

学会、2009年8月(山口)

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、
亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健
「イヌの全国調査から再確認された日本脳
炎ウイルスの蔓延」第148回日本獣医学会
学術集会、2009年9月(鳥取)

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、
亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健
「イヌの抗体保有状況から再確認された日
本脳炎ウイルスの蔓延」平成21年度日本獣
医公衆衛生学会[中国]、2009年10月(島根)

Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim
Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi,
Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi
Que Huong, Maria del Carmen Parquet,
Futoshi Hasebe, Kouichi Morita :
Frequent introductions of Japanese
encephalitis virus from Southeast Asia
and continental East Asia to Japan.
International Joint Forum on Infectious
Diseases 2009. Siam City Hotel,
Bangkok, Thailand、2009年9月

左一八、在原雅貴、加藤大介、渡邊一平、
森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルス感染
における硫酸化糖鎖分子の構造と機能。第
44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海
道千歳市、2009年6月

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：
長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保
有率調査(第2報)。第44回日本脳炎ウイ
ルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年
6月

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：
長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイ
ルス感染状況。第57回日本ウイルス学会学術
集会・東京都千代田区都市センター、2009
年10月

村上 学、上村 清、及川陽三郎、太田隆
英、石垣靖人、竹上 勉：石川県での分離
JEV(Ishikawa-K05)の細胞と実験動物での
毒性 第44回日本脳炎ウイルス生
態学研究会、小樽(2009.6)

村上 学、及川陽三郎、上村 清、竹上
勉：石川県内の水田近辺で行ったCDC型ト
ラップによる蚊の採集結果、第16回ト
ガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京
(2009, 10)

村上 学、竹上 勉：Ishikawa-K05(2005
年石川県分離日本脳炎ウイルス)感染時の
細胞毒性と細胞応答、第57回日本ウイ
ルス学会、東京(2009, 10)

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 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 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 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, Soengeng
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：勧奨接種ワクチン」 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, 44th 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 44th Joint Working Conference on Viral Diseases Sapporo, Japan. June 28-30, 2010

Kouichi Morita: Rapid and comprehensive arboviruses detection by using nLC-ESI/MS/MS, 14th 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・デュアン・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）
分担研究総合報告書

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

ヒト血清中の日本脳炎ウイルス NS1 抗体を測定する ELISA 法

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）

田部井 由紀子（東京都健康安全研究センター）

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およ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（平成20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。2 年目（平成21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。また、熊本県（2004年～2008年）および東京都（2004年～2006年）における1.3%～2.6%の平均年間自然感染率を明らかにした。最終年度（平成22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に ELISA 法のプロトコルを作成して評価した。

A. 研究目的

日本脳炎は、致死率（約20%）が高い重篤な疾患である。日本において、1960年代中頃まで年間1,000例以上あった患者数が、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公表した。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および

今後の予防戦略に重要である。

ワクチン接種集団中の自然感染個体を識別する方法として、非構造蛋白に対する抗体を測定する方法がある。不活化ワクチンは、構造蛋白に対する抗体のみを誘導するが、一方感染を受けると構造蛋白に加え、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。当研究室では、非構造蛋白の一つである NS1（nonstructural protein 1）を対象とし、ヒトおよびウマにおける NS1 抗体を測定する免疫染色法を確立した。しかし、免疫染色法は手技がやや煩雑で結果を肉眼で判定するなどの問題点があった。ウマにおいては、より客観的かつ多数検体処理可能な ELISA 法を確立できたが、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。本研究では、疫学調査に有用であるヒト血清中の NS1 抗体を測定する ELISA 法の確立、およびその技術を地方衛生研究所に移転するためのプロトコルの作成および評価を目的とした。

B. 研究方法

ヒト血清：JEV 感染陽性対照として、タイ国人および韓国人 JE 患者血清 10 検体を用いた。陰性対照として、黄熱ワクチン未接種米国人健康者血清 40 検体を用いた。自然感染率の調査には、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熊本県住民の血清（2004～2008 年に 1190 検体）および東京都住民の血清（2004～2006 年に 955 検体）を用いた。

動物血清：8 週令の ICR マウス、3 ヶ月齢のブタ（クラウンミニ系）、カニクイザルに JEV を実験感染させた後の血清を用いた。

抗体：JEV の NS1 抗原特異的マウスモノクローナル抗体 JE-6H4 は、ウエスタンブロットにおける陽性対照に、JE-2D5 は NS1 抗原のアフィニティ精製および NS1 抗原測定 ELISA に用いた。

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。

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。

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 % Tween 20, 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。

ウエスタンブロット法：精製 NS1 抗原を非還元下において 10 %ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。転写後、ヒト血清、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体、ニトロブルーテトラゾリウムを順次反応させた。

中和試験：ヒト血清は 50%プラーク減少法、また動物血清は 90%プラーク減少法により中和抗体価を測定した。

（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倫理委員会において承認された。また、動物血清を採取した実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された後に実施した。

C. 研究結果

陽性判定のカットオフ値：米国人健常者血清 40 検体を測定した結果、ELISA 値の平均は 0.0167、標準偏差は 0.0473 であり、確率水準 0.1 % の信頼限界である 0.185 をカットオフ値として設定した。

免疫染色法との比較：三木市住民血清を用いて、ELISA 法を免疫染色法と比較した。両測定法間の相関係数は、0.764 ($P < 0.001$) であり、結果の一致率は 82.5 % であった。

ウエスタンブロット法による NS1 抗体の確認：ELISA 法で NS1 抗体陽性と判定された検体をウエスタンブロット法で調べた結果、NS1 の分子量の位置にバンドを検出した。

JEV 感染した動物血清中の NS1 抗体の測定：JEV を実験感染させたマウス、ブタ、サルより経時的に採取した血清を測定した。マウスおよびブタでは感染後 6 日目、サルでは感染後 4~5 週目から NS1 抗体の上昇が認められた。

NS1 抗体保持期間の推定：ELISA 値が陽転してから陰転するまでの期間を求めるために、三木市住民から 1 年間隔で採取されたペア血清を測定し、4.2 年を NS1 抗体保持期間と推定した。

第 1 バージョンの ELISA 法の問題点と改良：熊本県住民血清の NS1 抗体を測定した結果、ワクチン接種歴が無く、また中和抗体も陰性である 1~5 歳の小児の 102 検体中 21 検体 (21%) が陽性となった。ウエスタンブロットで解析した結果、これらの血清検体中に BSA 抗体が含まれており、第 1 バージョンの NS1 抗体測定 ELISA における偽陽性反応の原因となることが判明した。解決法の 1 つは、NS1 抗原中の BSA 量を 1 ng/ml 以下 (NS1 抗原量の 1% 以下) に低下させることである。もう 1 つは、抗原非感作ウエルに、NS1 抗原に混入した

BSA 量と同じ量の BSA を感作させ、感作ウエルとの吸光度の差を求める方法である。

熊本県住民の NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率：改良した ELISA 法により、2004~2008 年に収集された熊本県住民の血清 1190 検体の NS1 抗体を測定した。陽性率は 7.6% であり、平均年間自然感染率は 1.8% であった。

熊本県住民の中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率：0~9 歳のワクチン非接種者 145 名の中で、中和抗体陽性者は 15 名 (10.3%) であった。145 名の平均生存期間は 4.0 年であったので平均年間自然感染率は 2.6% ($10.3/4.0$) と計算された。

東京都住民の NS1 抗体陽性率から推定された年間自然感染率：2004~2006 年に収集された東京都住民の血清 955 検体における NS1 抗体陽性率は 5.5% であった。平均年間自然感染率は、1.3% であった。

東京都住民の中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率：熊本県住民と同様に平均年間自然感染率を計算した結果、2.6% であった。

ELISA 法の予備的技術移転：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プロトコルを作成した。そして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。これら 2 名の技術員の得た成績 (ELISA 抗体値) 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。

D. 考察

ELISA 法に用いられる希釈液には、0.05% Tween20 添加 PBS、またはそれに BSA を添加する場合が多い。JEV の NS1 抗体を測定する ELISA 法においては、BSA を希釈液に含める系では非特異反応が高く、不顕性感染で生じる低いレベルの NS1 抗体

を捉えることができなかった。本研究により、希釈液にBSAでなく、カゼインを用いることで非特異反応を低減し、低レベルのNS1抗体を測定できるようになった。ヒト血清中のBSA抗体が偽陽性反応を生じることが問題となったが、本研究で解決法も示した。

熊本県および東京都住民の血清を用いて、2種の異なる検査法(NS1抗体ELISAと中和試験)から推定される年間自然感染率を比較した結果、NS1抗体陽性率から推定された年間自然感染率は、中和抗体陽性率から推定された年間自然感染率とほぼ同等かやや低い値であり、NS1抗体を測定するELISA法が年間自然感染率の推定に使用できることが示された。同時にNS1抗体陽性率および中和抗体陽性率から得られた1.3%~2.6%というヒトの年間自然感染率は、熊本県および東京都におけるJEVの自然界での活動を証明する。

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も行った。その結果、プロトコルはこれらの技術員に首尾よく受け入れられた。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法を確立および評価し、自然感染率の推定に適することを示した。また、熊本県および東京都において、現在でもヒトがJEVの暴露を受けていることを明らかにした。さらに、地方衛生研究所への技術移転のためにプロトコルを作成した。

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

Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26, 2772-2781, 2008.

Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27, 769-770, 2008.

Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi Yamanaka: Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61, 410-411, 2008.

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。 *臨床と微生物*, 36, 41-44, 2009,

小西英二: 日本脳炎 DNA ワクチンの開発。 *臨床獣医*, 27 (3), 22-26, 2009

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A.: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 May;80(5):856-61.

Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of

viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine*. 2009 Jun 8;27(28):3735-43.

Konishi E, Kitai Y.: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine*. 2009 Nov 23;27(50):7053-8.

Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine*. 2009 Nov 23;27(50):7129-30.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A.: A simple assay system for infection-enhancing and neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 2010;163:360-367.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S and Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.

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

Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, Eiji Konishi: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences

Program. May, 2008

山中敦史、酒井陽平、小西英二: インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

北井陽子、近藤高志、小西英二: ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二: 日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中のWNV特異NS1抗体測定: ブロッキングELISA法とCDC法の評価。第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2008年10月

宮川優子、山中敦史、小西英二: デング2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二: 補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的NS1抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

桑原三和、小西英二: 日本脳炎ワクチン抗

原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月

Atsushi Yamanaka, Soengeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Eiji Konishi: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Atsushi Yamanaka, Soengeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Aryati, Puspa Wardhani, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Eiji Konishi: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Peter W. Mason, Douglas Widman, Tomohiro Ishikawa, Nigel Bourne, Ryosuke Suzuki, Evandro Winkelmann, Ilya Frolov, Ricardo Carrion, Eiji Konishi: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, January 2009

山中教史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soengeng Soegijanto、小西 英二: インドネシアの Dengue 熱・Dengue 出血熱患者における血清中の総補体価 CH50 の測定。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

北井 陽子、原田誠也、西村浩一、田部井

由紀子、小西 英二: NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

桑原三和、小西英二: 昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi and Eiji Konishi: A method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue type 2 virus using K562 cell layers. Forty-third Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, 2009年7月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soengeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soengeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2009年9月

山中教史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen

Susilowati, Eryk Hendrianto, Takako Utsumi, Mochamad Amin, Maria Inge Lusida, Soengeng Soegijanto, 小西英二 : 2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

田渕裕子、山中敦史、小西英二 : 準接着系K562細胞を用いたデング2型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

山中敦史、Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soengeng Soegijanto, 小西英二 : インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

宮川優子、小西英二 : デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

小西麻由、小西英二 : 日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

瀧澤山人、小西英二 : デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

田渕裕子、山中敦史、小西英二 : デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10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, Soengeng 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

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」
平成 20-22 年度 分担研究総合報告書

イノシシから分離された日本脳炎ウイルスの性状解析と
急性脳炎患者への γ -グロブリン製剤投与と日本脳炎血清診断 IgM 抗体検査系の標準化

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）
協力研究者 小滝 徹、池田真紀子、田島 茂、倉根一郎
（国立感染症研究所ウイルス第一部）
沢辺京子、小林陸生（国立感染症研究所昆虫医科学部）
島津幸枝（広島県立総合技術研究所保健環境センター）
小川知子（千葉県衛生研究所 ウイルス研究室）
原田誠也（熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部）
湊 千壽（静岡県環境衛生科学研究所 微生物部）
脇口 宏（高知大学医学部小児思春期医学）
山遠 剛（国立病院機構高知病院小児科）
石井亜紀子（筑波大学臨床医学系神経内科）

研究要旨：日本脳炎ウイルスの越冬に関する謎は解明するために、日本脳炎ウイルスの増幅動物として最も効率の良い動物であるブタ以外にイノシシの可能性を検討した。西日本を中心に住環境に野生のイノシシが出現する機会が増え、イノシシが日本脳炎ウイルス抗体を有していると報告されるようになってきた。そこでイノシシがブタ同様、日本脳炎ウイルスの増幅動物であり、感染源となりうるのかという点から、兵庫県西宮市を中心に住環境に出現し、有害鳥獣として捕獲されたニホンイノシシ (*S. scrofa leucomystax*) の血液から日本脳炎ウイルスの分離を試み、2008 年 12 月上旬に捕獲されたイノシシから日本脳炎ウイルス (JaNB037 株) を分離できた。2009 年度は分離ウイルスの性状解析を行った結果、現行細胞培養日本脳炎ワクチン (北京株) により免疫されたマウスの血清は、JaNB037 株を十分に中和した。また、2008 年-2009 年のブタからの分離ウイルスの E 領域のアミノ酸配列を比較したところ E 領域 142 番目のアミノ酸が、セリンであり他のブタ由来の株ではフェニルアラニンであったところが異なっていた。また 3' NCR の遺伝子配列においても欠損部位が異なっていることが確認された。一方、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。本方法はブタやイノシシ用の IgM 抗体検出にも応用可能である。また、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。したがって、 γ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例でも IgM 捕捉 ELISA 法は極めて有用である。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスの研究は、1960年代の年間数千人の患者の発生があった当時、日本脳炎の研究も活発にすすめられた。しかし、日本脳炎ウイルスの越冬に関する謎は解明にいたらなかった。日本脳炎ウイルスの増幅動物としては、ブタが最も効率の良い動物である。近年、西日本を中心に住環境に野生のイノシシが出現する機会が増えている。イノシシの日本脳炎ウイルスに対する感受性および増殖性が、ブタと同等であった場合、ヒトへの新たな感染リスクの一つとなる。そのため、捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルスの分離を試み、野生のイノシシから日本脳炎ウイルス JaNBo37 株を分離し、遺伝子解析・性状解析を実施した。

B. 研究方法

1) イノシシからの日本脳炎ウイルス分離ウイルス

2008年12月12日に兵庫県西宮市甲陽園目神山町で捕獲されたイノシシから分離された日本脳炎ウイルス JaNBo37 株を分離した。

ウイルス遺伝子検出：

イノシシの血清 200 μ l から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) によりウイルス遺伝子を検出した。プライマー・プローブセットは遺伝子 1 型用、3 型用および共通プライマー・プローブセットの 3 種類を用いた、リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937, 2004) の方法により、Step One Plus-1 リアルタイム PCR システム (ABI 社) により実施した。

ウイルス分離：

千葉、静岡、広島、熊本のブタ血清からウイルス分離にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた。また、血清中感染性粒子数は、Vero 細胞を用いたプラーク形成法により実施した。

ウイルス遺伝子配列の決定：

JaNBo37 株およびブタからの分離ウイルスは日本脳炎ウイルス 1 型遺伝子用のプライマーを用いてダイレクトシーケンシングにより、ABI prism Avant 7100 (ABI 社) により

プロトコールに従い塩基配列を決定した。

中和試験

細胞培養日本脳炎不活化ワクチンを 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍希釈し、それぞれ 0.5mL を 4 週令の一群 10 匹のマウス (DDY) に 1 週間隔で腹腔内投与により 2 回免疫したマウスの血清を用いて、チャレンジウイルスを Bejin-1 株および JaNBo37 株にてプラーク減少法により中和能を解析した。

2) IgM 捕捉 ELISA 法の標準化

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 (ショ糖密度勾配法) 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。

3) γ -グロブリン製剤を投与された急性脳炎症例について検討

急性脳炎を発症し、 γ -グロブリンを投与された 2 症例に関して日本脳炎抗体検査を実施した。

C. 研究結果

1) イノシシからの日本脳炎ウイルス分離

イノシシから分離されたウイルスは、遺伝子 1 型ウイルスであり、近年日本国内のブタから分離されるウイルスと近似であり、2004 年に三重県のブタから分離されたウイルス (Mie40 株, GenBank#AB231463) との相同性は 99.4% であった。2008-2009 年度のブタからの国内分離株とも極めて近似であったが、E 領域 142 番目のアミノ酸が、セリンであり他のブタ由来の株ではフェニルアラニンであったところが異なっていた。また日本脳炎ウイルスで遺伝子欠損がよく認められる 3'NCR の領域については、上流域の近い部位に欠損が存在したが、ブタからの分離株では、22-30 番目の 9 塩

基が欠損していたが、JaNBo37 株では 31-37 番目の異なる部位の 7 塩基が欠損していた。

分離ウイルスの免疫学的性状解析を行った結果、現行細胞培養日本脳炎ワクチン（北京株）により免疫されたマウスの血清は、JaNBo37 株に対してホモウイルス（Beijing-1）に対する中和力価と比較して相対力価 0.64 であったが、感染防御効果としては十分な力価を示した。

2) IgM 捕捉 ELISA 法の標準化

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。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。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

3) γ -グロブリン製剤を投与された急性脳炎症例

1 例は日本脳炎症例、他の 1 例は日本脳炎ではなかった。しかし、どちらも国内で製造されたグロブリン製剤であったため、抗日本脳炎 IgG 抗体、中和抗体上昇した。しかし、非日本脳炎症例では抗日本脳炎 IgM 抗体は陰性であり、日本脳炎症例では血清、髄液ともに IgM 抗体が陽性であった。

D. 考 察

1) イノシシからの日本脳炎ウイルス分離

野生のイノシシから分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析、性状解析を行った。2008-09 年の千葉、静岡、広島、熊本のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス（genotype 1）と E 領域のアミノ酸配列と 3'NCR の塩基配列を検討したところ、わずかな相違が認められた。この変異が病原性に関与するかどうかは不明である。また、イノシシに感染したことで生じた変異か、もともとこの変異のあるウイルスに感染したのかも不明である。

しかし、現行細胞培養日本脳炎ワクチン（北京株）により免疫されたマウスの血清は、JaNBo37 株を十分に中和したことから、

現行ワクチンの接種が感染防御に有効であることが示唆された。

2) IgM 捕捉 ELISA 法の標準化

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った。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。2 次抗体も良好な反応性を確認した。今回完成した *in house* キットは、十分な感度・特異性を有すると考えられた。

3) γ -グロブリン製剤を投与された急性脳炎症例

髄液中の日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体は、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。また、血清中および髄液中 IgM 抗体は、 γ -グロブリン製剤の投与にも左右されない。したがって、IgM 抗体測定は診断上非常に有用である。

E. 結 論

野生イノシシから分離された日本脳炎ウイルス（JaNBo37 株）に対して、現行日本脳炎ワクチンは有効であることが確認された。また、現在ブタの間で感染している日本脳炎ウイルス（遺伝子 1 型）と近似であるが、E 領域および 3'NCR 領域においては、わずかであるが相違が認められた。

血清中および髄液中 IgM 抗体は、 γ -グロブリン製剤の投与にも左右されない有用な実験室診断法である。本研究班では、日本脳炎 IgM 抗体検査用の *in house* キットを完成し標準化した。

F. 健康危険情報

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.

- 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.

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)
- 6) 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

- 7) 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

- 8) 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.

- 9) 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

- 10) 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

- 11) 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

- 12) 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

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 20 - 22 年度 分担研究総合報告書

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、2008 年度～2010 年度の 3 年間、飼育ブタの HI 抗体検査を強化した。その結果、HI 抗体保有時期と保有率、すなわち、JEV の活動は地域によって異なることが判明した。そこで、JEV 高活動地域のブタを対象として検査を行ったが、2009 年度は患者発生日より先に日本脳炎（JE）注意報を発令することができなかった。このことから、時宜を得た JE 注意報を発令するためには、JEV 高活動地域のブタを検査対象とし、さらに、発令基準の変更を検討する必要性が感じられた。

HI 抗体検査に用いたブタ血清から、この 3 年間に 11 株の遺伝子 I 型 JEV が分離された。また、2009 年度と 2010 年度は、リアルタイム PCR 法による遺伝子検査を併用したところ、それぞれ 180 検体中、18 検体と 29 検体から I 型 JEV 遺伝子が検出された。ただし、検出時期は 7 月下旬～9 月初旬の約 1.5 ヶ月に限られ、10 月以降は検出されなくなった。しかし、分離 JEV のシーケンス解析では、越冬株の存在を暗示する結果が得られている。

研究期間中に報告された JE 患者は 2009 年度の 1 名のみであった。患者はワクチン未接種の男児（7 歳 10 ヶ月）で、髄膜炎症状を呈し、脳炎までは至らずに回復した。このような症状であったことから、原因不明として冷凍保存されていた 1994 年度以降の髄液 225 検体について、リアルタイム PCR 法及び IgM Capture ELISA 法による JEV 検査を行った。結果は、JEV 遺伝子は検出できなかったものの、3 検体から IgM 抗体が検出された。

JEV ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられた 2005 年 5 月以降、ワクチン未接種児が増加していることから、小児を中心に中和抗体の検査を強化した。移行抗体の影響がなく、かつワクチン歴の信憑性が高い 1 歳～9 歳のワクチン未接種児の中和抗体保有率から、2004 年度～2010 年度の年間自然感染率は 2.2%と算定された。また、JEV 自然感染者のみに特異的とされる NS1 抗体保有率に基づく同期間の年間自然感染率は 1.5%であった。したがって、熊本県では、まだ JEV 自然感染の可能性があり、ワクチン接種の重要性が示唆された。

最後に、手間の係る中和抗体測定法を簡便化するため、厚生労働省流行予測事業検査術式に記載された 50%ブランク減少法（P 法）において、48 ウェルプレートを利用した血清希釈・中和法を考案した。これにより、検査に要する期間が原法の約半分に短縮された。その後、さらに簡便な PAP 法を応用した 50%フォーカス減少法（F 法）との比較検討を行ったところ、P 法と F 法には強い相関があり、F 法でも十分有効であることが確認された。

A. 研究目的

過去、熊本県は全国でも有数の日本脳炎 (JE) 患者多発県であったが、全国的な傾向で 1960 年代半ばをピークに患者数は激減した。特に 1991 年度以降は 1 人以下となり、2000 年度～2003 年度は患者発生のない年が続いた。しかし、2004 年度と 2005 年度に各 1 人、2006 年度に 3 人、及び 2007 年度に 1 人と、患者発生が続いていた。

本研究では、1.ブタ血清中の抗体検査と JE 注意報発令基準の検討、2.ブタ血清の JE ウイルス (JEV) 検査、3.ヒト血清の中和抗体及び NS1 抗体検査並びに年間自然感染率の推定、4.JE 患者調査、5.原因不明保存髄液からの JEV 検査、及び 6.JEV 中和抗体測定法の改良・比較等を通して、熊本県における JEV の活動状況を明らかにし、今後の JE 予防戦略構築の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法

1.ブタ血清中の抗体検査と JE 注意報発令基準の検討

2008 年度～2010 年度の 3 年間、厚労省感染症流行予測事業の JEV 感染源調査を強化した。すなわち、毎年 7 月～9 月間に、県内各地の豚舎から熊本畜産流通センターに搬入された飼育ブタの放血液を毎週 1 回、飼育地域別に 5 頭ずつ 20 頭分を計 9 回、180 頭分採取した。検査法は平成 14 年 6 月版の本事業の検査術式 (流行予測検査術式) に従い、JaGAR#01 株 (デンカ生研) を抗原として HI 抗体及び 2-ME 感受性抗体を測定した。

また、その結果と患者調査を基に、JEV 活動の地域特性と JE 注意報発令基準との関連性を検討した。

2.ブタ血清の JEV 検査

HI 抗体測定に用いたブタの血清から、細胞培養法で JEV 分離を行った。分離された JEV は、エンベロープ (E) 領域 1,500 塩

基及び 3'非翻訳領域 (NCR) 約 500 塩基について、ダイレクトシーケンスにより解析した。また、2009 年度及び 2010 年度はリアルタイム RT-PCR 法による JEV 遺伝子を併用した。さらに、2010 年度は 10 月以降も、月に約 40 頭のブタから採取した血清中の JEV 遺伝子検査を継続し、JEV の越冬機序解明を試みた。

3.ヒト血清の中和抗体及び NS1 抗体検査並びに年間自然感染率の推定

厚労省感染症流行予測事業の JEV 感受性調査によるヒト血清の中和抗体検査を強化した。すなわち、2008 年度は 326 検体、2009 年度は 276 検体と 2005 年度の保存血清 225 検体、及び 2010 年度は 274 検体のヒト血清について、流行予測検査術式に準じた改良 50%プラーク減少法 (P 法) で中和抗体を測定した。

移行抗体の影響がなく、かつワクチン歴の信憑性が高い 1 歳～9 歳のワクチン未接種児の中和抗体保有率から、2004 年度～2010 年度の年間自然感染率を算定した。

また、小西らの開発した NS1-ELISA 法で 2004 年度～2010 年度に採取したヒト血清から NS1 抗体を測定した。得られた NS1 抗体保有率から、NS1 抗体保持期間を 4.2 年として、2004 年度～2010 年度の年間自然感染率を求めた。

(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頂いた。また、NS1 抗体検査に際し、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会の承認を得た。

4.JE 患者調査

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) の JE 発生届に基づき調査した。患者検体が入手できたものは、IgM Capture ELISA 法による JEV 及びウエストナイルウイルス (WNV) に対する IgM 抗体の測定、培養細胞による JEV 分離、リアルタイム RT-PCR 法及び