

**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 ウイルス第一部・第二室長
協力研究者 田島 茂 ウイルス第一部・主任研究官

研究要旨

本研究事業において我々は主に蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス(JEV)について、近年国内外で分離された JEV 株の性状解析およびこれらの株に対する現行ワクチンの効果を調べてきた。本研究期間中の研究成果として、1) 高病原性型と考えられる NS4A 3-IIe 型株の分離株中の割合を調べ、約 20%であることを示した。また 3-IIe 型でも高病原性を示さない株が存在することを明らかにした。2) 遺伝子型 III 型ベースで生産されている現行ワクチンは I 型株に対しても III 型と同様に中和効果があることを明らかにした。3) 一方、遺伝子型 V 型に対する現行ワクチンの中和効果は I, III 型に比べ低く、また V 型 Muar 株のマウス病原性は比較的強いことを明らかにした。我々の結果は、現在の主要型である遺伝子型 I 型に対してはこれまでの対応で特に問題ないことを示す一方で、現在のところ国内で確認されていない V 型が侵入した場合には、ワクチン接種をしていても不安が残ることを示唆している。V 型株はこれまでに世界でも 3 株しか分離されていないことから解析が進んでおらず、性状も不明な点が多いためこの先蔓延する可能性があるのか予測できない。今後はワクチン接種したヒト血清を用いた解析や、蚊での媒介能力など更なるウイルス性状解析が必要となるだろう。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス(JEV)の感染が原因の中枢神経の疾患である。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。これまでに我々は 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ところ、1 つの株 (Mie/40/2004 株) が他に比べ顕著に高い病原性を示した。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 (I 型) 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. しかし現行の国内ワクチンはこれら海外のワクチン株とは異なることから, 別途解析が必要である.

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.

以上の背景を踏まえ, 本研究事業において我々は, 1 年目に国内および国外での 3-Ile 株の蔓延状況を把握し, かつ Mie/40/2004 株以外の 3-Ile 株の性状解析を行った. 2 年目には近年分離された遺伝子型 I 型 JEV に対する III 型ベースで生産されている現行ワクチンの有効性について調べた. さらに 3 年目には 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

我々の所有する I 型 JEV 分離株 98 株の NS4A および E 遺伝子の塩基配列を決定し, 分子系統樹解析を行った. データベースに登録されている国内外の JEV 配列と比較し, 3-Ile 型株の地理的分布状況を調べた. 3-Ile

型 JEV 分離株 5 株の全塩基配列を決定し, 既知の株の配列と比較した. またこれらの株について, 各種培養細胞中での増殖速度を調べた.

3-Ile 型分離株のマウスに対する病原性を調べるため, 3 週齢のマウス (ddY 系統) に 1×10^5 pfu/mL の各ウイルス液を腹腔接種し, 21 日間経過観察した. 生存曲線を作成し, log-rank 法により 3-Val 型 Mie/41/2002 株との差異を比較検討した.

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), これらに加え 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^{Beijing-1}-M41/pMW119 および rJEV-E^{Nakayama}-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^{Muar}-M41/pMW119 および rJEV-E^{XZ0934}-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

1994 年～2010 年に国内で分離された I 型 JEV 分離株 98 株の NS4A 領域の塩基配列を決定した (各ウイルスの分離地域は以下の通りである: 東京都, 千葉県, 静岡県, 新潟県, 石川県, 三重県, 兵庫県, 広島県, 島根県, 香川県, 高知県, 長崎県, 熊本県, 鹿児島県および沖縄県)。20 株 (20.4%) が 3-Ile 型であった (表 1)。3-Ile 型株はすべて 2004 年～2008 年に分離されたもので, 地域は本州西部～東日本 (広島県, 兵庫県, 三重県, 石川県, 静岡県および千葉県) にわたっていたものの, 九州や四国では 1 株も同定されなかった。三重県では 3 年連続で 3-Ile 型のウイルスが分離されていることがわかった。NS4A 配列をもとにした系統樹上において, 1 株の例外を除き 3-Ile 型株が 1 つのクラスターを形成した (図 1)。E 配列を用いた場合にも同様のクラスターを形成した。国外の分離株についても調べたと

ころ, 中国において日本とほぼ同時期 (2004 年～2008 年) に各々隣接していない 3 省で 3-Ile 型株が分離・同定されていた。そのうちの 1 株は日本脳炎患者から分離されたものであった。我々が同定した 3-Ile 型株の中から 5 株 (Mie/34/2004, Mie/84/2005, Mie/51/2006, Tokyo/373/2005, Tokyo/602/2005) を選択し全塩基配列を決定したところ, Mie/84/2005 株は Mie/40/2004 株とアミノ酸配列が完全に一致したが, 他 4 株はそれぞれ Mie/34/2004 株で 2 残基, Mie/51/2006 株で 5 残基, Tokyo/373/2005 株で 1 残基, Tokyo/602/2005 株で 4 残基が異なっていた。3 種の哺乳動物由来培養細胞を用いた *in vitro* での感染実験において, 3-Ile 株間で増殖速度に顕著な差異は認められなかった。一方蚊由来株化細胞 C6/36 細胞においては, 同じ 3-Ile 型株である Tokyo/602/2005 株 (低増殖性株) と Mie/51/2006 株 (高増殖性株) 間で 7 倍以上の差異が認められた。各 3-Ile 型株のマウスに対する病原性 (神経浸潤毒性) を調べたところ, Mie/34/2004 株, Tokyo/373/2005 株および Tokyo/602/2005 株は Mie/40/2004 株とほぼ同等の病原性を示した。一方 Mie/51/2006 株は Mie/40/2004 株に比べ顕著に病原性が弱く, その程度は Mie/41/2002 株とほぼ同等であった (図 2)。

方法欄に記したワクチン接種マウス血清およびウイルス株を用いて中和解析を行った (表 2)。遺伝子型 I 型, III 型については, 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。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ったワクチン接種血清を用いて中和反応を行った (表 3)。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 3)。 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

本研究により 3-IIe 株は主要株ではないものの, 本州の広範囲に存在していたことが判った。また, Obara ら (2011) の報告と我々のデータと統合すると, 今回調べていない富山県でも 2005 年から 2009 年に 3-IIe 型の JEV が存在していたことが示唆された。以前我々は, 3-IIe 型ウイルスと 3-Val 型ウイルスで *in vitro* での増殖性に顕著な差異が認められないことを示した (Yamaguchi *et al.*, 2011)。今回の結果も哺乳動物由来株化細胞を使用した場合はほぼ同様であった。一方, 蚊由来培養細胞 C6/36 細胞を使用したとき,

3-IIe 株間で最大 7 倍以上の差異が観察された。この解析で高増殖性を示した Mie/51/2006 株は, 3-Val 型株である Mie/41/2002 と同等であり, さらにともにマウスを用いた病原性解析では両ウイルスとも Mie/40/2004 株に比べ有意に低い病原性を示した。C6/36 細胞での増殖性とマウス病原性が逆相関しているようなデータであり興味深い。その理由は不明である。Mie/51/2006 株は今回性状解析した株の中では最も Mie/40/2004 株とアミノ酸が異なる株であり, E 領域に 2 ヶ所, NS4B 領域に 1 ヶ所, NS5 領域に 2 ヶ所差異がある。これらの部位は他の株とは共通していないことから, これらのうちの何処かが病原性の弱さに関与しているものと想像される。このような部位を同定することにより, 新たな病原性規定部位を明らかにすることが可能であろう。

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。我々はこの 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た。その結果国内で生産されている現行ワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることが明らかとなった。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

JEV の NS4A 遺伝子領域に焦点を当て、近年の野外分離株の遺伝子解析を行った。約 20% が高病原性型である 3-Ile 型株であった。3-Ile 型の分離株計 5 株の *in vitro* での増殖性を調べた。哺乳動物由来株化細胞において差異は認められなかったが、蚊由来細胞 C6/36 細胞において数倍の差異が観察された。上記の株についてマウスに対する病原性を比較したところ、1 株が他の 3-Ile 株に比べ有意に低い病原性を示した。

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。一方、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. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi Y., Nukui Y., Kotaki A., Sawabe K., Saijyo M., Watanabe H., Kurane I., Takasaki T., Tajima S. 2013. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *J. Gen. Virol.*, 94: 90-96.

白鳥（田島）茂，高崎智彦。「日本脳炎ワクチンの品質管理」2012. 臨床とウイルス，第 40 巻第 5 号: 297-305.

2. 学会発表

山口幸恵，小滝徹，新井智，沢辺京子，倉根一郎，西條政幸，高崎智彦，田島茂。非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析。第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2012 年 5 月，阿蘇市

田島茂，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦。 Dengue ウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析。第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会，2012 年 11 月，大阪市

田島茂，山口幸恵，小滝徹，新井智，沢辺京子，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦。日

本脳炎ウイルス NS4A の分子疫学的解析 .
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 , 2012
年 11 月 , 大阪市

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・ベ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

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. 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

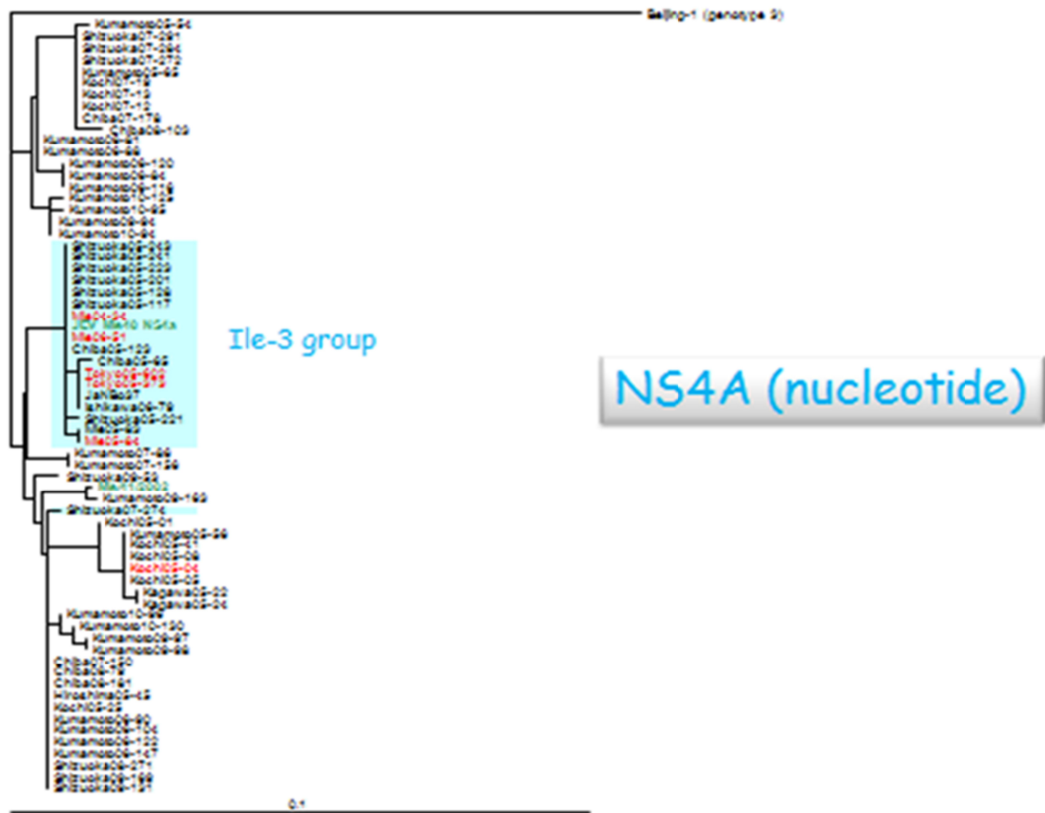


図1 分離株の系統樹解析 (NS4A 遺伝子)

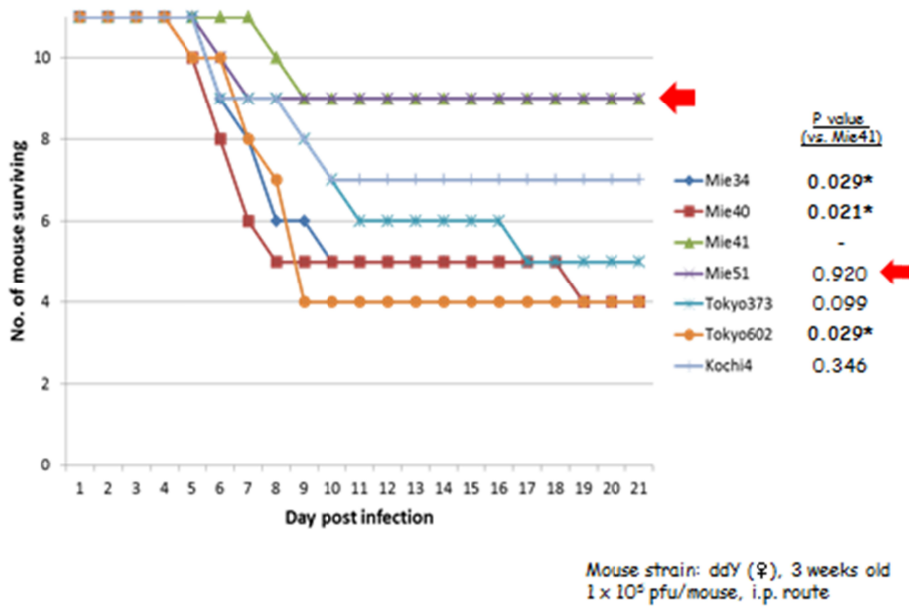


図2 3-Ile 型 JEV のマウスに対する病原性の比較 (生存曲線)

表2 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-1 vaccine	
		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3 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 ^{Nakayama}	>1280	640	640	160
rJEV-E ^{Beijing-1}	40	10	160	40
rJEV-E ^{Muar}	10	<10	20	<10
rJEV-E^{XZ0934}	<10	<10	10	<10

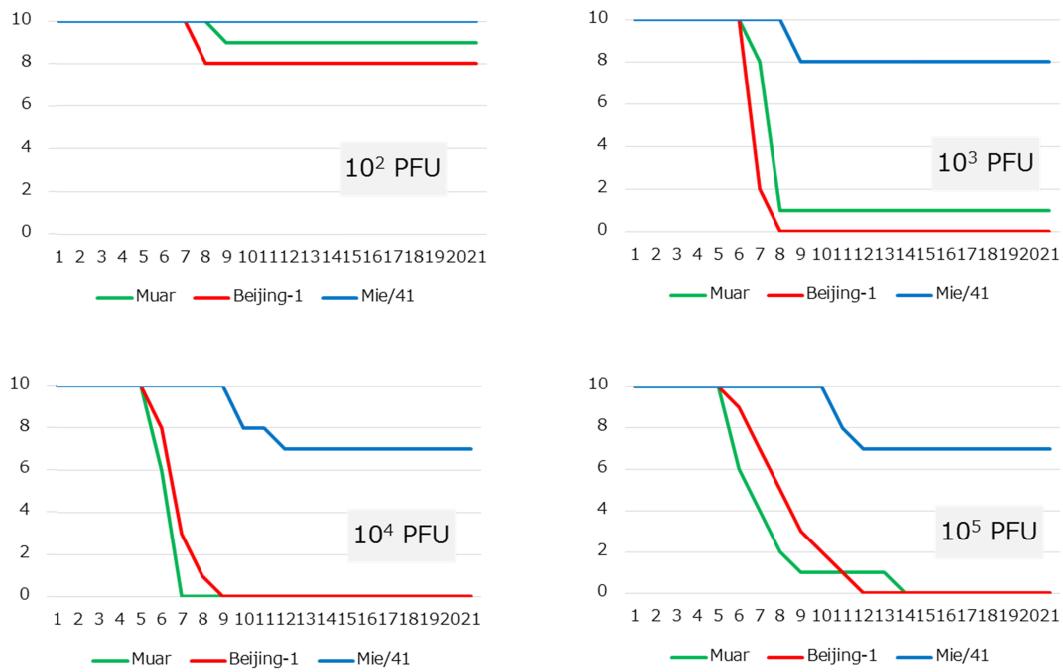


図3 マウスにおける病原性解析（生存曲線：X軸は接種後の生存日数，Y軸は匹数）