

東京都における日本脳炎ウイルスの活動状況

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、細矢 博子、菅野 このみ、  
岩越 一之、林 志直、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 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。

また、日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられた期間（2005 年 5 月～2010 年 3 月）における東京都内の JEV 活動状況を把握するため、同期間のうち既に報告している 2005 年度（2005 年 4 月～2006 年 3 月）を除いた 2006 年度から 2009 年度（2006 年 4 月～2010 年 3 月）に都内で飼育されたブタを調査対象として、JEV に対する HI 抗体検査、ウイルス分離試験及び遺伝子検査を行い、ブタにおける JEV 感染状況について調査を行なった。その結果、2005 年度のブタにおける JEV 感染状況はそれ以前の 10 数年間に例をみない最大で 74%と高い HI 抗体保有率であったことは報告されているが、それ以降の 2006 年度から 2009 年度の全てにおいて、低い HI 抗体保有率であり、ウイルス分離試験及び遺伝子検査においても JEV は検出されなかった。

A. 研究目的

国内における日本脳炎の患者発生は、1967 年に開始されたワクチン接種によって患者数は激減し、近年では年間 10 人未満の患者数となっている。しかし、マウス脳由来の日本脳炎ワクチンを接種した人が急性散在性脳脊髄炎（Acute disseminated encephalomyelitis: ADEM）を発病したことから、厚生労働省は 2005 年 5 月にワクチン接種の積極的勧奨を差し控えた。この日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えは、その後新たに開発された培養細胞由来ワクチンの安全性が確認された 2010 年 3 月末まで継続された。この間、低年齢層における日本脳炎ワクチン接種は事実上の中

止状態となったため、抗体を保有していない年齢層は年々拡がりつつあったことから、日本脳炎の再流行が危惧された。

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、昨年実施した JEV 遺伝子検査に加えて JEV に対する IgM 抗体検査を行い、JEV の感染状況について調査を行った。また、日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられた期間（2005 年 5 月～2010 年 3 月）における東京都内の JEV 活動状況を把握することを目的に、同期間のうち既に報告している

2005年度(2005年4月～2006年3月)を除いた2006年度～2009年度(2006年4月～2010年3月)に都内で飼育されたブタを調査対象として、JEVに対するHI抗体検査、ウイルス分離試験及び遺伝子検査を行い、ブタにおけるJEV感染状況について調査を行なったので併せて報告する。

## B. 研究方法

### ①東京都内におけるJEV感染症の発生動向

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531件(2004年97件、2005年92件、2006年70件、2007年104件、2008年84件および2009年84件)である。これら髄液検体は全て、昨年の本研究によってJEV遺伝子検査が陰性であることを確認している。

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。

### ②東京都内におけるJEV活動状況

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に対するHI抗体検査は、厚生労働省流行予測調査事業の検査術式に準じて行い、HI抗体価10倍以上を抗体陽性とした。また、2-メルカプトエタノール処理後のHI抗体価が通常の方法で測定したHI抗体価よりも8倍以上減少した場合を、2ME感受性抗体(IgM抗体)陽性とした。

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。各年度における調査対象数は、2006年度が598件、2007年度が618件、2008年度が480件、2009年度が648件の計2,344件である。

分離試験は、ブタ血清0.02 mLを乳飲みマウスの脳内に接種後、中枢神経症状等を呈するか否かを10日間観察して行った。

JEVの遺伝子検査は、ウイルス分離試験と同じ2,344件のブタ血清を調査対象としてリアルタイムPCR法により行った。すなわち、JEen562s-585プライマー(CTGGAYTGTGARCCAAGGA)、JEen623c-585プライマー(GAHCCCACGGTCATGA)及び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ならびにブタ血清を使用して行った。

## C. 研究結果

### ①東京都内におけるJEV感染症の発生動向

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531件についてJEVに対するIgM抗体検査を行った結果、調査対象とした髄液検体は全て陰性であった(表1)。

### ②東京都内におけるJEV活動状況

#### 1)HI抗体検査

2006年度から2009年度のブタ血清を調

査対象にして日本脳炎ウイルスに対する HI 抗体検査を行った結果を年度ごとに表 2 から 5 に示した。

2006 年度のブタにおける抗体保有状況は、4 月、5 月及び 6 月に採取した血清から日本脳炎ウイルスに対する抗体が検出された。それぞれの月の抗体保有率は、18 %、16 %及び 4 %であり、その抗体価は 10 倍～1,280 倍と高い値であったものの、感染直後を示す 2ME 感受性抗体が検出されなかったことから、2006 年度以前の感染によって産生された抗体が検出されたものと推察された。特に、前年度である 2005 年度のブタにおける日本脳炎ウイルス感染流行は過去 10 数年来で最も大規模であったことから、2006 年度当初に採取されたブタの血清からも高い割合で抗体が検出されたものと推察された。また、6 月以降では 9 月と 10 月に採取された血清から抗体が検出されたものの、2ME 感受性抗体は検出されなかった (表 2)。

2007 年度、ブタにおいて日本脳炎ウイルスに対する抗体が最初に検出されたのは、7 月 20 日に搬入された血清 2 件であったが、2ME 感受性抗体は検出されなかった。続いて、8 月 24 日に搬入された血清 4 件で抗体が確認され、このうち抗体価が 40 倍であった血清からは 2ME 感受性抗体も検出された。9 月 21 日から 3 月 7 日搬入分では 2 %から 20 %で推移しており、このうち 9 月 28 日から 10 月 26 日及び 11 月 30 日搬入分では抗体が検出された血清の 20 %～100 %で 2ME 感受性抗体が検出されたことから、2007 年度のブタにおける JEV の感染流行時期は、8 月後半から 11 月であったことが推察された (表 3)。

2008 年度、ブタにおいて日本脳炎ウイルスに対する抗体が最初に検出されたのは、4 月 18 日に搬入された血清 6 件からであり、その抗体価は 40 倍から 1,280 倍と高い値で

あったが、抗体が検出された 6 件全てで 2ME 感受性抗体が検出されなかったことから、2006 年度結果と同様に前年度におけるウイルス感染によって獲得した抗体が検出されたものと推察された。続いて、8 月 8 日及び 9 月 5 日に搬入された血清 3 件からも抗体が検出されたが、これら 3 件の抗体価は 10 倍と低い値であったために 2ME 感受性抗体は測定できなかった。その後、9 月 12 日に搬入された血清 2 件で抗体が検出され、このうち抗体価が 320 倍であった血清 1 件は 2ME 感受性抗体も検出された。10 月 10 日から 3 月 13 日搬入分では 4 %から 20 %で推移しており、この期間において抗体が検出された血清のうち、10 月 10 日、10 月 24 日及び 11 月 7 日搬入分では抗体が検出された血清の 33.3%～60 %で 2ME 感受性抗体が検出されたことから、2008 年度のブタにおける日本脳炎ウイルスの感染流行時期は、9 月から 11 月初旬であったことが推察された (表 4)。

2009 年度についても 2006 年及び 2008 年と同様に 4 月及び 5 月に採取した血清 1 件ずつから抗体が検出されたが、2ME 感受性抗体は検出されなかった。これ以降では、8 月から 10 月に採取された血清 5 件から抗体が検出されたものの、いずれも抗体価が 10 倍と低く、2ME 感受性抗体は測定できなかった。また、11 月から 3 月に採取された血清からも抗体は検出されたが、2ME 感受性抗体は検出されなかった (表 5)。

2006 年度から 2009 年度全ての調査年度において HI 抗体保有率及び抗体価は共に低値であったことから、2006 年度から 2009 年度のブタにおける日本脳炎ウイルスの感染流行は、小規模であったことが示唆され、2005 年度にブタ間で起きた JEV の感染流行は単年度限りで終息したことが確認された。

## 2) ウイルス分離試験

2006 年度から 2009 年度のブタ血清 2,344

件を調査対象にして JEV の分離試験行った結果を年度ごとに表 2 から 5 に示した。

マウス脳内接種法によるウイルス分離試験の結果、ブタ血清 2,344 件は全てで陰性であった。

### 3) 遺伝子検査

2006 年度から 2009 年度のブタ血清 2,344 件を調査対象にして JEV の遺伝子検査行った結果を年度ごとに表 2 から 5 に示した。

リアルタイム PCR 法による遺伝子検査の結果、ブタ血清 2,344 件は全てで陰性であった。

## D. 考察

流行予測調査事業によって測定した 2005 年から 2010 年における都民の JEV に対する中和抗体保有調査の結果を図 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、年齢階層別にみた都民の JEV に対する中和抗体保有率は、全ての年齢階層で低下傾向にある。また、図 2 のようにワクチン接種歴別にみた抗体保有率でも、ワクチン接種歴の有無にかかわらず、抗体保有率は年々低下傾向にある。さらに、ワクチン接種歴がない都民の抗体保有率は 2006 年には 38.9% であったが、これ以降では低下し、2008 年には 1.0%、2009 年には 1.7% ならびに 2010 年には 0.0% と、都民については JEV 自然感染による抗体獲得及びブースター効果が無くなってきているものと推察された。

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昨年実施した JEV 遺伝子検査に加えて、JEV に対する IgM 抗体検査を実施した。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。JEV 遺伝子検査が陰性であったこれら髄液は全て、JEV に対する IgM 抗体検査も陰性であり、2004 年～2009 年の東京都においては日本脳炎の患者発生が無いだけでなく、JEV 感染による脳炎・脳症および髄膜炎等患者発生も無いものと推察された。

また、我々が以前に行った 2005 年度の都内のブタにおける JEV の感染調査では、最大 74% の高い抗体保有率を経験し、9 月及び 10 月に採取された血清から JEV2 株を分離していることから、日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられている 2006 年度以降にも都内のブタにおける JEV の感染流行は引き続き起こるのか否か、抗体調査及びウイルス分離試験に加えて遺伝子検査を実施した結果、2006 年度から 2009 年度のブタにおける JEV に対する抗体保有率は最大でも 20% と低い値であり、ウイルス分離試験及び遺伝子検査によるウイルス保有調査では調査対象全てでウイルスの保有は確認されなかった。

ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられた 2005 年 5 月から 2010 年 3 月末までの期間において、2005 年には過去 10 数年来で最も大規模なブタにおける JEV の感染流行がみられたが、これ以降については 2005 年度規模での流行は継続せず、都内における JEV の侵淫度は低かったことが明らかとなった。しかしながら、2005 年のようなブタにおける突発的な感染流行が今後も起こる可能性は少なくない。再流行を早期に探知し、的確な対策を講じるためにも、引き続き、JEV の動向監視を行う必要性は高いと思われた。

## 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531件についてJEVに対するIgM抗体検査を行った。その結果、調査対象とした髄液検体は全てIgM抗体検査が陰性であった。これら髄液検体は、昨年の本研究において全てJEV遺伝子検査が陰性であることも確認されていることから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。

また、2006年度から2009年度の東京都内におけるJEVの動向を把握するために、都内で飼育されたブタにおけるJEV感染状況を抗体検査、ウイルス分離試験及び遺伝子検査によって調査を行った。その結果、抗体検査では全ての調査年度において低い抗体保有率であり、ウイルス分離試験及び遺伝子検査においてもウイルスは検出されな

かった。このことから、2006年度から2009年度のブタにおけるJEV感染流行は小規模であり、都内におけるJEVの侵淫度は低いことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

田部井由紀子, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 岩崎則子, 菅野このみ, 細矢博子, 岩越一之, 林志直, 甲斐明美: 都内のブタにおける日本脳炎ウイルスの感染状況. 東京都健康安全研究センター研究年報, 61, 153-159, 2010.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 髄液検体におけるJEV遺伝子検査及びJEV-IgM抗体検査結果

検体採取年	JEV遺伝子検査検体数	JEV遺伝子検査結果	JEV-IgM抗体検査検体数	JEV-IgM抗体検査結果
2004年	100	(-)	97	(-)
2005年	107	(-)	92	(-)
2006年	104	(-)	70	(-)
2007年	127	(-)	104	(-)
2008年	118	(-)	84	(-)
2009年	125	(-)	84	(-)
総数	681	(-)	531	(-)

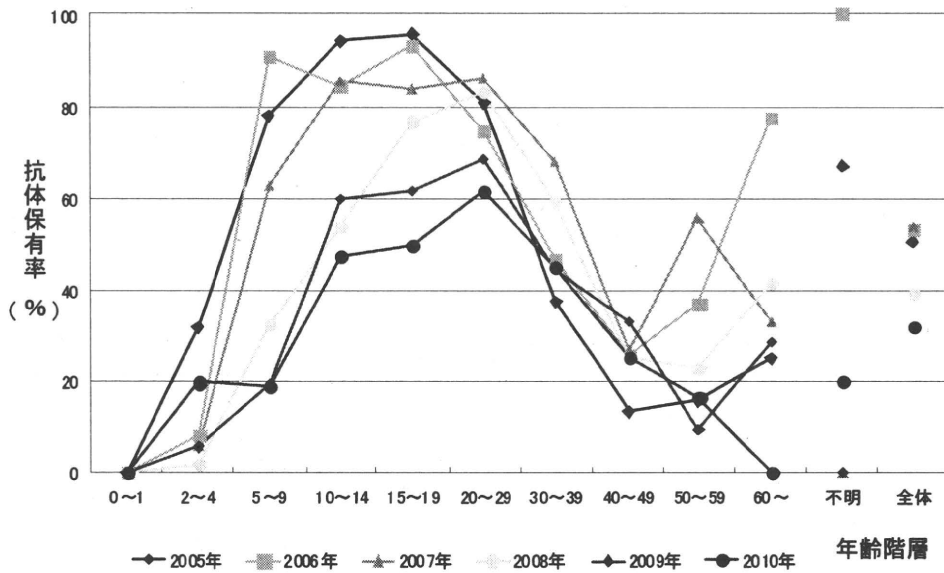


図1. 東京都民における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有調査

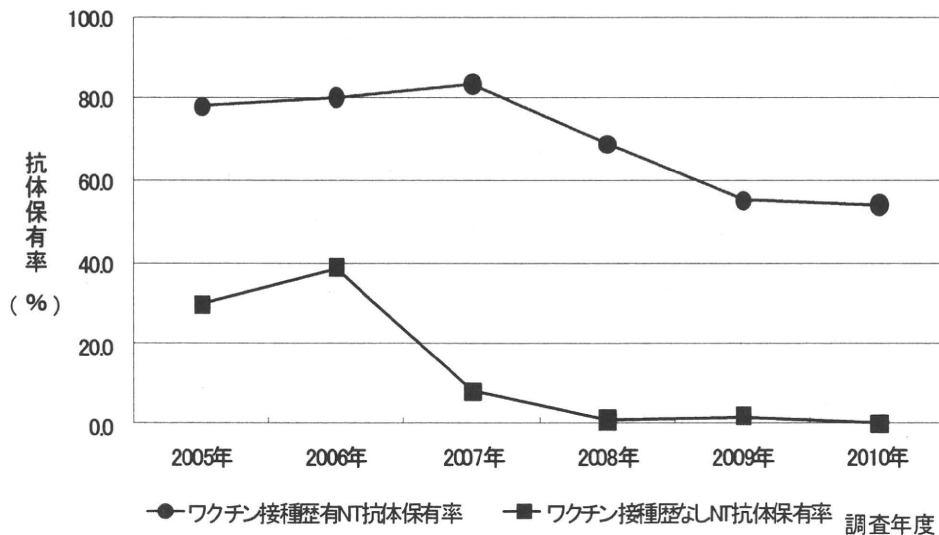


図2. ワクチン接種歴別にみた都民における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有率

表2. プタ血清における日本脳炎ウイルスに対するHI抗体ならびにウイルス保有状況(2006年)

搬入日	検査数	HI抗体価(倍)											抗体保有率 (%)	2ME感受性抗体保有率 (%)*	ウイルス分離**	リアルタイムPCR**	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	≥5,120					
4月 21日	50	41	1		1	2	1	4						18.0	0.0 (0/9)		
5月26日	50	42	1		1	1			3	2				16.0	0.0 (0/8)		
6月23日	50	48	1							1				4.0	0.0 (0/2)		
7月 21日	50	50												0.0			
8月 11日	50	50												0.0		0/50	0/50
8月25日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月 8日	50	49		1										2.0	0.0 (0/1)	0/49	0/49
9月 15日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月22日	50	47	3											6.0	0.0 (0/3)	0/50	0/50
9月29日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月 6日	50	49		1										2.0	0.0 (0/1)	0/49	0/49
10月 13日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)	0/50	0/50
10月 20日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)	0/50	0/50
10月 27日	50	50												0.0		0/50	0/50
11月 10日	50	50												0.0			
11月 24日	50	50												0.0			
12月 8日	50	50												0.0			
1月 19日	50	50												0.0			
2月 16日	50	50												0.0			
3月 9日	50	50												0.0			

\*2ME感受性抗体陽性数/HI抗体陽性数 (10倍以上)      \*\*陽性数/供試数

表3. プタ血清における日本脳炎ウイルスに対するHI抗体ならびにウイルス保有状況(2007年)

搬入日	検査数	HI抗体価(倍)											抗体保有率 (%)	2ME感受性抗体保有率 (%)*	ウイルス分離**	リアルタイムPCR**	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	≥5,120					
4月20日	50	50												0.0			
5月25日	50	50												0.0			
6月22日	50	50												0.0			
7月20日	50	48	2											4.0	0.0 (0/2)		
8月10日	50	50												0.0		0/50	0/50
8月24日	50	46	3		1									8.0	25.0 (1/4)	0/49	0/49
9月 7日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月14日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月21日	50	48	1								1			4.0	0.0 (0/2)	0/49	0/49
9月28日	50	49				1								2.0	100.0 (1/1)	0/49	0/49
10月 5日	50	47			2				1					6.0	33.3 (1/3)	0/47	0/47
10月12日	50	49					1							2.0	100.0 (1/1)	0/49	0/49
10月19日	50	45		1		1	2		1					10.0	60.0 (3/5)	0/45	0/45
10月26日	50	46	1				1	1	1					8.0	50.0 (2/4)	0/47	0/47
11月 9日	50	46						2	1	1				8.0	0.0 (0/4)	0/46	0/46
11月30日	50	40				1		5	3	1				20.0	20.0 (2/10)	0/40	0/40
12月14日	50	47					1	2						6.0	0.0 (0/3)	0/47	0/47
1月18日	50	45		1		1		2	1					10.0	0.0 (0/5)		
2月15日	50	41	1	2	2	1	3							18.0	0.0 (0/9)		
3月 7日	50	44	1	1		1		2	1					12.0	0.0 (0/6)		

\*2ME感受性抗体陽性数/HI抗体陽性数 (10倍以上)      \*\*陽性数/供試数

表4. プタ血清における日本脳炎ウイルスに対するHI抗体ならびにウイルス保有状況(2008年)

搬入日	検査数	HI抗体価(倍)										抗体保有率 (%)	2ME感受性抗体保有率 (%)*	ウイルス分離**	リアルタイムPCR**		
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560					≥5,120	
4月18日	50	44			1	2		1	1	1				12.0	0.0 (0/6)		
5月23日	50	50												0.0			
6月20日	50	50												0.0			
7月18日	50	50												0.0			
8月8日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)		
8月22日	50	50												0.0			
9月5日	50	48	2											4.0	0.0 (0/2)	0/50	0/50
9月12日	50	48	1					1						4.0	50.0 (1/2)	0/49	0/49
9月19日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月26日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月3日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月10日	50	48		1	1									4.0	50.0 (1/2)	0/48	0/48
10月17日	50	48			1			1						4.0	0.0 (0/2)	0/48	0/48
10月24日	50	47					2		1					6.0	33.3 (1/3)	0/47	0/47
11月7日	50	45					1	3					1	10.0	60.0 (3/5)	0/45	0/45
11月21日	50	41					2	3	2	2				18.0	0.0 (0/9)	0/41	0/41
12月19日	50	45					1	3		1				10.0	0.0 (0/5)		
1月16日	50	42		1	1	5	1							16.0	0.0 (0/8)		
2月20日	50	40	1	1	1	4	1	2						20.0	0.0 (0/10)		
3月13日	50	47		2	1									6.0	0.0 (0/3)		

\*2ME感受性抗体陽性数/HI抗体陽性数 (10倍以上)

\*\*陽性数/供試数

表5. プタ血清における日本脳炎ウイルスに対するHI抗体ならびにウイルス保有状況(2009年)

搬入日	検査数	HI抗体価(倍)										抗体保有率 (%)	2ME感受性抗体保有率 (%)*	ウイルス分離**	リアルタイムPCR**		
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560					≥5,120	
4月17日	50	48						2						4.0	0.0 (0/2)		
5月15日	50	49				1								2.0	0.0 (0/1)		
6月19日	50	50												0.0			
7月24日	50	50												0.0			
8月7日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)	0/50	0/50
8月21日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)	0/50	0/50
9月4日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月11日	50	48	2											4.0	0.0 (0/2)	0/50	0/50
9月18日	50	50												0.0		0/50	0/50
9月25日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月2日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月9日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月16日	50	50												0.0		0/50	0/50
10月23日	50	49	1											2.0	0.0 (0/1)	0/50	0/50
11月6日	50	50												0.0		0/50	0/50
11月13日	50	49		1										2.0	0.0 (0/1)	0/49	0/49
12月11日	50	47	2	1										6.0	0.0 (0/3)	0/49	0/49
1月15日	50	45		1	2	1	1							10.0	0.0 (0/5)		
2月19日	50	45		2		1		1	1					10.0	0.0 (0/5)		
3月19日	50	45	2			1	1	1						10.0	0.0 (0/5)		

\*2ME感受性抗体陽性数/HI抗体陽性数 (10倍以上)

\*\*陽性数/供試数



分担研究報告書（H22年度）

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

分担研究者 多屋馨子(国立感染症研究所 感染症情報センター)

協力研究者 新井 智、浜田雅史、荒木和子、山本久美、前田大久、佐藤 弘、岡部信彦  
(国立感染症研究所 感染症情報センター)

要約

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(2008 年は 3 例、2009 年は 3 例、2010 年は 4 例)。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活動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日本での状況と現在の状況の比較が必要となっている。そこで、1960 年代から近年までに分離された日本脳炎ウイルスの全長配列を基にした比較を行い、ウイルス性状の変化を行った。また、アジア地域の日本脳炎ウイルス媒介蚊の多様性を比較することで諸外国と日本の媒介蚊の性状比較を行うと伴に、効果的な媒介蚊対策を行う必要があると考えられた。

A 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 万人の死者が生じている重篤な感染症である。しかしながら日本では、近年患者報告数が年間 10 例を下回るようになり、また、2005 年 5 月には、定期予防接種の積極的勧奨の差し控えが行われ、接種率が激減した。2010 年度から、3 歳児についてのみ積極的勧奨が再開され、同年 8 月 27 日以降は、第 2 期の追加接種年齢（9 歳以上 13 歳未満）で受けそびれていた初回接種を定期接種として受けられるようになったが、接種率は 2004 年以前の状況には戻っていない。以上のような国内の予防接種の現状から感染リスクの実態把握が急務となっている。

日本脳炎ウイルスの全長配列を基にした詳細な系統解析は行われておらず、ウイルス性状解析情報が不足している。また、日本脳炎ウイルスの主要なベクターであるコガ

タアカイエカの遺伝的多様性データが不足しており、日本にいるコガタアカイエカと海外のコガタアカイエカが同一なのか情報が不足している。そこで、以下の研究を実施した。

(1) 日本を含め、ベトナムおよび日本で分離された日本脳炎ウイルスの全長配列を基にした系統解析を行い、1960 年代から現在までの日本脳炎ウイルスの多様性出現のメカニズムを明らかにする。

(2) ベクターであるコガタアカイエカ及び近縁蚊の遺伝的多様性を明らかにし、日本脳炎ウイルスの拡散や流行メカニズムの解析を行う

B 研究方法

① 島根県のブタから分離された 6 株、北海道のブタから分離された 3 株、大阪府の蚊から分離された 18 株、千葉県  
の蚊から分離された 2 株、長崎県の蚊か

ら分離された 2 株、ベトナムの蚊から分離された 3 株を用いた。それぞれのウイルス株は、培養上清から 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。

- ② 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。

#### C 研究成果

(1) これまでに島根県のブタから分離した 6 株、北海道のブタから分離された 3 株、大阪府の蚊から分離された 18 株、千葉県の蚊から分離された 2 株、長崎県の蚊から分離された 2 株、ベトナムの蚊から分離された株の全長配列を決定することに成功し、それぞれの genotype は GenotypeI と GenotypeIII であった。また、各ウイルスの遺伝子変異スピードの解析から、日本脳炎ウイルスの GenotypeI は、約 490 年前、GenotypeIII は約 670 年前に出現したと予想された。まだ全長配列を決定していない数株のウイルスについても順次決定し、更に詳細な系統解析を行う予定である。

(2) 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。現在、代表的な蚊のミトコンドリア遺伝子全長配列の決定を進めており更に詳細な比較を行う予定である。

#### D 考察

(1) 日本脳炎ウイルスの遺伝的な変異スピードから、日本脳炎ウイルスの GenotypeI は少なくとも数百年前に出現し、年によって海外から侵入してきている可能性が示唆され、国内対策だけでなく広くアジア地域全体の疫学状況と日本脳炎ウイルス常在国との協力体制が対策に重要であることが示唆された。

(2) 蚊のミトコンドリア配列から、海外のコガタアカイエカと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り、今後サーベイランスに応用できる可能性が示唆された。

#### E 結論

- ① 日本脳炎ウイルス全長配列決定により、GenotypeI が 490 年前ごろ、GenotypeIII が 670 年前ごろに出現したと予想された。
- ② 日本及びアジア地域のコガタアカイエカの COI 遺伝子の配列を決定し、今後分類に使用できる可能性が示唆された。

#### F 健康危機管理情報

なし

#### G 研究発表

なし

H 知的所有権の出願・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）  
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  
H22 年度分担研究報告書

「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と  
レポーターレプリコンの構築」

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）  
小滝徹（ウイルス第一部・非常勤職員）  
山口幸恵（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、これまでに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。今回は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。

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。

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、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。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し、今回はマウスに対する病原性を調べた。また基礎ウイルス学研究および抗ウイルス剤スクリーニングに有効なフラビウイルスレポーターレプリコンの作製を試みた。

#### 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、a13) 作製した (昨年度報告済み)。マウス病原性は以下の通り調べた。生後 3 週齢のマウス (C3H/He 系統) にウイルス液を腹腔接種し ( $1 \times 10^5$  / head)、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。また各個体について毎日体重を測定した。

日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンとデング 1 型ウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築はほぼ同様に行なった。日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 およびデング 1 型ウイルス感染性分子クローン rD1(02-20)/pMW119 の C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末側 28 アミノ酸までをウミシイタケルシフェラーゼ

(RLuc) 遺伝子 - FMDV2A (ペプチド切断配列) (RepRL3) あるいは RLuc - IRES 配列 (RepRL4) に置換することにより作製した。両レプリコンプラスミドよりレプリコン RNA を *in vitro* で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入した。経時的に細胞を回収し抽出液を得、ルシフェラーゼ解析に供した。レプリコンが抗フラビウイルス剤スクリーニングに適用できるか検討するため、フラビウイルスの複製を阻害することが知られているリバビリンを添加し、レポーター活性が低下するかを調べた。レプリコンを導入した Vero 細胞にリバビリンの量を変えて添加し、12 および 66 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。リバビリンおよびその溶剤の細胞毒性については MTT 法により評価した。さらに日本脳炎ウイルスの増殖がリバビリンにより抑制されることを確認するため、ウイルス増殖能試験を行なった。Vero 細胞にウイルスを接種後、リバビリンを添加し 24 時間後に培養上清を回収し、これに含まれる感染性ウイルス数 (力価) をプラーク法により測定した。

#### C. 研究結果

##### 1) 日本脳炎ウイルス変異体のマウス病原性の比較

Mie41 (親株)、d5、d9、d5d9、d27 をマウス (C3H/He 系統) 10 匹に接種し、25 日間観察および全頭の体重測定を毎日実施した。親株接種群で 1 匹死亡したのに対し、d9 および d5d9 接種群で 3 匹、d5 接種群で 4 匹、d27 接種群で 5 匹死亡した。これらの生存曲線に対し Log rank 検定を行なったが、有意差は認められなかった。体重変

化についても差異は認められなかった。

## 2) 日本脳炎ウイルスおよびデング 1 型ウイルスレポーターレプリコンの構築とその解析

デング 1 型ウイルスレポーターレプリコンプラスミド ( rD1RepRL3 および rD1RepRL4) および日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンプラスミド ( rJEVRepRL4/pMW119 のみ。RL3 タイプは作製中) を作製した。これらのクローンよりレプリコン RNA を *in vitro* で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入した。経時的に細胞を回収し抽出液を得、ルシフェラーゼ活性を調べた。デング 1 型ウイルスレプリコンでは、細胞の酒類およびレプリコンの種類に関わらず導入した RNA に由来するレポーター活性のみ検出され、細胞内で複製された RNA に由来する活性は確認されなかった。一方、日本脳炎ウイルスレプリコンについては両細胞で複製された RNA 由来のレポーター活性が認められたが、Vero 細胞でより明確な増加 (ピーク) が検出された。よって以降の解析では、日本脳炎ウイルスレプリコンを Vero 細胞に導入して解析を進めた。今回構築した日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンが抗ウイルス剤スクリーニング等に使用可能かを調べるため、フラビウイルスの複製を阻害する活性を有する薬剤リバビリンにより、レポーター活性が低下するかを調べた。その結果 12 時間ではリバビリン添加にかかわらず活性はほぼ一定であったが、66 時間後ではリバビリンの用量依存的にレポーター活性の低下が確認された。次にこの活性低下がリバビリンおよびその溶剤 (DMSO) の細胞毒性によるものでないことを確認す

るため、リバビリン添加細胞について MTT アッセイを行なった。本アッセイにより細胞毒性は観察されず、リバビリン添加によるレポーター活性の低下は細胞毒性によるものではないことが確認された。さらにレポーター活性の低下が観察されたリバビリン濃度で日本脳炎ウイルスの増殖が低下するかを調べたところ、確かにウイルス増殖の低下が確認された。

## D. 考察

近年分離される日本脳炎ウイルスにしばしば観察される欠失の意義を探るために、これまで同様の欠失を有する組換え日本脳炎ウイルスを作製し、その増殖性およびマウスに対する病原性を調べてきた。昨年までに、欠失が観察される領域全体を欠失させたウイルス (d27 変異体) では、1) マウスおよびヒト神経芽細胞腫由来細胞での増殖性がわずかに低下すること、2) マウス (ddY 系統) での病原性がわずかに低下することを見出してきた。そこで今回、ddY 系統よりも日本脳炎ウイルスに対し感受性を示すとの報告のある C3H/He 系統を用いて感染実験を行った。しかし、各種ウイルス間で明確な差異は観察されなかった。以上の結果より、最近見出される欠失は、ウイルスの増殖性にわずかながら影響する可能性はあるものの、病原性に明らかな差異を引き起こす可能性は低いと思われる。今回の研究では欠失の意義を明確にすることは出来なかった。しかし、欠失のあるウイルスが増えつつある状況から、ウイルスにとって何らかの利点があるものと思われる。あるいは、以前はこの領域が必要であったが近年は何らかの理由で必要なくなったの

かもしれない。今後蚊個体内での増殖能なども調べる必要があると思われる。

デング 1 型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築を行なったが、日本脳炎ウイルスレプリコンでは弱いながらも自立的複製が確認できたが、デング 1 型ウイルスレプリコンでは確認できなかった。これまでにデング 2 型ウイルスレポーターレプリコン構築の報告があり、それを参考に我々は構築してきた。同様の作製方法であるにもかかわらず、我々のデング 1 型ウイルスだけうまくいかない理由についてはいまのところ不明である。今後、どの程度 C および E 蛋白質を残すひつようがあるか検討する必要がある。日本脳炎ウイルスレプリコンについては、リバビリンによりその複製（レポーター活性）が阻害されることが明らかとなり、本レプリコンが抗ウイルス剤スクリーニングに使用可能であることが示された。しかし複製されたゲノムに由来するレポーター活性はまだ低く、まだかなり改良する余地がある。今後はこの改良に努め行きたい。

#### E. 結語

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だろうと推測された。

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。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表（英文）

- 1) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., dos Santos, F., de Jesus, M.D., Lina B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Drager, R.D., Andjaparidze, A., and Kurane, I. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 181-184, 2010.
- 2) Moi, M.L., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Lim, C.K., Sakamoto, M., Iwagoe, H., Kobayashi, K., and Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1770-1772, 2010.
- 3) 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..

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
- 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. 1<sup>st</sup> 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



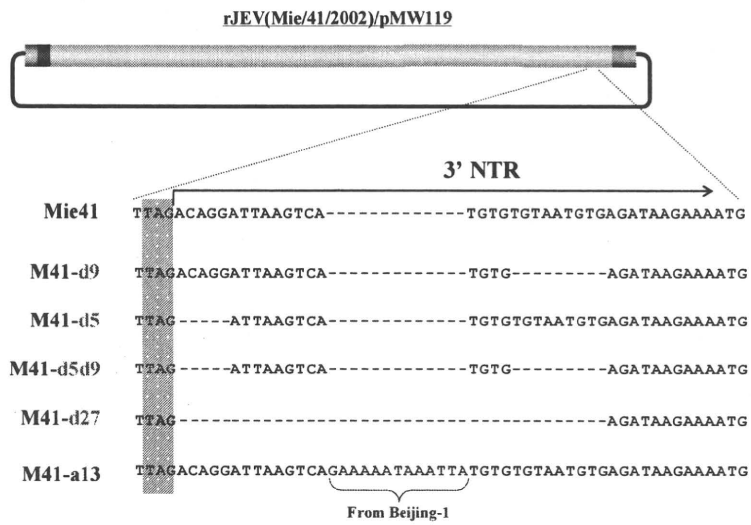


図1 3'NTRに変異を有する組換えJEVの作製

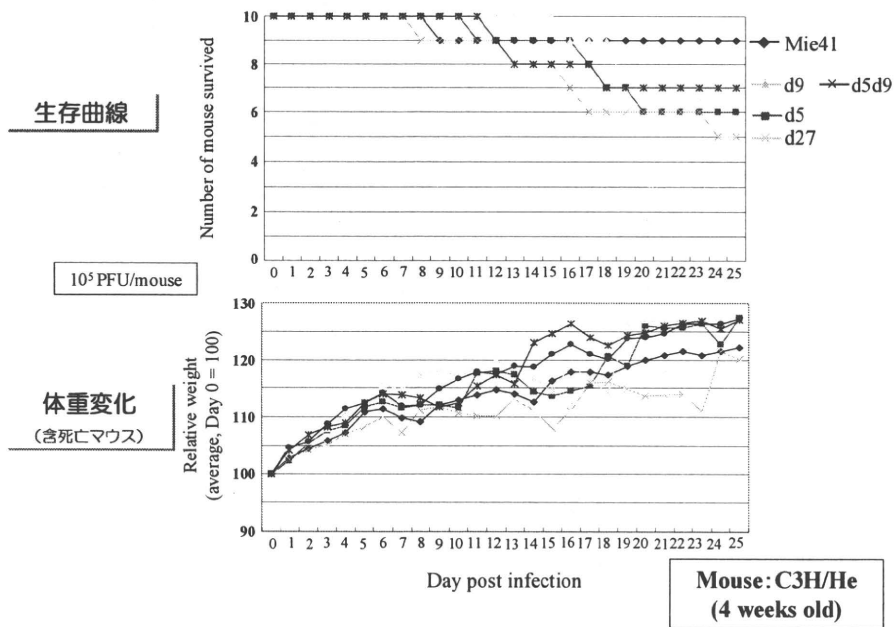


図2 マウスにおける病原性の解析

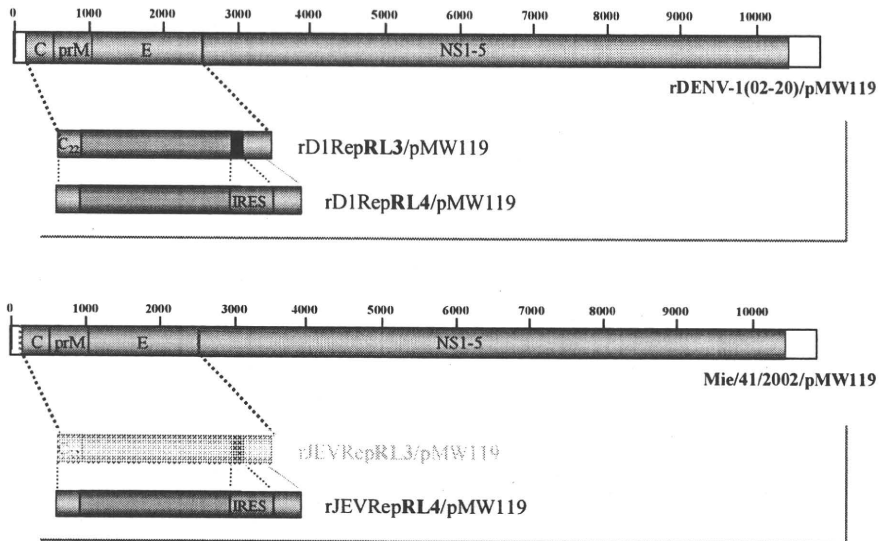


図3 デング1型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築

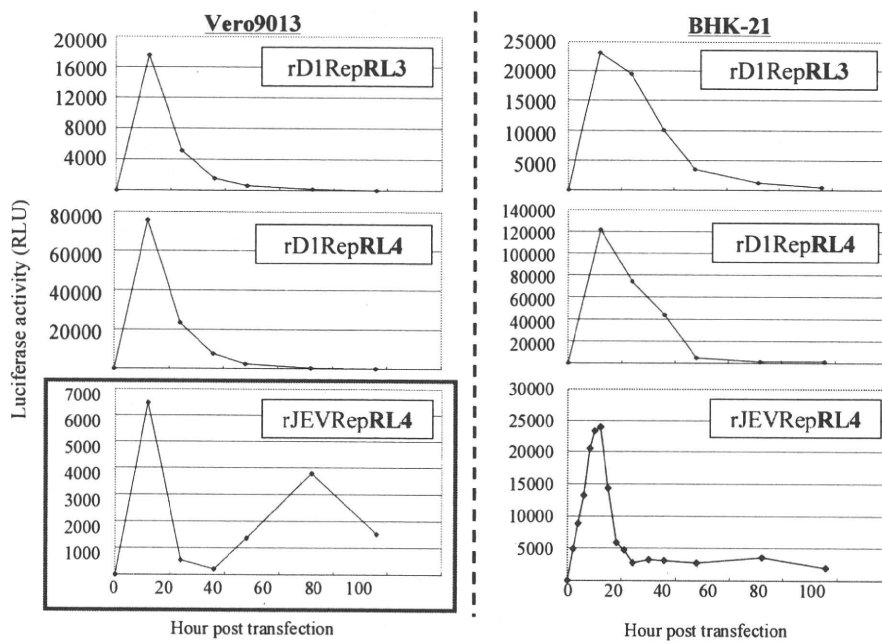


図4 構築したDENV-1およびJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性変化

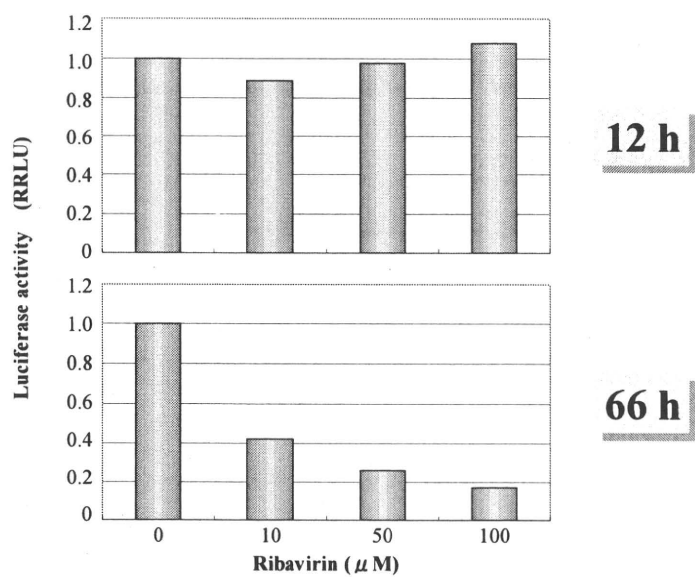


図5 RBV含有培地でのJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性

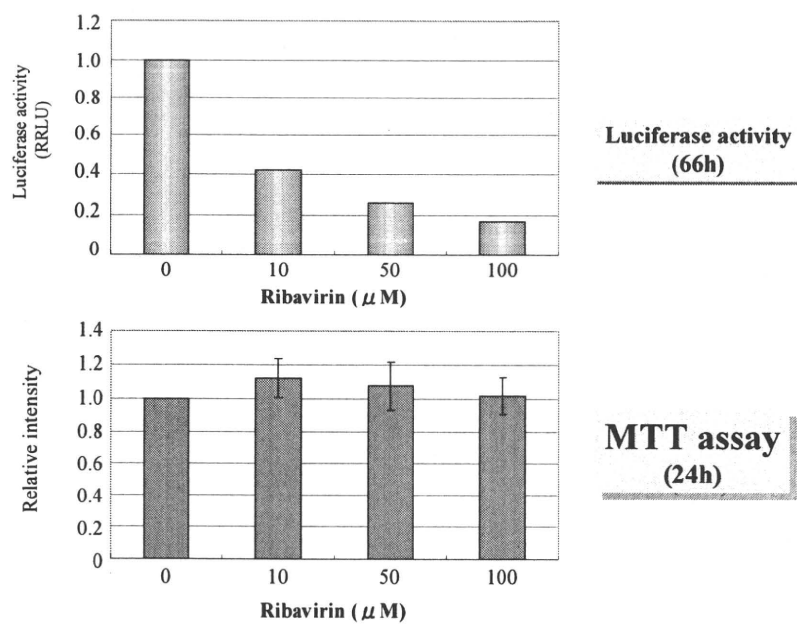


図6 RBVによる細胞障害性の検討

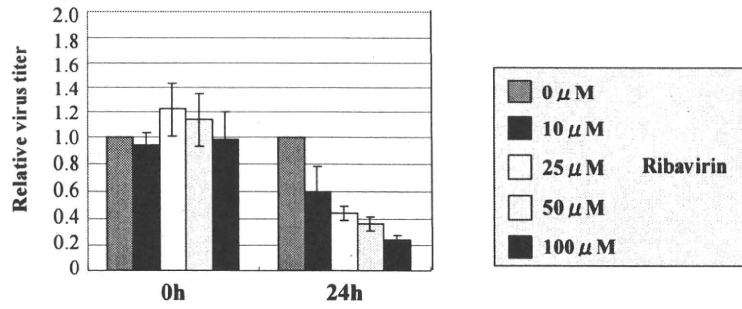
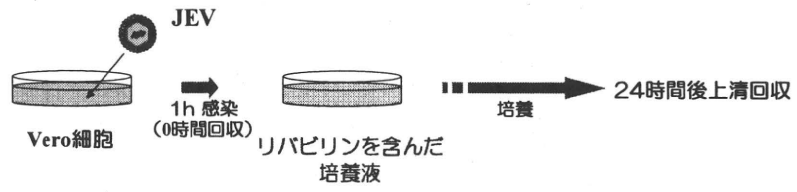


図7 JEVの増殖に対するリバビリンの効果