

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.

- 6) 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.
- 7) 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) 田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム 3'非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)
- 2) 貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝

徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の1アミノ酸変異は IFN $\beta$  の誘導を低下させることにより病原性を高める。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)

- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：*in vitro* における Dengue 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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

(厚生労働科学補助金 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戦略に関する研究」

分担研究総合報告書 (H20-22 年度)

## 岡山県における日本脳炎のリスク調査と日本脳炎の多様性

分担研究者 川崎医科大学小児科 寺田喜平

研究協力者 川崎医科大学小児科 赤池洋人、川畑順子

津山中央病院小児科 梶俊策

さとう記念病院小児科 内田立志

神戸大学医学部医療基礎学講座 小西英二

国立感染症研究所 高崎智彦、倉根一郎

### 要旨

日本脳炎汚染地区である岡山県の都市部と農村部に行ける血清抗体 (HI 法と EIA 法) の疫学調査から不顕性感染がどの程度あるのかを検討した。HI 法では 3 歳未満での抗体陽性はおらず、3 歳以降では 2~5%の不顕性感染があり、農村部と都市部とで有意差はなかった。EIA-IgM の抗体陽性者はいなかった。しかし、EIA - IgG 抗体では 3 歳未満で 33~70%、3 歳以降でも 51~77%の不顕性感染者が存在し、有意に都市部よりも農村部に不顕性感染が多かった。都市部にも不顕性感染が存在しており、山口県の都市部在住のワクチン未接種小児に片麻痺から発症する日本脳炎が認められた。現在、抗体検査は商業的には HI 抗体しか測定できない。感度が悪く、早期診断のためには EIA-IgM 抗体の測定が必要である。

### A. 研究目的

岡山県は 2005 年成人 2 例の日本脳炎例を認め、リスクのある地域と思われる。我々は 2006 年岡山県で都市部と農村部における日本脳炎のリスク調査として、脳炎 3 例と無菌性髄膜炎 17 例の髄液を収集し、RT - PCR で髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を調べた。都市部である県南部では 0/7 例と陽性例はなかったが、農村部である県北部では無菌性髄膜炎の 3/12 例で陽性を認めた。2010 年 4 月 1 日から日本脳炎ワクチンの 3 歳児への積極的勧奨が再開されたが、2005 年からの日本脳炎ワクチンの積極的な接種勧奨差し控えによる期間により、今後日本脳炎の発生が増加してくる可能性がある。今回岡山県で都市部と農村

部における血清抗体の疫学調査から不顕性感染率を調べたので報告する。

### B. 研究方法

川崎医大倫理委員会の承諾を得て、2008 年、2009 年の 7 月から 11 月にかけて県北農村部の津山市にある津山中央病院 (津山)、勝央町にあるさとう記念病院 (さとう)、県南都市部の倉敷市にある川崎医大 (川崎) で外来または入院し、インフォームドコンセントを取った患者の残血清から日本脳炎ウイルス抗体 (HI 法) とその患者の日本脳炎ワクチン接種歴を調査した。2009 年度のさとう記念病院は小児科が閉鎖したため検体採取ができなかった。患者血清は SRL で HI 抗

体を測定した。HI 抗体 10 倍以上を陽性とした。また国立感染症研究所で、日本脳炎 IgG および IgM 抗体 (EIA) を測定した。2009 年度は都市部川崎医大の検体を NS1 抗体 (EIA 法) で測定した。大量ガンマグロブリン療法を受けていた川崎医大の患者 2 名は対象から除外した。

### C. 研究結果

農村部 (津山) で 2008 年度 58 名、2009 年度 61 名、農村部 (さとう) で 2008 年度 122 名、都市部 (川崎) で 2008 年度 149 名、2009 年度 202 名、計 592 名から血清を収集できた。

#### 1) HI 法

HI 抗体は、生後 12~36 ヶ月では農村部、都市部すべてで陰性であった。生後 37 ヶ月以降でワクチン未接種者の陽性率は、2008 年度農村部 (津山) 1/18 (5.6%)、農村部 (さとう) 1/23 (4.3%)、都市部 (川崎) 0/28 (0%) であった。2009 年度農村部 (津山) 1/16 (6.2%)、都市部 (川崎) 1/27 (3.7%) であった。生後 37 ヶ月以降の既接種者では、2008 年度農村部 (津山) 6/15 (40%)、(さとう) 16/28 (57.1%)、都市部 (川崎) 3/12 (25%) であった。2009 年度農村部 (津山) 7/14 (50%)、都市部 (川崎) 7/24 (29.1%) であった。そのうち 2009 年農村部 (津山) の 6 歳児がワクチン未接種で 80 倍と高値であったが、2-ME 処理による有意な減少はなかった。

#### 2) EIA 法

2008 年度は EIA - IgM 抗体を評価した。P/N 値 2.0 以上の陽性例はなかった。疑陽性 (P/N 値 1.5~2.0 未満) は、12 ヶ月未満では農村部 (津山) 0/8、農村部 (さとう) 0/15、都市部 (川崎) 1/18 (5.5%)、12~36 ヶ月では農村部 (津山) 0/13、農村部 (さとう) 3/28 (10.7%)、都市部 (川崎) 1/41 (2.4%)、37 ヶ月以降未接種者では、農村部 (津山) 2/18 (11.1%)、農村部 (さとう) 2/23 (8.7%)、都市部 (川崎) 0/28 であった。37 ヶ月以降既接種者およびワクチン接種不明ではす

べて陰性であった。

EIA-IgG 抗体陽性は経胎盤以降抗体があるため 12 ヶ月以降で検討した。

2008 年度では 12~36 ヶ月の EIA-IgG 抗体陽性率は、農村部 (津山) 12/13 (92.3%)、農村部 (さとう) 25/28 (89.2%)、都市部 (川崎) 31/41 (75.6%)、37 ヶ月以降未接種者では農村部 (津山) 16/18 (88.8%)、農村部 (さとう) 20/23 (86.9%)、都市部 (川崎) 23/28 (82.1%) であった。37 ヶ月以降既接種者では、農村部 (津山) 14/15 (93.3%)、農村部 (さとう) 28/28 (100%)、都市部 (川崎) 12/12 (100%) であった。

2009 年度では 12~36 ヶ月の EIA-IgG 抗体陽性率は、農村部 (津山) 5/19 (26.3%)、都市部 (川崎) 5/67 (7.4%)、37 ヶ月以降未接種者では農村部 (津山) 8/16 (50%)、都市部 (川崎) 5/27 (18.5%) であった。37 ヶ月以降既接種者では、農村部 (津山) 9/14 (64.2%)、都市部 (川崎) 14/24 (58.3%) であった。

#### 3) NS1 抗体

2009 年度の都市部 (川崎) で抗体陽性例はなかった。

### D. 考察

検査法に関して通常の病院から依頼できる HI 法と国立感染症研究所でのみ評価できる EIA 法には検出率に大きな差があった。抗体の陽性率が高いと思われるワクチン接種群をみると、HI 法の陽性率 39/93 に対し EIA 法では 76/92 (両群に有意差  $p < 0.0001$ 、 $\chi^2$  検定) であり、EIA と比較し HI 抗体は著明に感度が悪かった。これらは、現在コマーシャルで測定できないので、感度の良い検査法が選択できるようにすべきである。

日本脳炎ワクチンは通常 3 歳以降に接種されるので、生後 13~36 ヶ月と 37 ヶ月以降のワクチン未接種者における抗体陽性者は、不顕性感染と推定される。EIA-IgM 抗体はすべて陰性であり、検査時に不顕性感染をおこしている例はなかつ

た。EIA-IgG 抗体に比較して感度の悪い HI 法では、12～36 ヶ月ではすべて陰性で、37 ヶ月以降の未接種者の陽性率は、農村部 3/57 (5.2%)、都市部 1/55 (1.8%) であった。37 ヶ月以降の既接種者の陽性率は 29/57 (50.8%)、都市部 10/36 (27.7%) であった。また農村部では抗体価が 160 倍と高くブースターがかかっていると思われる症例もあった。これらより HI 法では 3 歳未満では抗体陽性者がおらず、3 歳以降では 2～5% の不顕性感染者があり農村部と都市部に有意差はなかった。

一方、感度の良い EIA-IgG 抗体では、12～36 ヶ月の農村部抗体陽性率は 42/60 (70.0%)、都市部は 36/108 (33.3%) (両群に有意差  $p=0.01$ 、 $\chi^2$  検定) であった。37 ヶ月以降未接種者では農村部 44/57 (77.1%)、都市部 28/55 (50.9%) (両群に有意差  $p=0.04$ 、 $\chi^2$  検定) であった。これらにより、EIA-IgG 抗体では 3 歳未満で 33～70% の不顕性感染者が存在し、3 歳以降でも 51～77% の不顕性感染者が存在し、有意に都市部よりも農村部の不顕性感染が多かった。37 ヶ月以降のワクチン既接種者における抗体陽性率は、HI 抗体で 27～51%、EIA-IgG 抗体で 72～89% であり、都市部と農村部に有意差はなかった。

高知県では 1 歳の日本脳炎患者が報告されており、岡山県でもワクチン未接種で EIA-IgG 抗体陽性の 12 ヶ月～36 ヶ月の児がいるため地域によっては、12 ヶ月からの日本脳炎ワクチン接種勧奨も検討しておく必要がある。

山口県の都市部で、ワクチン未接種の小児の日本脳炎例があった。片麻痺から発症し、髄膜刺激症状は後で発現した。非常にまれな例であったが、日本脳炎も多様性があり、鑑別診断の必要性を示唆する例であった。

## E. 結論

1) 全体の抗体陽性率は、農村部のほうが高いが、都市部でも HI 法および IgG-EIA 抗体で不顕性感

染が認められた。岡山県では農村部だけでなく都市部でも日本脳炎の発生が予想される。農村部でも都市部でも日本脳炎ワクチンの接種勧奨をおこなっていく必要がある。

2) 確定診断するために、感度の良い抗体測定法がコマーシャルでも選択できるようにする必要がある。

3) 日本脳炎脳症例の多様性を知って疑い、鑑別診断できるような啓発が専門家に対しても必要である。

## F. 健康危機管理情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

寺田喜平. 日本脳炎. 小児内科 40 増刊 1188-1190, 2008

### 2. 学会発表

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金・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（H20-22年度）

『小児日本脳炎患者発生の実情と日本脳炎細胞培養ワクチンに関する意識  
調査』

分担研究者 脇口 宏 高知大学小児思春期医学  
研究協力者 前田明彦 高知大学小児思春期医学

高知県内の急性脳炎症例の日本脳炎サーベイランスを実施した。その結果予防接種歴のない日本脳炎の1歳6カ月症例、 $\gamma$ -グロブリン投与により日本脳炎抗体が上昇した非日本脳炎急性脳炎症例（6歳児）を経験した。また、日本脳炎予防接種の積極的勧奨接種再開後、保護者に対する大規模質問紙法調査を行った。高知県0歳・1歳児を対象とした大規模健康診査会（第80回赤ちゃん会；2010年4月18日に高知市と四万十市で開催）参加者の両親にアンケート調査を行い日本脳炎および日本脳炎予防接種に関する意識調査を実施した。その結果、①日本脳炎の病像や感染経路に対する理解は比較的正確であった。②新しい細胞培養ワクチンの存在については73%が知らず、公費で受けられることも広く知られていなかった。③子どもにワクチンを受けさせると答えた親も1/3にとどまっていた。ワクチン不足への懸念からPRを控えた影響が調査時点では根強く残っており、啓発が不十分であった。今後、積極的な広報活動がなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

**A. 研究の意義**

- (1) 日本脳炎ワクチンの勧奨接種差し控え（2005年以降）にともなう疾患感受性者の増加により日本脳炎患者数増加が危惧されるのが現状である。
- (2) 日本脳炎患者についての詳細な監視と調査が重要な時期にある。
- (3) 新しい細胞培養ワクチン実施開始後のワクチン接種の実態と現状について明らかにする必要がある。

**B. 研究の目的**

- (1) 本邦におけるとくに小児日本脳

炎患者発生の現状を把握することが急務である。

- (2) 日本脳炎ワクチン接種対象者の保護者に対する意識調査を行い現状の把握と問題点を抽出し、ワクチン接種を有効に進めるための方策を探る。

**C. 研究結果**

- (1) 2001年に高知県で発生した予防接種歴のない日本脳炎の11歳女児例について調査し、詳細について報告した（2008年度報告書）。
- (2) 2009年に高知県で発生した1歳児

例について調査し、その詳細を報告した。診断にはペア血清を用いた抗体価測定と、髄液中抗体価測定が有用であった（2009年度報告書）。

(3) 2010年4月に保護者に対する大規模質問紙法調査を行った。高知県0歳・1歳児を対象とした大規模健康診査会（第80回赤ちゃん会；2010年4月18日に高知市と四万十市で開催）参加者の両親にアンケート調査を行った。自宅に郵送されたアンケート用紙に回答してもらい審査会場で回収した。対象は0歳2カ月～1歳8カ月の児をもつ保護者で自発的に参加を希望する者にアンケート用紙を郵送で配布した。

大規模健康診査会に参加した2,271名のうち2,111名（高知県年間出生数の37%に相当）について回収し、解析を行った。アンケート回収率は86.0%であった。

結果は以下の通りであった。①81%の者が日本脳炎を知っていると答えた。②日本脳炎の病像や感染経路に対する理解は比較的正確であった。③新しい細胞培養ワクチンの存在については77%が知らず、公費で受けられることも知っている親も59%にとどまり広く知られていなかった。④2009年発症の県内症例（前述）について知っている者は22%に過ぎなかった。⑤子どもにワクチンを受けさせると答えた親も33%にとどまり、受けさせないと答えた親が23%みられた。

以上から、今後、積極的な広報活動

がなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。ワクチン不足への懸念からPRを控えた影響が調査時点では根強く残っており、啓発が不十分なことが関連していることは明らかと思われる（2010年度報告書）。

#### D. 考 察

(1) 本邦におけるとくに小児日本脳炎患者発生の動向を継続的に監視することが重要である。

(2) 新しい（細胞培養）日本脳炎ワクチンは認知度、接種への動機づけともに低いことが明らかになった。今後積極的にワクチン接種を推進するべく広く啓発することが必要である。

#### E. 結 論

(1) 2005年以降の日本脳炎ワクチン積極的勧奨差し控え以降、日本脳炎感受性者が蓄積している現状があり、小児日本脳炎患者の発生が目立つ傾向にある。

(2) 2009年6月から接種が可能となった新しい（細胞培養）日本脳炎ワクチンについて、広く啓発し接種率を向上することが不可欠である。

#### F. 健康危険情報

な し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

前田明彦、脇口 宏：特集 新時代のワクチン戦略について考える 各論 1. 勧奨接種のワクチン—現行ワクチンの問題点と将来に向けて 2) 日本脳炎. 臨床検査 54: 1882-1367, 2010

### 2. 学会発表

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

## 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

## 伴侶動物および野生動物における日本脳炎感染状況の調査

分担研究者 前田 健（山口大学農学部獣医微生物学教室）  
研究協力者 下島昌幸（山口大学農学部獣医微生物学教室）  
佐藤 宏（山口大学農学部獣医寄生虫病学教室）  
奥田 優（山口大学農学部獣医内科学教室）  
鈴木和男（田辺市ふるさと自然公園センター）  
横山真弓（兵庫県立大学森林動物研究センター）  
宇仁茂彦（大阪市立大学医動物学教室）  
柴崎高宏（大阪府動物愛護畜産課）  
大野 佳（山口大学農学部獣医微生物学教室）  
下田 宙（山口大学農学部獣医微生物学教室）  
長尾裕美子（山口大学農学部獣医微生物学教室）

### 研究要旨

ヒトへの日本脳炎ウイルスの感染の可能性を調べるために、全国で飼育されている飼育犬および野生動物・生産動物の日本脳炎抗体保有率を調査した。その結果、(1) 日本脳炎抗体陽性率は全体で 25%、室内飼育犬で 8%、室外飼育犬で 45%であった。(2) 農村部のイヌは、都市部や住宅地のイヌと比較して有意に抗体陽性率が高かったが、都市部や住宅地でも日本脳炎ウイルスに感染していることが示された。(3) ユビナガコウモリの 33%が日本脳炎に対する抗体を保有していた。またアライグマ、シカ、イノシシ、アナグマ、イタチ、テンにも日本脳炎感染歴が示された。特にシカは 94%の抗体保有率であった。(4) 牛での抗体保有率を 2000年から 2005 年の保存経過血清と比較した結果、牛も 11 月までには約 70%が JEV に感染するがその流行には 8 月前後で年度により違いが認められることが分かった。更に、2003 年にウマに致死をもたらした JEV/eq/Tottori/2003 株の全塩基配列を決定した。現在国内で流行している genotype I である他の分離株と比較した結果、大きな違いが認められなかった。しかし、マウスにおける病原性を genotype III と比較した結果、脳内接種では病原性が同じであったにもかかわらず、腹腔内接種では病原性が弱かった。日本脳炎ウイルスを犬に実験的に接種し、病原性、抗体上昇とその持続、ウイルス血症の有無を調べた結果、日本脳炎ウイルスは犬に感染するが病気を引き起こさず、ウイルス血症も起こらないことが示された。更に、抗体価の上昇が認められ、その抗体価は最低 56 日間持続することが確認された。このことは犬での調査が都市部および室内における JEV 媒介蚊の侵入を知るための安全で優れた指標となることが示している。

### A. 研究目的

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) はヒト、ウマなどに感染し、時に致死的な症状を引き起こす。国内では、ブタにおける JEV 感染の調査を実施することにより、日本脳炎の流行を定期的に把握している。しかし、養豚場の都市部からの隔離、農業形態の変化による媒介蚊の分布、地球温暖化、外来移入種

の増加など様々な要因が日本脳炎ウイルスの生態に影響を与えていると考えられている。

一方、ヒトでの患者は年間 10 名以下にとどまっている。これは日本脳炎予防接種の効果であると考えられているが、現在は予防接種の積極的勧奨が取り止められており、ワクチン接種を受けていない子供が増加す

ることから、日本脳炎患者の増加が危惧されている。更に、2003年には北海道から移動されたワクチン未接種のウマで18年ぶりの日本脳炎の発生が報告されている。

本研究ではブタでの流行予測調査が国内のJEV感染の実態を反映しているのか、現在もヒトや動物が日本脳炎感染の脅威にさらされているのかを、伴侶動物・野生動物・生産動物の調査を実施することにより検証した。また、馬に致死を引き起こした株の全塩基配列の決定、マウスにおける病原性を検討した。更に、犬に日本脳炎を感染実験し、抗体価の持続、ウイルス血症の有無を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 血清

アライグマの血清：合計204頭のアライグマから血清が2005年5月から2008年2月に回収された。

イノシシの血清：イノシシ36頭の血清は2007年11月から2008年3月に和歌山県で回収された。

タヌキの血清：タヌキ19頭の血清は2007年11月から2008年3月に和歌山県で回収された。

イヌの血清：2006年から2007年にかけて全国の動物病院に来院した飼育犬合計652頭から血液を採取し血清を回収した。その際に、年齢以外に飼育形態(室内飼育・室外飼育・両方)、飼育地域(農村部・住宅地・都市部)を飼い主にアンケートした。

ユビナガコウモリの血清：2009年5月9日に綿山県田辺市導水路にて50頭のユビナガコウモリを捕獲し、血清を回収した。捕獲された28頭の雌のうち25頭が妊娠していた。ユビナガコウモリの捕獲には和歌山県知事の許可を得ている。

野生動物の血清：有害鳥獣、錯誤捕獲、交通事故等で得られた野生動物から血清を回収した。これは和歌山県田辺市ふるさと自然公園センターの鈴木和男先生のご協力による。本年度は2008年から2009年にかけて捕獲した血清を調査した。

ウシの血清：山口県に保存されていた60頭の2000年から2005年にかけて6月・8月・11月に回収された血清を山口県中部家畜保健所より分与していただいた。

すべての血清は56°Cで30分非働化した後ウイルス中和試験に供試した。

### (倫理面への配慮)

イノシシ・タヌキに関しては、狩猟期に捕獲あるいは交通事故により死亡したもの、アライグマは特定外来種として捕獲されたものと交通事故により死亡したものを調べた。

飼育犬に関しては、調査研究に利用する旨の承諾を飼い主に得て採血している。

## 2. ウイルス

JEV Genotype IであるJEV/sw/Chiba/88/2002株(国立感染症研究所高崎智彦先生より分与)、2003年に鳥取県で日本脳炎を発症したウマより分離されたJEV/eq/Tottori/2003株、Genotype IIIであるJaOH0566株(阪大微生物病研究会より分与)を用いた。

ウイルスの増殖にはC6/36細胞を、ウイルスの力価測定および中和試験にはVero9013細胞を用いた。

## 3. ウイルス中和試験

一次スクリーニング：2%ウマ胎児血清(FCS)加EMEM(GIBCO)で希釈した被検血清およびコントロール100 $\mu$ lと100PFUのウイルスを含むウイルス希釈液100 $\mu$ lを等量混合し、37°Cで90分間反応させた。その後、6ウェルプレート(SUMILON)に増殖させたVero9013細胞に接種した。37°Cで90分間ウイルスを吸着後、2回EMEMで洗浄し、2mlの0.8% SeaPlaque Agarose (FMC Bioproduct)を含む5%FCS加EMEMを重層した。4日後に緩衝ホルマリンで細胞を固定後、クリスタルバイオレットにて生細胞を染色し、プラークを計測した。血清を含まないコントロール群と比べて80%以上プラークが減少しているものをJEV抗体陽性と判定した。抗体については80%プラークが減少している最大希釈倍率を中和抗体価とした。

## 4. 塩基配列の決定

JEV感染細胞よりRNAをQIAGEN RNA Mini Kitを用いて回収し、TaKaRa RNA LA PCR Kitを用いてRT-PCRを実施した。得られた断片

を QIAGEN PCR Purification Kit で精製後、ABI Big-Dye Sequencing Kit Ver3.1 にて反応を行い、塩基配列を決定した。5' 末端と 3' 末端の塩基配列を決定するために、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) を用いた。

#### 5. 犬への JEV 感染実験

**動物：**JEV に対する抗体陰性を確認したビーグル犬(2カ月齢、雌)3匹を株式会社ナルクより購入し、一週間馴致した後、実験に供した。なお、動物実験は山口大学農学部動物実験安全委員会の承認のもと、規則に則って行った。

**感染実験：**2%FCS 加 DMEM で  $1 \times 10^7$  PFU/ml に調整した JaOH0566 株を 0.5ml 皮下及び 0.5ml 静脈内に接種した。感染後毎日体重・体温測定、臨床症状の観察を行った。感染後 2 週間は毎日採血を行い、血清を回収した。更に週二回 2ml の EDTA 加血液より末梢血単核球 (PBMC) を回収した。

**ウイルスゲノムの検出：**血清 140  $\mu$ l から QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出後、QIAGEN one-step RT-PCR kit を用いて RT-PCR を行った。プライマーは JEV (2927-2947) 5' -GGA ACA GCA TGC AAA TCG AAG-3' と JEV (3578-3558) 5' -ACC AGA AGG CCC AGC TGA AAA-3' を用いた。この RT-PCR の検出感度は 1.7 PFU であることが確認されている。

**ウイルス分離：**PBMC および血清を Vero 細胞および C6/36 細胞に接種し、細胞変性効果 (CPE) を指標に 3 回盲継代を繰り返した。血清を 3 日齢の乳のみ BALB/c マウス (SLE) に 20  $\mu$ l 接種し、接種マウスの致死を指標にウイルス分離を試みた。

#### 6. JEV/eq/Tottori/2003 の病原性の検討

C57BL/6 マウス (4 週齢、雌) に希釈したウイルス液を腹腔内および脳内に接種した。腹腔内接種は 200  $\mu$ l、脳内接種は 20  $\mu$ l で行った。接種後は致死を指標に病原性を判定した。

#### 7. 有意差検定

得られたデータの解析には  $\chi^2$  検定を実施し、 $p < 0.05$  のものを有意差ありとした。

### C. 研究結果

#### 1. アライグマの JEV 中和抗体保有状況

アライグマ 184 頭の JEV に対する中和抗体保有状況を調査した結果、109 頭 (59.2%) に抗体価が存在した。

#### 2. イノシシの JEV 中和抗体保有率

イノシシ 36 頭のウイルス中和抗体保有率を調査した結果、83% にウイルス中和抗体が存在した。

#### 3. タヌキの JEV 中和抗体保有率

タヌキのウイルス中和抗体保有率を調べた結果、19 頭中 12 頭の 63% が陽性であった。

#### 4. 和歌山県のコウモリを含む野生動物の疫学調査

和歌山県で 2008 年から 2009 年にかけて捕獲されたコビナガコウモリは 33%、イノシシは 63%、シカは 94% が抗体陽性であった。それ以外にもアナグマ、テン、イタチ、キツネも JEV 陽性であった。

#### 5. ウシでの日本脳炎抗体保有率の調査

毎年 60 頭の牛から 6 月、8 月、11 月に血清を経時的に回収し、中和抗体の有無を検討した結果、日本脳炎の流行が終了する 11 月には 63 - 75% のウシが JEV に対する抗体を保有していることが分かった。しかし、日本脳炎の流行前と思われる 6 月にも 22 - 49% の抗体保有率が認められた。これは移行抗体の影響だと考えている。2000 年、2002 年、2005 年の 8 月は 11 月並みに抗体保有率が高いのに対して、2001 年、2003 年は抗体保有率が 6 月並みであった。

#### 6. 飼育犬における JEV 抗体保有状況全国調査

2006 年から 2007 年にかけて 47 都道府県の飼育犬から最低 10 頭ずつ採血し JEV 抗体保有状況を調査した。その結果、652 頭中 164 頭の 27% が JEV 感染歴を有していた。飼育形態別にみると室外飼育犬が 45% であったのに対し、室内飼育犬は 8% が陽性であった。九州と四国の室外飼育犬はそれぞれ 75% と 77% の高い抗体保有率であった。

#### 7. JEV/eq/Tottori/2003 の全塩基配列

今回、2003年に鳥取県のウマに致死をもたらしたウイルス JEV/eq/Tottori/2003 の全塩基配列を決定した。その結果、典型的な genotype I であり、他の株と異なる特徴的な変異は認められなかった。

#### 8. JEV/eq/Tottori/2003 の病原性

脳内接種の場合、JEV/eq/Tottori/2003 株の 10 PFU の投与によりすべてのマウスが死亡した。JaOH0566 株でも 10 PFU の投与ですべてのマウスが死亡した。腹腔内接種の場合、JEV/eq/Tottori/2003 株を 10,000 PFU 投与しても 4 匹中 1 匹しか死亡しなかった。JaOH0566 株では 1,000 PFU の投与によりすべてのマウスが死亡した。

#### 9. 犬への JEV 感染実験

Genotype III である JaOH0566 株を経皮と静脈内接種で同時接種し、その後の体重、体温、臨床症状を観察した。臨床症状における異常は認められなかった。血液検査の結果においては CRP のみが異常値を示した。一方、ウイルス中和抗体価は感染後 14 日目には上昇が始まり、感染後 21 - 28 日目には抗体価がほぼ上限に達した。その後は少なくとも感染後 56 日目まで抗体価は維持された。また、血清および PBMC からのウイルス遺伝子の検出および分離できなかった。

#### D. 考察

1. アライグマ、イノシシ、タヌキなど近畿地方の野生動物で JEV 感染歴があった。
2. イヌの JEV 抗体陽性率から、四国と九州地方で JEV が蔓延していることが再確認された。
3. 室内飼育犬は 8.6% の低い JEV 抗体陽性率であったが、JEV 媒介蚊の室内への侵入が日本全国で証明された。飼育犬の JEV 抗体保有率の結果はブタでの日本脳炎流行予測調査結果と多くの点で一致していた。しかし、ブタがあまりいない地域でも調査可能であるという利点があり、その調査の結果、以前として、西日本を中心として JEV 感染の危険性が高いと考えられた。
4. 日本で流行している genotype I はマウスでの病原性が低いため、弱毒であると

考えられがちであるが、ウマに致死をもたらした株も他の株とあまり異なっていないことから、より慎重な判断が必要であることが示された。

5. 犬は JEV に感染し、炎症反応は伴うものの、臨床症状は示さないことが確認された。更に、JEV に対する抗体価は 56 日以上持続すること、ウイルス血症を引き起こさないことが確認された。これら感染実験の結果と前年度までの調査結果により、犬は日本脳炎感染状況を血清学的に調査するための安全で優れた対象となることが示された。
6. 牛での調査は毎年 70% 近くの牛が感染していることが確認され、以前のシカでの結果とともに偶蹄類は JEV に対して感受性が高いことが示された。

#### E. 結論

野生動物と伴侶動物の JEV 抗体保有率の結果はブタでの日本脳炎流行予測調査結果と多くの点で一致しており、依然として九州・四国地方を中心に日本各地で日本脳炎ウイルスが活動していることが示された。室内飼育犬での調査は、室外に出ることが少ない幼児や老人も日本脳炎に対する注意喚起が必要であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shimoda H, Ohno Y, Mochizuki M, Okuda M, Iwata H, Maeda K\*. Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2010 Jul;16(7):1137-1139.

Shimajima M†, Nagao Y†, Shimoda H, Tamaru S, Yamanaka T, Matsumura T, Kondo T, Maeda K\*. Full genome sequence and virulence analyses of the recent equine isolate of Japanese encephalitis virus. *Journal of Veterinary Medical Science* (In press) (†Equally contributed)

Ohno Y, Sato H, Suzuki K, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, Sashika M, Inokuma H, Kai K, Maeda K\*. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2009. 71(8):1035-1039.

前田 健「イヌジステンパーウイルスおよび日本脳炎の抗体保有状況と課題」兵庫県におけるアライグマの現状 (兵庫県森林動物研究センター研究部編集)第6章 p55-65, 2009

前田 健:野生動物、伴侶動物、生産動物、昆虫、人が関与する日本脳炎ウイルス. *Journal of Veterinary Medicine* (獣医畜産新報)(文永堂) 2010

## 2. 学会発表

前田 健、大野 佳、佐藤 宏「伴侶動物と野生動物における日本脳炎ウイルス感染の血清疫学調査」第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2008年6月(香川)

大野 佳、前田 健、甲斐一成、佐藤 宏、鈴木和男「野生動物における日本脳炎ウイルスの感染状況」第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月(宮崎)

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、望月雅美、前田 健「イヌにおける日本脳炎ウイルス感染状況(全国調査)」第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月(北海道)

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」第46回山口県獣医学会、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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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）  
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（H20-22年度）

## 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）  
喜屋武向子（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班）  
小滝 徹（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：1985～2010年のJEV感染源調査結果を用いて、沖縄本島のJEV活動の現状を検討した結果、2000年頃から沖縄本島のJEV活動が低下している可能性が考えられた。しかし、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、沖縄本島全体のJEV活動が低下しているのではなく、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。沖縄本島以外の島のJEV活動状況調査では、5～10ヶ月齢ブタ血液検体を宮古島で2005～2007年に125検体、石垣島で2005～2007年および2009～2010年に240検体、久米島で2005～2007年に42検体、与那国島で2006～2007年に54検体、そして、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抗体の検出を行った。結果、宮古島、久米島、与那国島からJEV抗体は検出されなかったが、石垣島のブタ血液9検体(3.8%)および西表島のイノシシ血液47検体(44.8%)がJEV抗体陽性を示した。石垣島のJEV抗体陽性9検体中5検体は2005年に採集されたもので、それらのHI価は1:40～2560を示し、4検体がIgM抗体陽性を示した一方、2009～2010年に採集された4検体はいずれもHI価1:10であった。また、西表島のJEV抗体陽性率は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。これらのことから、石垣島、西表島においては一時的にJEV活動が活発になった可能性が考えられた。さらに石垣島および西表島のブタ、イノシシ血液検体からJEV遺伝子の検出を行った結果、2005年に採集された石垣島のブタ血液検体1検体からJEV遺伝子が検出され、E領域の一部の塩基配列(151nt)を解析したところ、遺伝子型3型で2006～2008年の台湾株に近年の株であった。このことから、石垣島と西表島においては、島外からJEVが侵入した可能性もまた考えられた。1972～1976年に沖縄本島で分離されたJEV 19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(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おり、例年、沖縄県はこれによりJEV活動の活発化を確認すると、日本脳炎注

意報を発令していた。しかし、2009年、2010年には発令がされなかった。また、沖縄県には沖縄本島以外に多くの島々があるが、JEV感染源調査は沖縄本島のみで行っているため、これ以外の島のJEV活動状況については多くが不明である。

県民あるいは沖縄県を訪れる観光客のJEV感染予防の点から、県内のJEV活動状況をより正確に把握することは極めて重要である。今回、1985～2010年までのJEV感染源調査記録から沖縄本島のJEV活動の現状を検討するとともに、沖縄本島中南部のJEVワクチン未使用農家の繁殖豚血清中のJEV抗体保有状況調査および宮古島、石垣島、久米島、与那国島、西表島のブタおよびイノシシのJEV感染状況調査を行った。

また、当所において凍結乾燥されていた1972～1976年に沖縄本島で分離されたJEVについて遺伝子解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 沖縄本島のJEV活動状況調査

1985～2010年のJEV感染源調査結果を用いて、沖縄本島のJEV活動の現状を検討した。調査は年によって若干異なるが、4月下旬から8月まで毎週1回実施し、検体は沖縄本島北部および中南部の農家から、と畜場に搬入された5～8ヶ月齢のブタの血液を各25検体採集している。採血はと畜場の職員により行われ、農家の指定、特定はしていない。JEV抗体の検出は血液から血清を分離後、1:10～1:5120まで2倍階段希釈し、感染症流行予測調査事業検査術式に則りHI試験により実施している。1:40以上で陽性のものは2-メルカプトエタノール感受性抗体(IgM抗体)の検出を行っている。なお、2008～2010年は中南部における調査は実施していない。

また、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 $3.1 \pm 1.1$ であった。これらについて、HI試験を実施した。

### 2. 宮古島、石垣島、久米島、与那国島、西表島のJEV活動状況調査

ブタ血液は5～10ヶ月齢のブタから採血を行い、宮古島で2005～2007年に125検体、石垣島で2005～2007年および2009～2010年に240検体、久米島で2005～2007年に42検体、与那国島で2006～2007年に54検体を採集した。表1に各月の検体数を示す。イノシシ血液は狩猟期に捕獲されたイノシシから採血を行い、2008～2011年の狩猟期に石垣島17検体、西表島105検体を採集した。血液検体は血清を分離し、HI試験と、一部の検体についてはRT-PCR法あるいはreal-time RT-PCR法によりE領域を標的としたJEV遺伝子の検出を実施した。

### 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。ブタ血液はと畜場に搬入されたブタから採集し、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

北部および中南部のJEV抗体陽性率の年間最高値; 1985年に中南部が80%以下を示したが、1986～2004年までは北部、中南部ともに80%以上を示した。しかし、中南部において2005年に80%を、2006、2007年に50%を下回り、北部においては2007年まで80%以上を示したが、2008年に80%を、2009、2010年に50%を下回った。

北部および中南部の 5～9 月それぞれの平均 JEV 抗体陽性率；平均 JEV 抗体陽性率は各年 5～9 月のうち、2 回以上調査が実施された月を対象に算出した。北部においては 2003 年以降、中南部においては 2003 年を除き 1999 年以降、7 月で平均 JEV 抗体陽性率が 50%以上を、8 月で 80%以上を示さなかった。また、中南部では 2006 年 8 月、9 月に、北部では 2010 年 7 月、8 月に JEV 抗体が検出されなかった。IgM 抗体は北部、中南部ともに確認されない月がいくつかみられた。

各月の北部と中南部を合わせた HI 抗体陽性検体中各 HI 価を示した検体の割合；5 月および 6 月においては 1:10 および 1:20 を示した検体が多く、7 月には 1:1280、8 月には 1:640 と 1:1280、9 月には 1:640 が最も多かった。北部および中南部の 1985～1999 年と 2000 年以降の、7～9 月の HI 抗体陽性検体中 HI 価が 1:640 以上を示した検体の割合は、北部、中南部ともに 1985～1999 年の割合が 2000 年以降よりも有意に高かった ( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.001$ )。また、1985～1999 年および 2000 年以降ともに北部の割合は中南部よりも有意に高かった ( $P<0.01$ )。

繁殖豚血液が採集された農家の位置と、HI 試験の結果；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. 宮古島、石垣島、久米島、与那国島、西表島の JEV 活動状況調査

ブタ血液中 JEV 抗体調査の結果、石垣島の 9 検体(3.8%)から JEV 抗体が検出され、宮古島、久米島、与那国島は全て陰性であった。石垣島の JEV 抗体陽性 9 検体の HI 抗体価は、2005 年 8 月に採血された 5 検体の HI 価は 1:40～2560 で、4 検体は IgM 抗体陽性を示した。一方、2009、2010 年の 4 検体の HI 価は 1:10 であった。石垣島のブタ 240 検体において JEV 遺伝子の検出を実施したところ、2005 年 8 月の 1 検体から JEV 遺伝子

が検出された。この検体は JEV 抗体陰性で、Vero および C6/36 細胞を用いたウイルス分離に供したが、JEV は分離されなかった。検出された JEV 遺伝子 151nt について、クローニングを実施後、塩基配列を解析し、既知の JEV 株と比較した結果、遺伝子型 3 型に属し、2006～2008 年に台湾で分離された株に近縁であった。

イノシシ血液中 JEV 抗体調査の結果、石垣島は全て JEV 抗体陰性で、西表島は 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。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 ( $p<0.05$ )。西表島の体重別 JEV 抗体陽性率は、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。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。

3'NTR 領域について解析した結果、JaOAr73050 株と JaOAr73062 株において、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

沖縄本島において 1985～2010 年に実施された JEV 感染源調査の結果から、JEV 活動の現状を検討した。JEV 抗体陽性率の年間最高値は北部では 2008 年、中南部では 2005 年から低下し、月ごとの平均 JEV 抗体陽性率および HI 価は 2000 年頃から低下していた。これらのことから、沖縄本島の JEV 活動が低下している可能性が考えられた。

しかし、繁殖豚の調査において、中南部 8 市町村のブタ農家の JEV 抗体陽性率は 0～ $\geq$ 80% と差があった。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。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ことから、今回、採集した検体は、約 2～3 歳のブタを中心に採血されたものと考えられた。2008 年以降、JEV 感染源調査において中南部の調査は行っていないが、中南部においても依然として JEV が活動しており、そして、その活動には地域差があることが示された。

沖縄県農林水産部農業関係統計によると、1985 年から 2000 年に沖縄本島のブタ農家は 1912 戸から 434 戸と約 4 分の 1 に、ブタ頭数は 300,900 頭から 290,796 頭と 10,104 頭減少し、一農家当たりの平均ブタ頭数は 4.3 倍に増加した。その後、2000 年から 2005 年にブタ農家は 117 戸、ブタ頭数は 56,790 頭減少し、平均ブタ頭数は 1.1 倍に増加した。1985 年から 2000 年に沖縄本島のブタ農家は少数大規模化が進み、その後の 5 年間はブタ頭数が大きく減少したことから、ある程度の規模の農家においても廃業や規模縮小などが起こったと考えられた。水田は南部の一部と中部から北部にかけて分布しているが、その面積もまた 1985 年から 2005 年に 213ha から 159ha と減少していた。これらのことから、沖縄本島のブタ農家は、少数化により各農家で周囲の環境が異なるようになり、結果として JEV 活動状況にも差が出るようになったと考えられた。

JEV 感染源調査では採血する農家の指定をしていない。農家数減少により、採血対象となる農

家が固定化され、それが JEV 活動の低い農家であるため、JEV 抗体陽性率が増加しない可能性が考えられた。今後、北部においても同様の調査を行い、得られた結果を考慮し JEV 感染源調査を行っていくことが重要である。

## 2. 宮古島、石垣島、久米島、与那国島、西表島の JEV 活動状況調査

ブタおよびイノシシの調査結果から、宮古島、石垣島、久米島、与那国島における JEV 活動状況は極めて低いことが示された。宮古島および久米島は水田がない、もしくは極めて少なく、結果、水田を主な発生地とするコガタアカイエカの数が少ない可能性があり、このことが JEV 活動の低い要因と考えられた。一方、石垣島と与那国島は水田が豊富にあるが、過去に大規模な蚊の駆除作業や島内のブタの全頭と殺を行っており、これが関与していると考えられた。しかし、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 年の調査期間中に 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、今

回、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) JEV 感染源調査により、2000 年ごろから沖縄本島の JEV 活動の低下が確認されたが、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 抗体保有状況の調査結果から、沖縄本島全体の JEV 活動が低下しているのではなく、地域により JEV 活動状況が異なる可能性が考えられた。
- 2) 宮古島、石垣島、久米島、与那国の JEV 活動は極めて低いものと考えられた。しかし、石垣島、西表島においては島外から 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：

- (1) Nidaira, M., Taira, K., Okano, S., Shinzato, T., Morikawa, T., Tokumine, M., Asato, Y., Tada, Y., Miyagi, K., Matsuda, S., Itokazu, K., Kudaka, J., Nakamura, M., Tamanaha, K. Survey of Japanese Encephalitis Virus in Pigs on Miyako, Ishigaki, Kume, and Yonaguni Islands in Okinawa, Japan. *J. Infect. Dis.*, 62, 220-224, 2009
- (2) 仁平稔、平良勝也、岡野祥、松田聖子、糸数清正、久高潤、中村正治、玉那覇康二、宮城国太郎、多田雪宏. 沖縄県石垣島のブタからの日本脳炎ウイルス抗体および遺伝子型Ⅲ型の日本脳炎ウイルス遺伝子の検出. 病原微生物検出情報 (IASR), 30, 9-10, 2009

#### 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

## 日本脳炎ウイルスの分離とその病原性に関する研究

分担研究者 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：** 近年にあっ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、一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砕液を用いて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、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。

遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べるために2005年分離のIshikawa-K05株（遺伝子タイプ1型）に注目している。Ishikawa-K05株とJaGAR01株（遺伝子タイプ3型）との生物活性の比較では、細胞における増殖性はJaGAR01株が高いが、マウスに対する病原性ではIshikawa-K05株の方が毒性は若干高かった。FACSによる詳細な解析では両株共に細胞のアポトーシスを起こしていることが確認された。JEV感染における宿主応答を遺伝子レベルから解析することも必要と思われ、我々は引き続き宿主応答の解析を行っている。感染病態の詳細な解析は将来的にJEV感染に対する有効治療法開発に向けての有用な基礎データとなるであろう。

### 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た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ろう。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、破砕した。破砕液は遠心（10,000 x g、10分間）にて分画した。

RNA抽出及びRT-PCR：蚊破砕液を材料としてIsogen試薬を用いてRNA抽出し、得られたRNA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%牛胎児血清入りの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年)、591匹(2010年))。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細胞を利用したウイルス分離で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FACS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 PE