

表1 日本脳炎ウイルス接種後の中和抗体価の推移

	PID14	PID21	PID28	PID35	PID42	PID49	PID56
<b>No.1</b>	1:160	1:1280	1:640	1:1280	1:640	1:640	1:640
<b>No.2</b>	1:320	1:640	1:640	1:640	1:640	1:320	1:320
<b>No.3</b>	1:40	1:160	1:320	1:320	1:160	1:80	1:160

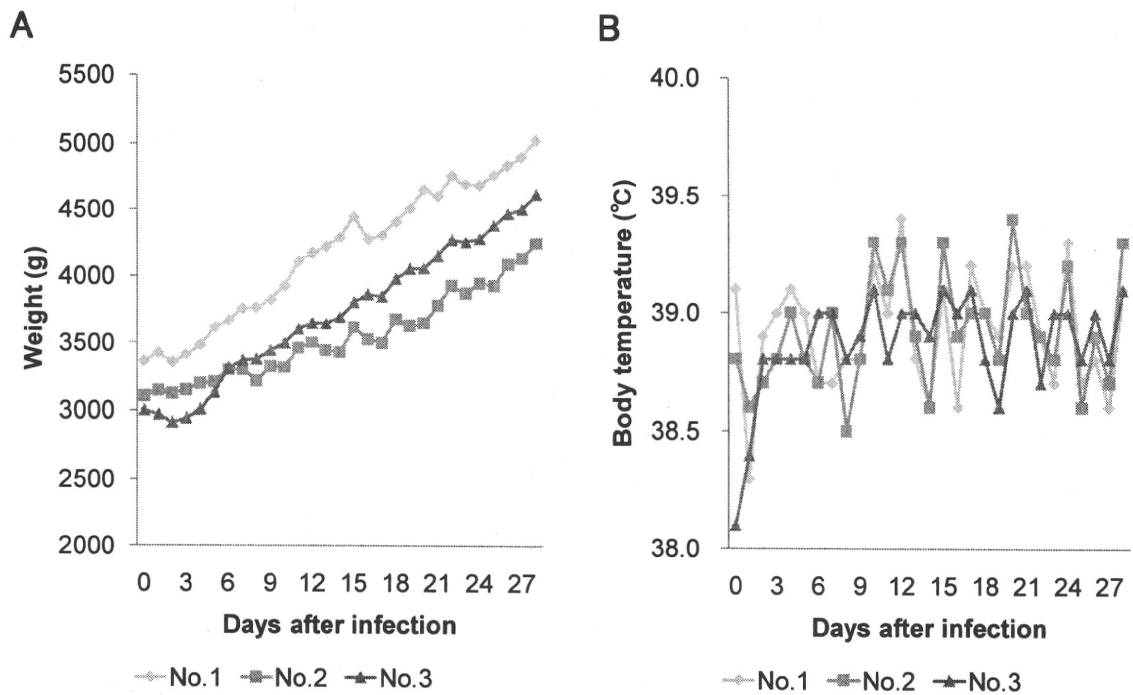


図1 日本脳炎ウイルス接種後の体重と体温の推移

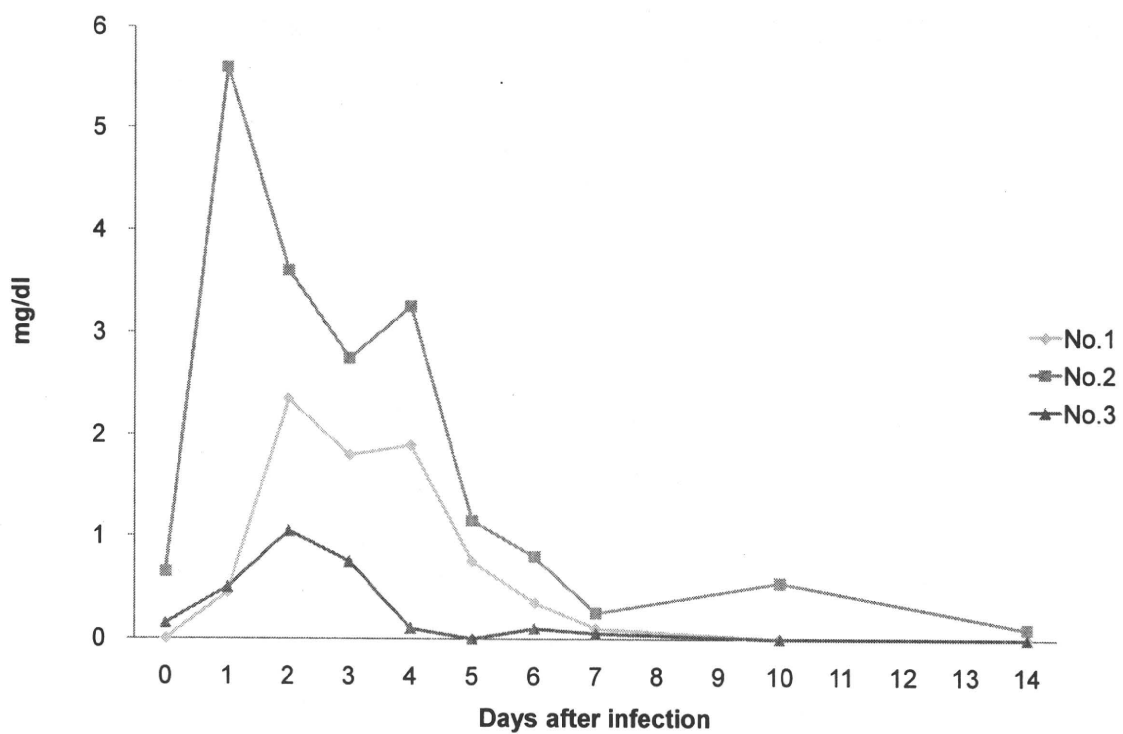


図2 炎症マーカーであるCRPの推移

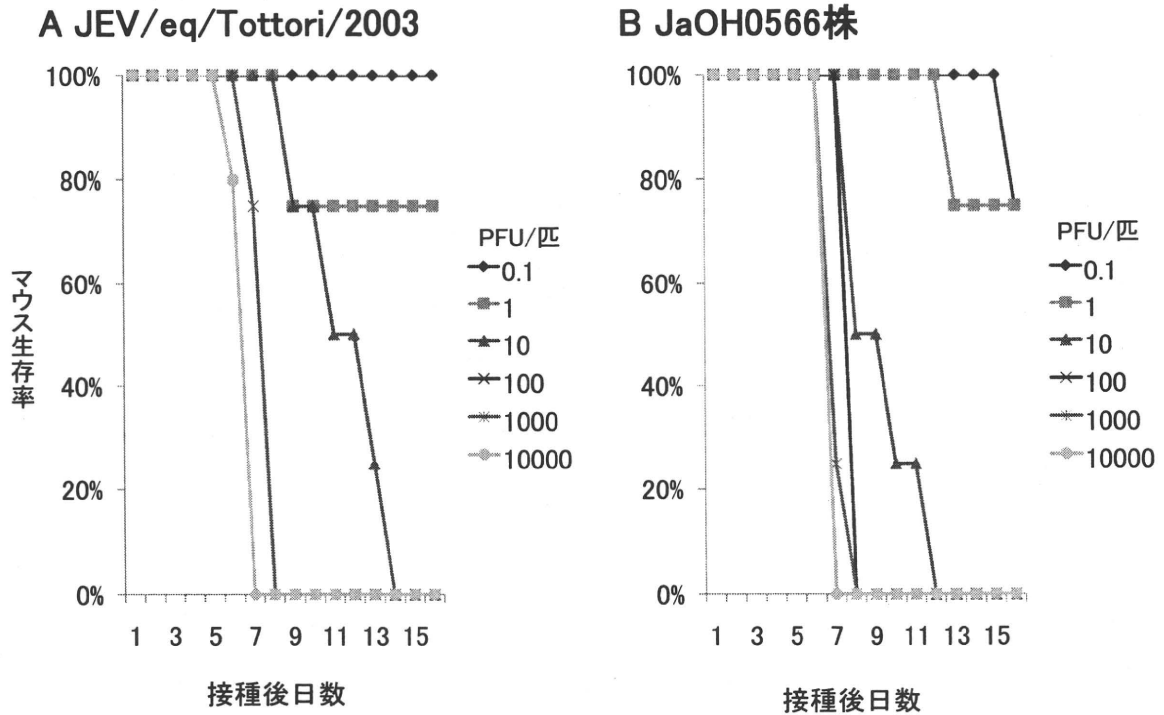


図3 日本脳炎ウイルスを脳内接種したマウスの生存率

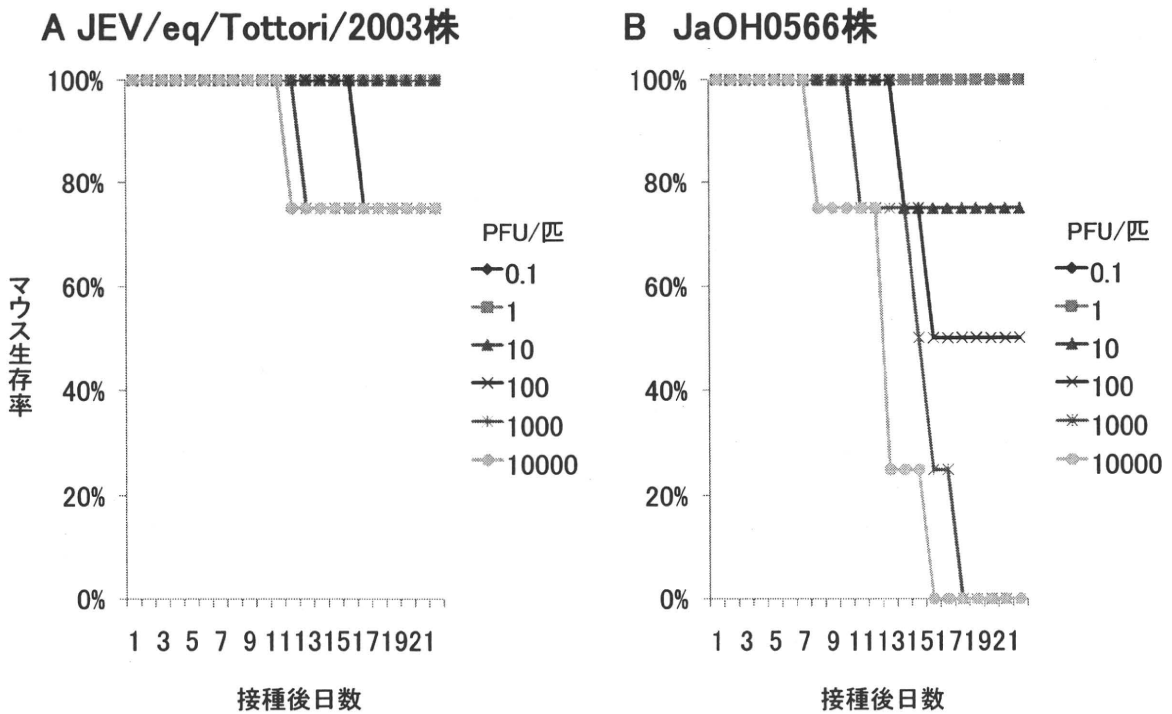


図4 日本脳炎ウイルスを腹腔内接種したマウスの生存率

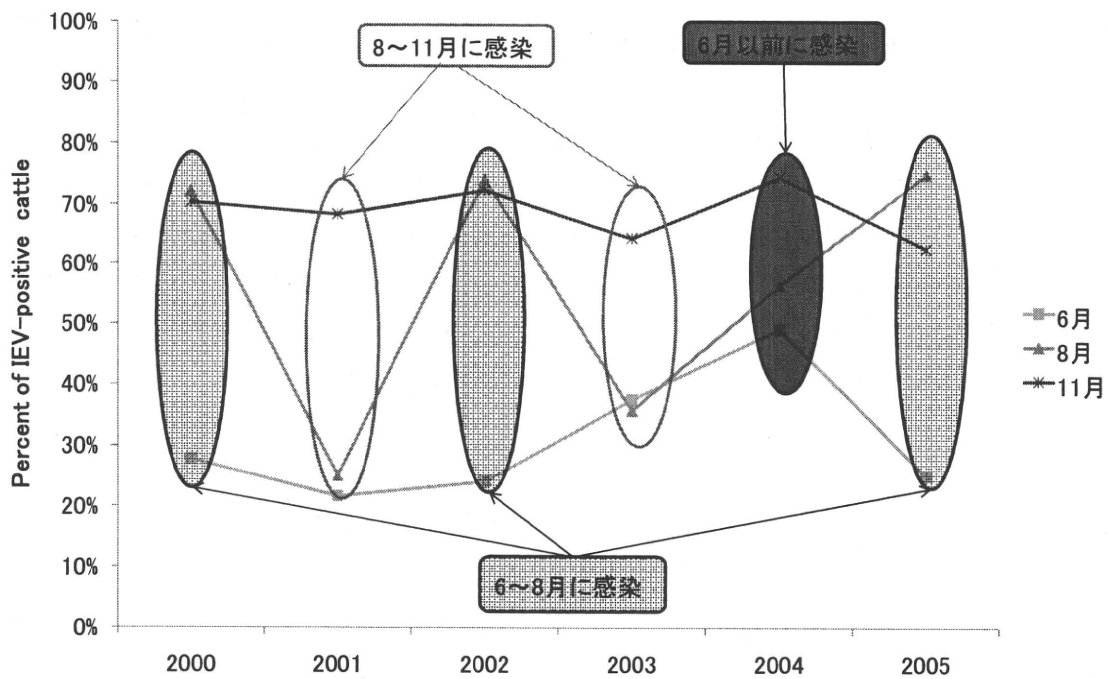


図5 牛における日本脳炎抗体保有率（2000-2005）

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

沖縄県における日本脳炎ウイルス調査

研究分担者 玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班班長）

研究協力者 仁平 稔（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班）

研究協力者 喜屋武向子（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班）

研究協力者 小滝 徹（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：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。また、石垣島で2009～2010年に7ヶ月齢ブタ血液128検体、野生イノシシ血液検体を2008～2011年の狩猟期に石垣島17検体、西表島105検体を採集し、JEV抗体およびJEV遺伝子の検出を行った。結果、石垣島ではブタ血液4検体(3.1%)がHI価1:10でJEV抗体陽性を示したが、イノシシは全てJEV抗体陰性で、西表島ではイノシシ血液47検体(44.8%)がJEV抗体陽性を示したが、2008～2009年が75.0%(15/20)、2009～2010年が52.8%(19/36)、2010～2011年が26.5%(13/49)と減少傾向にあった。JEV遺伝子はいずれの検体からも検出されなかった。これらのことから石垣島では明確なJEV活動はなく、西表島のJEV活動は減少傾向にあると考えられた。1972～1976年に沖縄本島で分離されたJEV19株について、E領域と3'NTR領域の塩基配列を解析した結果、これらの株は台湾や中国に由来する株と考えられ、また、2株において、3'NTR領域に他に報告のない欠失がみられた。

#### A. 研究目的

沖縄県において日本脳炎ウイルス(JEV)患者は、1998年を最後に報告されていないが、沖縄本島で実施されている赤血球凝集抑制(HI)試験によるブタ血中JEV抗体保有状況調査(流行予測調査事業JEV感染源調査)により、沖縄県は依然としてJEV活動が活発な地域として考えられていた。しかし、近年、抗体陽性率の低下がみられ、現在の調査ではJEV活動を正確に把握していない可能性が考えられた。

また、沖縄県には沖縄本島以外に多くの島々があり、2005～2007年に宮古島、石垣島、久米島、与那国島においてHI試験によるブタ血中JEV抗体保有状況調査を行った結果、宮古島、久米島、与那国島ではJEV活動は確認されなかったが、石

垣島においてJEV抗体およびJEV遺伝子が検出された。しかし、これらが検出されたのは2005年に採集された検体からのみで、さらにJEV遺伝子は2006～2008年の台湾株に近縁な遺伝子型3型の株であった。

そこで今年度は、沖縄本島と石垣島、さらに石垣島に近い西表島において、JEV活動状況の調査を行った。また、1972～1976年に沖縄本島で分離されたJEVについて解析を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 沖縄本島のJEV活動状況調査

沖縄県中央家畜保健衛生所から、2009年5月～2010年11月に採血されたJEVワクチン未使用農家の繁殖豚の血清、8市町29農家193検体を分与

していただいた。これらの繁殖豚の平均±標準偏差産歴は3.1±1.1であった。これらについて、流行予測調査事業検査術式に則り、HI 試験により JEV 抗体を検出した。

## 2. 石垣島、西表島の JEV 活動状況調査

2009～2010年の7～9月に、石垣島の7ヶ月齢のブタから血液128検体を採集した。また、2008～2011年の狩猟期間中に捕獲されたイノシシから血液、石垣島17検体、西表島105検体を採集した。これらから上記と同様に JEV 抗体と2-ME 感受性抗体を検出し、また、リアルタイム RT-PCR により JEV 遺伝子の検出を行った。

## 3. 1972～1976年に沖縄本島で分離された JEV の遺伝子解析

凍結乾燥されていた JEV 19株を細胞維持培地1mlに溶解後、Vero細胞に接種し、CPEを確認後に上清を回収した。これらから viral RNA を抽出し、E領域全長と3'NTR領域について RT-PCR を実施し、PCR産物について塩基配列を解析した。

### (倫理面への配慮)

繁殖豚血清は、中央家畜保健衛生所が飼養衛生管理のため採血し、保存していたものを分与していただいたものである。石垣島のブタ血液については、と畜場に搬入されたブタから採集し、石垣島および西表島のイノシシ血液は、猟友会に協力を得て、狩猟期間中に捕獲されたイノシシから採血したものであることから、倫理面の問題はないと判断した。

## C. 研究結果

### 1. 沖縄本島の JEV 活動状況調査

図1に繁殖豚血液が採集された農家の位置と、HI試験の結果を示した。JEV抗体陽性率が高率な農家の位置からA～Cの3つの地域を分類したところ、AのJEV抗体陽性率は64.8%(35/54)、Bは76.3%(45/59)、Cは78.6%(11/14)を示した。また、HI抗体価が1:40以上で陽性とする、3つの地域のJEV抗体陽性率は、Aが53.7%(29/54)、Bが67.8%(40/59)、Cが42.9%(6/14)を示した。

### 2. 石垣島、西表島の JEV 活動状況調査

石垣島において、ブタ血液4検体(3.1%)から JEV 抗体が検出され、HI価はいずれも1:10であった。イノシシは全て JEV 抗体陰性であった。西表島はイノシシ血液47検体(44.8%)が JEV 抗体陽性で、HI価は1:10～640を示し、2009～2010年狩猟期に採集された2検体は、IgM抗体陽性を示した(表1)。また、3年の調査期間中、JEV抗体陽性率は減少傾向にあり、2010～2011年の JEV 抗体陽性率は、2008～2009年および2009～2010年の JEV 抗体陽性率と有意差を示した( $p<0.05$ )。図2に西表島の体重別 JEV 抗体陽性率を示す。2010～2011年の JEV 抗体陽性率は20～30kgにおいて、2008～2009年および2009～2010年の JEV 抗体陽性率と有意差を示し( $p<0.01$ )、30kg以上において、2009～2010年の JEV 抗体陽性率と有意差を示した( $p<0.05$ )。JEV遺伝子は石垣島および西表島の全ての検体から検出されなかった。

### 3. 1972～1976年に沖縄本島で分離された JEV の遺伝子解析

E領域全長について既報告の日本株、韓国株、台湾株、中国株と系統解析を実施した(図3)。1972～1976年の沖縄株19株中12株は塩基配列と分離された年が重複するため省略した。系統樹はa～hの8つのグループに分類され、今回解析した株はいずれも遺伝子型3型で、1959～1981年の日本株、1958～2008年の台湾株、1955、1960s、2008、2009年の中国株と同じグループに分類された。図4に3'NTR領域について解析した結果を示した。JaOAr73050とJaOAr73062において、Stop codonより10塩基目から12塩基の欠失がみられた。

## D. 考察

### 1. 沖縄本島の JEV 活動状況調査

ブタは生後約一年で繁殖可能となり、年2回の分娩が可能とされる。今回、採集したブタ血清は、平均±標準偏差産歴から約2～3歳のブタを中心に採血されたものと考えられた。

調査の結果、沖縄本島中南部の8市町村内のブ

タ飼養農家において、ブタ血中 JEV 抗体陽性率は 0~ $\geq$ 80%と差があり、JEV 抗体陽性率が高率な農家の位置から 3つの地域を分類したところ、それらの JEV 抗体陽性率は 64.8~78.6%を示し、HI 価 1:40 以上を陽性とする と 8.5~35.7%低下した。沖縄本島中南部内においても、JEV は活動しているが、その活動状況は地域によって異なることが考えられた。沖縄本島において約 2~3 年飼育されたブタの JEV 抗体陽性率および HI 価として、これらの値が高率なのか、今後、北部においても同様の調査を行い比較するとともに、これらの結果を考慮し JEV 感染源調査を行っていくことが重要と考えられた。

## 2. 石垣島、西表島の JEV 活動状況調査

今回の調査において、石垣島のブタ、イノシシから JEV 遺伝子は検出されず、JEV 抗体はブタ血液 4 検体(3.1%)から検出されたが、HI 価はいずれも 1:10 であったことから、明確な JEV 活動はなかったと考えられた。石垣島においては 2005 年にのみ高い HI 価の JEV 抗体、IgM 抗体が検出されており、2005 年に一時的に JEV 活動が活発になった可能性が考えられた。

石垣島の隣に位置する西表島において我々は、2000~2005 年に ELISA により西表島のイノシシの JEV 抗体調査を行い、JEV 抗体陽性率は 3.7% (1/27) を示した(Nidaira ら、2007)。今回の調査で示された JEV 抗体陽性率は 3 年ともに 2000~2005 年の調査結果から有意に増加したが ( $p<0.05$ )、3 年の調査期間の中では、JEV 抗体陽性率は減少傾向にあり、西表島においても石垣島と同様に、一時的に JEV 活動が活発になった可能性が考えられた。体重別では、調査の 3 年目に 20kg 以上のイノシシの JEV 抗体陽性率は減少したが、10~<20kg の比較的若いと考えられるイノシシの JEV 抗体陽性率に差はなかった。IgM 抗体が検出されていることから、西表島において JEV 感染環が形成された可能性があり、西表島では JEV 増幅動物であるブタが飼育されていないことから、イノシシなどの野生動物が JEV 増幅動物の役割を果たしている可能性が考えられた。

石垣島および西表島において島内の JEV 活動が一時的に活発になった可能性がある一方で、2005 年に石垣島で検出された JEV 遺伝子は、近年、日本国内では検出されていない遺伝子型 3 型で、2006~2008 年の台湾株に近縁であった。このことから、島外から JEV が侵入してきた可能性もまた考えられた。石垣島の JEV 活動はその後、定着しておらず、西表島においても減少傾向にあるが、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であると考えられた。

## 3. 1972~1976 年に沖縄本島で分離された JEV の遺伝子解析

日本国内の JEV の主要な遺伝子型は、1990 年代に入ると 3 型から 1 型へと変わり、沖縄本島においても同様である。日本国内の 1 型の JEV は、多くが東南アジア等を由来すると考えられているが、沖縄本島の 1 型の JEV の由来は不明である。今回、1972~1976 年の JEV の E 領域について、系統樹解析を行ったところ、遺伝子型は 3 型で、日本、台湾、中国の株と同じグループに分類されたことから、この年代の沖縄本島の JEV は台湾、中国を由来する株と考えられた。

また、3'NTR 領域を解析したところ、19 株中 2 株において 12 塩基の欠失がみられた。この領域の欠失は JEV の病原性や増殖能に関わる可能性が示唆されており、今後、更なる解析が必要と考えられた。

## E. 結論

- 1) 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があり、今後、北部においても同様の調査を行うとともに、JEV 感染源調査を行うに当たり、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。
- 2) 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。

- 3) 1972～1976年に沖縄本島で分離された JEV は、遺伝子型が 3 型であり、台湾や中国に由来する株と考えられた。また、3'NTR 領域に 12 塩基の欠失を持つ株があり、今後の解析が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

なし

2. 学会発表:

- (1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

なし

2. 実用新案登録:

なし

3. その他:

なし



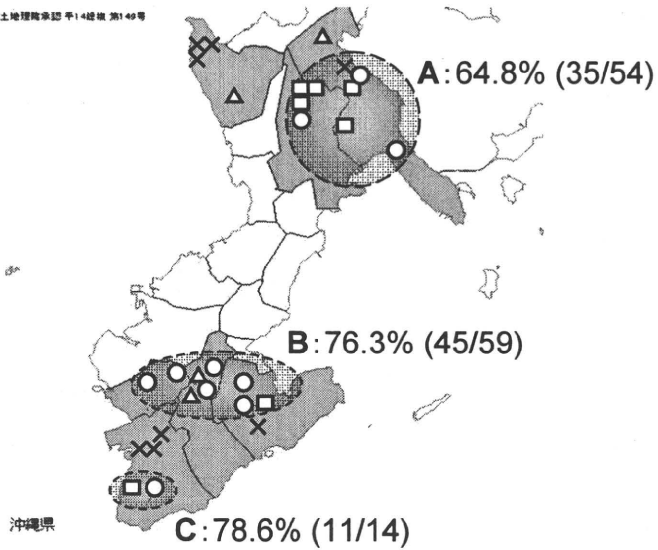


図1. JEVワクチン未使用繁殖豚のJEV抗体陽性率  
 ○: JEV抗体陽性率80~100%、□: 50~79%、△: >0~49%、×: 0%を示す

表1. 西表島のJEV抗体調査結果

採血年	検体数	HI価									JEV抗体 陽性数	JEV抗体 陽性率	IgM陽性		
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280				2560	≥5120
2008-2009	20	5	2	4	5	2	1	1					15	75.0%	0
2009-2010	36	17			1	7	6	4	1				19	52.8%	2
2010-2011	49	36		3	2	5	2	1					13	26.5%	0
合計	105	58	2	7	8	14	9	6	1	0	0	0	47	44.8%	2

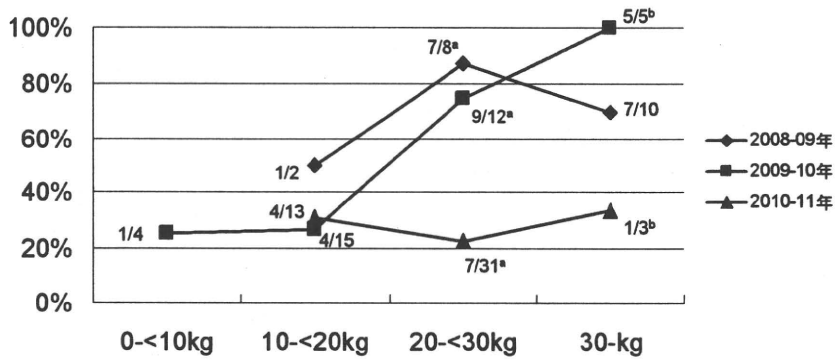


図2. 西表島イノシシの体重別JEV抗体陽性率

a: 20-<30kgにおいて2010-11年と2008-09年および2009-10年の間に有意差あり (p<0.01)

b: 30-kgにおいて2010-11年と2009-10年の間に有意差あり (p<0.05)

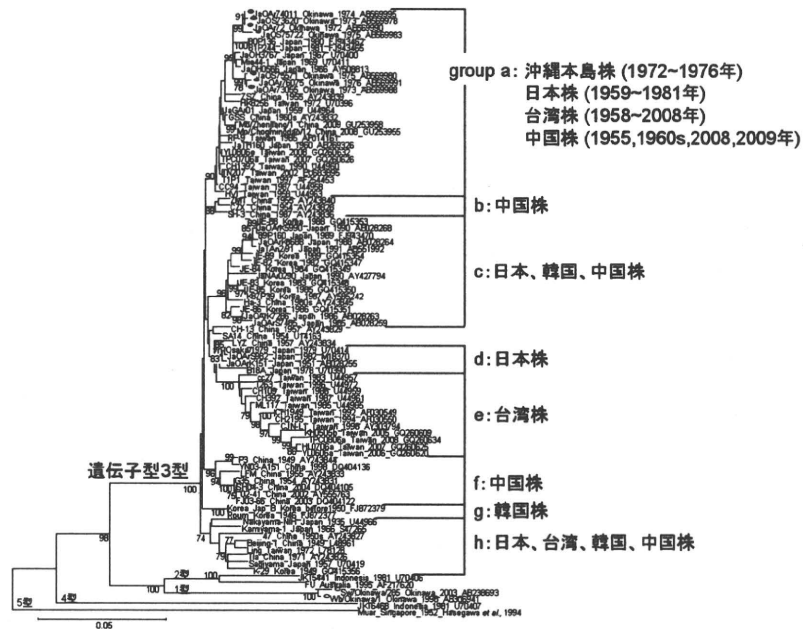


図3. E領域1500ntの系統樹

●は、本研究において解析されたJEV株

		Stop codon	
Beijing-1 Jncr	1	TAGTGTGATTAAAGGAGAAAATAAATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAA-GGA	67
JATAn2/91	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----TGTAAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	58
AB571824 JaOS73620	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGAGATTGTTAAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571825 JaOS73832	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571826 JaOS75571	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571827 JaOS75642	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571828 JaOS75672	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571829 JaOS75722	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571830 JaOS75770	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571831 JaOS75833	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571832 JaOS75918	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571833 JaOA73050	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	55
AB571834 JaOA73055	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571835 JaOA73062	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	55
AB571836 JaOA772	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571837 JaOS76075	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571838 JaOS74728	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571839 JaOS74729	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571840 JaOA74010	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571841 JaOA74011	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB571842 JaOS74801	1	TAGTGTGATTAAAGGTGAAAAGTAGATTATGTAATAATGTAATGA-GAAAATGATGATAATGGA	67
AB471675 okinawa08-402	1	---AAGGATTAAGTAA-----TGTGTGTAATGTGAGATAGAAAATG--TGATGTGGA	50
AB471671 okinawa08-154	1	---AAGGATTAAGTAA-----TGTGTGTAATGTGAGATAGAAAATG--TGATGTGGA	50
AB471672 okinawa08-254	1	---AAGGATTAAGTAA-----TGTGTGTAATGTGAGATAGAAAATG--TGATGTGGA	50
AB471673 okinawa08-372	1	---AAGGATTAAGTAA-----TGTGTGTAATGTGAGATAGAAAATG--TGATGTGGA	50
AB471674 okinawa08-377	1	---AAGGATTAAGTAA-----TGTGTGTAATGTGAGATAGAAAATG--TGATGTGGA	50

1972~1976年  
遺伝子型3型

2008年  
遺伝子型1型

図4. 3'NTR領域の塩基配列

「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」

— 日本脳炎ウイルスの分離とその病原性に関する研究 —

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)

研究要旨： 近年にあつては我が国における日本脳炎患者数は年間10名に満たない数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。今なお分布しているウイルス自身の遺伝子タイプの変遷や変異を考えると、JEVの病原性についての解析は継続して行っていくべきものであろう。我々は毎年石川県におけるウイルス媒介野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点(3地点)、定時期(8月末～9月初)に行い、さらにウイルス病原性についての解析を行っている。過去5年の採集蚊の推移をみると、458匹(2006年)、885匹(2007年)、990匹(2008年)、1336匹(2009年)と続き、2010年は591匹であった。ある程度の数値的差異はあるが、全般的に能登地域での蚊の生息数に大きな変化は無いことを示唆している。本年度も媒介蚊の破碎液を用いてRT-PCR法及び培養Vero細胞によるウイルス分離を行った。その結果、RT-PCR陽性サンプルは6件あり、ウイルス分離を行った結果2株(Ishikawa10(C6)およびIshikawa10(C9))のウイルス分離に成功した。遺伝子解析の結果、分離ウイルスはいずれも遺伝子タイプは1型であった。遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べたところ、Ishikawa10(C6)株ウイルスの細胞での増殖性はJaGAR01株(遺伝子タイプ3型)より若干低く、形成するプラークサイズは小さいものであった。同じく石川県分離JEVのIshikawa-K05株(遺伝子タイプ1型)と類似している、マウスに対する病原性では大きな差異はない。JEV感染に伴う宿主応答における、異なる遺伝子タイプ間での応答差異について、引き続き解析を行っている。感染病態の詳細な解析は将来的に有効治療に向けての有用な基礎データとなる。

A. 研究目的

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間10名に満たない数で推移している。しかしながら、アジア地区での日本脳炎感染者は年間数万人になるとされ、世界的には拡大傾向にある。石川県においても2007年に2名の脳炎患者がでている事実等から日本国内での日脳感染ウイルス(JEV)の動向についてより注意が必要であらう。こうした状況の中で、我々は1998年以来、石川県における定点、定時期で採取した野外蚊からJEVの分離を試みている。本研究では、(1)日本の北部地区石川県におけるJEV分布状況の実態把握、および(2)ウイルス病原性発現機構の解明を研究目的としている。

B. 研究方法

**蚊の採集:** 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによるCO<sub>2</sub>採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い水田で行っている。蚊40匹を1プールとして乳鉢にてPBSを入れ、破碎した。破碎液は遠心(10,000 x g、10分間)にて分画した。  
**RNA抽出及びRT-PCR:** 蚊破碎液を材料としてIsogen試薬を用いてRNA抽出し、得られたRN

Aを用いてRT-PCRを行った。RT-PCRではJEV特異的プライマーのエンベロープ(E)蛋白、NS4a蛋白領域、さらに3'末端領域のプライマーを用いた。

**ウイルス分離:** ウイルス分離のために培養細胞株Vero細胞を用いた。24穴プレートを用い、5%牛胎児血清入りMEM培養液の中でVero細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、BHK細胞を用いてウイルス力価を計測した。

**遺伝子配列解析:** ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

**遺伝子発現・細胞解析:** 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た。細胞解析はフローサイトメトリー(FACS)によって行った。

**マウス実験:** ウイルスのマウスに対する病原性を調べるためにマウスICRにウイルスを接種(ip)し、生死を観察した。なお、倫理的な側面については金沢医大動物委員会での承認を受けて実験

を進めている。

### C. 研究結果

例年、1,000匹台のJEV媒介蚊(458匹(2006年)、885匹(2007年)、990匹(2008年)、1336匹(2009))を採取しているが、2010年は591匹であった。蚊破砕液から得られたRNAについてJEV特異的プライマーを用いたRT-PCR法によって6件の陽性サンプルを得、その後のVero細胞を利用してのウイルス分離でJEV2株分離(Ishikawa10(C6)およびIshikawa10(C9))に成功した。E蛋白についてヌクレオチド解析を行い、新分離ウイルス(Ishikawa10(C6)株とJaGAR01株(遺伝子タイプ3型)とは88.9%、Ishikawa-K05株(遺伝子タイプ1型)とは97%の相同性がみられ、アミノ酸ではそれぞれ97.8%及び99%の相同性がみられた。新分離ウイルスのVero細胞における増殖性は対照に用いているJaGAR01株に比べ低いものであり、また形成するプラークサイズは小さいものであった。生物活性は2005年分離株のIshikawa-K05株と類似な性状を示し、マウスに対する病原性に大きな差異はなかった。新分離ウイルス株を用いたウイルス感染細胞における遺伝子発現(DNAマイクロアレイ、リアルタイムPCR)についての比較解析は現在進行中である。

### D. 考察

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。JEVが北陸地域に分布していることは他のデータも含めてみると明らかと言える。新分離ウイルス(Ishikawa10(C6)株は遺伝子タイプが1型であり、2005年分離のウイルス(Ishikawa-K05)に類似したウイルスであった。遺伝子解析の結果ではE蛋白領域で99%の相同性を示した。生物活性の調査では、比較として用いているJaGAR01株に比べ、細胞での増殖性は若干低いものの、マウスに対する病原性等は必ずしも低くはない。しかしながら、現在の日本国内において分布している遺伝子タイプ1型のJEVウイルスの毒性がどの程度かについてはさらに検討・解析が必要と考えられる。

2007年に日本脳炎患者が石川県において発生していることも重要視すべきである。ワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少がある現在、特に幼児において近い将来に起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要がある。引き続き野外蚊からのウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。

### E. 結論

新たなウイルス分離株を得たことから、石川県での野外蚊(媒介蚊)においてJEV(遺伝子タイプは1型)分布は変わりなく存在すること、またマウス実験から新分

離のJEV株(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より注目すべきであること、さらにDNAマイクロアレイやFACSIによる解析で、細胞レベルでのJEV病原性解析も重要であることが再認識された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Nukuzuma S, Nakamichi K, Kameoka M, Sugiura S, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T: Efficient propagation of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC virus in COS-7-derived cell lines stably expressing Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Microbiol Immunol* 54: 758-762, 2010
- (2) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Nemoto N, Kurihara T, Koga H, Nakagawa H, Takegami T, Tomosugi N, Miyazawa S, Kuwabata S: Ionic liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis. *Microscopy Res Tech* (in press), 2010
- (3) Zhang L, Higashi K, Ishigaki Y, Ueda Y, Sakuma T, Takegami T, Oguchi M, Xu K, Ota Y, Nishida H, Tonami H: Assessment of VEGF-D expression measured by immunohistochemical staining and F-18 FDG uptake on PET as biological prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. *Ann Nucl Med* 24:533-540, 2010

#### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and physiological role of JEV protein NS4a, 1st Asia Pa

cific Workshop on Neurovirology Seoul (2010, 7)

- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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・ペステウイルス研究会、東京 (2010, 12)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案登録  
特に無し
3. その他

厚生労働省科学研究費補助金（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」

分担者研究報告書（H22 年度）

## 日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究

分担研究者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：本研究班のこれまでの調査および近年国内外から発表された報告により、日本において日本脳炎は超低流行状況にあるものの、感染リスクは依然として存在することは明らかである。とくに我々の昨年来の調査により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り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。このような状況のなかで日本において活動しているウイルスとアジアの日本脳炎流行地域のウイルスの差異を継続的に比較研究することは日本における今後の日本脳炎対策を考えるうえで重要である。本年度の研究では平成 20、21 年度に引き続き、ベトナム、中国、日本で過去に分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子の分子疫学解析を継続する一方で、中国本土から日本に飛来する日本脳炎ウイルスの移動ルートと方法を解明することを目的として、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。さらに、ウイルスの病原性（脳炎発症性）について、

### A. 研究目的

1. 中国から日本に飛来する日本脳炎ウイルスの移動ルートと方法を明らかにすること、およびウイルス保有あるいは増幅動物として野生イノシシの役割を明らかにすること、
  2. 日本脳炎ウイルスの病原性とくに中枢神経障害性について分子レベルでその機序を明らかにすること、
  3. 増幅動物であるブタにおける日本脳炎ウイルスの効果的増殖戦略を分子レベルで解明すること、
- 以上を目的に本研究を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. <疫学調査>

##### 1) 蚊の採取

2010 年 9 月 13 日～16 日、五島列島（五島市、新上五島町）においてライトトラップ及び吸血管により捕集した蚊 551 匹を分類後、雌雄判別及び吸血の有無を確認し、54pool（最大 20 匹 / pool）を作製した。媒介蚊の各 pool はホモジナイズした後、Vero 9013 細胞に接種してウイルス分離を行った。

##### 2) ブタの調査

2010 年 1 月から 11 月まで、と畜場に長崎県央地区と五島から出荷されたブタを毎月 1 回 10 頭ずつ（長崎県央地区は 7 月と 8 月に 2 回、

9月に1回追加、五島は8に1回追加)血液を採取し、日本脳炎ウイルスに対する JEV 抗体価 (IgG, IgM) を ELISA 法により測定するとともに Vero 9013 細胞を用いてウイルス分離を実施した。分離・同定した JEV はエンベロープタンパク (E) 領域の塩基配列を決定した。

### 3) イノシシの調査

長崎県内各所 (五島列島と対馬を含む) で捕獲されたイノシシから採血し、ブタと同様に JEV 抗体価 (IgG, IgM) の測定とウイルス分離を実施した。

## 2. <病原性の研究>

5週齢の近郊系 C57BL/6j マウスに日本脳炎ウイルス Ja0ArS982 株を  $10^4$  PFU 皮下感染させ、その病状を観察し体重を測定した。13日目に重症個体と軽症個体を体重減少率により区別し (既報)、それぞれの脳内のウイルス量および炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4) の発現量を比較した。

### 3. <ブタ (細胞) における増殖特性の研究>

サル由来培養細胞 (LLC-MK2) とブタ由来培養細胞 (PS) に日本脳炎ウイルスを感染させ、増殖の拡大 (プラーク形成)、ウイルス増殖度、インターフェロンの産生を継時的に測定した。また感染細胞内でのウイルス発現タンパク質と dsRNA の細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により詳細に解析した。

## C. 結果

### 1. <疫学調査>

1) 五島列島で蚊からの日本脳炎ウイルス分離媒介蚊のホモジネイト 54 プール中からウイルス分離はできなかった。

### 2) ブタの調査

と場で採取した長崎県央地区産 160 頭、五島産 120 頭の計 280 頭のブタ血液のなかで日本脳炎抗体陰性であった長崎県央地区産 49 頭、五島産 42 頭の計 91 頭のブタからウイルス分

離を試みた。その結果、長崎県央地区産 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 (表 1)。現在ウイルス遺伝子の解析を実施している。

と畜場に出荷されたブタの IgM 抗体検査において長崎県央地区では 7 月末から 9 月までの長期にわたり日本脳炎の流行がみられ、五島では 1 週間ほど遅れて流行がみられた (表 2)。8 月末に長崎県 9 年ぶりの患者発生があったことからブタの IgM 抗体検査の結果が地域の流行を反映していることが明らかとなった。

### 3) イノシシの調査

2009 年調査した 192 頭につづき、捕獲したイノシシ 111 頭からはウイルスは分離できなかった (表 3)

捕獲イノシシの抗体検査においては、2009 年の調査結果につづき長崎本土と五島列島、対馬において抗体陽性個体が確認された (表 3)。抗体保有率は 60%~77% であった。昨年も報告したが、離島調査地域の上五島と対馬ではブタは飼育されておらず、この地域ではブタを介しない日本脳炎ウイルスの伝搬が存在することが改めて確認できた。

## 2. <病原性の研究>

結果を図 1 に示す。重症個体では大脳皮質におけるウイルス量が軽症個体にくらべ高かった。また、大脳皮質における TNF alpha の発現が有意に上昇、IL-2、IL-4 低下していた。したがって、これらのサイトカインが関係した炎症反応が重症化に関わっていることが考えられた。

### 3. <ブタ (細胞) における増殖特性の研究>

図 2(A) に示すように日本脳炎ウイルスはブタ由来細胞 (PS) においてサル由来細胞 (LLC-MK2) よりも高い増殖性と感染拡大 (プラークサイズ) をしめした。しかしながらブタ



細胞ではインターフェロンの産生はサル細胞より遅れた立ち上がる現象が見られた(図 2C)

日本脳炎ウイルス感染でインターフェロンの誘導物質としてはウイルス由来 dsRNA が細胞の細胞質中に存在するリセプターにより認識されることにより誘導される。抗 dsRNA 抗体を用いた観察により、dsRNA は感染後しばらくの間、細胞質内に露出せず、粗面小胞体に存在することが示された。特にブタ細胞においてはサル細胞よりも長く粗面小胞体にとどまり細胞認識機構から回避していることが観察された。(図 3C)

#### D. 結論

- 1) 2008 年、2009 年につづき 2010 年も五島列島で日本脳炎ウイルスを分離した。
- 2) 2010 年にと場で採取したブタ血液から日本脳炎ウイルスを分離した。
- 3) 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。
- 4) マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの中樞神経への病原性の強弱は個体それぞれの炎症性サイトカインの発現パターンにより決定されていることが示唆された。
- 5) 日本脳炎ウイルスはブタ細胞においてその遺伝子複製産物である dsRNA の細胞質への露出を遅延させ、インターフェロンの産生を遅らせていると結論した。

#### E. 考察

- 1) 3 年間にわたり五島列島において日本脳炎ウイルスがブタあるいはコガタアカイエカから分離された。本年度分離したウイルスの遺伝子解析は現在進行中であるが、昨年の分離株とは異なり、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。

2) 日本脳炎ウイルスの感染においては 200 人～2000 人に一人の人が脳炎を発症するといわれている。この脳炎発症に関して今、明らかにしつつある炎症性サイトカインの発現差が重要である可能性が示唆され、今後効果的な治療法の開発、たとえば重症化に関与するサイトカインの抑制薬の開発などを進めるうえで重要な知見が得られたと考える。

3) ブタ細胞における日本脳炎ウイルスの高い感受性にかんして、細胞レベルではウイルスによるインターフェロンの発現遅延作用の関与が明らかになったが、ブタ個体レベルでの高い感受性についてもこの機構が関与するか否かについて今後の研究を展開する必要がある。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

- 1) 論文発表

Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K., Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* Vol.10(2): 143-150, 2010

Nabeshima T and Morita K.

Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. *Future Virology*. Vol.5(May) 343-351. 2010

Kenta Okamoto, Yushirou Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Do Phuong Loan, Bui Minh Trang, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Development of a rapid and comprehensive

proteomics-based arboviruses detection system. *J.Virol.Meth.* Vol.167:31-36. 2010

Daisuke Katoa, Shota Era, Ippei Watanabe, Masataka Arihara, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, Yasuo Suzuki, Kouichi Morita, Kazuya I.P.J. Hidari, Takashi Suzuki. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Research* Vol.88:236-243. 2010

森田公一、3. 期待されているこれからのワクチン 8) ウエストナイル熱、臨床検査、Vol. 54:1411-1446, 2010

## 2) 学会発表

### 国際会議における発表

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

### 国内会議における発表

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・テュアン・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. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(表1) 屠場ブタからの日本脳炎ウイルス分離成績

Collection Year	Number of Sera	No. of JEV Seronegative Sera	Number of JEV Isolates	Strain
2001	144	60	9	JaNP-26-01, JaNP-32-01, JaNP-43-01, JaNP-45-01, JaNP-48-01, JaNP-53-01, JaNP-55-01, JaNP-59-01, JaNP-60-01
2002	160	20	0	
2003	155	107	3	JaNP-59-03, JaNP-76-03, JaNP-84-03
2004	133	57	2	JaNP-52-04, JaNP-77-04
2005	160	57	5	JaNP-42-05, JaNP-57-05, JaNP-62-05, JaNP-65-05, JaNP-100-05
2006	152	67	2	JaNP-69-06, JaNP-70-06
2007	80	23	1	JaNP-12-07
2008	80	0	0	
2009	80	0	2	JaNP-22-09, JaNP-25-09
2010	280	91	3	JaNP-95-10, JaNP-96-10, JaNP-84G-10

(表2) と畜場出荷ブタの IgM 抗体検査とウイルス分離の結果

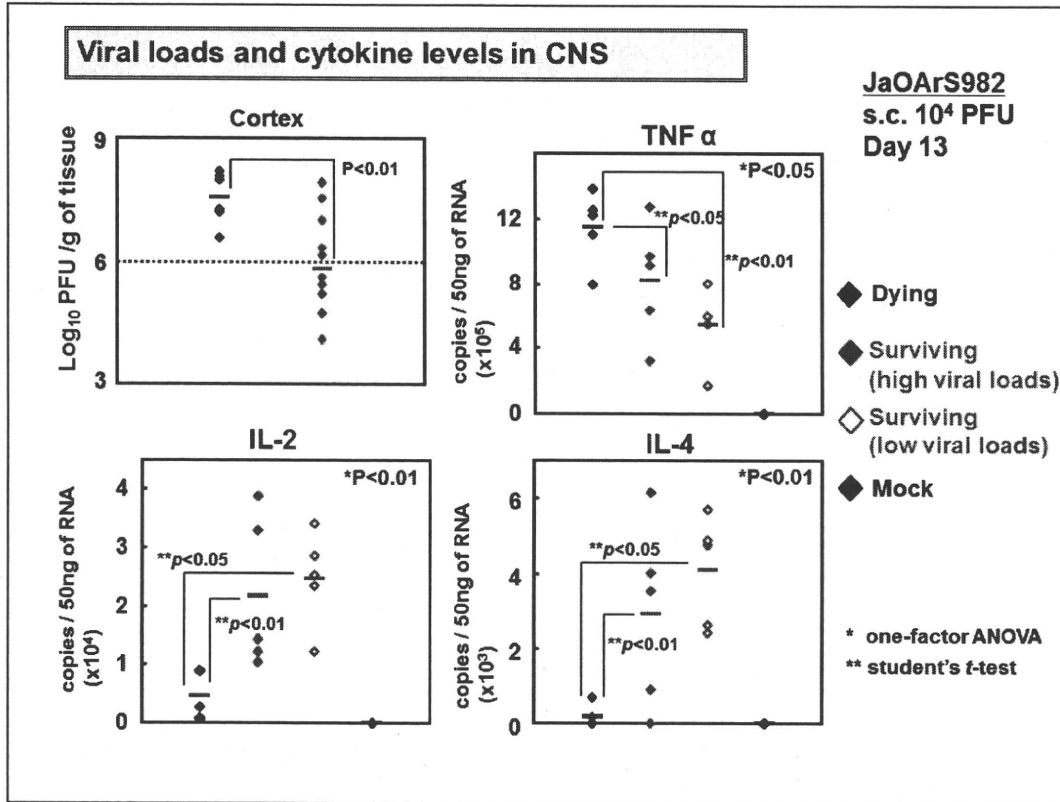
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月初	7月中	7月末	8月初	8月中	8月末	9月初	9月中	10月	11月
長崎	IgM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	4	7	5	0	0
	分離	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
五島	IgM	0	0	0	0	0	0	0			0	5		8		0	0
	分離	0	0	0	0	0	0	0			0	1		0		0	0

(表3) 捕獲イノシシの抗体検査とウイルス分離の結果

	調査頭数	抗JEV IgG陽性(%)	抗JEV IgM陽性(%)	ウイルス分離
長崎	73	49 (67.1)	0 (0.0)	0/24
県北	20	15 (75.0)	0 (0.0)	0/5
上五島	13	10 (76.9)	0 (0.0)	0/3
対馬	5	3 (60.0)	0 (0.0)	0/2
合計	111	77 (69.4)	0 (0.0)	0/34

: ブタの非飼育地区

(图 1)



(图 2)

