

T as biological prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. *Ann Nucl Med* 24:533-540, 2010

(4) Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T: Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. *Microbiol Immunol* 53: 496-501, 2009

## 2. 学会発表

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、竹上 勉：石川県内でのドライアイストラップによるコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離、第45回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京 (2010. 5)
  - 2) Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and biological activity of JEV protein NS4a, 44<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sapporo (2010, 7)
  - 3) Takegami T, Murakami M, Ishigaki Y: Pathogenicity of Japanese encephalitis virus (JEV) and physiological role of JEV protein NS4a, 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul (2010, 7)
  - 4) 村上 学、竹上 勉：石川県内の水田近辺で採取したコガタアカイエカ採集と日本脳炎ウイルスの分離(2009-2010年度)、第58回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
  - 5) 竹上 勉、村上 学、奴久妻聡一：日本脳炎ウイルスの非構造蛋白NS4a変異と宿主応答の差異、第58回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
  - 6) 奴久妻聡一、中道一生、亀岡正典、杉浦重樹、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉：HIV-1 Tat はPML型JCVの増殖を促進する、第58回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
  - 7) 竹上 勉、村上 学、石垣靖人：持続感染日本脳炎ウイルスの蛋白NS4aにおける変異多発と宿主応答の関わり、第33回日本分子生物学会、神戸、(2010, 12)
  - 8) 村上 学、竹上 勉：石川県内豚舎周辺で採取したコガタアカイエカからのJEV分離 (2009~2010)、第17回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京 (2010, 12)
  - 9) 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)
  - 10) 太田隆英、前田雅代、村上 学、竹上 勉、達家雅明：ヒト上皮系細胞株においてRhoGDI $\beta$ は中心体および頂端側細胞間接着部位に存在する、第68回日本癌学会総会、横浜 (2009, 10)
  - 11) 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)
  - 12) 竹上 勉、村上 学：フラビウイルス感染における宿主応答とウイルス病原性との関わり、第57回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)
  - 13) 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)
  - 14) 奴久妻聡一、亀岡正典、杉浦重樹、中道一生、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉：HIV-1 Tat によるArchetype JCウイルスの増殖促進、第57回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)
  - 15) 蔡傑、石垣靖人、太田隆英、村上 学、竹上 勉：HCV蛋白NS3は宿主遺伝子の安定性に影響しうる、第32回日本分子生物学会、横浜、(2009, 12)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」

分担者研究報告書

日本脳炎ウイルスの疫学に関する研究

分担研究者 森田 公一（長崎大学・熱帯医学研究所 教授）

研究要旨：近年、日本において日本脳炎は超低流行状況にあり年間の患者発生は10名をきっている。しかしながら夏季には関東以南の地域で継続的に日本脳炎ウイルス（JEV）の活動が確認されており、野外採取のコガタアカイエアから JEV が分離されている。さらに小西らの調査では一般市民の不顕性感染が存在することが証明されており、我が国においては日本脳炎の感染リスクは依然として存在する。一方隣国の中国ではワクチンの普及とともに患者数は激減しているが、いまだ数千人単位の日脳患者が発生しており、東南アジアやインドでは以前より大きな流行が報告されている。このような状況のなかで日本において活動しているウイルスとアジアの日本脳炎流行地域のウイルスの差異を比較研究することは日本における今後の日本脳炎対策を考えるうえで重要である。本年度の研究では平成20年度に引き続き、ベトナム、中国、日本で過去に分離された JEV の遺伝子を分子疫学解析する一方で、タイ国など東南アジアに生息している JEV を比較しアジア全域の JEV 分子疫学解析を実施した。その結果、前年度と同じくインドシナ半島北部に生息する JEV が比較的頻繁に中国を経由して日本に到達していることを確認する一方でインドシナ半島南部に生息し中国、日本方向へは転進しないウイルスグループが存在することを明らかにした。さらに前年度に引き続き、中国から日本に JEV が飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島における JEV の採取と解析も継続実施するとともに五島列島を含む長崎県全域のブタおよび野生イノシシの血清疫学調査を実施し野生イノシシにおける抗体陽性率を明らかにした。さらに、ウイルスの病原性（脳炎発症性）についても解析した。

#### A. 研究目的

中国、日本、東南アジアで分離された JEV の遺伝子を分子疫学解析し、東南アジアと日本に生息している JEV の生態をより詳細に解析すること。および、中国から日本に JEV が飛来する場合、もっとも早く到達すると考えられる1つの場所として長崎県五島列島を想定し、ブタと蚊における調査を開始して、東南アジア

から日本までの JEV の移動状況を詳細に明らかにすること、さらにウイルス保有あるいは増幅動物として野生イノシシの役割を明らかにすること、さらに日本脳炎ウイルスの病原性やブタにおける生き残り戦略を分子レベルで解明することを目的として本研究を実施した。

#### B. 研究方法

1) 日本脳炎ウイルスの分子疫学

我々が日本やアジア各国で分離したウイルス株、およびGenBankに登録されている JEV 遺伝子の情報 (Genotype I:119 株, Genotype II: 10 株, Genotype III:183 株, Genotype IV: 3 株) 315 系統の JEV 株について E 蛋白質領域のアラインメントを行った後、遺伝子型 I 型と III 型に分けてネイバージョイニング法を用いて系統樹解析を実施した。

## 2) 蚊の採取

2008 年～2010 年の毎夏 (①2008 年 8 月 20 日～22 日、②2009 年 8 月 24 日～27 日、③2010 年 9 月 13 日～17 日)、五島列島 (五島市、新上五島町) においてライトトラップ及び吸血管により捕集した蚊を分類後、雌雄判別及び吸血の有無を確認し、各々プール (最大 20 匹 / pool) を作製した。媒介蚊の各プールはホモジナイズした後、蚊培養細胞クローン C6/36 細胞及び Vero9013 細胞に接種してウイルス分離を行った。分離・同定した JEV はエンベロープタンパク (E) 領域の塩基配列を決定した。

## 3) ブタとイノシシ調査

2006 年 5 月～2010 年 4 月までに長崎県内各所 (五島列島と対馬を含む) で捕獲されたイノシシ 303 頭と 2008 年～2010 年と畜場に出荷されたブタから採血し、JEV に対する JEV 抗体価 (IgG, IgM) を ELISA 法により測定するとともに C6/36 細胞及び Vero9013 細胞を用いてウイルス分離を実施した。分離・同定した JEV は E 領域の塩基配列を決定した。

## 4) 中枢神経病原性の研究

5 週齢の近郊系 C57BL/6j マウスに日本脳炎ウイルス JaOArS982 株を  $10^4$ PFU 皮下感染させ、その病状を観察し体重を測定した。13 日目に重症個体と軽症個体を体重減少率により区別し (既報)、それぞれの脳内のウイルス量および炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4) の発現量を比較した。

## 5) ブタ (細胞) における増殖特性の解析

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

## C. 結果

### 1) 東南アジアの JEV 分子疫学解析

昨年の解析により遺伝子型 I 型のウイルスは比較的頻繁に東南アジアから中国を経て日本に飛来している事実を明らかにした。本年の解析においてはタイ国で分離されたウイルスを加えて解析した。その結果、遺伝子型 I 型のウイルスの一部のグループはタイ国を中心に生息しているが、他の 1-A (1-A-1 ~1-A-8) に分類されるグループのように東アジアを西から東に移動することはなく東南アジアに限局して生息していることが明らかになった。このことは JEV の生態学を考える上で極めて重要な所見である。すなわち、1-A グループに見られる長距離の移動はウイルスがもつ何らかの生物学的性状によって規定されるのか、あるいは 1-A が多く生息する地域 (ベトナム北部から中国雲南省) にウイルスを効率よく運ぶ手段が存在するのかのいずれかの可能性が考えられる。また、今回新たに実施した JEV 遺伝子型 III 型の解析では III 型ウイルスは 7 つのグループに分類できた。このうち 3-A-1, 3-A-2, 3-B-1, 3-D と定義したグループでは同時期に中国、日本、韓国、ベトナムにおいて分離されており 1990 年以前、即ち日本に I 型ウイルスが侵入する以前にも III 型ウイルスが比較的頻繁にアジアを移動していることが推測できた。興味深いのは、3-E のグループは近年中国でのみ分離されており 2000 年以降中国で独自の進化 (変化) を遂げているグループである。このグ

ループがどうして日本に侵入しないのかについては今のところ全くわからない。

## 2) 五島列島で蚊からの JEV 分離

2010 年は JEV を分離できなかったが、2008 年に *Culex tritaeniorhynchus* 及び *Culex* 属の 7 プールから 7 株 (JaNAr-01G-08, JaNAr-03G-08, JaNAr-04G-08, JaNAr-11G-08, JaNAr-14G-08, JaNAr-23G-08, JaNAr-33G-08) の計 7 株と 2009 年 *Culex tritaeniorhynchus* の 1 プールから 1 株 (JaNAr-01G-09) を分離した (表 1)。E 領域に基づく遺伝子解析から 2008 年は 1-A-5 に、2009 年は 1-A-1 と異なる subcluster に属した。

## 3) ブタとイノシシの調査

と畜場で採取したブタ血液のなかで日本脳炎抗体陰性であったブタ 440 頭 (2008 年 80 頭、2009 年 80 頭、2010 年 280 頭) からウイルス分離を試みた。その結果 2009 年に 2 頭から 2 株 (JaNP-22-09, JaNP-25-09)、2010 年に 3 頭から 3 株 (JaNP-95-10, JaNP-96-10, JaNP-84G-10) の JEV を分離した。E 領域に基づく遺伝子解析から 2009 及び 2010 年の長崎本土産のブタ血清から分離された JEV 株は 1-A-5 に、2010 年の五島産のブタ血清から分離された JEV 株 (JaNP-84G-10) は 1-A-2 と異なる subcluster に属し、更に、この JaNP-84G-10 は 2008 年及び 2009 年に五島列島で蚊から分離された JEV 株とも異なる subcluster に属した。また捕獲したイノシシ 303 頭からはウイルスは分離できなかった (表 2) 捕獲イノシシの抗体検査においては長崎本土と五島列島、対馬において抗体陽性個体が確認された。抗体保有率は 52%~67%であった。離島調査地域の上五島と対馬ではブタは飼育されておらず、この地域ではブタを介しない日本脳炎ウイルスの伝搬が存在することが明らかになった。

## 4) 中枢神経

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

## 5) ブタ (細胞) における増殖特性の研究

日本脳炎ウイルスはブタ由来細胞 (PS) においてサル由来細胞 (LLC-MK2) よりも高い増殖性と感染拡大 (プラークサイズ) をしめした。しかしながらブタ細胞ではインターフェロンの産生はサル細胞より遅れた立ち上がる現象が見られた。

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

## D. 結論

- 1) 日本脳炎ウイルス遺伝子型 III 型のウイルスは 1990 年以前に東南アジアから東に向かって移動し日本列島に飛来していた可能性が高い。
- 2) 遺伝子型 I 型のウイルスの一部はベトナム、雲南省から中国を経由して日本に移動している。しかしタイ国を中心として東南アジアに生息している他の I 型ウイルスにはそのような兆候は見られず地域に局限している。
- 3) 遺伝子型 III 型のウイルスのうち一部のグループは中国で継続的に進化 (変化) をしているが、日本に侵入した形跡がない。
- 4) 2008 年~2010 年に五島列島で JEV を蚊

及びブタ血清から計9株分離した。

- 5) 2009年及び2010年に長崎のと畜場で採取したブタ血液から JEV 計4株を分離した。
- 6) 2009年に五島列島、対馬で捕獲されたイノシシの血液から日本脳炎ウイルス抗体を検出した。
- 7) マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの中樞神経への病原性の強弱は個体それぞれの炎症性サイトカインの発現パターンにより決定されていることが示唆された。
- 8) 日本脳炎ウイルスはブタ細胞においてその遺伝子複製産物である dsRNA の細胞質への露出を遅延させ、インターフェロンの産生を遅らせていると結論した。

#### E. 考察

日本脳炎ウイルスが長距離を移動していることは我々が昨年、本年と実施した分子疫学解析により明らかである。しかしながら、本年の研究では一部の遺伝子型グループが東南アジア、あるいは中国に限局して生息し進化(変化)をつづけていることも明らかになりつつある。この生態学的な差異はウイルスの生物学的性状に起因するのか、ウイルスの運び屋となる同動物との関連において規定さえるのか今のところ不明である。日本脳炎ウイルスの生態を解明し感染予防に役立てるために今後この点を明らかにすることが必要である。

日本脳炎ウイルスの増幅動物であるブタのいない離島において野生のイノシシが日本脳炎に感染していることが明らかになった。これらの離島では冬には完全に媒介蚊が消失していることがわかっており、ウイルスが島で越冬することは考えにくい。おそらく毎年中国本土あるいは日本本土から何らかのルートでウイルスが侵入していると考えるのが妥当であろう。幸い本年も昨年に引き続き五島列島では蚊から日本脳炎ウイルスの分離に成功した。今後この五島列島で分離した日本脳炎ウイルスの

遺伝子解析から分子疫学分析を実施することでウイルス侵入(移動)経路が明らかになるものと期待される。

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

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

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

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

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

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

Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. *J. Virol. Meth.* Vol.167:31-36. 2010

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

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

Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT. Development and evaluation of a real-time reverse transcription- loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* Vol. 47(3): 645-51. 2009

Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. 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, and Kouichi Morita. *J Gen Virol.* Vol.90: 827-832. 2009

Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K., Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009

Kinoshita H, Mathenge EG, Hung NT, Huong VT, Kumatori A, Yu F, Parquet MC, Inoue S, Matias RR, Natividad FF, Morita K, Hasebe F. Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic Fever patient. *Jpn J Infect Dis.* Vol.62(5):343-50. 2009

Kouichi Morita. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in East Asia. *Vaccine.* Vol.27:7131-7132, 2009

森田公一；「日本脳炎、その他の脳炎」、in 新臨床内科学第九版、高久史磨・尾形悦郎・黒川清・矢崎義雄 監修、医学書院、2009

森田公一；蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患—デング出血熱の発症機序をめぐって—；最新医学 (The Medical Frontline) , Vol 64(4), 919-923, 2009.

森田公一、木下一美；デング熱研究の最前線、医学のあゆみ (J.Clin.Exp.Med.) Vol.229(4), 241-245, 2009

森田公一；日本脳炎ワクチン、化学療法の領域、Vol.25:1459-1465. 2009

## 2) 学会発表

国際会議における発表

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Dihn Tuan Duc, Hitomi Kinoshita, Kazuki Kitaura, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: The mechanism of severe form of Japanese encephalitis virus infection 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases Sapporo, Japan. June28-30, 2010

Kouichi Morita: Rapid and comprehensive arboviruses detection by using nLC-ESI/MS/MS, 14<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infections in the Pacific Rim. Penang, Malaysia October 4-6, 2010

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 16—17 日 . (Oral Presentation II)

Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Co Thach, Vuong Duc Cuong, Ngo Khanh Phuong, Shingo Inoue, Yu Fuxun, Pham Cong Tien, Dang Tuan Dat, Phan Thi Nga, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita : 2009 Bats Survey in Vietnam - Bats are important reservoir hosts of arboviruses - . International Joint Forum on Infectious Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, 2009 年 9 月 16—17 日 . (Poster Session)

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Kenta Okamoto, Tomoshirou

Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Filipinas F. Natividad, Phan Thi Nga, Futoshi Hasebe: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Phan Thi Nga, Do Phuong Loan, Nguyen Viet Hoang, Bui Minh Trang, Le Thi Hien Thu, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Arnaud Fontanet, Paul Brey, Nguyen Tran Hien: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Phan Thi Nga: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia: The 4<sup>th</sup> Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki City, Japan, 26-28 December, 2009.

Kazuya I.P.J. HIDARI, Kouichi MORITA, Takashi SUZUKI : ANTI-DENGUE VIRUS ACTIVITY OF SULFATED POLYSACCHARIDES. Emerging Infectious Diseases 2009. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009 年 12 月 8—11 日 .

Yasunami M, Nguyen TPL, Horie H, Kurata S, Yamazaki A, Shibata H, Vu TQH, Tran TT, Ha MT, Vo VT, Tran VD, Kikuchi M, Morita K, Hirayama K : SUSCEPTIBILITY TO SEVERE DENGUE VIRUS INFECTION CONFERRED BY LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE 3 (LAG3) POLYMORPHISM. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

M. A. Islam, Choudhury, M.A.H.Z., Banu, S., Solaiman, H., Moula, K., and Morita, K. : ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THREE SERO-TYPES OF DENGUE VIRUSES FROM THE OUTBREAK YEAR 2007 AND 2008 IN BANGLADESH. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

Pandey B, Pun R, Pant K, Shah OP, Shah Y, Poudel A, Morita K, Inoue S, Kurane I : SEROLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF DENGUE VIRUS INFCION IN THE ENDEMIC TERAJ REGION OF NEPAL. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

#### 国内会議における発表

早坂大輔、上村将夫、田中香苗、森田公一：日本脳炎ウイルスの準種(quasispecies)による病原性の検討。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会・東京都新宿区、2010年5月28-29日  
左一八、須藤豊、神邊友宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルスによる硫酸化糖鎖認識。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会・東京都新宿区、2010年5月28-29日

早坂大輔、上村将夫、ディン テュアン デュク、田中香苗、永田典代、岩田奈緒子、佐多徹太郎、森田公一：日本脳炎ウイルスの株および準種の違いによる重症化の検討。第47回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリージュ、2010年9月3-4日

Lyre Anni E. Murao, Kouichi Morita. Defective recognition of Japanese encephalitis virus RNA in porcine cells delays the interferon response to promote viral dissemination. 第47回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市ホテルメリージュ、2010年9月3-4日

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、ディン・チュアン・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

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19日・20日

早坂大輔：ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で摂取した際の発症・致死性の比較。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19日・20日

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19日・20日



岡本健太、遠藤友志朗、Possadas Guillermo、余福勲、Maria del Carmen Parquet、鍋島武、井上真吾、Nguyen Thanh Thuy、Bui Minh Trang、Nguyen Tran Hien、Vu Sinh Nam、Filipinas F. Natividad、長谷部太、森田公一：プロテオミクス法を用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法の開発。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19日-20日

左一八、渡邊一平、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、長岡正人、森田公一、鈴木隆：フラビウイルス感染に関わる硫酸化糖鎖分子の構造と機能。第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日-11日

渡邊一平、左一八、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木隆：グリコサミノグリカンによるフラビウイルス感染阻害。第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日-11日

長谷部太： Dengue ウイルスと viral quasispecies(ウイルス準種)。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

岡本健太、遠藤友志朗、井上真吾、鍋島武、Posadas Guillermo、余福勲、Filipinas F. Natividad、Phan Thi Nga、長谷部太、森田公一：LC/MS/MSを用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

Lyre Anni Murao, Kouichi Morita: RNA-dependent regulation of the interferon response by dengue virus. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Murao, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Kenji Hirayama: Role of circulating plasma DNA in severe dengue disease. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

渡辺直熙、Nguyen Thi Phuong Lan、Vu Thi Que Huong、Tran Thi Thuy、Vo Dinh Tham、Tran Van Dat、菊池三穂子、安波道郎、森田公一、平山謙二、古田隆久： Dengue 熱の病態形成におけるマスト細胞の関与。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

上地玄一郎、山城哲：ファージディスプレイ法を用いたインフルエンザウイルス H5N1 亜型に中和活性を示すヒト単クローン性抗体の分離。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

山城哲、中込とよ子、中込治：北部ベトナムにおける小児重症下痢症に関する網羅的病因検索と混合感染の重要性に関する研究。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

吾郷昌信、平野学、山口顕徳、吉川亮、Umami Qifqiyar Nur、西村順裕、清水博之：上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出同定法。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25-27日

山城哲、中込とよ子、中込治：ベトナムにおける重症小児科下痢症に関する疫学研究。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25-27日

堀田こずえ、高桑弘樹、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、山城哲：ハノイ市郊外で飼育されるアヒルおよびブタにおけるA型インフルエンザウイルス分布調査。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25-27日

余福薫、木下一美、井上真吾、長谷部太、森田公一：Sero-diagnosis of SARS infection using recombinant N protein expressed by baculovirus expression system。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25-27日

左一八、加藤大介、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖を介したデングウイルス-宿主細胞間相互作用。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25-27日

北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高島郁夫、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸透潤T細胞の解析。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25-27日

早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時

期の致死性。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25-27日

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25-27日

久保亨、井上真吾、森田公一：ケニア共和国における黄熱ウイルスならびにその他の蚊媒介性熱帯ウイルス感染症の網羅的血清学的解釈。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25-27日

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

日本脳炎ウイルス感染のリスク評価指標設定および実施に関する研究  
－沖縄本島北部における日本脳炎ウイルス感染リスク評価－

研究分担者 砂川 富正 国立感染症研究所 感染症情報センター主任研究官  
研究協力者 神谷 元 国立感染症研究所 感染症情報センター研究員  
研究協力者 斉藤 美加 琉球大学大学院医学研究科・感染制御学専攻・微生物学・腫瘍学講座助手  
研究協力者 當間 孝子 琉球大学医学部保健学科国際環境保健学分野教授  
研究協力者 伊佐 真之 沖縄県立北部病院小児科 部長  
研究協力者 浜端 宏英 アワセ第一医院小児科 医長

研究要旨

研究班最終の2010年度より参加した本研究班における、「沖縄本島（特に北部）における日本脳炎ウイルス感染リスク評価」の活動では、計画していた人、蚊に関する調査については、蚊についての調査しか実施できなかった。蚊の調査からは沖縄本島北部においては日本脳炎リスクが引き続き存在することが示唆された。2011年度以降に、沖縄県北部地域を中心とする日本脳炎ウイルス感染リスクに関する情報収集を、血清疫学を中心に実施予定である。その結果、標準的に使用可能な指標を整理する。その結果を持って、地域レベルのサーベイランスの改良やワクチン接種等の公衆衛生上の提言を行っていく。

A. 研究目的

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスを保有している蚊に刺されることにより、感染・発症するウイルス感染症である。感染した後発症するのは、100～1000人に1人程度と考えられているが、発症すると、高熱を発し、痙攣、意識障害などの脳炎症状を呈する。有効な治療方法はなく、致死率は20%程度、約半数は後遺症を残し、中には脳にダメージを受け麻痺などの重篤な後遺症が残る場合もある。

わが国の日本脳炎患者報告数は、農業形態の変化による媒介蚊の減少、都市化や生活環境の変化、またワクチン接種と連動して著しく減少し、近年では、年間数名程度の発生にとどまっ

ている。しかし、日本脳炎ウイルスの増幅動物であるブタにおける感染状況をみると、西日本を中心に毎年広い地域で抗体陽性のブタが確認されており、これは日本脳炎ウイルスに感染しているブタが多数存在することを意味する。

また、2005年5月30日の、厚生労働省による日本脳炎ワクチン積極的勧奨の差し控え以降、3～6歳での日本脳炎ワクチンの接種率が激減し、その結果、ヒトの日本脳炎に対する抗体保有状況は2008年度の0～6歳群でこれまでになく低い割合になっている。

日本における日本脳炎は、近年患者発生数は少ないが、ウイルスが存在している事が示されている。このため、感染のリスク評価を行うこ

とは、病勢の正確な把握と予防接種の介入の必要性、重要性を考慮する上で必須と考えられる。

今回の研究における大きな目的は以下のようになっている。「わが国の、地域レベルで実施可能な日本脳炎ウイルス感染リスクを評価するための指標を設定する。実際にその指標を用いて、国内各地域の感染リスクを評価し、ワクチン接種を含む決め細やかな公衆衛生上の介入策について提言を行う」。

今回我々は、日本脳炎ウイルスの活動が低下している事が示唆されている沖縄本島（特に北部地域）においての感染リスク評価を詳細に行い、全国的な指標の設定作業へ寄与する情報として実施し、実際に沖縄本島北部地域におけるリスクを評価し、公衆衛生上の提言を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

日本脳炎ウイルスの感染リスクを人、ブタ、媒介蚊（コガタアカイエカ）の調査から評価する。調査実施場所としては、以前ウイルスが存在すると考えられる沖縄本島北部を主とする。

人—日本脳炎に対する血清抗体を測定する。検体は沖縄県立北部病院にて採取し、抗体価は琉球大学医学部微生物学・腫瘍学講座にて測定する。

<対象> 沖縄県立北部病院を受診した7ヶ月から就学前（6才未満）の小児（出来るだけ各年齢20人程）、沖縄本島北部：260人。本島北部との対照群として中部の医療機関（アワセ第一病院を想定）を受診した7ヶ月から就学前（6才未満）の小児（出来るだけ各年齢20人程）：120人についても計測を実施。共にワクチン未接種が明らかである者が望ましいが、調査協力（検体確保を含む）の実現性を優先する。具体的には3mlの血液を採取する（血清1.5ml）。<質問票にて収集する疫学情報> 性別、生年月日、郵便番号、日本脳炎ワクチン接種歴、屋外における活動の状況、動物との接触、家屋の

状況等。

<検査診断の方法> 中和抗体価を測定（50%フォーカス減少法）（日本脳炎ウイルス Beijing 株、沖縄の遺伝子型1株と遺伝子型3株、中山株）。

<調査期間> 感染研の倫理委員会通過後3か月程度を予定。

蚊—コガタアカイエカの分布状況、蚊の日本脳炎ウイルス保有率等について、琉球大学医学部国際環境保健学講座にて調査する。具体的には牛舎に日没前から翌朝まで、ライトトラップを設置し、成虫を捕獲し、その後分類を実施。

ブタ—日本脳炎ウイルス抗体の保有率等について、すでに流行予測調査で調査を行っている沖縄県衛生環境研究所と協議する。

（倫理面への配慮について）

本調査は、被接種者に関する個人情報扱うため、国立感染症研究所、琉球大学医学部、沖縄県立北部病院において、倫理審査の申請を行っている。

## C. 研究結果

人—予定していた研究期間に検査機関における検査の目途が延期となり、それに合わせて臨床検体の収集も延期となった。よって、実際の研究そのものの実施が延期となった。

蚊—沖縄県の沖縄本島での日本脳炎媒介蚊の調査結果は以下の通りである。

4月に1回、7月に2回調査を行った。その結果4月は4属7種503個体、7月の第1回目の調査では5属9種943個体、第2回目は4属7種715個体の蚊成虫が捕獲された。いずれの調査でも、日本脳炎を媒介するコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* が捕獲された。捕獲された蚊に対するコガタアカイエカの割合は25-78%で、7月に高頻度であった。

豚—沖縄県衛生環境研究所からの情報によると、今年度は研究としての本島北部についての抗体価の測定は行われていないものの、中南部の、日本脳炎ウイルスの活動性が低いと考えられている地域においてもウイルスの活動が得られている（本研究班における沖縄県衛生環境研究所：仁平氏他の研究結果を参照）。

#### D. 考察

沖縄本島内における日本脳炎ウイルスの活動性についてはこれまで流行予測調査により、豚の血清抗体価上昇などの情報が得られてきていたが、人を中心とした感染リスクについてはそのエビデンスは十分ではないと考えられる。今回、人、蚊、豚の三者より総合的なアセスメントを試み、それを持って、全国的に使用可能な指標の設定を検討したが、実際には、ヒトの血清疫学については準備段階までの実施に留まった。蚊については減少しつつあると言われたコガタアカイエカの存在が検出されたものの、経年的な情報が不足しているために、この情報のみを持って増加・減少を言うことは出来ない。豚については流行予測調査以外での研究としては本島中南部における血清調査が行われたが、ここでもウイルスの活動が検出されたことから、豚舎や水田などの状況がそろそろ北部においてはリスクが存在する可能性が非常に高いと考えられる。その評価のための今後の調査が重要である。今後、有効な指標が設定できるようであれば、豚の抗体上昇による警報・注意報をさらに強化するきめ細やかなは字ードマップのようなものを全国的に作成し、ワクチン接種強化や蚊の対策などの情報に資することが可能となると考える。

#### E. 結論

2010年度のみの本研究班の活動の中で、計画していた人、蚊に関する調査については蚊についての調査しか実施できなかった。蚊の

調査からは沖縄本島北部においては日本脳炎リスクが引き続き存在することが示唆された。

2011年度以降に、沖縄県北部地域を中心とする日本脳炎ウイルス感染リスクに関する情報収集を血清疫学を中心に実施予定である。その結果、標準的に使用可能な指標を整理する。出来れば国内各地で実際に日本脳炎ウイルスのヒト感染リスク評価を実施し、地域レベルのサーベイランスの改良やワクチン接種等の公衆衛生上の提言を行うことが目標となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表（著書を含む）

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	27	7129-7130	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.	80	856-861	2009
Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E	Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008	Japanese Journal of Infectious Diseases	63	58-60	2010
Konishi E, Kitai Y.	Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans.	Vaccine	27	7053-7058	2009
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	Jpn. J. Infect. Dis.	62	220-224	2009
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	J. Vet. Med. Science	71	1035-1039	2009

前田明彦、 脇口 宏	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	54	1367- 1382-	2010
Nabeshima T and Morita K.	Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia	Future Virology	5	343-351	2010
Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Koichi 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 (14)	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 (5)	875-878	2010
<u>Eiji Konishi</u> , 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
Miwa Kuwahara, <u>Eiji Konishi</u>	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 (10)	1560- 1566	2010



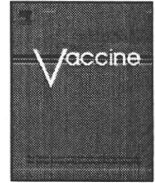
Jun-ichi Imoto, Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka, Misako Konishi, Kenji Murakami, Tomoyuki Shibahara, Masanori Kubo, Chang Kweng Lim, Masataka Hamano, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Haruhide Udagawa, Yoshihiro Mukuta, <u>Eiji Konishi</u>	Needle-free jet injection of small doses of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows.	Vaccine.	28 (46)	7373-7380	2010
Tomohiro Ishikawa, 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, <u>Eiji Konishi</u>	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
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
Shimoda H, Ohno Y, Mochizuki M, Iwata H, Okuda M, Maeda K	Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus.	Emerging Infectious Diseases.	16(7)	1137-1139	2010

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

## Short report

## Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: Prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses

Eiji Konishi

Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences, 7-10-2 Tomogaoka Suma-ku, Kobe 654-0142, Japan

## ARTICLE INFO

Article history:  
Available online 30 September 2009

Keywords:  
Japanese encephalitis virus  
Natural infection  
Nonstructural 1 protein

## ABSTRACT

The literature on natural infections with Japanese encephalitis virus in Japan and subclinical:clinical infection rates was summarized. To detect natural infections, conventional serologic methods were used in the past, while nonstructural 1 protein-based methods have been used recently. Annual infection rates in humans and horses indicated the status of natural virus activity in Japan.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Japanese encephalitis (JE) virus is characterized as a virus that produces a large number of subclinical infections, while its clinical infection manifests as deadly disease in humans and horses. In Japan, strong recommendation for JE vaccination was halted in 2005. This paper summarizes reports on JE surveys for revealing natural infection rates and subclinical:clinical infection rates, both of which are critical to evaluate the significance of JE vaccination.

Before 1960, natural infection rates in humans were calculated from age-dependent seropositivities obtained at one time point or seroconversion rates in paired sera collected before and after an epidemic period. Surveys carried out in 1946 [1,2] revealed antibody prevalences in different age groups, from which annual infection rates in central and south Japan including Tokyo (5%), Okayama (4%), Kumamoto (3%) and Okinawa (12%) are estimated using a method described later [3,4]. A report from Saitama in 1954 [3] described an annual infection rate of 17%, and another from Chiba and Saitama in 1956 [5] did 5%.

After the nationwide distribution of inactivated JE vaccine, conventional serologic methods, such as neutralization tests, were not appropriate for surveying natural infections, since these methods cannot differentiate antibodies induced by infection from those induced by vaccination. To address this issue, a method to detect antibodies to nonstructural 1 (NS1) protein of JEV was developed [6]. Since inactivated JE vaccine consists of viral structural proteins, NS1 antibodies are only induced by infection, not by vaccination; thereby they constitute a marker of natural infection among vaccinated populations. Annual infection rates were calculated basically from NS1 antibody prevalences which were divided by the duration of NS1 antibody responses.

Annual infection rates in humans between 1980 and 2004 ranged from 0.2 to 10%, roughly lower than those reported before 1960 (3–17%). A survey in and around Kobe, west-central Japan, revealed annual infection rates of 5–10% in the early 1980s and mid 1990s [6]. In addition, the rates in 8 selected prefectures across Japan in 2001 were 0.2–3.4% [7]. Further, a survey carried out in Tokyo using sera consecutively collected from each individual during 2001–2004 [8] revealed an annual infection rate of 2.8%, as determined by the number of individuals showing a significant increase in NS1 antibody levels during the epidemic season. A recent survey in Kumamoto (south Japan) showed an average infection rate of approximately 2% from 2004 to 2008 (unpublished data).

Surveys among racehorses supported the exposure of people to natural infection with JEV. Annual infection rates shown in 5 prefectures of the central (containing east and west) and south Japan ranged from 15 to 67% in 1998–2000 [9]. Another survey in Shiga (middle-central) and Ibaraki (east-central) prefectures revealed an average rate of 18%, based on a significant increase in NS1 antibody levels in serial sera collected during 1999–2003 [10]. A recent survey carried out in Shiga and Ibaraki still showed such high annual infection rates in racehorses in 2006 and 2007 (unpublished data).

In addition to natural infection rates, subclinical:clinical infection rates are another factor to consider the significance of vaccination. This factor was calculated from the natural infection rate obtained in a small population and the number of cases recorded in a big population including the small population used for obtaining the natural infection rate. Surveys carried out in Saitama (east-central Japan) in 1954 revealed an approximate subclinical:clinical infection rate of 1000:1 [3,11]. The rate reported from Kunsan of Korea in 1958 [12] was 25:1, which is the highest among those reported to date. A report from Thailand in 1969–1970 showed approximately 300:1 [4]. Thus, the subclinical:

E-mail address: [ekon@kobe-u.ac.jp](mailto:ekon@kobe-u.ac.jp).

cal:clinical infection rate ranged from 25:1 to 1000:1 in a variety of survey area (with different JEV strains), subjects (with different host susceptibilities) and period.

In conclusion, people are still exposed to natural infection with JEV in Japan, except for non-endemic northern areas. The subclinical:clinical infection rate surveyed in Japan using vaccinated people during 1982–1991 was 2,000,000:1, which was 2000–80,000 times higher than the ratio previously reported for unvaccinated populations as described above (25:1 to 1000:1), indicating the vaccine efficacy [6]. Therefore, the restart of recommendation for vaccination would be urgent for protecting people from JE in Japan.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid through Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (H20-shinkou-ippan-003) and Research on International Cooperation in Medical Science (H21-kokui-shitei-003), the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

#### References

- [1] Bawell MB, Deuel RE, Matsumoto M, Sabin AB. Status and significance of inapparent infection with virus of Japanese B encephalitis in Japan in 1946. *Am J Hyg* 1950;51:1–12.
- [2] Deuel RE, Bawell MB, Matsumoto M, Sabin AB. Status and significance of inapparent infection with virus of Japanese B encephalitis in Korea and Okinawa in 1946. *Am J Hyg* 1950;51:13–20.
- [3] Southam CM. Serological studies of encephalitis in Japan. II. Inapparent infections by Japanese B encephalitis virus. *J Inf Dis* 1956;99:155–62.
- [4] Grossman RA, Edelman R, Willhight M, Pantuwatana S, Udomsakdi S. Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmai Valley, Thailand. III. Human seroepidemiology and inapparent infections. *Am J Epidemiol* 1973;98:133–49.
- [5] Scherer WF, Kitaoka M, Okuno T, Ogata T. Ecological studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VII. Human infection. *Am J Trop Med Hyg* 1959;8:707–15.
- [6] Konishi E, Suzuki T. Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations. *Vaccine* 2002;21:98–107.
- [7] Konishi E, Shoda M, Yamamoto S, Arai S, Tanaka-Taya K, Okabe N. Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: a nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein. *Vaccine* 2006;24:3054–6.
- [8] Matsunaga T, Shoda M, Konishi E. Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Inf Dis J* 2008;27:769–70.
- [9] Konishi E, Shoda M, Kondo T. Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous vaccination. *Vaccine* 2004;22:1097–103.
- [10] Konishi E, Shoda M, Kondo T. Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine* 2006;24:516–24.
- [11] Southam CM. Serological studies of encephalitis in Japan. III. Epidemic encephalitis other than Japanese B encephalitis in Tokyo. *J Infect Dis* 1956;99:170–3.
- [12] Halstead SB, Grosz CR. Subclinical Japanese encephalitis. I. Infection of Americans with limited residence in Korea. *Am J Hyg* 1962;75:190–201.