

Nested RT-PCR 法による JEV 遺伝子の検出を行った。さらに、PCR 陽性検体はシーケンス解析により遺伝子型を決定した。

5.原因不明保存髄液からの JEV 検査

2009 年に報告された JE 患者 1 名は髄膜炎症状のみで回復したことから、当所に検査依頼があり、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 法で JEV 検査を行った。

6.JEV 中和抗体検査法の改良・比較

JEV に対する中和抗体検査に際し、多検体の検査が簡便に行えるよう、流行予検査術式に記載された P 法の検体希釈・中和工程を改良した。すなわち、血清の希釈に 48 ウェルプレートと 12 チャンネルマイクロピペットを用いて 2 倍階段希釈を行った。希釈後、ウイルス (JaGAR#01 株) 液を加えて混合し、シールしてビニール袋に入れ、37°C の温浴中で 90 分間中和した。中和終了後は直ちに氷上に置き、従来法同様 6 ウェルプレートに単層培養した Vero9013 細胞に摂取して検査を続行した。

また、2010 年度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改良 P 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 (F 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.ブタ血清中の抗体検査と JE 注意報発令基準の検討

HI 抗体検出時期と保有率はブタの飼育地域によって差があった。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。特に県下有数の畜産地帯で出荷頭数が多く、検査対象となる機会の多かった地域は、HI 抗体の保有時期が遅く、保有率も低かった。そこで、JEV 高活動地域のブタを対象とした検査に変更したところ、測定し

た週による HI 抗体価のバラツキはかなり改善された。しかし、それでも 2009 年度は、患者発生日より先に JE 注意報を発令することができなかった。

2.ブタ血清の JEV 検査

2008 年度に 1 株、2009 年度に 5 株、2010 年度に 5 株の JEV が分離された。以前の分離株と併せ、2005 年度～2009 年度分離の 20 株についてシーケンス解析を行ったところ、全株遺伝子 I 型の JEV で、3' NCR には、ストップコドンの少し下流に 13 塩基と 2 塩基の欠失が認められた。その他、ストップコドン直後に 5 塩基欠失のある株、13 塩基欠失の少し下流に 9 塩基欠失のある株及びこれらの欠失のない従来型配列株の 3 種類に大別された。

E 領域で作成した分子系統樹は 3' NCR の特徴をよく反映したものであり、異なった年度の分離株が同じクラスターに分類される等、越冬株の存在を暗示するような結果が得られた。

また、リアルタイム PCR 法による 2009 年度及び 2010 年度の遺伝子検査では、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。

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

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、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。

年齢別抗体保有率の推移は、例年ほぼ同様で、20 歳前後にピークがあり、年とともに漸減して 40 歳代後半から 50 歳代前半が大きく落ち込み、以降は漸増するパターンであったが、JEV ワクチン接種の積極的勧奨差し控えの影響で、2008 年度は 0～4 歳児の低下が見られたものの、ワクチン接種の再開とともに 2009 年度から回復した。

2004年度～2010年度の検査成績を基に、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について、中和抗体保有率から年間自然感染率を計算すると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抗体保有率から計算した2004年度～2010年度の年間自然感染率は1.5%であった。

4. JE患者調査

熊本県では2004年度以降、毎年JE患者発生報告が続いていたが、本研究期間中は2009年度の1例のみであった。この中で2004年度と2005年度の各1例、2006年度の2例及び2007年度の1例は患者検体が保存されていた。そこで、遺伝子検査による確認検査を行った。特に2006年度は9月に3例が報告され、この中にはワクチン未接種の3歳男児が1例含まれていた。この3歳男児を含む2006年度の2例と2007年度の1例からJEV遺伝子が検出され、シーケンス解析で、遺伝子型はI型と判定された。

2009年度の1例は、熊本市在住、7歳10ヶ月の男児で既往歴はなく発育良好、JEワクチン未接種であった。患者は軽熱、腹痛の症状にて発症し、翌日には39℃台の高熱となった。活気は低下していたものの意識障害、頭部CT異常は認められず、総合所見により無菌性髄膜炎と診断され入院となった。その後高熱が持続したが、1週間程度で軽快退院した。その間に実施されたMRI検査でも脳の異常は認められなかったものの、ペア血清でJEVに対するHI抗体が有意に上昇していた。

また、髄液検査では、リアルタイムRT-PCR及びNested RT-PCRはいずれも陰性であったが、IgM捕捉ELISA法にて抗JEV IgM抗体が陽性となり、JEV感染が確認された。抗WNV-IgM抗体は陰性であった。以上により、本事例はJEV感染に

よる無菌性髄膜炎であることが確定した。

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、幼児の髄液3検体が陽性と判定された。

6. JEV中和抗体検査法の改良・比較

流行予測検査術式によるP法を改良したことで、検査に要する期間が原法の約半分短縮された。

また、P法とF法による中和抗体測定結果を比較したところ、F法の抗体価の方が少し低い傾向が見られたものの、両者は強い相関を示した。このことから、F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

飼育ブタのHI抗体調査は間接的にJEVの活動状況を把握し、住民にJE注意報を発令して注意を喚起する重要な検査であるが、近年、熊本県ではHI抗体保有率が測定した週によって大きく変化し、かつ低下傾向にあった。そこで、安定した検査結果が得られるよう、飼育地域別に検体を採取し、HI抗体の保有時期と保有率の地域差を検討した。その結果、JEVの活動は均一ではなく、かなりの地域差があることが判明した。そこで、現在は飼育地域を考慮した検査を行っているが、それでもJE注意報発令日より患者発生の方が早い年があることから、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、「ブタのJE抗体保有率が50%以上、かつ2-ME感受性抗体が1頭でも検出された時点」というJE注意報の発令基準を「2-ME抗体が検出された時点」等に変更する必要があると感じられた。

ブタ血清中のJEV及び患者由来のJEVは共に遺伝子I型であり、熊本県で活動し

ている JEV は、ほぼ完全にⅢ型からⅠ型へ移行していると推察された。過去にコガタアカイエカから分離され、保存されていた JEV の遺伝子解析結果から、熊本県では遅くとも 1991 年にはⅠ型 JEV の侵入があったことが分かっている。なお、この時期からコガタアカイエカからの JEV 分離率、及び JE 患者数が共に激減したことから、Ⅰ型 JEV の病原性の低下が囁かれている。病原性の解明は今後の検討課題である。

ヒト血清の JEV に対する中和抗体検査結果をみると、JE ワクチン接種の積極的勧奨差し控えとなった 2005 年度以降、4 歳以下で若干中和抗体保有率の減少が見られた。しかし、2009 年度以降は JE ワクチン接種再開のためか 4 歳以下が 2004 年度以前の状態まで回復した。また、検体数が非常に少ないため信頼性は低いものの、ワクチン未接種者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% と計算された。この数字は、熊本県民約 180 万人のうち、4 万人近くが毎年感染している計算となり、少し高すぎるように思われた。しかし、JEV の自然感染に特異的とされる NS1 抗体保有率から計算した 2004 年度～2010 年度の年間自然感染率は 1.5% であり、本県では相当数の自然感染が起きていると考えられる。したがって、時宜を得た JE 注意報による県民への注意喚起と積極的なワクチン接種の推進が望まれる。

E. 結論

- 1 飼育ブタの抗体保有率を基に、効果的な 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、JE 注意報の発令基準を見直す必要がある。
- 2 JEV のブタ感染は夏季の 1.5 ヶ月程度の期間であり、遺伝子型はⅠ型であった。
- 3 中和抗体保有率から計算した 2004 年度～2010 年度の年間自然感染率は 2.2% であり、NS1 抗体保有率から計算した同期間の

年間自然感染率は 1.5% であった。

4 熊本県では 2004 年度以降、毎年 JE 患者発生報告が続いていたが、本研究間中は 2009 年度の 1 例のみであった。なお、ヒトから検出された JEV もⅠ型であった。

5 原因不明無菌性髄膜炎の保存髄液 225 検体は、すべて JEV 遺伝子陰性であったが、IgM Capture ELISA 法で、3 検体から IgM 抗体が検出された。

6 F 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

熊本県では依然として患者が発生し、ブタから JEV が分離されることから、時宜を得た JE 注意報発令とワクチン接種の励行が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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(4), 296-298, 2010

2. 学会発表

- 1) 原田誠也、松尾 繁、中島龍一、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎。肥育ブタの日本脳炎抗体調査の検討と分離ウイ

- ルスの遺伝子解析。平成 20 年度日本獣医公衆衛生学会九州地区学会（那覇市）
- 2) 原田誠也、松尾 繁、中島龍一、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎。肥育ブタの日本脳炎抗体調査の検討と分離ウイルスの遺伝子解析。平成 20 年度日本獣医公衆衛生学会年次大会（岩手）
 - 3) 原田誠也、西村浩一、北井陽子、小西英二、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎：熊本県における日本脳炎ウイルスの疫学調査、第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2009 年 6 月 北海道千歳市
 - 4) 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 北海道千歳市
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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

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（H20-22年度）

東京都における日本脳炎ウイルスの活動状況とヒトの自然感染率に関する研究

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）
小西英二（国立大学法人神戸大学）

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631件を調査対象として、JEV 遺伝子検査および JEV に対する IgM 抗体検査を行った。その結果、調査対象は全て遺伝子検査、IgM 抗体検査共に陰性であり、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、それ以前の10数年間に例をみない最大で74%と高い抗体保有率であった2005年度以降の2006年度から2009年度の全て調査年度において、抗体保有率は低率であり、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ことから、都内における JEV の侵淫度は低いことが明らかとなった。

さらに、都民における JEV に対する抗体保有状況を把握するため、都民から採取した血清を調査対象として JEV に対する中和抗体を測定した。その結果、都民の JEV に対する中和抗体保有率は、年々低下する傾向にあり、特にワクチン接種歴が無い都民の抗体保有率は2010年には0.0%までに低下していた。また、JEV の自然感染率（不顕性感染率）を推察することを目的に都民の血清について NS1 抗体を測定した結果、2004年～2006年の都民における JEV の自然感染率は6.4%と推定された。

A. 研究目的

国内における日本脳炎の患者発生は、ワクチン接種が開始された1967年以前には年間1千人にも達していたが、これ以降は激減し、近年では年間10人未満となっている。しかしながら、2002年には定型的な脳炎症状までには至らない髄膜炎症状のみを呈した患者から日本脳炎ウイルス（以下 JEV）が検出されたという報告もあり、国内での患者発生は新たな展開を迎えているとも考えられる。また、2005年5月から2010

年3月末まで日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられたことから、抗体を保有していない低年齢層は年々拡がりつつあり、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、JEV 遺伝子検査ならびに 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）に東京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。さらに、都民におけるJEVに対する抗体保有状況の把握とJEVの自然感染率（不顕性感染率）を推察することを目的に、都民から採取した血清を調査対象としてJEVに対する中和抗体とJEVのNS1に対する抗体（NS1抗体）を測定した。

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681件（2004年100件、2005年107件、2006年104件、2007年127件、2008年118件および2009年125件）である。また、JEVに対するIgM抗体については、髄液681件のうち検体が残存していた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）を調査対象とした。

髄液を調査対象としたJEV遺伝子検査は、リアルタイムPCR法によって行った。すなわち、JEen562s-585プライマー（CTGGAYTGTGARCCAAGGA）、JEen623c-585プライマー（GAHCCACGGTCATGA）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。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年間に採取された計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。

③都民血清におけるJEV中和抗体及びNS1抗体測定

中和抗体は、2004年から2010年に流行

予測調査事業によって採取された都民の血清 2,392 件 (2004 年:319 件、2005 年:311 件、2006 年:334 件、2007 年:365 件、2008 年:355 件、2009 年:343 件、2010 年 365 件) を調査対象として 50%プラーク減少法にて測定した。

NS1 抗体測定の調査対象は、2004 年～2006 年に採取された都民の血清 964 件 (2004 年:319 件、2005 年:311 件、2006 年:334 件) のうちで、JEV に対する中和抗体が陽性であり、かつ血清検体が残存していた 497 件 (2004 年:177 件、2005 年:145 件、2006 年:175 件) である。また、中和抗体が陰性であった 82 件 (2004 年:28 件、2005 年:25 件、2006 年:29 件) を陰性対照として用いた。

JEV の NS1 抗体測定は、小西らの方法によって行った。すなわち、JEV-NS1 発現細胞由来の精製 NS1 抗原 (3G8-NS1) に対する抗体を ELISA 法によって測定した。

(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髄液検体ならびにブタ血清を使用して行った。また、ヒト血清を調査対象とした研究については、研究を行うにあたり実施前に東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において審査を受け、本研究が倫理的に問題のないことが承認されている。

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 681 件について JEV 遺伝子検査を、このうち 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分離試験、遺伝

子検査共に陰性であった。

②東京都内における JEV 活動状況

1) 都内飼育ブタにおける HI 抗体保有状況

2006 年度から 2009 年度のブタ血清を調査対象にして JEV に対する HI 抗体検査を行った結果を年度ごとに表 3 から表 6 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 JEV 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 JEV 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。

2007 年度、ブタにおいて JEV 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。

2008 年度、ブタにおいて JEV 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。

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。

2) ウイルス分離試験及び遺伝子検査

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の分離試験及びJEV遺伝子検査を行った結果を年度ごとに表3から6に示した。

ブタ血清2,344件は、マウス脳内接種法によるウイルス分離試験、リアルタイムPCR法による遺伝子検査共に全て陰性であった。

③都民血清におけるJEV中和抗体及びNS1

抗体測定

1) 中和抗体測定

都民のJEVに対する中和抗体保有率は、図1のように2004年が57.4%、2005年が50.8%及び2006年が53.3%、2007年が53.8%、2008年が39.7%、2009年が31.8%及び2010年が32.1%であり、保有率が低下する傾向がみられた。年齢階層別にみた中和抗体保有率においては、全ての調査年度で40歳代の抗体保有率が低下していた。年次変化をみると、低年齢層の抗体を保有していない年齢層が拡がっており、全ての年齢階層で抗体保有率が低下傾向にあった。さらに、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った。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2008年には1.0%、2009年には1.7%ならびに2010年には0.0%と低下していた。

2) NS1抗体測定による自然感染率の推定

NS1抗体測定の調査対象とした2004年～2006年における中和抗体の測定結果は、血清964件中519件(2004年が319件中183件、2005年が311件中158件及び2006年が334件中178件)が陽性であり、中和抗体の陽性率は53.8%であった。これら中和抗体が陽性であった血清519件のうち血清検体が残存していた497件を調査対象及び中和抗体が陰性であった82件を陰性対照として、NS1抗体測定を行った結果、NS1抗体は497件中32件で陽性であった。NS1抗体陽性数の年次内訳は、2004年が177件中16件、2005年が145件中7件及び2006年が175件中9件であり、中和抗体陽性者の中でNS1抗体の陽性率は6.4%であり、各年では2004年が9.0%、2005年が4.8%及び2006年が5.1%であった。また、陰性対照82件については、全てでNS1抗体陰性

であった。

NS1 抗体が陽性であった 32 件の結果を表 9 に示した。NS1 抗体陽性者の年齢、ワクチン接種歴、中和抗体価及び NS1 抗体の index 値に関連はみられなかった。

D. 考察

本研究のうち、東京都内における JEV 感染症の発生動向及び都民血清における JEV 中和抗体及び NS1 抗体測定についての調査対象は、2004 年以降に採取された検体を調査対象として実施した。調査対象を 2004 年以降とした理由として、まず、日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨が差し控えられたのが 2005 年であったため、その前後の年で何らかの変化がみられるのではないかと思われたこと、次に、これまでに行った都内で飼育されたブタにおける JEV 感染状況調査において、2005 年には過去 10 数年間に例を見ない高い感染率を経験したことがあげられる。

本研究では、まず、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 JEV 遺伝子検査及び JEV に対する IgM 抗体検査を実施した。調査対象とした髄液検体は全て JEV 遺伝子、JEV に対する IgM 抗体検査共に陰性であり、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。

次に、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、抗体検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、分離試験及び遺伝子検査によるウイルス保有調査でも調査対象全てで JEV は確認されなかったことから、2006 年度から 2009 年度のブタにおける JEV 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。

さらに、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では、抗体を保有していない低年齢層が年々拡大しており、2005 年からの事実上のワクチン接種が停止したことに関連した結果であると推察された。また、全ての年齢階層において抗体保有率は年々低下する傾向にあった。この抗体保有率の低下は、ワクチン接種歴の有無にかかわらず同様にみられたが、特にワクチン接種歴が無い都民の抗体保有率は 2008 年には 1.0%、2009 年には 1.7%、2010 年には 0.0% までに低下していた。JEV 感染によって上昇する NS1 抗体の陽性率については調査年次及び年齢階層における変化はみられなかったものの都民については 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ことが推察された。

本研究によって、都内における JEV の侵淫度は低い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について JEV 遺伝子検査及び 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遺伝子検査、IgM 抗体検査共に陰性であったことから 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。

さらに、都民における JEV に対する抗体保有状況を把握するため、都民から採取した血清を調査対象として JEV に対する中和抗体を測定した。その結果、都民の JEV に対する中和抗体保有率は、年々低下する傾向にあり、特にワクチン接種歴が無い都民の抗体保有率は 2010 年には 0.0%までに低下していた。また、JEV の自然感染率（不顕性感染率）を推察することを目的に都民の血清について NS1 抗体を測定した。その結果、2004 年～2006 年の中和抗体陽性率は 53.8%であり、中和抗体陽性者における NS1 抗体の陽性率、すなわち JEV の自然感染率は 6.4%であった。

F. 健康危険情報

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.

田部井由紀子, 岩崎則子, 岡崎輝江, 長谷川道弥, 保坂三継, 甲斐明美 : 東京都におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊の生息状況. 東京都健康安全研究センター研究年報, 60, 73-78, 2009.

田部井由紀子, 岩崎則子, 岡崎輝江, 長谷川道弥, 保坂三継, 甲斐明美, 小西英二 : 東京都民における日本脳炎ウイルスの NS1 抗体保有状況. 病原微生物検出情報, 30(6), 154-155, 2009.

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

田部井由紀子, 長谷川道弥, 岩崎則子, 岡崎輝江, 仲真晶子, 矢野一好 : デング熱診断における NS1 抗原検査の有用性について. 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会, 2008 年 9 月, 神奈川県川崎市

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, 北海道

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

分担研究総合報告書

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）

研究要誌

日本における日本脳炎は、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状況と現在の状況の比較が必要となっている。そこで、過去 30 年間の感染症流行予測調査の抗体保有調査結果を用いた近年の日本脳炎ウイルス感染状況の解析、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ウイルス性状比較、日本及びアジア地域の日本脳炎ウイルス媒介蚊であるコガタアカイエカの遺伝的多様性の解析、家畜の弱毒生ワクチン株と親株との比較を基にしたウイルス弱毒化メカニズムの解析を行い、現在の日本脳炎ウイルス媒介メカニズムの解析および対策立案の検討を行った。過去 30 年間の血清抗体保有状況の比較から、日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染率は、20 年前より低下傾向を示していた。日本脳炎ウイルス全長配列を基にしたウイルスの系統解析では、Genotype I (GI) が 490 年前ごろ、GIII が 670 年前ごろに出現したと推測された。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、日本に生息するコガタアカイエカと海外に生息するコガタアカイエカに明らかな遺伝的な違いが確認された。媒介蚊の違いにも関わらずアジア地域全体で日本脳炎ウイルスが流行しており、これまで考えられてきた以上に流行地域全体が相互に関連している可能性が示唆され、今後対策を立案する場合にはこれまで以上にアジア地域全体の状況を考慮した対策が必要である可能性が示唆された。

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勸

奨の差し控えが行われ、ワクチン接種率が激減した。2010 年度から、3 歳児についてのみ積極的勸奨が再開され、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。一方、ブタにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体価の上昇が毎年確認されており、環境中の日本脳炎ウイルス活動状況は依然として活発であることが報告されている。近年の患者報告数の推移は、ウイルス活動状況と相反する結果になっており、感染リスクの評価や今後の対策立案のためにもごく最近の感染実態の把握と感染メカニズムの解析が必要である。そこで本研究班では、近年の抗体保有状況の推移、媒介蚊の遺伝的多様性、日本脳炎ウイルスの遺伝的多様性の解析およびウイルス弱毒化の解析を目的に以下の研究を実施した。

- (1) 過去約 30 年間の日本脳炎ウイルス抗体保有状況の変化を基に、近年の日本脳炎ウイルス活動状況の評価を行う。
- (2) 日本を含め、アジア地域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。
- (3) 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。
- (4) 日本では、家畜に対して弱毒生ワクチンが用いられている。これら生ワクチン株を詳細に解析することでワクチン株共通の性状を明らかにし、弱毒化に重要な部位の検索を行う。

B 研究方法

- ① 感染症流行予測調査事業で行われている血清疫学調査結果、約 30 年分を用いて出生年別抗体保有状況を比較した。出生年別に抗体価を比較することで日

本脳炎ウイルスに対する自然感染の変化及び抗体持続状況の変化を明らかにした。

- ② 日本脳炎ウイルスの遺伝的多様性検索には、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、千葉県の子牛から分離された 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。
- ③ 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。
- ④ 家畜で用いられている家畜用日本脳炎弱毒生ワクチン株の全長配列を決定し、野外株である親株と弱毒化したワクチン株を比較することで病原性に影響を与える部位の検索を行った。

C 研究成果

- (1) 感染症流行予測調査で実施している血清抗体保有状況調査結果を出生年別に解析した。その結果、自然感染によって維持されていると推定される 40 歳以上の抗体陽性率は、過去 30 年間で 10 年ごとに分けて比較するとごく最近が最も抗体保有率が低く、徐々に自然感染率が低下

している可能性が示唆された。

- (2) 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 Genotype I (GI) と Genotype III (GIII) 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 GI は、約 490 年前、GIII 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。
- (3) 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。
- (4) 家畜で用いられている、もしくは用いられていたワクチン株 3 株 (at 株、m 株、ML17 株) とその親株 2 株

(AT31 株、Ja0H566 株) の全長配列を決定した。その結果、ワクチン株に共通で親株と異なるアミノ酸配列は Envelope の一アミノ酸のみであった。このワクチン株にのみ共通のアミノ酸は、中国でヒトに対して使用されている弱毒生ワクチン株においても保存されていた。本アミノ酸変異部位は既に弱毒化に影響のある部位として報告されているものであったが、病原性において極めて重要な部位である可能性が改めて示唆された。

D 考察

過去 30 年間の抗体保有状況を出生年別に比較することで単年度調査の感染症流行予測調査を複数年度で実施するコホート調査に近い形で評価することができた。このような手法は、日本脳炎だけでなく麻疹や風疹にも応用が可能で、感染症流行予測調査結果の新しい解析手法として利用できる可能性が示唆された。また、近年日本脳炎ウイルスの自然感染率が低下していることが示唆されていたが、我々の結果も同様の結果であった。今後、継続した解析を進め、自然感染率の低下が持続的なものなのか、それとも一時的なものなのか詳細な解析を行う必要がある。

今回、日本脳炎ウイルス全長配列を基にした解析から、日本脳炎ウイルスの GI は少なくとも数百年前に出現したウイルスであることが示唆された。また、日本脳炎ウイルスの一部は、海外から侵入してきている可能性も示唆された。ベクターである蚊のミトコンドリア配列を基にした比較では、国内に生息しているコガタアカイエカと東南アジア地域に生息するコガタアカイエカ

が遺伝的に異なる集団であることが明らかになった。遺伝的に異なる蚊であっても日本脳炎ウイルスは、どちらのコガタアカイエカが生息している地域でも流行しており、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。

蚊のミトコンドリア配列の違いから、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ったため、今後蚊のサーベイランスに応用できる可能性が示唆された。簡便な判別法の確立が望まれる

E 結論

- ① 過去約 30 年間の血清抗体保有状況から、近年の自然感染状況は 20 年前よりも低下してきている可能性が示唆された。
- ② 日本脳炎ウイルス全長配列決定により、Genotype I (GI) が 490 年前ごろ、GIII が 670 年前ごろに出現したと予想された。
- ③ 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。
- ④ 家畜で利用されている弱毒生ワクチン株とその親株との比較から、ワクチン株に共通で親株と異なるアミノ酸配列は Envelope の一アミノ酸のみであった。

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

「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索するため、この可変領域内に同様の変異を有する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。様々な培養細胞を用いて増殖能を比較してきたが、マウスおよびヒト神経芽細胞腫由来細胞において、最も広範囲な欠失を有する変異体で増殖能の低下が観察された。また同変異体はマウスに対する病原性もわずかに低下している可能性が示唆された。以上より近年見出される欠失がウイルス性状にわずかながら影響することが示唆されたが、その意義に関しては更なる解析が必要である。

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（レポーターレプリコン）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。日本脳炎ウイルスレプリコンでのみ自立的複製が確認された。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研究を行ってきた。以前に我々が作製した日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 より、野外株に観察される欠失等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た。

フラビウイルスゲノムの構造蛋白遺伝子領域の大部分を欠失させた RNA は、細胞内で自立的に複製できる。この RNA はレプリコンと呼ばれる。レプリコンだけでは感染性ウイルスを産生することは無いが、構造蛋白質を供給することにより粒子産生能のない感染性シュードウイルスを作製することが可能である。さらにこの構造蛋白質遺伝子領域をルシフェラーゼ遺伝子等に置換したレポーターレプリコンは基礎ウイルス学的解析のみならず、抗ウイルス剤のスクリーニング等にも応用されている。本研究では、すでに我々が作製した Dengue 1 型ウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染性分子クローンを用いて、Dengue 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(Mie41/2002)/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 (図 2)。d5 および d9 は実際に確認された欠失を導入したものであり、また d5d9 および d27 はそれぞれ両

方の欠失を同時に有するものおよび両領域をカバーする領域すべてを欠失させたもので実際には検出されていない欠失である。

a13 は 1980 年台以前に分離された遺伝子型 3 型の日本脳炎ウイルスで相当する配列 13 塩基を挿入したものである。これらの組換え JEV 感染性粒子は Vero (9013) 細胞を用いて調製した。

各株化細胞でのウイルス増殖能は、感染後経時的に培養上清を回収し、Vero 細胞を用いてその感染力価をプラーク形成法により測定した。本解析には、Vero (9013) 細胞、ブタ腎由来 PK15 細胞、ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞、ウズラ由来 QT-6 細胞、マウス神経芽細胞腫由来 N18 細胞およびヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を使用した。

マウス病原性は 2 系統のマウスを使用して以下の通り調べた。生後 3 週齢の ddY 系統マウスにウイルス液を腹腔接種し (1×10^4 / head あるいは 1×10^5 / head)、15-16 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。2 回目の実験では各個体について毎日体重を測定した。一方生後 3 週齢の C3H/He 系統マウスにウイルス液を腹腔接種し (1×10^5 / head)、25 日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 Dengue 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 Dengue 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) 各種株化培養細胞における日本脳炎ウイルス変異体の増殖特性

3'非翻訳領域内可変領域に変異を有する組換え日本脳炎ウイルス変異体を各種株化細胞に接種し、その増殖速度およびプラーク形態を比較した。Vero 細胞および PK15

細胞での増殖速度およびプラーク形態に差異は認められなかった。C6/36 細胞においては培養温度を 28℃ と 35℃ で行なったが、いずれにおいても差異は認められなかった。QT-6 細胞では培養温度 35℃ では差異は認められなかったが、40℃ では変異体の増殖速度の低下が認められたものの、データがばらついた (図 5)。N18 においては、MOI = 0.01 および 0.1 の両方において d27 の増殖能の低下が観察された。IMR-32 についても d27 の増殖能の低下が見られたが、N18 の場合ほどはっきりとした差異ではなかった。

2) 日本脳炎ウイルス変異体のマウス病原性の比較

Mie41 および d27、a13 変異体を ddY 系統マウス 1 群 10 匹に接種し病原性を比較した。16 日までに Mie41 および 13a 接種マウス各 3 匹が死亡した。一方 d27 では接種したすべてが生き残った。次に上記 3 ウイルスに d5d9 を加え、10 倍ウイルス力価を上げて接種し観察すると共に、毎日体重を測定した。15 日までに d5d9 および a13 で 2 匹が死亡した。一方親株および d27 では接種した 10 匹すべてが生き残った。しかし各マウスの体重の推移を見ると、死亡した個体を除くと親株と a13 では d27 および d5d9 に比べ増加が鈍い傾向が観察された。この傾向は各群で体重の平均を算出した場合にもはっきりと見られた。次に Mie41 および d5、d9、d5d9、d27 変異体を C3H/He 系統マウス 1 群 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。

3) 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、ルン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。その結果、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た。そこで 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が、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) Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., and Kurane, I. Dengue virus type I isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal. *Journal of Travel Medicine*, 15: 46-49, 2008.
- 2) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., dos Santos, F., de Jesus, M.D., Lina