

**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」**

研究分担者 高崎 智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部・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**

昨年度我々は、日本国内で分離された日本脳炎ウイルス（JEV）遺伝子型 I 型株の現行ワクチンに対する感受性を保持しているかについて調べ、これらの分離株に対し現行ワクチンは中和活性を保持していることを示した。本年度は近年中国および韓国で相次いで分離された遺伝子型 V 型の JEV に着目し、我々が保有する V 型株（Muar 株）に対する日本脳炎ワクチンの中和効果をワクチン接種マウス血清を用いて調べた。I 型の場合とは異なり Muar 株に対しては現行ワクチンの効果が低いことが明らかとなった。次に我々は、遺伝子型 I 型 JEV をベースとしたリバースジェネティクス法によりエンベロープ（E）蛋白質のみを Muar 株および中国で分離された V 型株 XZ0934 株のものに置換した組換え JEV を作製し、これらに対するワクチンの中和効果を調べた。その結果 Muar 株と同様、両組換えウイルスに対する中和効果は低いことが明らかとなった。V 型株はこれまでに世界中で 3 株しか分離されておらず、その性状解析は全く進んでいない。そこで Muar 株のマウスに対する病原性を調べた。Muar 株は強毒株の北京株と同等の病原性を有することが明らかとなった。以上より、V 型は病原性が高く、かつ現行ワクチンが効きにくい可能性が示唆された。今後 V 型株の国内への侵入を注意深く監視していくとともに、蚊での媒介能力など詳細な性状解析が必要である。

**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 年代初頭を境に 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。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。昨年度我々は、国内で分離された遺伝子型 I 型株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。その結果、現行の国内ワクチンは I 型株に対し中和活性を維持していることを明らかにした。

一方近年、中国と韓国で相次いで遺伝子型 V 型の日本脳炎ウイルスが蚊から約 60 年ぶりに分離同定された。V 型ウイルスは今回の中国、韓国のものを含め 3 株しか分離されていない。系統樹解析からは、現在の主流である I 型、III 型からは遺伝学的に少し離れていることがわかっているが、その他ウイルス性状等についてはほとんど解析されていない。そこで本年度我々はこの V 型 JEV に焦点をあて、我々が唯一所有する V 型株である Muar 株を使用し、現行ワクチンの V 型株に対する有効性や V 型株の病原性解析を進めた。

## 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 種類をしようした。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、初回免疫から 2 ヶ月後および 4 ヶ月後に全採血し、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、昨年度使用した株(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, Tokyo602/05, 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)に加え V 型の Muar 株(1952 年にマレーシアで分離された)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 2 倍階段希釈し、適当に希釈したウイルス液と混合後 35 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 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(50%, 70% および 90%減少率)を算出しウイルス間で比較した。

すでに作製済みの遺伝子型 I 型ベースの組換え JEV キメラクローン(rJEV-E<sup>Beijing-1</sup>-M41/pMW119 および rJEV-E<sup>Nakayama</sup>-M41/pMW119)に加え、今回新たに 2 種類の組換えキメラクローン(rJEV-E<sup>Muar</sup>-M41/pMW119 および rJEV-E<sup>XZ0934</sup>-M41/pMW119)を作製した。Muar 株由来配列は Muar 株ゲノム RNA から作製し、XZ0934 株由来配列は登録されている塩基配列情報から合成 DNA を作製して使用した。各クローンから全長の組換えウイルス RNA を in vitro で合成し、それを Vero 細胞にトランスフェクトした。培養上清中に分泌されるウイルス液を回収し、感染力価を測定後解析に用いた。

マウスに対する病原性を調べるため、3 週齢の ddY 系統マウスに 3 種類のウイルス(Beijing-1 株, Mie/41/2002 株および Muar 株)をそれぞれ  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  pfu ずつ(各群 10 匹)を腹腔より接種し、3 週間経過観察した。

## C. 研究結果

昨年度使用したウイルス株に Muar 株を加えて中和解析を行った(表 1~3)。昨年度も使用した株の中ではワクチン株を除いていずれの条件においても株間で顕著な差異は認められなかった。一方、Muar 株につ

いては、いずれの条件においても常に中和力価が低く、他に比べて4倍程度低い場合が半数程度の条件で観察された。このことから、現行のワクチンは他の株に比べ Muar 株を中和しにくいことが明らかとなった。

中和反応においてもっとも重要な役割を果たす E 蛋白質のアミノ酸配列を今回使用したウイルス間で比較した(表4)すると、Muar 株以外はワクチン株との差異が2.4%以下であるのに対し Muar 株は8.2%(北京株)および8.8%(中山株)であった。また他の V 型株についても Muar 株と同等あるいはそれ以上であった(8.2~9.2%)。

次に4種類の組換え E 領域キメラウイルスを使用して上記で使用したワクチン接種血清を用いて中和反応を行った(表5)。中山株、北京株、Muar 株由来 E 蛋白に置換したキメラウイルスはいずれもそれらの由来ウイルスと同様の中和力価を示した。このことから E 蛋白置換キメラウイルスでその由来ウイルスのワクチン感受性を判定可能であることが確認された。XZ0934 株の E 蛋白を持つキメラウイルスを用いた場合、Muar キメラウイルスと同等あるいはそれよりも中和力価が低かった。よって V 型ウイルスは I 型、III 型ウイルスに比べ現行のワクチンに中和されにくいことが考えられた。V 型 JEV のマウスに対する病原性を明らかにするため、Muar 株、および強毒株である北京株(III 型)、比較的病原性が低くまた今回用いた組換えウイルスクローン株でもある Mie/41/2002 株(I 型)の3種類の JEV 株を5段階の濃度に希釈後マウスに接種し経過観察した(図1)。 $10^1$  pfu 接種ではいずれのウイルスでも死亡は確認されなかった。生存曲線から Muar 株は北京株と類似した比較的強い病原性を示すことが明らかとなった。

#### D. 考察

日本国内に蔓延している JEV の主要型は現在 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。昨年度はこの III 型由来のワクチンが国内で分離された複数の I 型株に対し中和能を保持しているかを調べ、現行のワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることを示した。しかし近年、中国および韓国で立て続けに新たな遺伝子型 V 型のウイルスが分離同定された。V 型株は 1952 年に初めて分離されたのだが、この一度きりでその後約 60 年間報告がなかった。そのため V 型株に関する知見は遺伝子配列情報以外皆無であった。そこで本研究では V 型株に対する現行ワクチンの中和能およびウイルスの病原性を調べた。するとワクチンは効きにくい傾向がみられ、病原性も高い可能性が示唆された。ワクチン効果については、やはり E 蛋白の相同性が低いことが影響していると考えられる。遺伝子型は違っても I 型と III 型では 3% も違わない。それに対し V 型はこれらと 8% 以上異なる。実際に今回我々は、E 蛋白を I 型から V 型に置換することで、中和力価が 8 倍もしくはそれ以上低下することを示した。今回用いたのは現行ワクチンを接種したマウス血清であることから、必ずしもヒトで同様の結果になるかは限らない。今後は実際にワクチン接種前後のヒト血清を用いた研究が必要であろう。しかし今回の我々のデータは現行ワクチンの汎用性に対し問題提起できたということで価値があると考えている。

またもう一つの成果として、Muar 株が比較的(我々が調べた多くの I 型分離株と比べて)強いマウス病原性を有していることが明らかとなったことである。ただし、V 型が全般的に強毒であると結論づけるのは早計である。Muar 株のような何十年も前に分離されたウイルスはマウス脳への接種により分離・増殖・継代させてきたものが多い。するとマウスに順化している可能性も高く本来の性状を維持・反映しているかは不明である。一方、最近分離同定された株はそ

のような影響は少ない。今回我々は、E 蛋白のみ XZ0934 株のものに置換したキメラウイルスを作製した。さらに我々のグループを含め多くの研究室で E 蛋白が病原性を規定しているとの発表がなされている。今後このキメラウイルスの病原性を解析することにより、V 型本来の性状を解明していきたいと考えている。

#### **E. 結論**

近年中国と韓国で相次いで分離同定された遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスに対する現行の日本脳炎ワクチンの中和効果は、遺伝子型 I 型や III 型株に比べて弱い可能性が示唆された。また V 型ウイルスは強い病原性を維持している可能性も示唆された。国内で V 型株が確認されたとの報告はないが、今後も注意深く監視を続けることが重要である。

#### **F. 健康危機情報**

特になし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，モイメンリン，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦．日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型，型および V 型株に対する不活化日本脳炎ワクチンの効果．第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014 年 5 月，山口市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，Moi Meng Ling，林昌宏，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦．遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルス株に対する日本脳炎ワクチンの中和効果．第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

#### **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 初回免疫から2週間経過したマウスの血清を用いた中和試験 (PRNT50)

Genotype	Strain	Nakayama vaccine		Beijing-1vaccine	
		x2 dilution	x8 dilution	x2 dilution	x8 dilution
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	320	320	160
	Beijing-1(NIID)	80	40	320	160
GI	Hiroshima/46/1998	80	40	160	80
	Mie/41/2002	320	80	160	80
	Tokyo602/2005	160	40	80	80
	Kochi/25/2005	160	40	160	40
	Kumamoto/65/2005	80	40	160	40
	Mie/51/2006	160	80	80	80
	Kumamoto/81/2006	80	40	80	40
	Kumamoto/104/2006	80	40	80	40
	Chiba/150/2007	160	40	160	40
	Chiba/103/2008	80	40	80	40
JaNB037/2008	160	80	160	80	
GMT of GI viruses		124.4	48.3	116.8	54.8
GIII	JaTH160/1960	80	40	160	80
	JaTAn1/75/1975	160	40	80	80
	JaTAn1/90/1990	160	80	160	160
	GMT of GIII viruses		127.0	50.4	127.0
GV	Muar/1952	20	<10	20	10

表2 初回免疫から2ヶ月経過したマウスの血清を用いた中和試験

Genotype	Strain	Nakayama vaccine x2 dilution			Nakayama vaccine x8 dilution			Beijing-1vaccine x2 dilution			Beijing-1vaccine x8 dilution		
		PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90
		Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	>640	320	320	160	80	320	160	40	320
	Beijing-1(NIID)	80	40	20	10	10	<10	>640	320	160	320	160	40
GI	Hiroshima/46/1998	160	80	80	20	10	10	160	160	80	160	80	40
	Mie/41/2002	320	160	80	20	20	10	320	160	40	320	80	40
	JaTH160/1960	160	160	80	20	10	<10	320	160	40	80	80	40
GIII	JaTAn1/75/1975	160	80	40	20	10	<10	80	40	20	80	80	20
	JaTAn1/90/1990	320	160	80	20	10	<10	160	40	40	160	40	40
GV	Muar/1952	20	20	<10	<10	<10	<10	20	20	10	20	10	<10

表3 初回免疫から4ヶ月経過したマウスの血清を用いた中和試験

Genotype	Strain	Nakayama vaccine x2 dilution			Nakayama vaccine x8 dilution			Beijing-1vaccine x2 dilution			Beijing-1vaccine x8 dilution		
		PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	>640	>640	160	160	80	320	160	80	80	40	20
	Beijing-1(NIID)	80	80	40	40	40	20	320	160	80	320	160	40
GI	Hiroshima/46/1998	320	160	80	40	40	20	160	80	80	80	80	40
	Mie/41/2002	320	320	160	80	40	40	160	160	40	80	80	40
	JaTH160/1960	160	160	160	80	40	40	160	80	80	80	80	40
GIII	JaTAn1/75/1975	160	160	80	40	40	20	80	80	20	40	40	20
	JaTAn1/90/1990	160	160	80	80	40	20	160	80	40	80	40	20
GV	Muar/1952	80	20	10	10	<10	<10	80	40	20	40	10	<10

表4 E蛋白におけるワクチン株とのアミノ酸の差異(%)

Genotype	Strain	VS. Nakayama(NIID)	VS. Beijing-1(NIID)
GI	Hiroshima/46/1998	2.2	1.8
	Mie/41/2002	2.0	1.6
	Tokyo/602/2005	2.2	1.8
	Kochi/25/2005	2.2	1.8
	Kumamoto/65/2005	2.2	1.8
	Mie/51/2006	2.2	1.8
	Kumamoto/81/2006	2.2	2.0
	Kumamoto/104/2006	2.2	1.8
	Chiba/150/2007	2.2	1.8
	Chiba/103/2008	2.4	2.0
	JaNBo37/2008	2.2	1.8
GIII	JaTH160/1960	1.6	1.2
	JaTAn1/75/1975	1.6	1.2
	JaTAn1/90/1990	1.2	0.8
GV	Muar/1952	8.8	8.2
	XZ0934/China/2009	9.2	8.6
	10-1827/South Korea/2010	8.8	8.2

表5 キメラウイルスを用いた中和試験 (PRNT50)

Recombinant virus	Nakayama vaccine		Beijing-1 vaccine	
	X2 dilution	X8 dilution	X2 dilution	X8 dilution
Mie/41/2002 (parent virus)	160	80	160	80
rJEV-E <sup>Nakayama</sup>	>1280	640	640	160
rJEV-E <sup>Beijing-1</sup>	40	10	160	40
rJEV-E <sup>Muar</sup>	10	<10	20	<10
<b>rJEV-E<sup>XZ0934</sup></b>	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;10</b>	<b>10</b>	<b>&lt;10</b>

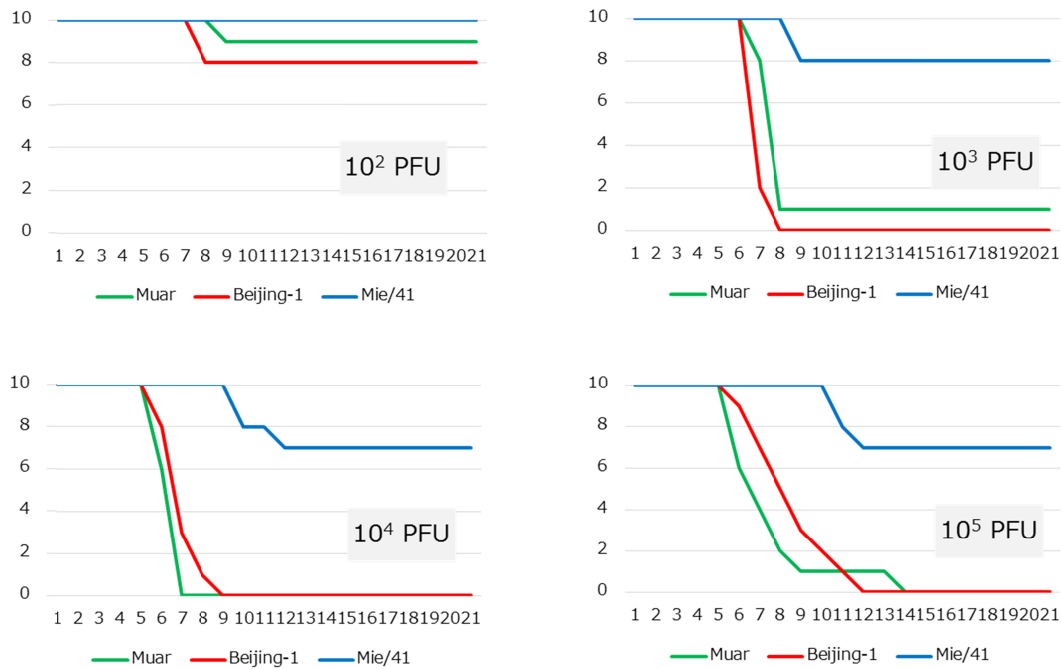


図1 マウスにおける病原性解析 (生存曲線: X軸は接種後の生存日数, Y軸は匹数)