、左中心前溝脳表の病変を認めたため、麻痺症状が発症したと思われる。また幸い、9/21 には MRI 所見は改

善しほぼ消失し、臨床的に後遺症を残さず、改善を認めた。

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。このため日本脳炎 IgM 抗体捕捉 ELISA 法の標準化を行った結果、長崎県における日本脳炎患者診断に寄与した。また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検体では、日本脳炎の患者の髄液から抗日本脳炎 IgM 抗体陽性の検体が 3 検体確認された。しかし、東京都の検体では IgM 抗体陽性となった検体は存在しなかった。

沖縄県では、中南部 8 市町村で飼育されている JEV ワクチン未使用の繁殖豚の血中 JEV 抗体保有状況を調査した結果、地域により JEV 活動状況が異なる可能性明らかになり今後の調査にあたり、これらの結果を考慮した検体採集が重要であると考えられた。また、石垣島および西表島において、一時的に JEV 活動が活発になった可能性とともに、島外から JEV が侵入した可能性があり、今後、このようなウイルスに対するサーベイランスの構築が必要と考えられた。長崎県では 2009 年につづき 2010 年も五島列島、対馬で捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルス抗体を検出した。

#### 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改良 NS1 ELISA 法のプロトコルを作成した。地方衛生研究所への小規模の予備的技術移転は首尾よく受け入れられ、プロトコルの有用性が示された。
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. 細胞培養不活化日本脳炎ワクチン接種に関して、積極的な広報活動、動機づけの強化がなされなければ、2005 年以

- 来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。
4. 犬は JEV に感染するが発症せず、ウイルス血症にもならず、抗体も持続していることを感染実験により確認した。したがって都市部や室内における JEV 媒介蚊の存在を知るための安全で優れた指標となることが分かった。
  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. 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、野外で観察される欠失がウイルス性状に及ぼす影響はさほど大きくない推測された。
  7. 日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築に成功したが、今後更なる改良が必要である。
  8. 沖縄県中南部 8 市町村で飼育されている JEV ワクチン未使用の繁殖豚の血中 JEV 抗体保有状況を調査した結果、地域により JEV 活動状況が異なる可能性明らかになった。
  9. 日本脳炎の診断には、髄液中の IgM 抗体検査が重要で、その方法の標準化が確立された。
  10. 中国で以前に分離されたウイルスに近縁であるとの結果がでており、この地域においては毎年中国から夏季に日本脳炎ウイルスが飛来していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

韓国で 2010 年、日本脳炎患者が急増し、24 例報告された。

#### 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

石川知弘、小西英二：ベネズエラウマ脳炎

ウイルスレプリコン発現システムを用いた日本脳炎ウイルス NS1 タンパクの作成およびその性状解析。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月

瀧澤山人、小西英二：ジャカルタで 1988 年に患者から分離された Dengue 1 型および 3 型ウイルスの遺伝子系統樹解析。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月

武田祥子、田淵裕子、小西英二：感染増強活性あるいは中和活性のみを示す Dengue モノクローナル抗体の性状解析。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月

田淵裕子、小西英二：インドネシアとフィリピン住民における Dengue ウイルス感染増強抗体の保有率。第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Correlation between complement component levels and disease severity in dengue patients in Indonesia. The 44th Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 2010 年 6 月

Eiji Konishi: Dengue DNA Vaccine Research under Indonesia-Japan Collaboration. International Seminar on Viral Diseases: Control and Management, 2010. 2010 年 9 月

Eiji Konishi: ELISA to detect antibodies against Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in subclinically infected humans. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP). 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. 2010年10月

瀧澤 山人、小西 英二: インドネシア流行株およびプロトタイプに基づくデングワクチンの中和抗体誘導能の比較。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

田渕 裕子、山中 敦史、小西 英二: インドネシア住民におけるデングウイルス感染増強抗体の血清疫学。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

山中敦史、小西英二: 2008年にインドネシア国スラバヤ市で起きたデング2型から1型への流行型シフト。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

武田 祥子、田渕 裕子、小西 英二: デング1型ウイルス感染増強活性あるいは中和活性のみを示すモノクローナル抗体の性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

石川 知弘、小西 英二: ベネズエラウマ脳炎ウイルスレプリコン発現システムを用いた日本脳炎ウイルスNS1発現系の構築およびその性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. 2010年11月

小瀧将裕、瀧澤山人、小西英二: 数株のデング1型および3型ウイルスに対して数種のモノクローナル抗体が示す感染増強活性の比較。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2010年12月

桑原 三和、小西 英二: 日本脳炎ウイルス抗原を連続発現する昆虫細胞由来蛋白のワクチンおよび診断用抗原への適用。第14回日本ワクチン学会学術集会、2010年12月

加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎: 3' NTR 内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体の *in vitro* における増殖性および病原性解析 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月

山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎: 日本脳炎ウイルスE蛋白質の1アミノ酸置換(S123N)がウイルス増殖に及ぼす影響 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月

Tajima, S., Yamaguchi, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. Effects of single amino acid substitutions at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein on its growth rate *in vitro* and pathogenicity in mice. 1st Asia

Pacific Workshop on Neurovirology. Seoul, South Korea. July 15-17, 2010.

田島茂、高崎智彦、倉根一郎：in vitro におけるデング 1 型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖性および感染細胞側応答の比較 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月

加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポーターレプリコンの構築 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月

山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状における日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 1 アミノ酸置換の影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月

小滝徹、林昌宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス国内分離株の遺伝子解析(2005～2009)第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 11 月

原田誠也、西村浩一、清田直子、小滝徹、高崎智彦：熊本県における日本脳炎ウイルスの疫学調査(第 2 報)、第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2010 年 6 月 東京都

原田誠也、西村浩一、清田直子：熊本県における日本脳炎注意報発令と日本脳炎ウイルスの自然感染率に関する検討、第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 10 月 徳島市

西村浩一、原田誠也、清田直子、小滝徹、高崎智彦：熊本県におけるブタ及び日本脳炎患者から検出された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析、第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 10 月 徳島市

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

赤池洋人、寺田喜平、ほか。岡山県県南および県北部に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(仙台市) 2010 年 11/14～15

前田 明彦、脇口 宏：総合シンポジウム1「世界と日本のワクチンギャップ part1:勸奨接種ワクチン」どう勧めるか、日本脳炎ワクチン。第 113 回日本小児科学会学術集会 2010 年 4 月岩手

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、望月雅美、前田 健、下田 宙、長尾裕美子、下島昌幸、鈴木和男、酒井 宏治、水谷哲也「野生動物における日本脳炎ウイルス抗体保有状況とイノシシからのウイルス分離の試み」第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010 年 5 月(東京)

下島昌幸、長尾裕美子、下田 宙、田丸精治、山中隆史、松村富夫、近藤高志、前田健「日本脳炎発症馬から分離されたウイルスの全塩基配列の決定と病原性」第 25 回中国四国ウイルス研究会、2010 年 6 月(岡山)

下島昌幸、長尾裕美子、下田 宙、田丸精治、山中隆史、松村富夫、近藤高志、前田健「日本脳炎発症馬から分離されたウイルスの全塩基配列の決定と病原性」第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月(帯広)

下田 宙、長尾裕美子、鈴木和男、下島昌幸、前田 健「コウモリを含む在来種における日本脳炎ウイルス抗体保有状況とウイルス分離の試み」第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月(帯広)

仁平稔、喜屋武向子、平良勝也、岡野祥、久高潤、糸数清正、玉那覇康二、高崎智彦。1968～2008 年における沖縄本島の日本脳炎ウイルスの系統樹解析。2010 年 9 月 3 日、全国公衆衛生獣医師協議会平成 22 年度調査研究発表会

村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上勉：石川県内でのドライアイストラップによるコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離、第 45 回 日本脳炎ウイル

ス生態学研究会、東京 (2010. 5)  
**Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y :**  
Pathogenicity of Japanese encephalitis  
virus (JEV) and biological activity of JEV  
protein NS4a, 44<sup>th</sup> US-Japan Cooperative  
Medical Science Program、 Sapporo  
(2010, 7)

**Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y :**  
Pathogenicity of Japanese encephalitis  
virus (JEV) and physiological role of JEV  
protein NS4a, 1st Asia Pacific Workshop  
on Neurovirology Seoul (2010, 7)

村上 学、竹上 勉：石川県内の水田近辺  
で採取したコガタアカイエカ採集と日本脳  
炎ウイルスの分離(2009-2010 年度)、第 58  
回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)

竹上 勉、村上 学、奴久妻聡一：日本脳  
炎ウイルスの非構造蛋白 NS4a 変異と宿主  
応答の差異、第 58 回日本ウイルス学会、  
徳島 (2010, 11)

奴久妻聡一、中道一生、亀岡正典、杉浦重  
樹、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉：  
HIV-1 Tat は PML 型 JCV の増殖を促進す  
る、第 58 回日本ウイルス学会、徳島  
(2010, 11)

竹上 勉、村上 学、石垣靖人：持続感染  
日本脳炎ウイルスの蛋白 NS4a における変  
異多発と宿主応答の関わり、第 33 回日本  
分子生物学会、神戸、(2010, 12)

村上 学、竹上 勉：石川県内豚舎周辺で  
採取したコガタアカイエカからの JEV 分  
離 (2009~2010)、第 17 回トガ・フラビ  
・ペスチウイルス研究会、東京 (2010, 12)

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Dihn  
Tuan Duc, Hitomi Kinoshita, Kazuki  
Kitaura, Noriyo Nagata, Naoko Iwata,  
Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji  
Suzuki, Kouichi Morita: The  
mechanism of severe form of Japanese  
encephalitis virus infection 44<sup>th</sup> Joint  
Working Conference on Viral Diseases  
Sapporo, Japan. June28-30, 2010

Kouichi Morita: Rapid and  
comprehensive arboviruses detection by  
using nLC-ESI/MS/MS, 14<sup>th</sup>  
International Conference on Emerging  
Infections in the Pacific Rim. Penang,  
Malaysia October 4-6, 2010

早坂大輔、上村将夫、田中香苗、森田公一：  
日本脳炎ウイルスの準種(quasispecies)に  
よる病原性の検討. 第 45 回日本脳炎ウイル  
ス生態学研究会・東京都新宿区、2010 年 5  
月 28-29 日

左一八、須藤豊、神邊友宏、田島茂、高崎  
智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木隆：日本  
脳炎ウイルスによる硫酸化糖鎖認識. 第 45  
回日本脳炎ウイルス生態学研究会・東京都  
新宿区、2010 年 5 月 28-29 日

早坂大輔、上村将夫、ディン テュアン デ  
ュク、田中香苗、永田典代、岩田奈緒子、  
佐多徹太郎、森田公一：日本脳炎ウイル  
スの株および準種の違いによる重症化の検討.  
第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・宮  
崎市ホテルメリージュ、2010 年 9 月 3-4  
日

Lyre Anni E. Murao, Kouichi Morita.  
Defective recognition of Japanese  
encephalitis virus RNA in porcine cells  
delays the interferon response to promote  
viral dissemination. 第 47 回日本ウイル  
ス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリー  
ジュ、2010 年 9 月 3-4 日

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン・  
リュアン・デュク、田中香苗、岩田奈緒子、  
北浦一孝、木下一美、佐多徹太郎、鈴木隆  
二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染にお  
ける重症化機序の解析. 第 58 回日本ウイ  
ルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日

#### 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）

「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」

分担研究報告書（H22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：

プロトコルの作成と地方衛生研究所への技術移転

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）

青山 幾子（大阪府立公衆衛生研究所）

**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。本研究班における初年度は、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。昨年度は、この第1バージョンの 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が中和抗体陽性率から求められる年間自然感染率とほぼ同等であることを示した。本年度は、この ELISA 法の技術を地方衛生研究所に移転するための検討を行った。本技術には必要試薬（抗原や抗体）の調整を含む付随技術が必要となるが、移転には ELISA 法のみが適すると考えられた。ELISA 法のプロトコルを作成し、実際に熊本県と大阪府の技術員に熟練者がデモンストレーションを行い、さらにこれらの技術員が単独で実施することにより、技術移転が可能かどうかを評価した。プロトコルはこれらの技術員に首尾よく受け入れられ、単独の実施における成績（ELISA 抗体値）は熟練者の得た成績とほぼ同じであった。

#### A. 研究目的

日本脳炎は、高熱、頭痛、意識障害を主徴とし、致死率（約20%）が高い重篤な疾患である。日本における年間患者数は、1960年代中頃まで1,000例以上であったが、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。平成22

年に積極的勧奨は再開されたが、対象は3歳児に限られている。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。

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。本研究班における初年度は、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。昨年度は、この第1バージョンのELISA法を改良して、ヒト血清中のウシ血清アルブミン (BSA) 抗体の影響を最小限にした。さらに、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、これらがほぼ同等の値であることを示した。以上の検討から、本ELISA法は年間自然感染率を推定するために有用な方法であると考えた。

本年度は、このELISA法の技術を地方衛生研究所に移転するための検討を行った。すなわち、本技術には必要試薬 (抗原や抗体) の調整を含む付随技術が必要となるが、これらの技術も同時に移転するのかどうか、どのようなプロトコルがわかりやすいか、また実際に技術移転が可能かどうかを、少数の技術員に対して実施することにより検討した。

## 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 21 検体の血清を用いた。

**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。

**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。

**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ペルオキシダーゼ標識抗 BSA 抗体、次いでオルトフェニレンジアミン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。

**NS1 抗体測定 ELISA 法：**96 ウエル ELISA 用マイクロプレート (Maxisorp, Nunc) の 48 ウエルに精製 NS1 抗原を 1 ウエルあたり 10 ng (抗原(+))のウエル、残りの 48 ウエルに精製 NS1 抗原 10 ng 中の混入 BSA 量と等量の BSA (抗原(-))のウエルを感作した。感作プレートは、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。抗原(+))のウエルで得られた吸光度と抗原(-))のウエルで得られた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。

### (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

本 ELISA を実施するために必要な技術：抗原や抗体などの必要試薬の調整など、

本 ELISA 以外に 5 種の技術が必要である。

### 3G8 細胞の培養 (図 1)

#### (1) 継代 (維持)

細胞密度が約 70% のときに、トリプシン - EDTA 液により細胞をフラスコから剥離、単細胞浮遊液を作製する。単細胞浮遊液の 1/20 から 1/40 を新しいフラスコへと継代する。NS1 発現細胞の非発現細胞への里帰りを防ぐために、細胞密度 100% での継代は避ける。3-4 日毎の継代が必要。

#### (2) 継代 (培養液回収時)

細胞密度が約 70% のときに、トリプシン - EDTA 液により細胞をフラスコから剥離、単細胞浮遊液を作製する。単細胞浮遊液の 1/5 から 1/10 を新しいフラスコへと継代する (継代 1-2 日後に細胞密度が約 70% になるように)。細胞密度が約 70% のときに、培養液を回収用のものと交換し (交換 24 時間後には細胞密度が 100% となる)、36 時間後に培養液を回収する。

### 免疫染色 (図 2)

3G8 細胞株における発現細胞率を調べる目的で行う。3G8 細胞を乾燥させ、100% エタノールにて固定。固定後、抗 NS1 モノクローナル抗体、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体、アビジン - ビオチン複合体、VIP 基質を順次させる。発色後、顕微鏡下にて発現細胞率や発現強度を確認する。

### NS1 抗原定量の ELISA (図 3)

ウサギ抗 NS1 抗体を感作させた 96 穴プレートに、NS1 抗原、抗 NS1 モノクローナル抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体、p-ニトロフェニルリン酸を順次反応させ、吸光度を測定する。既知濃度 NS1 抗原の検量線より、未知の NS1 抗原濃度を算出する。

### NS1 抗原のアフィニティ精製 (図 4)

NHS-activated sepharose 4 fast flow (以下ビーズ) を担体として使用。ビーズに抗 NS1 モノクローナル抗体を結合させる (室温、2-4 時間)。ビーズにある未反応の活

性基をブロッキングする (室温、1 時間)。ビーズを洗浄後、3G8 細胞培養液と混合し、4 度で一晩反応させる。ビーズを洗浄後、グリシン溶液により NS1 抗原を溶出させる。

### BSA 量測定 of ELISA (図 5)

96 穴プレートに 1 ウェルあたり 10 ng の精製 NS1 抗原を感作後、ペルオキシダーゼ標識抗 BSA 抗体、o-フェニレンジアミンを順次反応させ、吸光度を測定する。既知濃度 BSA の検量線より、精製 NS1 中の混入 BSA 量を算出する。

移転に必要な技術: 第 1 回班会議において班員と討議した結果、地方衛生研究所の状況に鑑み、移転するのは ELISA 法のみが適すると判断された。抗原や抗体などの必要試薬は、これらを調整するに適切な機関が準備して、各地方衛生研究所に配布するのが実施可能であると考えられる。

ELISA 法のプロトコル: 理解しやすいプロトコルの完成を目的として、図 6 に示すドラフトを作成した。ELISA 法は一般的に用いられている手法であるが、初めて行う場合でも間違いなく正確に実施できるように配慮して作成した。

ELISA 法の予備的技術移転: 実際に熊本県と大阪府の技術員 2 名に技術移転を行い、このプロトコルの有用性を評価した。熟練者がデモンストレーションを行った後に、これらの技術員が単独で実施し、その成績 (ELISA 抗体値) を熟練者の得た成績と比較するという方法を用いた。21 検体を用いた試験の結果、これら 2 名の技術員の得た成績は熟練者の得た成績とほぼ同じであり、ELISA 抗体値の相関係数は 0.980~1.000 であった。この結果は、プロトコルが有用であったことを示す。

## D. 考察

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、従来の抗体測定法では