

図3 三重県志摩半島におけるマダニ捕集数および種構成

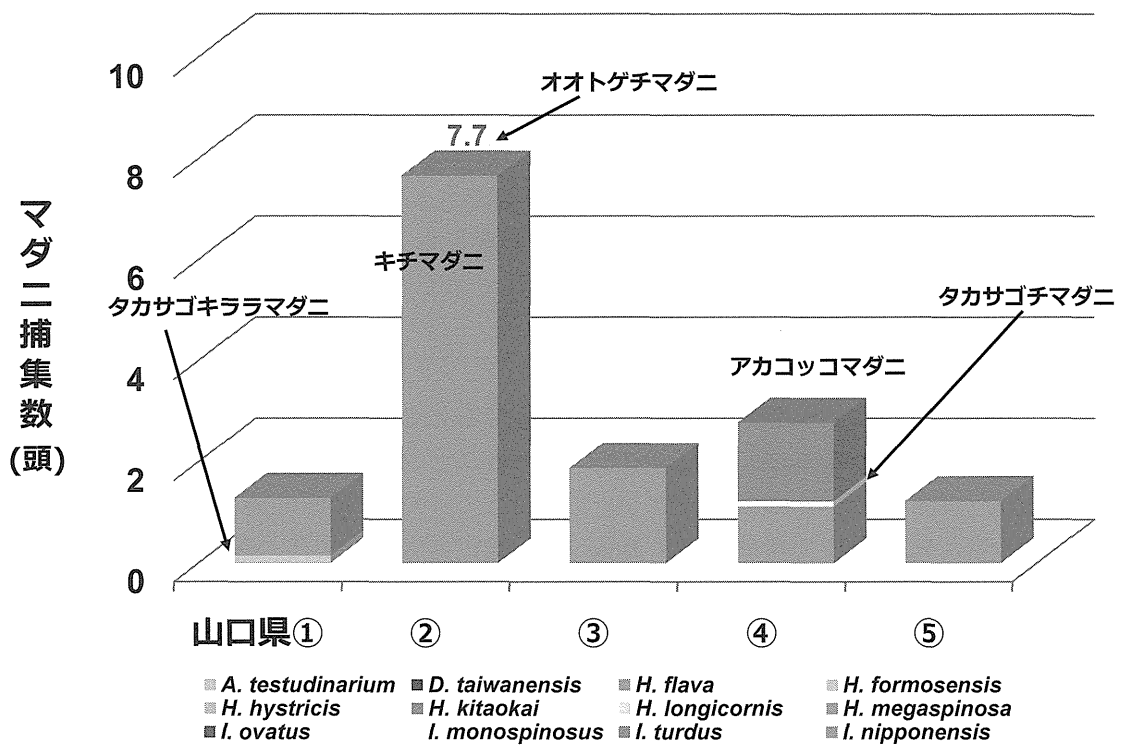


図4 山口県におけるマダニ捕集数および種構成

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）
分担研究報告書

国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析

分担研究者 伊澤晴彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長）
研究協力者 小林大介（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究生）
江尻寛子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）
鋤田龍星（国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員）
津田良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長）
佐々木年則（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
沢辺京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

研究要旨

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間十人以下で推移しているが、野外環境下での日本脳炎ウイルス（JEV）の活動は依然として活発であると考えられる。我々は、国内における日本脳炎主要媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況の把握とウイルス遺伝子解析を主な目的として、国内各地で捕集された蚊個体からの JEV の検出と分離、ならびにウイルス遺伝子の分子系統解析を 2005 以降継続して行っている。

2011 年は石川県七尾市（9/11）および熊本県合志市（8/29）、2012 年は長崎県諫早市（9/3-4）および群馬県前橋市（8/31-9/1）の畜舎とその周辺においてコガタアカイエカを捕集した。捕集蚊は最高 25 個体までを 1 プールとして乳剤を調製し、C6/36 細胞を用いてウイルス分離を試みた。その結果、長崎県諫早市捕集蚊の 1 プールから JEV が分離された。分離株のゲノム中のエンベロープ（E）領域の遺伝子配列を解析した結果、ウイルスの遺伝子型は 1 型であることが判明し、近年日本を含む東アジア地域で報告されている株と遺伝的に極めて近縁であることが確認された。

今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況を調査し、分離株の遺伝子解析を継続することで、JEV 媒介蚊からの感染リスクを把握しておくことは予防対策上重要であると考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) は東南アジアに広く分布し、WHO の報告では世界中で年間 3~5 万人の患者が発生していると推定されている。近年の日本国内における日本脳炎患者数は、年間 10 例以下と低く推移している。これには、現行の日本脳炎ワクチンによる予防接種が大きく寄与していると考えられる。しかしながら、西・南日本の高齢者

を中心に日本脳炎患者の発生は毎年途切れることなく続いており、症例として顕在化していない不顕性感染者も相当数あると推定される。また、近年の急速な遺伝子検出技術の向上を背景に、これまで原因不明の脳炎・無菌性髄膜炎あるいは意識障害と診断された症例の中には、JEV 感染が関与している場合が少なからず含まれていることも報告されている。一方、毎年継続的に行われている全国的なブタの JEV 抗

体価の調査からは、依然として JEV の地域的な蔓延が強く示唆されており、主要媒介蚊であるコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の発生も毎年広範囲で確認されることから、国内における JEV の感染リスクは依然として高いものと考えられる。

我々は、媒介蚊の JEV 保有状況と感染リスクを把握する目的で、2005 年以降、日本各地で捕集したコガタアカイエカから JEV の分離を試み、得られた分離株の遺伝子解析を継続して行ってきた。本研究では 2011 年と 2012 年夏期に国内各所で捕集したコガタアカイエカからの JEV の分離を試み、分離株の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. コガタアカイエカの捕集

コガタアカイエカは各調査地点の状況に応じ、捕虫網、吸血管あるいはドライアイストラップを用いて捕集した。

2. 捕集蚊の処理とウイルス分離

捕集蚊は捕集地および捕集日ごとに最高 25 個体までを 1 プールとしてマイクロチューブに回収し-80°C で保存した。このうち、吸血直後のため腹部に動物血液を有する蚊個体については、少なくとも 1 週間砂糖水のみで飼育を継続して消化管内の血液を完全に消化させるか、あるいは卵の産下後に回収することで、血液中の残存ウイルスならびに中和抗体の影響を極力排除した。これら蚊プール検体を、2%牛胎児血清および 0.2 mM 非必須アミノ酸液を添加したイーグル最少培地中で破碎した。この破碎蚊乳剤を遠心分離にかけ、得られた遠心上清の一部を口径 0.45 μm の濾過フィルターに通したのち、ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞に接種した。接種後は細胞変性効果の出現の有無を確認しながら 28°C、5%CO₂ 存在下で 7 日間培養した。さらに少

なくとも 2 代盲継代を繰り返した後、培養上清を回収し-80°C で保存した。

3. JEV ゲノムの検出と遺伝子解析

検体接種後の培養上清からの全 RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。各抽出操作は基本的に添付のマニュアルに従った。続く JEV ゲノム検出には、Kuno (1998) により報告されているフラビウイルス汎用プライマー (FU1 & cFD2 および FU2 & cFD3) を用いた One step RT-PCR で行った。反応後産物は 2%アガロースゲル電気泳動により確認した。これにより、フラビウイルス陽性と判定された検体については、エンベロープ (E) 領域の解析のための遺伝子増幅を行った。まず、SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Life Technologies) を用いて first strand cDNA を合成した。プライマーにはキットに内包のランダムヘキサマーを用い、逆転写反応は添付のマニュアルで推奨されている条件で行った。逆転写後の PCR は、KOD plus ver. 2 (TOYOBO) で行った。プライマーには、JEV E 全領域をカバーするように設計した特異的プライマー 3 組 (配列省略) を用い、反応条件は製品添付のマニュアルに従った。反応後の PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動により確認した。得られた増幅産物はゲルから抽出・精製後、BigDye Terminator ver.1.1 (Life Technologies) でシーケンシングサンプルを調製し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver.12 および BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。分子系統樹作成は、MEGA ver.3.1 を用いて行った。

C. 結果

今回、2011年および2012年夏期に4県の畜舎で捕集したコガタアカイエカからウイルス分離を試みた結果、長崎県諫早市捕集の1プールからJEVが分離された(検査蚊個体数900頭、陽性プール数1/検査プール数42、プール陽性率は2.4%) (表1)。MIR(陽性プールに最低1頭の感染蚊が存在すると仮定した場合の1,000頭中の感染蚊個体数)は1.1と算出された。長崎県は例年ブタにおけるHI抗体保有率は80%を超え、これまでの媒介蚊調査からもJEVの保有がほぼ毎年確認されることから、JEVの感染リスクが高い地域といえる。一方、他の地域の蚊からはJEVは分離されなかったが、蚊特異的ウイルスと考えられるコガタアカイエカラブドウイルス(CTRV)は、長崎県を含むいずれの地域でも高率に分離された(表1)。

分離されたJEV株のE領域の塩基配列を決定し、これを基に分子系統樹を作成した(図1)。その結果、今回分離されたウイルス株の遺伝子型は1型であり、近年東アジア地域から報告された株や2002年以降西・南日本を中心に分離された株と遺伝的にみて極めて近縁あることが確認された。また、これまで我々が解析した国内分離株と比較したところ、塩基配列レベルで若干の多様性が認められるものの、そのほとんどがコード蛋白質のアミノ酸変異を伴わない置換であった。一方、ウイルスの病原性に関連があるとされるE蛋白質の123番目のアミノ酸残基について、近年国内で分離される1型株は、アスパラギン(N)あるいはセリン(S)のほぼいずれかであることが報告されているが、今回の分離株は、アスパラギン(N)であった(図2)。

D. 考察

今回JEVが分離された長崎県諫早市の蚊捕集場所は、JEVの増幅動物であるブタが肥育されている畜舎で、周辺にはコガタアカイエカの発生源となる水田が点在している環境である。また、ヒトの生活環境にも程近い。JEVが分離された時期には、例年ブタのHIおよび2-ME感受性抗体の上昇が確認されており、捕集されたコガタアカイエカの中には、ウイルス血症を呈した時期のブタを吸血した経験のある個体が少なからず含まれていたと考えられる。同地域で過去に行った調査でも、ほぼ同じ時期に採集された蚊から高率にウイルスが分離されていることから、毎年JEVの活動が活発な地域であることが伺える。現在では、日本脳炎ワクチンの普及や生活環境の変化により、ブタの感染状況と患者発生は必ずしも一致していない。しかし、ブタや媒介蚊のウイルス感染状況からJEVが蔓延していると推測される地域では、JEVに対する免疫が低い周辺住民への感染リスクは依然として高いと推定される。実際、西・南日本の高齢者を中心とした散発的な患者発生は、JEV保有コガタアカイエカによる刺咬が直接的な原因と考えられる。日本国民においてはワクチンの定期接種により効果的な感染阻止が図られているが、日本脳炎ワクチンの接種が行われていない国や地域からの渡航者が日本国内で日本脳炎に感染するリスクはより高くなると考えられる。このため、今後急速に増加が見込まれる海外からの渡航者に向けた日本脳炎の感染リスクの周知と防蚊対策の啓発も重要である。

JEVは増幅動物や媒介蚊によってインド以東のアジア広域に拡散すると考えられており、その流行に伴って日本におけるJEVの遺伝子型が、1990年ごろを境に3型から1型へと遷移したことが報告されて

いる。遺伝子解析の結果、今回分離された株は1型に属しており、近年日本をはじめとする東アジア各地域で分離された株と極めて近縁であることが判明した。今後、これら分離株の増殖性や病原性を詳細に解明し、予防対策につなげていくことが重要である。

本研究により、依然として地域や時期によっては、JEVがコガタアカイエカからヒトへ媒介される可能性があることが強く示唆され、今後も国内における媒介蚊のJEV保有状況とウイルス遺伝子の変化と推移を把握しておくことは、疫学上重要であると考えられる。

謝辞：コガタアカイエカの捕集とウイルス検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力いただいた（敬称略）。吉川亮・松本文昭・吾郷昌信（長崎県環境保健研究センター）、松村正哉（九州沖縄農業研究センター）、二見恭子・砂原俊彦・皆川昇（長崎大学熱帯医学研究所）。各氏に深く感謝する。

E. 結論

1) 2011年に石川、熊本、2012年に長崎、群馬各県下の豚舎を含む畜舎で捕集されたコガタアカイエカからウイルス分離を行なった結果、長崎県捕集蚊の1プールからJEVが分離された（プール陽性率は2.4%、MIRは1.1）。

2) E領域の配列解析の結果から、今回分離されたウイルス株は、近年日本を含めた東アジア地域で多く検出されている1型のウイルスと遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。

3) 豚舎を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカはJEVを高率で保有する可

能性があり、ブタと蚊の感染状況からJEVが蔓延していると推測される地域では、ヒトへの感染リスクが高くなっていると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Kuwata, R., Satho, T., Isawa, H., Yen, N. T., Phong, T. V., Nga, P. T., Kurashige, T., Hiramatsu, Y., Fukumitsu, Y., Hoshino, K., Sasaki, T., Kobayashi, M., Mizutani, T., Sawabe, K. Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from *Culex* mosquitoes in Vietnam. *Arch. Virol.*, 2013, **58**: 2273-2284.

沢辺京子. 日本脳炎ウイルスの国内越冬と海外飛来. 化学療法の領域, **30**: 39-49, 2014

2. 学会発表：

江尻寛子, 伊澤晴彦, 津田良夫, 鎌田龍星, 石田恵一, 小林睦生, 佐々木年則, 沢辺京子. 2011年から2012年にかけて国内で捕集された蚊のウイルス保有状況の調査. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2013年5月, 熱海市

沢辺京子, 今西望, 鎌田龍星, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 新井智, 小林睦生, Nga PT., Phong TV., Yen NT. アジアにおける日本脳炎媒介蚊 *Culex vishnui* subgroup の季節消長とウイルス保有について. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2013年5月, 熱海市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 小林大介, 谷脇妙, 沢辺京子, 高崎智彦. Flap 配列を

付加したフラビウイルス共通プライマー
およびアルファウイルス共通プライマー
の評価とゲタウイルス検出の実例につい
て. 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス
研究会, 2013年11月, 神戸市

小林大介, 伊澤晴彦, 江尻寛子, 佐々木年
則, 砂原俊彦, 二見恭子, 吉川亮, 松本文
昭, 吾郷昌信, 津田良夫, 鍬田龍星, 田島
茂, 皆川昇, 小林睦生, 太田伸生, 沢辺京
子. 2012年に国内で捕集されたコガタア
カイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のウイル
ス保有状況調査. 第66回日本衛生動物学
会大会, 2014年2月, 岐阜市

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

表1 2011-2012年国内捕集コガタアカイエカからのウイルス分離成績

捕集地	♀/♂	捕集日	個体数	プール数	分離結果	
					JEV	CTRV
石川県七尾市	♀	2011. 9.11	38	4	0	2
熊本県合志市	♀	2011. 8.29	177	18	0	4
長崎県諫早市	♀	2012. 9.3-9.4	900	42	1	14
群馬県前橋市	♀	2012. 8.31-9. 1	121	6	0	6
合計			1236	70	1	26

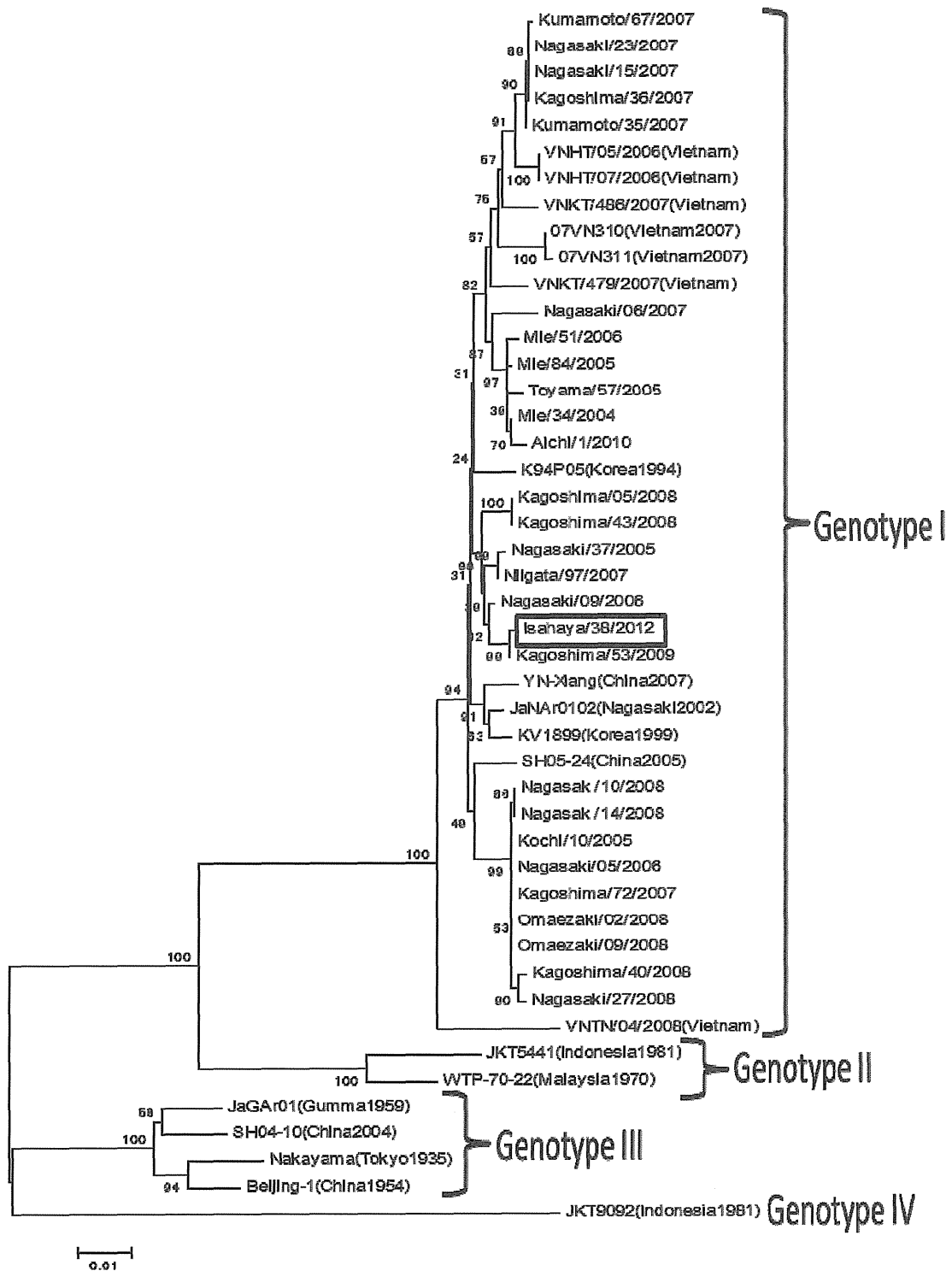


図1 エンベロープ領域の塩基配列に基づく分子系統解析（近接結合法による系統樹）

2005年分離株	05Kochi05aa	CTSKAIGRMIQPENI	} Genotype I
	05Nagasaki37aa	CTSKAIGRMIQPENI	
	05Toyama57aa	CTSKAIGRMIQPENI	
2006年分離株	Nagasaki0506	CTSKAIGRMIQPENI	
	Nagasaki0906	CTSKAIGRMIQPENI	
2007年分離株	07KGM36-Env	CTNKAIGRMIQPENI	
	07KGM72-Env	CTSKAIGRMIQPENI	
	07Kumamoto35	CTNKAIGRMIQPENI	
	07Kumamoto67	CTNKAIGRMIQPENI	
	07Nagasaki06	CTSKAIGRMIQPENI	
	07Nagasaki15	CTNKAIGRMIQPENI	
	07Nagasaki23	CTNKAIGRMIQPENI	
2008年分離株	07Niigata97	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Kagoshima05	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Kagoshima40	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Kagoshima43	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Nagasaki10	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Nagasaki14	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Nagasaki27	CTSKAIGRMIQPENI	
2009年分離株	08Omaezaki02	CTSKAIGRMIQPENI	
	08Omaezaki09	CTSKAIGRMIQPENI	
	09Kagoshima53	CTNKAIGRMIQPENI	
2010年分離株	10Aichi	CTSKAIGRMIQPENI	
2012年分離株	05Kochi10	CTSKAIGRMIQPENI	
	12IH-23_JEV	CTNKAIGRMIQPENI	

図2 近年のJEV国内分離株におけるエンベロープ蛋白質の123番アミノ酸残基に見られる変異

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）
分担研究報告書

日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発
「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部・第二室長）
研究協力者 田島 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官）

研究要旨

本年度は、近年分離される日本脳炎ウイルスが現行のワクチンに対して感受性を保持しているかについて調べた。現行の日本脳炎ワクチンで免疫したマウスの血清を使用し、1960年代から2000年代に国内で分離された JEV 野外株を用いた中和能解析を行った。ワクチン株に対する中和能が最も高かったものの、野外株間で差異はあるものの特に顕著なものは認められなかった。また、遺伝子型間（I型およびIII型）においても、株によってはIII型よりもむしろI型の JEV のほうがワクチンに対する感受性が高い傾向がみられることもあったが、顕著な差異とは言いがたいレベルであった。以上より現行の日本脳炎ワクチンは、現在国内で蔓延している JEV に対し有効性を保持していることが示された。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の感染が原因の中樞神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は20~40%に達する重篤な感染症である。JEV は水田等に発生するコガタアカイエカなど、イエカにより媒介され、ブタや水鳥などのウイルス増殖動物とともに感染環を形成する。一方ヒトは終宿主に当たる。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は1990年以降10例以下で推移している。しかしWHOの推計では、世界で年間約4万3千人が日本脳炎を発症し、うち約1万1千人が死亡、約9千人が重篤な超える後遺症に苦しんでいるとされる。このように世界的にみれば日本脳炎は決して過去の疾患ではなく、現在も警戒すべき感染症である。

また、日本国内でも JEV は現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には5つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは90年代初頭に境にIII型からI型へと変化した。同様の変化は日だけでなく、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、台湾、タイ、インドでも同様の変化が認められている。これまでに我々の研究室では、I型 JEV 分離株の性状解析を続けてきた。分離株のマウスに対する病原性を調べてきた結果、1つの株（Mie/40/2004株）が他に比べ顕著に高い病原性を示し、その原因を探ったところ、ウイルスの非構造蛋白質 NS4A 蛋白の3番目のアミノ酸をValからIleへ変化させることにより病原性が強くなることを見出した（Yamaguchi et al., 2011）。しかしこの解析を行った当時、本部位がValである

JEV 分離株は Mie/40/2004 株のみしか知られておらず、どの程度 3-Ile 株が蔓延しているかは不明であった。この理由として、NS4A 領域がこれまであまり注目されてこなかったため、本領域の配列データが蓄積されてこなかったと考えられた。我々は昨年度、国内および国外での 3-Ile 株の蔓延状況を調べ、約 20%が 3-Ile 型であることを明らかにした。さらにマウスを用いた病原性解析により、3-Ile は JEV を強毒化する絶対的な要因ではないことを明らかにした。3-Ile 型であるにもかかわらず低病原性を示す原因については、現在組換え JEV を作製し更なる解析を行っているところである。

前述したとおり、現在国内に蔓延しているのは遺伝子型 I 型の JEV であり、III 型はほとんど確認されない。一方現在流通している日本脳炎ワクチンは開発された 50 年以上前より III 型の JEV より製造されて今日に至っている。ワクチン株の遺伝子型は国内メーカーのみならず、海外で製造されているものもすべて遺伝子型 III 型である。ワクチン製造株と流行株との間の遺伝子型の齟齬については国外でも心配されており、すでにこの件について検証した結果が数件報告されている。しかしこれらの結果は必ずしもクリアーでなく、さらに海外と国内でワクチン製造に使用されるワクチン株が異なることから、国内ワクチンを用いた解析が必要である。そこで本年度は、主に近年分離される JEV が、現行のワクチンに対して感受性を保持しているかについて調べた。今回はこの解析結果について報告する。

B. 研究方法

ワクチン接種用のマウスは、通常日本脳炎ワクチンの国家検定にも使用されている ddY 系統（4 週齢、メス、SPF）を使

用した。接種ワクチンは中山株および北京株より製造された日本脳炎ワクチン参照品 2 種類を使用した。これらのワクチンを規定量の滅菌蒸留水にて溶解し、それを 2 倍および 8 倍に希釈して、1 匹あたり 500 マイクロリットルずつ 10 匹に接種した。1 週間後に同量を追加接種し、その 1 週間後に全採血し、中和反応に使用するプール血清を得た。

中和反応の攻撃用ウイルスとして、ワクチン株である中山株と北京株、遺伝子型 III 型野外株として、JaTAn1/75、JaTAn1/90、JaTH160 の 3 株、遺伝子型 I 型野外株として Hiroshima/46/98、Mie/41/02、Tokyo 602/05、Mie/51/06、Kochi/25/05、Kumamoto/65/05、Kumamoto/81/06、Kumamoto/104/06、Chiba/103/08、Chiba/150/07、JaNBo37 の 11 株、計 16 株を使用した。中和解析は Vero 細胞を用いてプラーク減少法で行った。血清を 10 倍から 640 倍まで階段希釈し、適度に希釈したウイルス液と混合後 35°C で 90 分間中和反応した。反応後細胞に接種し、メチルセルロース重層培地の下 4~6 日間 35°C にて培養した。ホルマリンで固定後メチレンブルー液で染色し、プラーク数をカウントした。各条件における減少率を算出しウイルス間で比較した。攻撃ウイルスの抗原量は抗 JEV E 蛋白抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。

C. 研究結果

まず初めに、ワクチン株 2 種類と、III 型株 2 種類（JaTAn1/75、JaTAn1/90）、および I 型株 4 種類（Hiroshima/46/98、Mie/41/02、Tokyo602/05、Mie/51/06）を使用し中和解析を行った（図 1~4）。中山株由来のワクチンは中山株および北京株の両ワクチン株に対し高い中和能を示し、特に中山株に対して顕著に強かった。野外株で

みると、III型よりもむしろI型のほうがよりワクチンにより中和される傾向が観察された。同様の傾向は北京株から製造されたワクチンでもみられたが、中山株ワクチンよりも株間および遺伝子型間での差異は大きくなかった。

中和反応で重要な役割を果たす、ウイルスのエンベロープ蛋白質E蛋白質であるが、国内分離株のI型JEVのアミノ酸配列を比較すると、20か所にバリエーションが見られる(図5)。先ほどの実験ではそのうち4か所分しかカバーできておらず、さらに多くをカバーできるよう、株数を増やす必要がある。そこで次にI型株を7株増やし、計12か所カバーできるようにして中和解析を行った(図6~8)。さらに2004年に高知県で分離されたIII型JEVに最も近縁であるJaTH160株も加えて解析を行った。中山株、北京株ワクチンともにJaTH160が他の野外株に比べ中和されやすい傾向がみられた。しかし50%抑制希釈倍数でみると、すべての野外株はすべて2倍の差異に収まった。よって株間および遺伝子型間で顕著な差異は認められないと考えられた。

D. 考察

現在、日本国内に蔓延しているJEVのほとんどはI型と考えられる。しかし一方で使用されている日本脳炎ワクチンはIII型から製造されたものである。一部海外からの報告では、III型由来のワクチンはI型に対しては効果が弱いとの指摘がある。そこで今回は、JEV国内分離株を用いて現行のワクチンに対する感受性を遺伝子型間、株間で明らかな差異が認められるかを調べた。株間で感受性の差異は確かにあったが、50%抑制される血清の希釈倍数は2倍に収まることから、これらの差異が決定的なものとは言いがたい。

また、遺伝子型間でも同様であった。つまり、株間・遺伝子型間でワクチンの効き方に大差はなく、現在蔓延しているJEVに対してもワクチンは効果を維持していると考えられる。中和抗体を誘導するE蛋白質上のエピトープは複数あるだろう。そういった部位はJEVで保存性の高い部位なのかもしれない。もしそうであるならばワクチンは問題なく効き続けるだろう。ただ今回の結果を注意深くみると、ある部位のバリエーションが、僅かだがワクチンの効果に影響を与えている可能性が示された。現在、この部位に関する解析を組換えJEVを用いて進行中である。また現行の日本脳炎ワクチンは免疫持続性があまりよくないとの報告もある。今後はワクチン接種後長時間経過したマウスの血清を用いた解析なども行っていく予定である。また我々の実験はマウスを用いたものであり、やはり最終的にはワクチン接種したヒトにおける状況を調査する必要があるだろう。

E. 結論

現在国内に蔓延しているJEVはほとんどがI型であるが、これらに対ししてもIII型から製造された日本脳炎ワクチンは有効であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

白鳥(田島)茂, 高崎智彦. わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点. 小児内科, 予防接種Q&A改訂第3版, 第45巻増刊号432-437, 2013

2. 学会発表：

田島茂，小滝徹，谷ヶ崎和美，小林大介，谷脇妙，沢辺京子，高崎智彦. Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について. 第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2013 年 11 月, 神戸市

田島茂，小滝徹，谷ヶ崎和美，林昌宏，西條政幸，高崎智彦. 製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

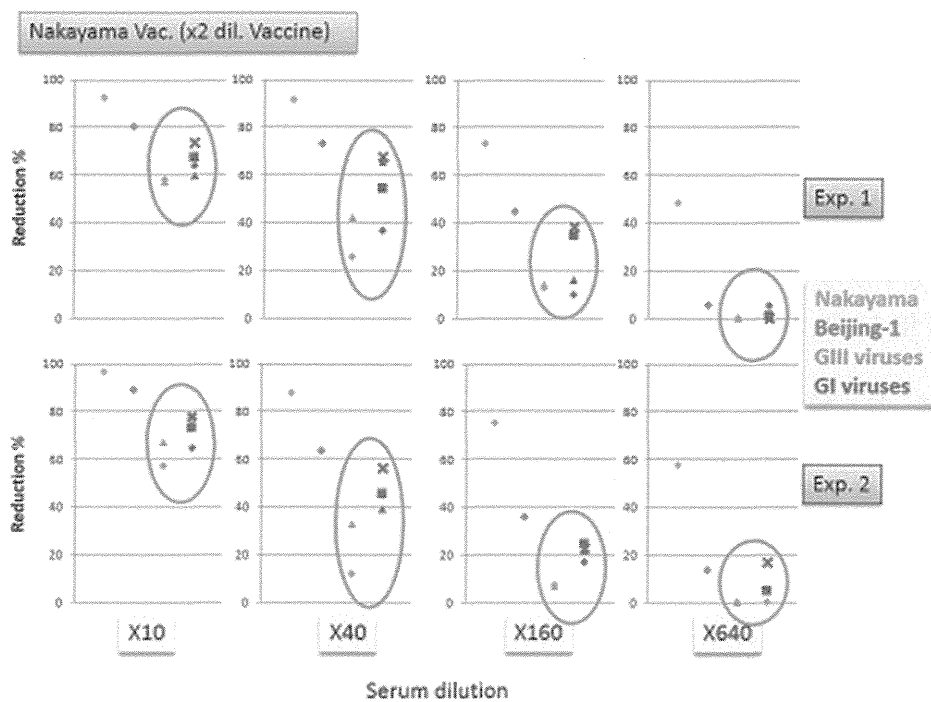


図1 中山株ワクチン（2倍希釈）接種血清を用いた中和試験結果

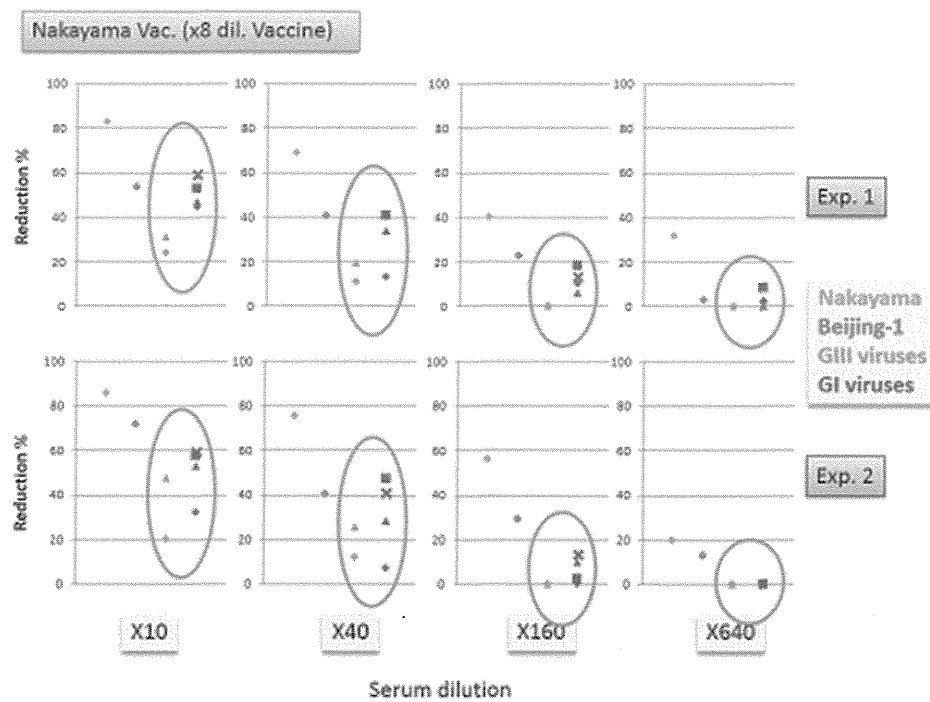


図2 中山株ワクチン（8倍希釈）接種血清を用いた中和試験結果

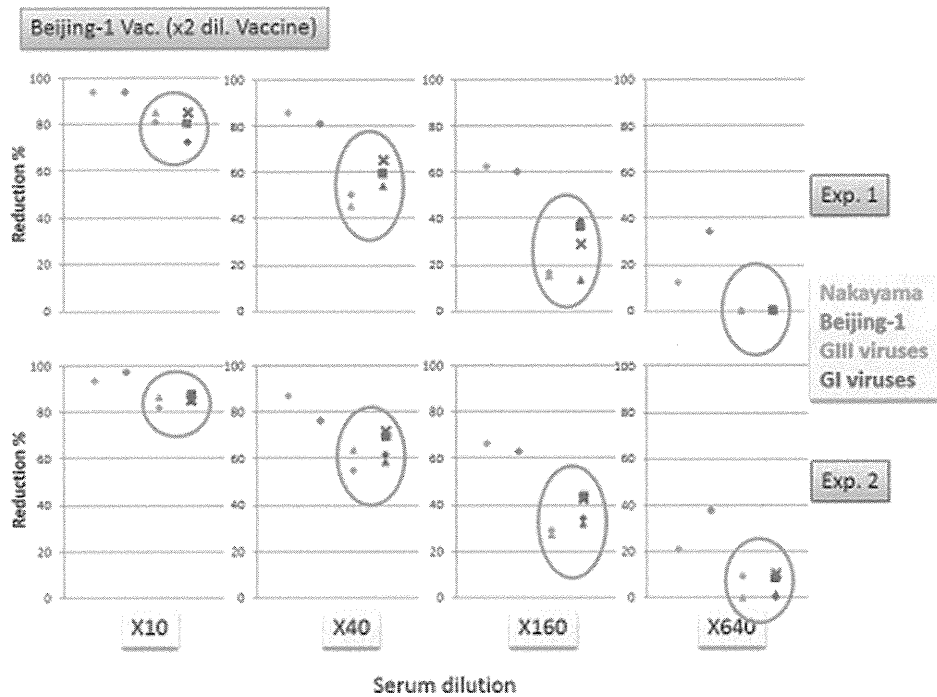


図3 北京株ワクチン（2倍希釈）接種血清を用いた中和試験結果

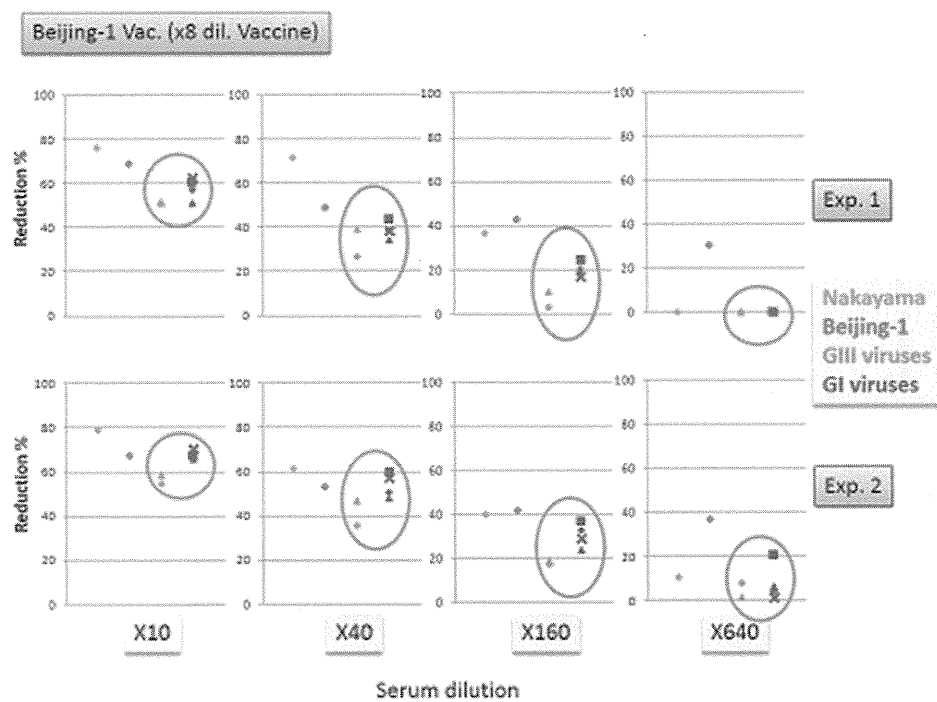


図4 北京株ワクチン（8倍希釈）接種血清を用いた中和試験結果

JEV遺伝子型I型のE蛋白質に見られるバリエーション(国内同定分)

AA position in E	11	51	66	76	119	123	142	157	197	208
Majority AA	Phe	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Phe	Ala	Asn	Ser
Minority AA	Ile	Asn	Asn	Met	Leu	Asn	Ser	Val	His	Pro
Minority strains	Kochi01/05 Shizuoka117/05 Shizuoka241/05 Shizuoka242/05	Mie51/06	Chiba155/07	Kochi01/05	Kochi03/05	(Majority)	JaTH160	Shizuoka151/08 Chiba150/08 Chiba127/08 Chiba112/08 Chiba114/08	Chiba155/08	Chiba155/08

AA position in E	243	280	329	330	374	399	400	433	435	494
Majority AA	Glu	Thr	Ser	Ile	Met	Asp	Ala	Val	Asn	Leu
Minority AA	Gly	Ala	Pro	Val	Val	Glu	Val	Ile	Ser	Ile
Minority strains	Kumamoto64/06	Mie41/06	Kumamoto04/09	Kagoshima43/06	Mie/Tokyo122/07	Kumamoto97/06 Kumamoto98/06	Kumamoto84/10	Kumamoto81/06	Tokyo402/06	Chiba154/06

2005年に高知で同定されたGIII JEVに最も近縁なGIII株JaTH160も加えて解析

図5 E蛋白質におけるバリエーション

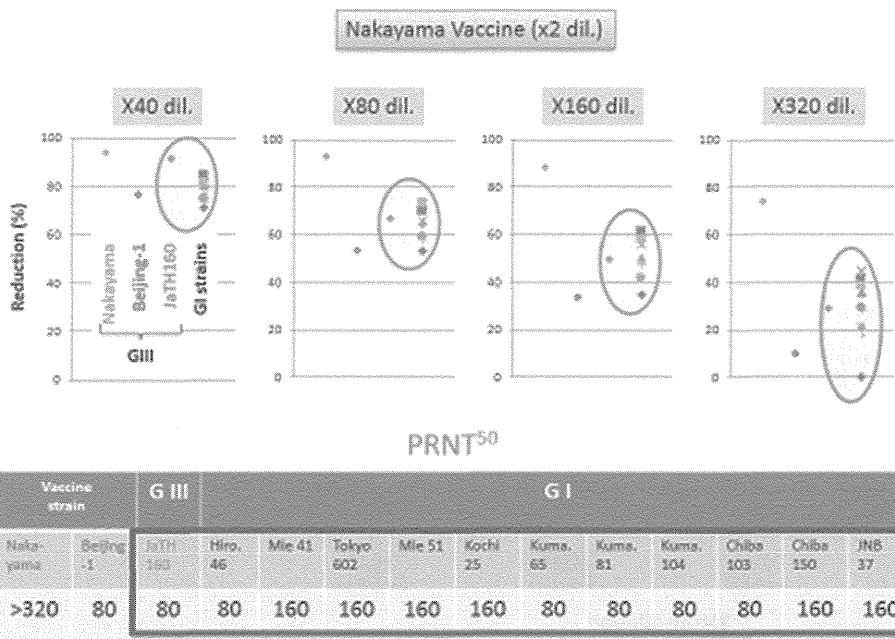


図6 中山株ワクチン(2倍希釈)接種血清を用いた中和試験結果

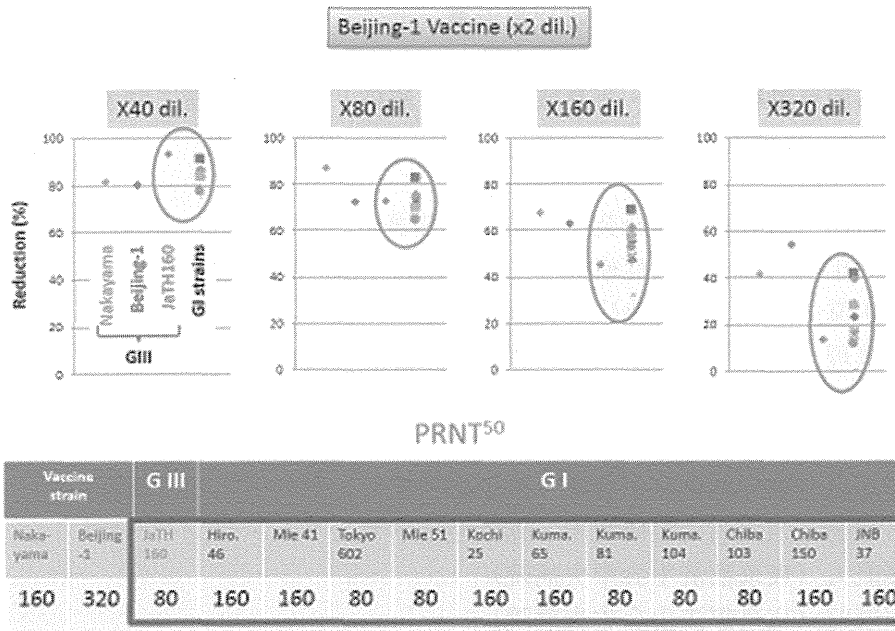


図7 北京株ワクチン（2倍希釈）接種血清を用いた中和試験結果

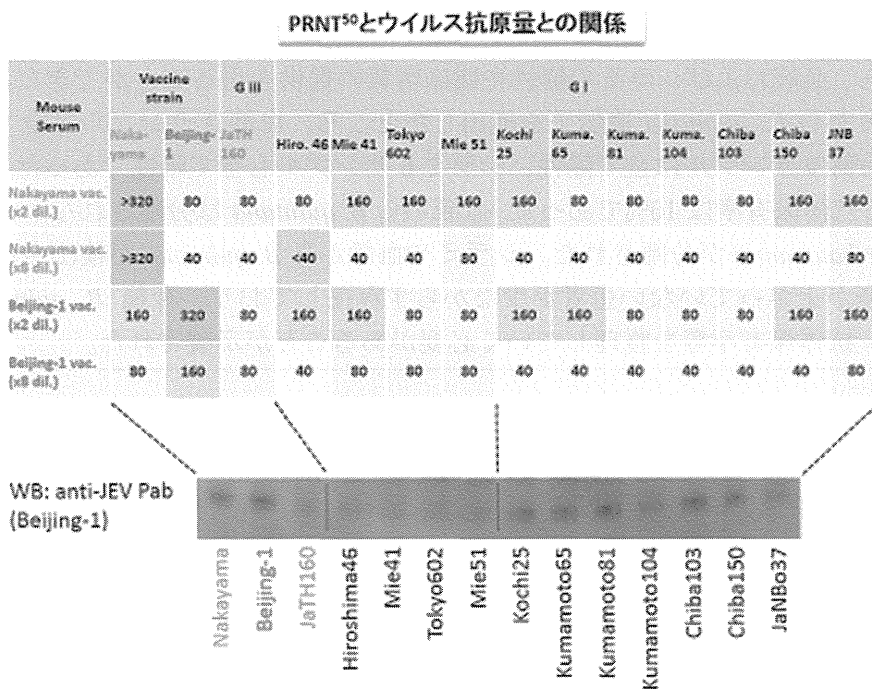


図8 50%抑制する血清希釈倍数とウイルス抗原量との関係

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）
分担研究報告書

感染症を媒介する節足動物の分布・生息域の変化、感染リスクの把握に関する研究
シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* などの疫学研究

分担研究者 伊澤晴彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長）
研究協力者 佐々木年則（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
久保田眞由美（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）
松井真理（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
鈴木里和（国立感染症研究所・細菌第二部・第一室長）
柴山恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
山岸拓也（国立感染症研究所・感染症疫学センター・主任研究官）
大石和徳（国立感染症研究所・感染症疫学センター・センター長）
伊藤航人（東京都済生会中央病院）
川崎麻紀（東京都済生会中央病院）
足立智英（東京都済生会中央病院）
沢辺京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

研究要旨

感染症を媒介する節足動物による感染リスクを把握する目的で、東京都済生会中央病院と共同で、シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* に対する疫学研究を始めた。当病院には、東京都内から多数の路上生活者が運び込まれ、現在までに、16名のコロモジラミを持つ患者から、血液およびシラミの提供や臨床情報の提供を得ることができた。血液、血餅、シラミから *B. quintana* 遺伝子を検出したところ、血液3サンプルは全て陰性であったが、血餅9サンプルは全て陽性、シラミ6サンプルも全て陽性であった。*B. quintana* に対する抗体保有率は10%であった。血液から *B. quintana* は分離されなかったが、*Acinetobacter baumannii* が分離された。シラミや血餅から *B. quintana* が検出されているが血清抗体価が上がっていない患者が少なからず存在しており、今後 *B. quintana* の遺伝子、分離、抗体保有率等を整理していく必要があることが示唆された。

A. 研究目的

近年、先進諸国の大都市部において、路上生活者における *Bartonella quintana* 感染が問題となっている（Brouqui et al., 1999）。ドキシサイクリン等の抗生物質投与による治療で治癒するが、無治療の場合1%未満で死亡する。そこで、正しい処置が求められる。悪化した場合、心内膜炎にいたることが報告され、気をつけな

ければならない再興感染症として世界中から注目されている。日本において、希少感染症と考えられる *B. quintana* 感染症の疫学研究を行い、国民に情報提供さらには *B. quintana* 感染症対策へ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

東京都済生会中央病院において、2013

年1月1日から12月31日まで、初診時にシラミが見つかった住所不定者、あるいは生活保護受給者を対象にした。患者カルテから年齢、性別、路上生活歴、主な生活場所、入院時の病名、体温、血圧、脈拍、頭痛の有無、湿疹の有無、抗生剤投与の有無、既往歴、血液検査で判明した項目および結果、シラミの有無、シラミ採取部位、血液培養の施行有無の基本情報、臨床情報を得た。

シラミ陽性患者が見つかった場合、病院でシラミと日常臨床上の検査で余った血液検体を利用した。血液検体は、残血を病院で血清と血餅に分離し4°Cで保存の上、培養検体は採取2週間後、シラミは数日以内に研究協力者が病院から回収した。また、病院検査部からは血液培養結果を入手した。

遺伝子検出は、*Bartonella* 属、あるいは *B. quintana* 特異的 PCR を行った。シラミからの菌分離は、シラミをヨード・エタノールで滅菌後、シラミを2分割し一方を PCR に用いた。残りを羊血液寒天培地に塗布し37°C5%CO₂で1ヶ月から3ヶ月間培養した。ELISA は、久保田らが開発した方法に従った (Matsuoka et al., 2013)。分離株の同定は、バイテックあるいは16S rDNA 遺伝子の PCR 法で行った。分離株の薬剤感受性検査は、バイテックを用いて行った。

シラミの採取、採血、アンケートへの回答は、本人に対し十分な説明を行い、同意のもと提供された。なお、この調査は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学倫理審査委員会 (受付番号 372) および東京都済生会中央病院倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

表1において、2013年1月から東京都

済生会中央病院の協力を得て、13名の患者からシラミおよびバルトネラについて調査することが出来た。11名全て男性で、45歳から71歳にわたる。中央値が66歳であり中高齢者となった。

路上生活歴は、半年から30年と幅が広く、中央値として5年となった。主な生活場所として、渋谷が4名、山谷、秋葉原、日本橋、東京駅、青山、高輪、代々木公園各1名となった。入院時の病名は、じょく創、低体温・肺炎、脳梗塞、蜂窩織炎、慢性心不全・アルコール性肝炎、顔面・頭部外傷、シラミ症、多発痛風結節、下腿潰瘍と多岐にわたった。体温について、36°C未満の患者が3名、37.3°C以上患者が4名であり、発熱をしていた患者がほぼ半数であったが、臨床的に塹壕熱が疑われる患者はいなかった。頭痛が1名(9%)報告された。抗菌薬は5名(45%)で、初診時診療前に投与されていた。

血液培養液から *B. quintana* に対する PCR を行ったところ、3検体全て陰性であった。一方、患者の血餅から直接 PCR を行うと9検体中全て陽性であった。さらに、シラミから *Bartonella* 属に対する PCR を行うと6検体全て陽性であった。シラミから培養を行うと17%菌分離が陽性で、その中に *Acinetobacter baumannii* が含まれていた。生きたシラミの状態が、菌分離には良かった。この *A. baumannii* は、ピペラシリン、セフォタキシム、セフトジジム、セフェピム、イミペネム、メロペネム、アミカシン、ゲンタマイシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ミノサイクリン、ホスホマイシン、トリメトプリム/スルファメトキサゾールに対して感受性であった。一方、アンピシリン、アモキシシリン/クラブラン酸、セファゾリン、セフォチアム、セフメタゾール、セフポドキシム、ホスホマイシ

ンに対して抵抗性であった。

D. 考察

以前にも、このような調査を行い同様の年齢層となった。血餅 PCR 陽性率の高さと抗体陽性率の低さを説明するのに、まず抗体は IgG を見ている点で感染直後の状況がわからないことがあげられる。*B. quintana* に対する IgG が産生されるのに低い *B. quintana* の感染量かもしれない。コロモジラミから *B. quintana* は分離されなかったが、サンプル数が少ないため東京近辺の状況を表しているとは言えず、今後継続的な検査が必要と思われた。コロモジラミから *A. baumannii* が分離された。ELISA による *B. quintana* に対する検出系もサンプル数を増やすため、継続的な検査を必要すると考えられた。

E. 結論

B. quintana の遺伝子は、検出されているものの、分離には至っていない。*B. quintana* に対する IgG は、10%と遺伝子検出率からすれば低い。現在、1年間の疫学研究のため、さらに継続的な疫学研究を行い、サンプル数を増やして *B. quintana* の感染状況を把握する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表：

佐々木年則，関なおみ. シラミ媒介性感染症，特に塹壕熱の現状と今後の課題. 化学療法の領域, **30**: 106-113, 2014

Matsuoka M., Sasaki T., Seki N., Kobayashi M., Sawabe K., Sasaki Y., Shibayama K., Sasaki T. and Arakawa Y. Heminbinding proteins as potent markers for serological diagnosis of infections with *Bartonella quintana*. *Clin. Vaccine Immunol.*, **20**: 620-626, 2013

2. 学会発表：

佐々木年則，久保田眞由美，澤邊京子，平山幸雄，鍬田龍星，伊澤晴彦，針原重義，柴山恵吾，小林睦生. 最近のシラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* 疫学研究. 第 65 回日本衛生動物学会大会, 2013 年 4 月, 江別市

沢辺京子, Arlene G. Bertuso, 佐々木年則, 葛西真治, 富田隆史, 小林睦生. アタマジラミにおける塹壕熱病原菌 *Bartonella quintana* 遺伝子保有調査. 第 65 回日本衛生動物学会大会, 2013 年 4 月, 江別市

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし