

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。NS1はJEVの非構造蛋白の中で唯一細胞外に放出される蛋白であるため、感染個体において高いレベルの抗体が誘導され、抗体検査法の標的には最も適すると考えられる。また、ELISA法は客観的かつ多数検体処理可能な方法であり、疫学調査に有用である。

日本脳炎ワクチン接種の意義を議論する上で、JEVの自然界における活動状況を把握することは重要である。JEVの活動状況を継続的に調査するためには、地方衛生研究所が本ELISA法の技術を習得し、実施できる体制を整えることが必要となる。本研究では、地方衛生研究所への技術移転が実施可能かどうかの予備的検討を行った。移転する技術を選択し、プロトコルを整備し、少人数の地方衛生研究所の技術員に移転を行い、その評価を行った。その結果、プロトコルはこれらの技術員に成功裏に受け入れられた。今後多くの地方衛生研究所に技術移転が展開すれば、大規模なJEV活動状況の把握が可能となり、厚生労働省の日本脳炎予防接種事業に貢献すると考えられる。

E. 結論

ヒト血清中のNS1抗体を測定する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。

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

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*. 28, 2664-2670, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo, Eiji Konishi: Complement-dependent cytotoxicity assay for differentiating West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in horses. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 875-878, 2010

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Antibodies to bovine serum albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections. *Jpn J Infect Dis.* 63, 296-298, 2010

Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 1560-1566, 2010

Jun-ichi Imoto, Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka, Misako Konishi, Kenji Murakami, Tomoyuki Shibahara, Masanori Kubo, Chang Kweng Lim, Masataka Hamano, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Haruhide Udagawa, Yoshihiro Mukuta, Eiji Konishi: Needle-free jet injection of Japanese

encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine*. 28, 7373-7380, 2010

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Combating Japanese encephalitis: Vero-cell derived inactivated vaccines and the situation in Japan. *Future Virol.* 5, 785-799, 2010

Yoko Kitai, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: Effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine. *J Virol Meth.* 171, 123-128, 2011

Yoko Kitai, Hiroaki Shirafuji, Katsushi Kanehira, Tsugihiko Kamio, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Specific Antibody Responses to West Nile Virus Infections in Horses Preimmunized with Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine: Evaluation of Blocking ELISA and Complement-Dependent Cytotoxicity Assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. in press 2011

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* in press 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent

Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health*. in press 2011

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デング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、田渕裕子、小西英二: 感染増強活性あるいは中和活性のみを示すデング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

田渕裕子、小西英二: インドネシアとフィリピン住民におけるデング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

田淵 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、田淵 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

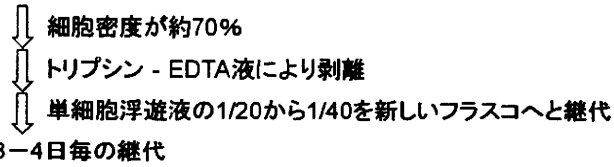
Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

3G8細胞の継代(維持)



3G8細胞の継代(培養液回収時)

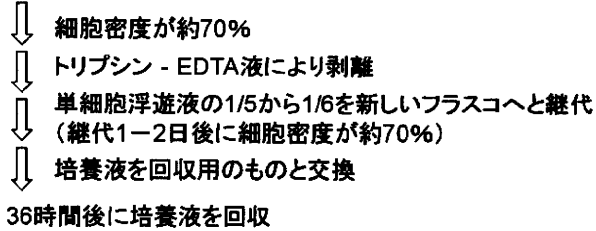
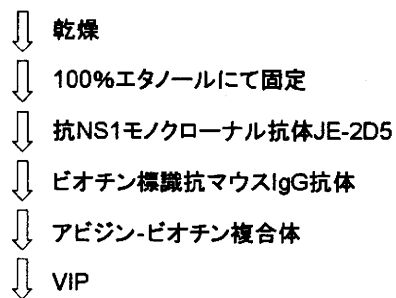


図 1. 3G8 細胞培養法。

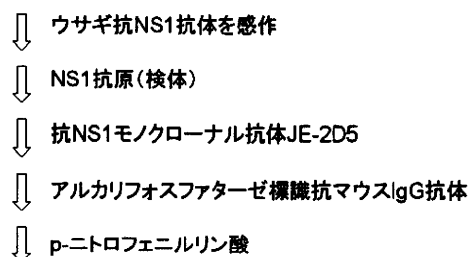
3G8細胞



顕微鏡下にて発現細胞率や発現強度を確認

図 2. 免疫染色法。

96穴プレート

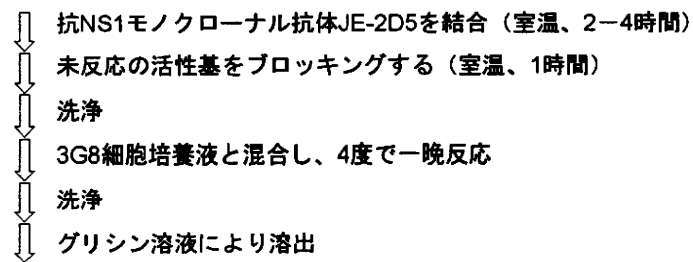


吸光度を測定

標準抗原の検量線より、未知のNS1抗原濃度を算出

図 3. NS1 抗原定量の ELISA 法。

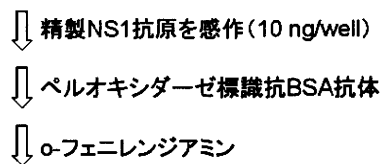
NHS-activated sepharose 4 fast flow



精製NS1抗原

図 4. NS1 抗原のアフィニティ精製法

96穴プレート



吸光度を測定

既知濃度BSAの検量線より、精製NS1中の混入BSA量を算出

図 5. BSA 量測定 of ELISA 法。

ヒト血清中NS1抗体測定法

試薬・プレート

- coating buffer : 0.1 M炭酸緩衝液 (pH 9.6)
- 3G8-NS1 : JEV-NS1発現細胞由来の精製NS1抗原
- BSA in PBS(-) (手順1にて、Ag(-)のウエルの感作に使用)
- PBS-Tween : 0.05% Tween20 in PBS(-)
- ELISA diluent: 0.05 M Tris, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.05% [vol/vol] Tween20, 0.2% [wt/vol] casein, 0.06% [wt/vol] NaN_3 , pH8.0
- Caseinは、SIGMA社 (cat.No. C-0626) を使用しています。
- アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体 : Goat anti human IgG alkaline phosphatase conjugate (Biosource社、Cat. No. AHI0305)
- p-ニトロフェニルリン酸
- DEA buffer : ジエタノールアミン97 gと蒸留水950 mlを混和し、塩酸によりpH9.8に調整。pH調整後、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を0.179 g加えたのち、蒸留水で最終量を1リットルにする
- 96穴プレート: Maxisorp (Nunc社、Cat. No. 442404)

手順

1. coating bufferで100 ng/mlに希釈した3G8-NS1を96穴プレートのウエルあたり100 μl 量を分注し、4℃で一晩感作する。非特異反応の影響を除くために抗原(+)と抗原(-)の吸光度差を求めるので、プレートの半分には抗原(-)として3G8-NS1中に含まれるBSAと同濃度のBSAをcoating bufferで調整し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ を分注する。
2. PBS-Tweenで2回洗浄。
3. ELISA diluentをウエルあたり100 μl 量を分注する。
4. 37℃で30分間保温。
5. PBS-Tweenで2回洗浄。
6. ELISA diluentで1 : 100に希釈した検体をウエルあたり100 μl 量を分注する (duplicate)。(ポジティブコントロールは1 : 500に希釈)
7. 37℃で1時間保温。
8. PBS-Tweenで3回洗浄。
9. ELISA diluentで1:5000に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体をウエルあたり100 μl 量を分注する。
10. PBS-Tweenで3回洗浄。
11. 37℃で保温していた蒸留水で3回洗浄
12. 37℃で保温していたDEA bufferにp-ニトロフェニルリン酸を1 mg/mlの濃度で溶かし (使用直前に調整)、ウエルあたり100 μl 量を分注する。
13. 37℃で保温 (大体、25分から30分でポジティブコントロールの吸光度が1付近になります。)
14. 主波長:415 nm、副波長:655 nmで吸光度を測定

計算方法

各検体の抗原(+)および抗原(-)の吸光度の平均を計算し、抗原(+)から抗原(-)の値を減じる。ポジティブコントロールの値が1.0になるように各検体の結果を換算する。

判定

吸光度の換算値が0.185以上のとき、NS1抗体陽性とする。

図6. NS1抗体測定ELISAのプロトコル。

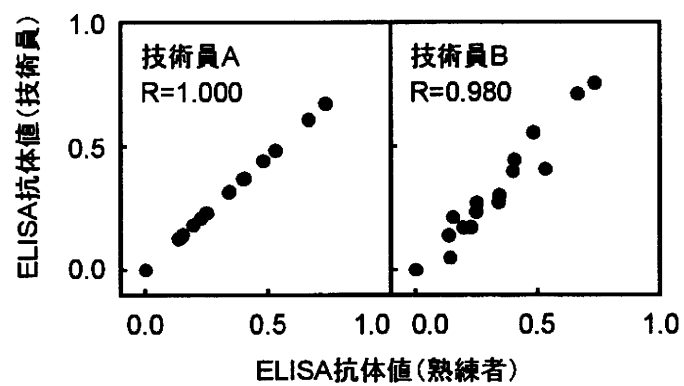


図 7. 技術員が得た ELISA 抗体値と熟練者の得た ELISA 抗体値との比較。

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）

日本脳炎 IgM 抗体捕捉 ELISA 検査法の標準化

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）
協力研究者 池田真紀子（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨 世界保健機関（WHO）のワクチンによる防御可能な感染症に日本脳炎が加えられたことから、我が国は日本脳炎実験室診断に関して、米国 CDC と共に各地域レファレンスセンターを指導する立場にある Global Specialized Laboratory (GSL) に WHO から指定されている。日本脳炎の血清学的診断法として、IgM 捕捉 ELISA 法は優れた方法であり、世界標準になりつつあるが、日本国内および世界においても市販されているキットで感度・特異性において安定した優れたキットが存在しない。そこで我々はキットの重要部分である①抗ヒト IgM プレート、②日本脳炎ウイルス抗原、③抗原検出用標識抗体を作製し評価した。その結果、非常に良好な結果、高評価が得られた。

A. 目的

世界保健機関（WHO）のワクチンによる防御可能な感染症としてポリオ、麻疹、風疹に日本脳炎を加えた。日本脳炎の流行地域にワクチンを普及しその効果を評価するためには、正確な実験室診断にもとづくサーベイランス情報が重要である。実験室診断法としては、病原体診断法（ウイルス遺伝子検出：PCR 法、ウイルス分離など）と血清学的診断法がある。日本脳炎の血清学的診断法として、IgM 捕捉 ELISA 法は優れた方法であり、世界標準になりつつあるが、日本国内および世界においても市販されているキットで感度・特異性において安定した優れたキットが存在しない。そこで我々はキットの重要部分である①抗ヒト IgM プ

レート、②日本脳炎ウイルス抗原、③抗原検出用標識抗体を作製し、*in house* キットの共通化・標準化を目指した。

B. 方法

IgM 捕捉 ELISA における 3 つの重要部分である下記の材料を用いた。

1) 抗ヒト IgM プレート

プレートは Nunc 社のマキシソープ 96well プレート (No.473768 ; 品質証明書付き)、抗体は抗ヒト IgM ポリクローナル抗体 (ウサギ抗体 ; Dako 社, Code#A0425) を用いた。

2) 日本脳炎ウイルス抗原

Vero 細胞に日本脳炎ウイルスを感染させホルマリンにより不活化し、超遠心

(シヨ糖密度勾配法)を用いて精製した。

3) 2次抗体

日本脳炎ウイルス抗原を検出するための2次抗体は、抗フラビウイルス単クローン抗体(6B6C)を精製しPOD標識したものを2000倍に希釈して用いた。

C. 結果

1) プレートは、日本脳炎患者血清、日本脳炎ウイルス抗原を用いて、WHOのデングキット評価で最も評価の高かった米国Focus社製のキットのプレートと比較したところ極めて近いOD値を示した(表1)。

2) 日本脳炎ウイルス抗原も2倍階段希釈して評価したところ、濃度依存性のOD値を示し十分な反応性を示した。

3) 作製した*in house*抗フラビウイルス単クローン抗体(6B6C)は、2000倍希釈で、Focus社のキットと同等の反応性を示した(表2)。

D. 考察

IgM抗体捕捉用プレートは、表面のスムーズな品質の良いプレートに抗ヒトIgM抗体をコーティングすることで、より高感度で非特異反応の少ないプレートとなり、保存性も高まることが明らかになった。本プレートは、ブタ用、イノシシ用などに転用できると考えられる。また細胞培養日本脳炎ウイルス抗原は、濃度依存性のOD値を示し十分な反応性があることが明らかとなった。今回完成した*in house*キットは、十分な感度・特異性を有するキットであると考えられた。

E. 結論

日本脳炎IgM抗体検査用の*in house*キットを完成した。今後、国内アルボウイルスセンターを中心に供給体制を確立する予定である。また、世界保健機関においても評価をGSL(感染研、米国CDC)およびRegional Reference Laboratory(中国CDC、韓国CDC)に依頼し、確認試験として統一する方向で進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by the additional mutations in the NS4B. *Archives of Virology* 156: 63-69, 2011.

2. 学会発表

1) 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

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

- 2) 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
- 3) 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.
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

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

デング熱 IgM キットで比較した感染研製プレートの評価

Serum dilution; x10 ³	Focus Diagnostics_Plate	NIID_Plate
1	2.138	2.043
2	1.805	1.704
4	1.168	1.144
8	0.627	0.676
16	0.320	0.342
32	0.161	0.171

血清、抗原はそれぞれ日本脳炎患者血清、日本脳炎ウイルス抗原を用いた。

表 3、感染研製 2 次抗体 (POD 標識 6B6C mAb) の評価

検査名	IgM 抗体						
検体名	<JE IgM	>IgM					
検査日	2 月 15 日						
Lot #	X101055		OD		INDEX		
	1	2	1	2	1	2	AVERAGE
A	Neg	Neg	0.075	0.064	0.51	0.50	0.50
B	posi	posi	0.263	0.202	1.78	1.57	1.67
C	cut off	cut off	0.141	0.134	0.96	1.04	1.00
D	cut off	cut off	0.154	0.124	1.04	0.96	1.00
E	11-07/2	11-07/2	0.094	0.077	0.64	0.60	0.62
F	11-10/2	11-10/2	0.952	0.594	6.45	4.60	5.53
G	11-20/2	11-20/2	0.119	0.103	0.81	0.80	0.80
H	11-21/2	11-21/2	0.745	0.676	5.05	5.24	5.15
	Focus6B6C	NIID6B6C					

Focus6B6C、NIID6B6C は同等の反応性を示した。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等 新興・再興感染症研究事業）
平成22年度 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）
研究協力者 西村 浩一、清田 直子（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部）
郷 博臣、大迫 英夫（熊本県食肉衛生検査所）
小西 英二、北井 陽子（国立大学法人神戸大学大学院 保健学研究科）
高崎 智彦、小滝 徹、林 昌宏（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

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、2010年度も主たる増幅動物である飼育ブタについて、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抗体保有ブタは昨年同様7月下旬から現れはじめたが、急増したのは8月中旬以降で、8月末には徐々に100%となった。2-ME感受性抗体は7月下旬から検出され始めたことから、2010年度も昨年同様7月中旬からJEVの侵淫が始まったと推測された。2010年は冬季が短く、かつ記録的な猛暑であったため、蚊の大量発生による日本脳炎（JE）患者の増加が心配されたが、本県では患者発生は見られなかった。なお、JE注意報発令日は8月18日で、昨年より10日早かった。

HI抗体検査に用いたブタ血清180検体中26検体からリアルタイムPCR法でJEV遺伝子が検出され、このうち5検体から遺伝子I型のJEVが分離された。さらに、JEVの越冬メカニズムを解明するため、10月以降も月に約40検体のブタ血清を採取し、リアルタイムPCR法による遺伝子検査を継続した。2011年2月現在210検体の追加検査を行ったが、JEV遺伝子を検出することはできなかった。

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、本年度採取したヒト血清274検体について、50%ブランク減少法による中和抗体価とELISA法によるNS1抗体の有無を測定した。予防接種歴の信憑性が高い1歳～9歳児のワクチン未接種者血清34検体中1検体が、50%ブランク減少法で中和抗体陽性と判定された。これは自然感染によるものと考えられることから、2010年の自然感染率は2.9%となり、対象者の平均生存年数（4.1年）で割ると、中和抗体による年間自然感染率は0.7%と計算された。一方、NS1抗体陽性検体は274検体中9検体（3.3%）で、これをNS1抗体の持続期間（4.2年）で割ると、NS1抗体による年間自然感染率は0.8%と計算された。

また、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、IgM Capture 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。

最後に、本年度採取したヒト血清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ものの、両者は強い正の相関を示した。このことから、フォーカス法は迅速簡便な中和抗体測定法として有効であることが確認された。

A. 研究目的

熊本県における日本脳炎ウイルス (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ため、2010 年度は、1.ブタ血清の HI 抗体及び 2・ME 感受性抗体検査、2.ブタ血清からの JEV の遺伝子検査と分離、3.冬季ブタ血清中の JEV 遺伝子検査、4.ヒト血清中の中和抗体及び NS1 抗体保有状況調査と年間自然感染率の推定、5.原因不明保存髄液からの JEV 検査、及び 6.JEV 中和抗体測定法の比較検討を行った。

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

2010 年 7 月～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 頭を計 9 回、180 頭採取した。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 遺伝子検出及び分離

HI 抗体測定に用いたブタ 180 頭分の血清から AGPC 法を用いて RNA を抽出し、前報のリアルタイム 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、エンベロップ (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。

3.冬季ブタ血清中の JEV 遺伝子検査

2010 年 10 月以降、月に約 40 頭のブタ血清を採取し、2 で示したリアルタイム RT-PCR 法で JEV 遺伝子を検出した。

4.ヒト血清中の中和抗体及び NS1 抗体保有状況調査と年間自然感染率の推定

2010 年に採取したヒト血清 274 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%ブランク減少法で中和抗体を測定し、1 歳～9 歳のワクチン未接種者の中和抗体保有率から年間自然感染率を算出した。

また、前報同様小西らの方法で NS1 抗体を測定し、NS1 抗体の持続期間を 4.2 年として年間自然感染率を算出した。

(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いただいた。

5.原因不明保存髄液からの JEV 検査

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 (感染研変法) による JEV-IgM 抗体検査を行った。

6.JEV 中和抗体測定法の比較検討

2010 年に採取したヒト血清 269 検体の JEV 中和抗体を、6 ウェルプレートを使用した従来の 50%ブランク減少法 (ブランク法) と、96 ウェルプレートを使用した PAP 法応用による 50%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。

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

2010 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。

7 月 12 日採取の 1 検体が HI 抗体価 1:10 を示したものの、7 月 20 日の検体はすべて陰性であった。7 月 26 日は 20 検体中 2 検体が、それぞれ 1:10 と 1:40 を示し、1:40 の検体から 2・ME 感受性抗体も検出されたが、8 月 9 日の検体は再びすべて陰性とな

った。その後、HI 抗体保有率は 8 月 16 日には急激に増加して 60%となり、8 月 18 日に JE 注意報が発令された。本年は 2004 年以来 6 年ぶりに 8 月 30 日採取分が 100%に達した。2008 年度～2010 年度における 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 の遺伝子検出と分離

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 26 日に 1 検体、8 月 2 日に 3 検体、8 月 9 日に 6 検体、8 月 16 日に 7 検体、8 月 23 日に 9 検体、8 月 30 日に 1 検体及び 9 月 6 日に 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、表 3 に示したとおりすべて I 型であった。

3. 冬季ブタ血清中の JEV 遺伝子検査

2010 年 10 月～2011 年 2 月現在までに採取したブタ血清 210 検体について、リアルタイム PCR を行ったが、すべて JEV 遺伝子陰性であった。

4. ヒト血清の中和抗体及び NS1 抗体保有状況調査と年間自然感染率の推定

2010 年に採取したヒト血清 274 検体の年齢群別中和抗体検査結果を表 4 に、年齢・年齢群別中和抗体保有率（抗体価 1：10 以上）のグラフを図 2 に示した。年齢群別中和抗体保有率は、60 歳以上がやや低かったものの、例年とほぼ同様であった。

また、母親からの移行抗体の影響がなく、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の血清は 34 検体であった。このうちの 1 検体が中和抗体陽性で、これは自然感染による抗体と考えられることから、2010 年の自然感染率は 2.9%となり、対象者の平均生存年数

（4.1 年）で割ると、中和抗体による年間自然感染率は 0.7%と計算された。

次に、NS1 抗体の検査結果を表 5 に示した。274 検体中 9 検体（3.3%）が NS1 抗体陽性と判定され、50 歳以上に陽性者が多かった。NS1 抗体の持続期間を 4.2 年とすると、NS1 抗体による年間自然感染率は 0.8%と計算された。

5. 原因不明保存髄液からの JEV 検査

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。しかし、IgM Capture ELISA 法では表 6 に示した 3 検体が陽性と判定された。

6. JEV 中和抗体測定法の比較検討

ブランク法とフォーカス法による中和抗体測定結果を表 7、関連性を示した散布図を図 3 に示した。両法による中和抗体価を比較した結果、フォーカス法の抗体価の方が少し低い傾向が見られたものの、両者は強い正の相関を示した。このことから、フォーカス法は、迅速簡便な中和抗体測定法として有効であることが確認された。

D. 考察

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。2010 年度はこれまでの研究成果を基に、飼育地域を限定してブタ血清を採取したため、HI 抗体保有率のバラツキが減少し、昨年より 10 日早く JE 注意報発令基準に達した。JE 患者発生は無かったが、夏季のブタ血清 180 検体中 29 検体（16%）が I 型の JEV 遺伝子陽性で、このうち 5 検体から I 型の JEV が分離された。このことから、熊本県で活動している JEV は依然として I 型が主流であり、夏季の活動は比較的活発であったと推測されたが、冬季の活動を解明することはできなかった。

次に、ヒト血清の JEV 中和抗体保有率は、60 歳以上がやや低かったものの、ほぼ例年

通りであった。なお、検体数が非常に少ないため信頼性は低いが、1歳～9歳のワクチン未接種児の中和抗体保有率から算定した年間自然感染率は0.7%、NS1抗体から算定した年間自然感染率は0.8%で、ここ数年の平均値よりも低い値であった。

昨年のJE患者は髄膜炎症状を呈し、脳炎まで至らずに回復したことから、昨年度原因不明の保存髄液195検体の遺伝子検査を行ったが、すべて陰性であった。本年度は30検体を追加した225検体について、IgM Capture ELISA法による抗体検査を併用した結果、3名からIgM抗体が検出された。したがって、髄膜炎の検査対象にJEVを含める必要性が感じられた。

我々はほぼ毎年度、多検体処理用に改良したプラーク法で中和抗体検査を行っているが、本年度はフォーカス法を併用し、両者の比較検討を行った。その結果、迅速・簡便法としてのフォーカス法の有用性が確認された。熊本県はJEVの活動が活発な地域であり、今後はフォーカス法に変更して中和抗体検査を継続する予定である。

E. 結 論

- 1 2010年、HI抗体陽性ブタは、7月下旬から現れ始め、8月下旬には徐々に100%に達した。JE注意報発令は8月中旬で、昨年より10日早かったが、JE患者の届出は無かった。
- 2 HI試験に用いたブタ血清180検体中、7月下旬～9月上旬の29検体からI型のJEV遺伝子が検出され、そのうちの5検体からI型のJEVが分離された。
- 3 2010年10月～2011年2月のブタ血清210検体はすべてJEV遺伝子陰性であった。
- 4 ワクチン未接種の1歳～9歳児の中和抗体保有率から計算した年間自然感染率は、0.7%であった。また、NS1抗体保有率から算定した年間感染率は0.8%であった。
- 5 原因不明髄液225検体は、すべてJEV

遺伝子陰性であったが、3検体からIgM抗体が検出された。

6 フォーカス法は、迅速簡便な中和抗体測定法として有効であることが確認された。

F. 健康危機管理情報

熊本県では毎年JEVの活動が続いており、予防接種の励行と時宜を得たJE注意報の発令が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konishi E, Kitai Y, Nishimura K, Harada S: Antibodies to bovine serum albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections: Jpn J Infect Dis. 2010 Jul;63(4):296-8.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

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 2-ME 感受性抗体検査結果(2010 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		
7/12	20	19	1						5%	
7/20	20	20							0%	
7/26	20	18	1		1				10%	100%
8/ 2	20	16				1	3		20%	75%
8/ 9	20	20							0%	
8/16	20	8		1	1	5	5		60%	64%
8/23	20	5			3	3	6	3	75%	47%
8/30	20				1	8	9	1	100%	10%
9/ 6	20	4			2	2	5	6	80%	13%

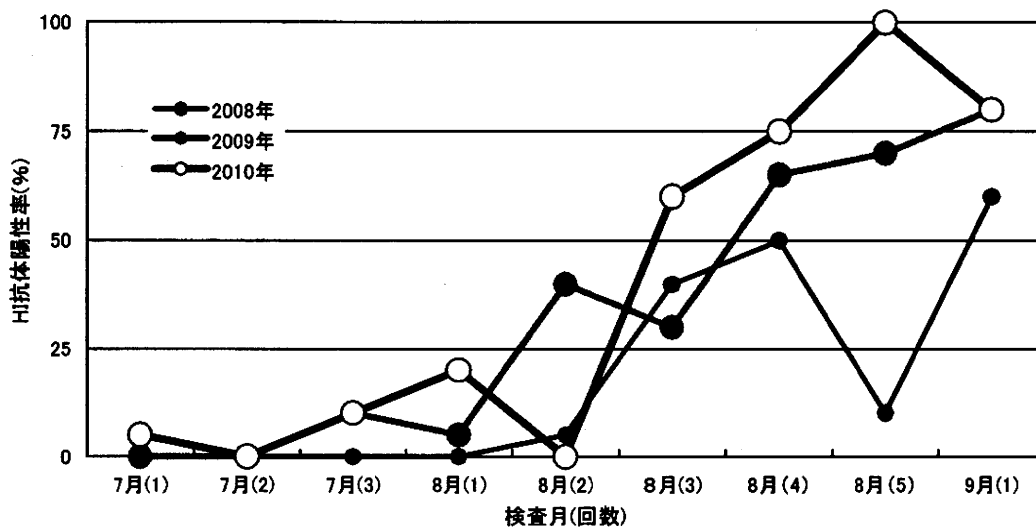


図 1 ブタ血清中の HI 抗体保有率の推移(2008-2010 年)

表2 ブタ血清の地域別 HI 抗体 JEV 遺伝子検査結果と JEV が分離されたロット

採血年月日	U町	Y市	G市	O町	A市	HI抗体 保有率	JEV 分離数	
2010/7/12	0/10	0/5	0/5			5%	3株	
7/20		0/5	0/5	0/5	0/5	0%		
7/26	1/10	0/5	0/5			10%		
8/2	3/10	0/5	0/5			20%		
8/9	6/10		0/5	0/5		0%		
8/16	2/10	5/5	0/5			60%		
8/23	2/10	3/5	4/5			75%		2株
8/30	0/10	0/5	1/5			100%		
9/6	0/5	1/5	0/5		1/5	80%		

HI 抗体保有頭数/検査頭数、 : 1頭から JEV 検出、 : 3頭から JEV 検出

表3 ブタ血清から分離された JEV の遺伝子型 (2010 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/ 94/2010	2010/8/9	U町(UE養豚場)	I型
2	Sw/kumamoto/ 95/2010	"	"	I型
3	Sw/kumamoto/ 96/2010	"	U町(U養豚場)	I型
4	Sw/kumamoto/125/2010	2010/8/23	G市(M養豚場)	I型
5	Sw/kumamoto/130/2010	"	K市(T養豚場)	I型

表 4 ヒト血清の年齢群別中和抗体検査結果(2010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 \leq	
0-4	40	1		3	1	3	2	2	52
5-9	16	1	1	2	2	3	3	11	39
10-14	6				2	5	2	10	25
15-19	4		1	3	1	2	6	8	25
20-29	4		3	4	1	4	4	7	27
30-39	9	2	6	2	2	5	1		27
40-49	12	2	4	6	1	1	1		27
50-59	11	3	7	3	2	1			27
60 \leq	10	1	4	4		1	2	3	25
合計	112	10	26	27	12	25	21	41	274

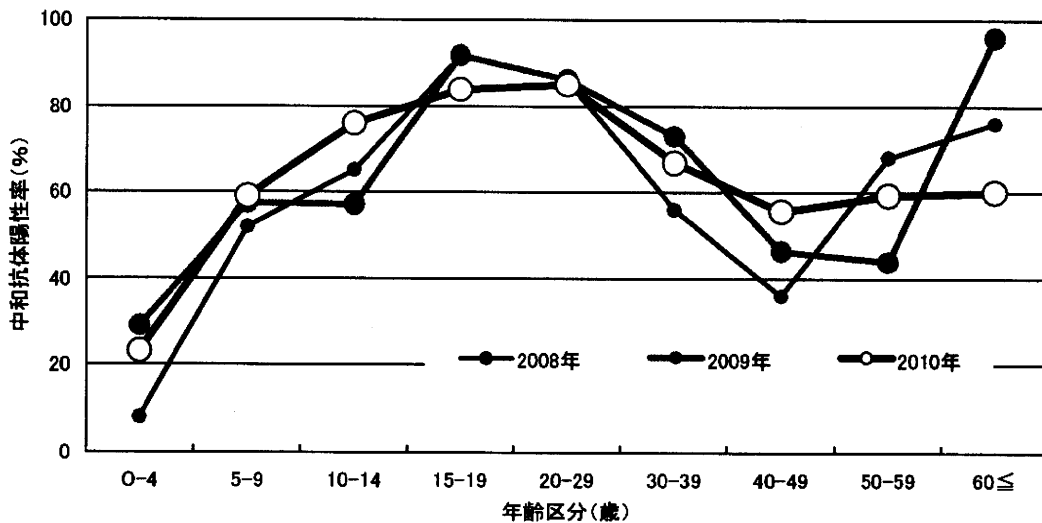


図 2 ヒト血清の年別・年齢群別中和抗体保有率(2008年~2010年)

表 5 ヒト血清中の NS1 抗体検査結果(2010 年)

年齢区分	NS1抗体陽性数
0-4	1
5-9	1
10-14	
15-19	
20-29	1
30-39	
40-49	
50-59	2
60≤	4
NS1 抗体陽性者	9
NS1 抗体陰性者	265
合計	274
NS1 抗体陽性率(%)	3.3
年間自然感染率	0.8

表 6 IgM Capture ELISA 法で陽性となった原因不明保存髄液検体

年度	年齢	性別	受付日	臨床診断名	主症状	P/N 比: (陽性:≥2.0)
1994	4ヶ月	女	8/18	無菌性髄膜炎	発熱(38.5°C) 髄膜炎	8.0
1998	5歳11ヶ月	女	4/17	"	発熱(38.5°C) 髄膜炎	3.3
2001	8歳11ヶ月	男	5/11	"	発熱(40°C) 髄膜炎、上気道炎	8.8

表7 プラーク法及びフォーカス法による中和抗体検査結果

		プラーク法							総計	
		<10	10	20	40	80	160	320		640≤
フォーカス法	<10	105	7	9	2					123
	10	4	3	13	7	1				28
	20			3	15	1	1			20
	40				2	9	5	1		17
	80						13	6		19
	160						6	10	6	22
	320							4	16	20
	640≤								20	20
総計		109	10	25	26	11	25	21	42	269

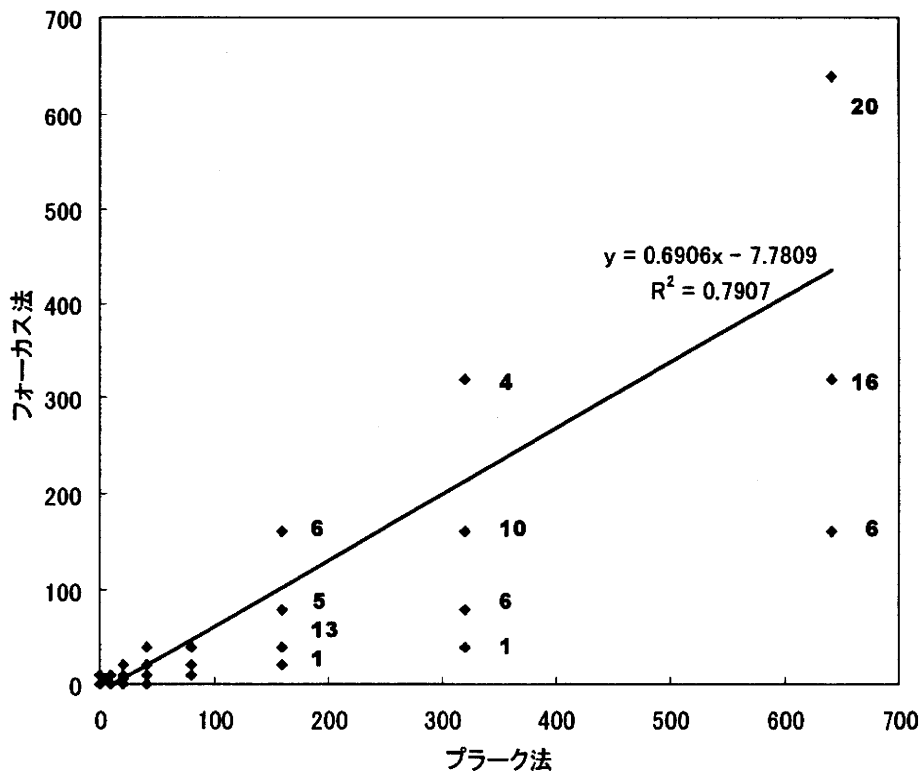


図3 プラーク法及びフォーカス法による中和抗体価の分布