

アルボウイルス、水系細菌叢、媒介生物のモニタリングによる温暖化の影響評価に関する研究

国立感染症研究所 昆虫医科学部 小林睦生（～H23年度）・沢辺京子（H24年度）

平成20～24年度合計予算額	68,827 千円
（うち、平成20年度当初予算額	15,949 千円
平成21年度当初予算額	14,867 千円
平成22年度当初予算額	14,421 千円
平成23年度当初予算額	12,719 千円
平成24年度当初予算額	10,871 千円

（1）ブタ・イノシシにおける日本脳炎ウイルス感染と気象要因の解析

国立感染症研究所ウイルス第一部

高崎智彦・小滝 徹・山口幸恵・池田真紀
子・田島 茂・倉根一郎

〔要旨〕

近年、我が国でブタから分離される日本脳炎ウイルス（JEV）は遺伝子Ⅰ型である。そのウイルス遺伝子解析すると、3'非翻訳領域（3'NCR）に塩基配列欠損が認められる。この現象は、近年、デングウイルスでも認められる現象である。この欠損現象が近年の地球温暖化に伴う蚊の生態と何らかの関連があるのかを、1980年代から1990年に京都府で蚊から分離されたウイルスに関して遺伝子解析し、比較検討した。JEVの3'NCR領域の遺伝子欠損は1980年代から認められ、さらに欠損部位が少し異なることが判明した。また、近年の暖冬傾向に伴って生息域を拡大しているイノシシがJEV感染およびウイルス増幅動物である可能性について検討した。結果、兵庫県下で2008年秋から2010年3月までに捕獲された120頭の野生のイノシシの血液を採取し、2010年度には4月から10月までの蚊の活動時期にイノシシ40頭分の血液に関してJEV感染状況を検討した。2010年3月下旬に捕獲されたイノシシの血液から、近年分離されていない遺伝子Ⅲ型JEVを検出した。

近年、中国および韓国においてJEV遺伝子Ⅴ型が分離されている。本ウイルスは何らかの方法で中国から飛来してくることを示唆する報告もあり、日本へ侵入している可能性が危惧されている。そこで、遺伝子Ⅲ型JEV（Beijing-1株）で製造されている現行JE不活化ワクチンが、遺伝子Ⅴ型ウイルスに対して有効かを中和抗体により検討した。JE不活化ワクチンをDDYマウスに2回免疫した後、心臓から採血し血清を分離して非働化した。このマウス血清をBeijing-1株、遺伝子Ⅴ型ウイルス（Muar株）を攻撃ウイルスとして用いて、Vero細胞によるプラーク減少法により中和抗体価を測定した。その結果、遺伝子Ⅴ型ウイルス（Muar株）に対する中和抗体価はBeijing-1株に対する中和抗体価に比較して、相対力価0.51とかなり低い値を示した。これは、2008年12月12日に西宮市甲陽園目神山町（関西学院大学から西へ約2.5km）で捕獲されたオスのイノシシ（1歳・体重25kg）の血液から分離されたJEV JaNBo37株（遺伝子Ⅰ型）に対する相対力価が0.67であったことと比較しても有意に低いと考えられた。そこで、Ⅴ型JEV

に特異的で高感度なプライマーを設計し、兵庫県下で2008年秋から2010年3月までに捕獲された120頭の野生のイノシシから採取された血液を再検査した結果、いずれの個体からもV型JEVは検出されなかった。

[キーワード]

日本脳炎ウイルス遺伝子型、中和抗体価、ウエストナイルウイルス、イノシシ、分布域、温暖化

1. はじめに

我が国のJEVの活動は、夏季を中心に蚊の活動するシーズンではブタのあいだで、依然として活発な活動を続けている。ヒトの患者報告数は10人以下ではあるが、近年は関東・東海地方でも患者が報告されている。また、患者発生時期も8月より9月・10月が多く、温暖化との関係が示唆される。そこで、日本国内で活動しているJEVを分離し、分子疫学的に解析した。また、節足動物が媒介するウイルスすなわちアルボウイルスは、環境が変化するとより効率のよい増幅動物を利用する可能性がある。最近、ヒトの住環境にしばしば出現するイノシシは、ブタと近縁な野生動物であり、JEVの増幅動物としての可能性を解明することは温暖化との関係においても重要である。近年、中国および韓国においてJEV遺伝子V型が分離されている^{1,2)}。何らかの方法で中国からウイルスが飛来してくることを示唆する報告もあり、日本にも侵入している可能性がある。そこで、遺伝子Ⅲ型ウイルス（Beijing-1株）で製造されている現行JE不活化ワクチンが、遺伝子V型ウイルスに対して有効であることを中和抗体により検討することは重要であり、将来のV型JEVの侵入に備えることが期待される。

2. 研究目的

日本国内で活動しているJEVを分離し、分子疫学的にその特徴を解析する。昨年に引き続き1980年代に京都で蚊から分離されたJEVをその対照とし、ウイルス遺伝子の相違を検討した。最近、ヒトの住環境にしばしばイノシシが出現するという状況は、西日本だけでなく東日本にも拡大する傾向にある。ブタと近縁な野生動物であり、JEVの増幅動物としての可能性を解明することを目的とし、抗JE抗体およびウイルス遺伝子検査、ウイルス分離を実施した。対象地域は、野生イノシシが住環境に出現する事例の多い兵庫県西宮市周辺を対象とした。

中国および韓国においてJEV遺伝子V型が分離されている。本ウイルスが何らかの方法で中国から飛来してくることが示唆されており、日本にも侵入している可能性がある。そこで、遺伝子Ⅲ型ウイルス（Beijing-1株）で製造されている現行JE不活化ワクチンが、遺伝子V型ウイルスに対して有効かを中和抗体により検討した。また、ウエストナイルウイルス（WNV）の日本侵入の有無を確認するために、WNVに関しても遺伝子検出および抗体検査を実施した。

3. 研究方法

(1) ウイルス分離および遺伝子解析

1) イノシシ血清の採取法

兵庫県で捕獲されたイノシシの血液から血清分離し、PCR法でJEV遺伝子陽性となったものをウイルス分離に供した。また、蚊からのウイルス分離は、すでに蚊プールの乳剤を乳のみマ

ウスに脳内接種し採脳し、 -70°C にて凍結されていた脳組織を材料とした。

2) ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を用いた。使用した細胞は Vero 細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）および C6/36 細胞（ヒトスジシマカ由来）を用いた。蚊の乳剤を接種した乳のみマウス脳は、マウス脳を乳剤化したものを Vero 細胞に接種後、細胞変性効果を確認し、細胞上清を回収した。

3) 遺伝子検出および解析

JEV 遺伝子検出；イノシシの血清 200 μL から RNA を抽出し、リアルタイム逆転写遺伝子増幅法（TaqMan 法）により、ウイルス遺伝子を検出した。

血清あるいは分離したウイルス（培養上清）からウイルス RNA を抽出し、E 領域に設定した 5 つのプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、ABI prism Avant 3100 (ABI 社)の遺伝子解析装置を用いてそのプロトコールにしたがって、E 領域および 3'NCR 領域の遺伝子解析を実施した。

(2) 抗 JEV IgM 抗体検査および抗ウエストナイルウイルス IgM 抗体検査

ブタ・イノシシ用抗日本脳炎 IgM 抗体捕捉 ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay；酵素結合免疫吸着法）を構築し、抗 JEV IgM 抗体を検出した。抗ウエストナイルウイルス IgM 抗体捕捉 ELISA 法は、ヒト用のキット（Focus Diagnostics 社）の抗ヒト IgM 抗体コーティングプレートを、抗ブタ IgM 抗体コーティングプレートに置き換えて使用した。

(3) 現行日本脳炎ワクチンの他遺伝子型への防御効果

遺伝子 III 型ウイルス（Beijing-1 株）で製造されている現行 JE 不活化ワクチンが、遺伝子 V 型ウイルスに対して有効かを中和抗体により検討した。JE 不活化ワクチンを DDY マウスに 4 週令、5 週令の 2 回免疫した。6 週令目に心臓から採血し血清を分離して非働化した。このマウス血清を Beijing-1 株、遺伝子 V 型ウイルス（Muar 株）を攻撃ウイルスとして用いて、Vero 細胞によるプラーク減少法により中和抗体価を測定した。Muar 株は 1952 年にマレーシアの患者から分離された日本脳炎遺伝子 V 型ウイルスである³⁾。JEV V 型株に特異的で高感度なプライマーを設計し、兵庫県下で 2008 年秋から 2010 年 3 月までに捕獲された 120 頭の野生のイノシシから採取された血液を再検査した。イノシシの血清 200 μL から RNA を抽出し、逆転写遺伝子増幅法（RT-PCR 法）により、ウイルス遺伝子を検出した。

4. 結果・考察

日本脳炎の遺伝子 V 型ウイルス（Muar 株）に対する中和抗体価は、Beijing-1 株に対する中和抗体価（表 1）に比較して、平行線定量法により解析したところ、相対力価 0.51 とかなり低い値を示した。これは、2008 年 12 月 12 日に西宮市甲陽園目神山町（関西学院大学から西へ約 2.5km）で捕獲されたオスのイノシシ（1 歳・体重 25kg）の血液から分離された JaNB037 株 JEV（遺伝子 I 型）に対しては相対力価が 0.67 であったことと比較して有意に低いと考えられる。次いで、兵庫県下で 2008 年秋から 2010 年 3 月までに捕獲された 120 頭の野生のイノシシから採取された血液を再検査した結果、いずれの個体からも V 型 JEV は検出されなかった。また、WNV についてもウイルス遺伝子および特異的 IgM 抗体は検出されなかった。

表 1 日本脳炎ウイルス遺伝子を検出したイノシシ

個体番号	雌雄	捕獲日	推定年齢	体重(Kg)	IgM 抗体
Bo37	♂	12月12日	1歳	25	陰性
Bo66	♀	3月27日	1歳	20	陽性
Bo76	♀	5月5日	1歳半	15	陰性

我が国における JEV の活動は、ヒトの患者数が激減しているにもかかわらず、蚊の活動するシーズンではブタとの間で毎年夏季に活発な活動を続けている。最近、我が国でブタから分離される JEV は遺伝子 I 型である。そのウイルス遺伝子を解析すると、3'NCR (3'非翻訳領域) に塩基配列欠損が認められた。この現象は、近年デングウイルスでも同領域で認められる現象である。

kyoto-JE81-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAAAGTAGACTA	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	59
JE87-82kyoto-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
Kyoto-JE87-22-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
Kyoto-JE87-82-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
kyoto-JE87-169-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
Kyoto-JE87-212-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
kyoto-JE87-275-3'NTR	1	TAGTGTGACTTAAGGTAGAAA-----	TGTAATAAATGT	AAATGAGAAAAATGCATG	50
cb07-150 3ncr	1	TAGATAGGATTAAAGTCA-----	TGTGTGAAATGTG	AGATAAGAAAAATG	TG 45
cb07-178 3ncr	1	TAGACAGGATTAAAGTCA-----	TGTG-----	AGATAAGAAAAATG	TG 36
sz07-272 3ncr	1	TAGATAGGATTAAAGTCA-----	TGTGTGAAATGTG	AGATAAGAAAAATG	TG 45
sz07-274 3ncr	1	TAGACAGGATTAAAGTCA-----	TGTG-----	AGATAAGAAAAATG	TG 36
kyoto-JE81-3'NTR	60	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG	CTCGC		119
JE87-82kyoto-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
Kyoto-JE87-22-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
Kyoto-JE87-82-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
kyoto-JE87-169-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
Kyoto-JE87-212-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
kyoto-JE87-275-3'NTR	51	CATATGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGGGTAGACGGTGTGCCTGCG			110
cb07-150 3ncr	46	CATGTGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGAGTAGACGGTGTGCCTGCG			105
cb07-178 3ncr	37	CATGTGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGAGTAGACGGTGTGCCTGCG			96
sz07-272 3ncr	46	CATGTGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGAGTAGACGGTGTGCCTGCG			105
sz07-274 3ncr	37	CATGTGGAGTCAGGCCAGCAAAAAGCTGCCACCGGATACTGAGTAGACGGTGTGCCTGCG			96
kyoto-JE81-3'NTR	120	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			179
JE87-82kyoto-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAATAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
Kyoto-JE87-22-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
Kyoto-JE87-82-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
kyoto-JE87-169-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
Kyoto-JE87-212-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAATAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
kyoto-JE87-275-3'NTR	111	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACAGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			170
cb07-150 3ncr	106	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			165
cb07-178 3ncr	97	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			156
sz07-272 3ncr	106	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			165
sz07-274 3ncr	97	TCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGACAAACGAAAAGTGAGAAAAGCCCTCAG			156
kyoto-JE81-3'NTR	180	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			198
JE87-82kyoto-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
Kyoto-JE87-22-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
Kyoto-JE87-82-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
kyoto-JE87-169-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
Kyoto-JE87-212-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
kyoto-JE87-275-3'NTR	171	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			189
cb07-150 3ncr	166	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			184
cb07-178 3ncr	157	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			175
sz07-272 3ncr	166	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			184
sz07-274 3ncr	157	AACCGTCTCGGAAGTAGGT			175

図 1 日本脳炎ウイルス 3'NCR 領域の塩基配列欠損

この現象が近年の地球温暖化に伴う蚊の生態と何らかの関連があるのかを、1980年代から1990年に京都府で蚊から分離されたウイルスに関して遺伝子解析し、比較検討した結果、JEVの

3'NCR 領域の遺伝子欠損は 1980 年代から認められ、さらに欠損部位が少し異なることが判明した (図 1)。1 段目の 1981 年の京都での JEV 分離株 (遺伝子 III 型) では塩基配列欠損は認められなかったが、2-7 段目の 1987 年の分離株 (遺伝子 3 型) では、9 塩基配列の欠損が存在した。一方、千葉県と三重県のブタから分離された遺伝子 I 型株 JEV (8-11 段) では、同じ部位に 13 塩基の配列欠損が存在した。

また、近年の暖冬傾向に伴って生息域を拡大しているイノシシの JEV 感染およびウイルス増幅動物である可能性について引き続き検討した結果、兵庫県下で 2008 年秋から 2010 年 3 月までに捕獲された 120 頭の野生のイノシシの血液を採取し、2010 年度は 4 月から 10 月までの蚊の活動時期にイノシシ 40 頭分の血液に関して JEV 感染状況を検討した。2010 年 3 月下旬に捕獲されたイノシシの血液から、近年分離されていない遺伝子 III 型 JEV を検出した。

2008 年 12 月 12 日に西宮市甲陽園目神山町 (関西学院大学から西へ約 2.5km) で捕獲されたオスのイノシシ (1 歳、体重 25kg) の血液から JEV (JaNBo37 株) が分離された。冬を越して 3 月 29 日捕獲のイノシシ (Bo66) 血清からウイルス遺伝子を検出、5 月 5 日捕獲のイノシシ (Bo76) 血清からウイルス遺伝子を検出した。3 つのウイルスとも遺伝子型は I 型であった (表 2)。しかし、H22 年度は 3 月下旬に捕獲されたイノシシ (Bo121) から、遺伝子 III 型の JEV 遺伝子を検出した。

表 2 日本脳炎ワクチンの遺伝子 V 型 (Muar 株) と遺伝子 III 型に対する中和抗体価

ワクチン 希釈率	Beijing 1 株 (遺伝子 III 型)	Muar 株 (遺伝子 V 型)	相対力価
2 倍	2.76	2.26	-0.34885
4 倍	2.64	2.08	-0.19709
8 倍	2.59	1.94	-0.14849
16 倍	1.66	1.27	-0.45164

通常の PCR で得られた増幅産物の遺伝子配列を決定し解析した結果、遺伝子 III 型ウイルスであることが確認された (図 2)。このことから、遺伝子 III 型の JEV は日本国内から消失したわけではなく、活動は活発ではないが存在していることが確認された。ウイルスを分離するために盲継代を重ねたが、おそらくイノシシの血液にコンタミしていたと考えられる *Micrococcus* 属の菌にはばまれ分離できなかった。

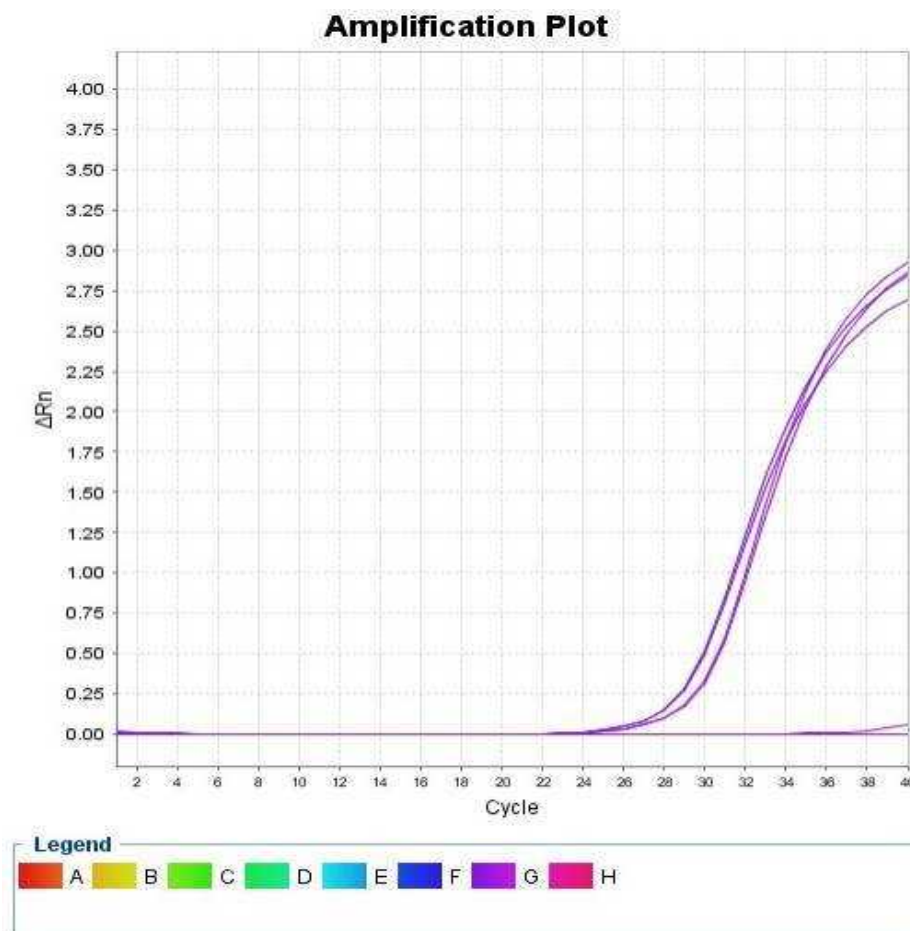
また、H22 年度の捕獲イノシシ 40 頭に関しては、血中にウイルス遺伝子を検出した個体は Bo121 以外になく、抗体検査においても 3 頭に IgM 抗体が陽性であったが、H22 年の夏季は猛暑であったにもかかわらず、JEV の活動はあまり活発ではなく、兵庫県下ブタの感染源調査でも 9 月上旬まで 0%、中旬に 33%、下旬にようやく 90% に達したという状況であった。イノシシの感染状況もこの活動状況を反映したのものであると考えられた。

遺伝子 V 型ウイルス (Muar 株) に対する中和抗体価は Beijing-1 株に対する中和抗体価と比較

して、平行線定量法により解析したところ相対力価 0.51 とかなり低い値を示した。これは、2008 年 12 月 12 日に西宮市甲陽園目神山町 (関西学院大学から西へ約 2.5km) で捕獲されたオスのイノシシ (1 歳・体重 25kg) の血液から分離された JaNBo37 株 JEV (遺伝子 I 型) に対しては

相対力価が 0.67 であったことと比較しても有意に低いと考えられる。そこで、V型 JEV に特異的で高感度なプライマーを設計し、兵庫県下で 2008 年秋から 2010 年 3 月までに捕獲された 120 頭の野生のイノシシから採取された血液を再検査したが、いずれの個体からも V 型 JEV は検出されなかった。

図 2 ウイルス遺伝子型別リアルタイム PCR 法により日本脳炎ウイルス genotype III を検出した



5. 本研究により得られた成果

- (1) 国内で分離される JEV の 3'末端側の非翻訳領域に遺伝子欠損があり、欠損部位が変化していることを明らかにした。
- (2) JEV がイノシシに感染し、12 月においてもウイルス血症をおこしていることを確認した。
- (3) 国内で分離される JEV は遺伝子型 I 型であるが、III 型ウイルスに感染したイノシシを確認し、遺伝子 III 型 JEV も存在していることを明らかにした。
- (4) JEV 遺伝子型 V 型のウイルスおよび WNV は検出されなかった。
- (5) 現行 JE ワクチンは、JEV 遺伝子 V 型に対して防御効果がやや低いことを明らかにした。

6. 引用文献

- 1) Takhampunya R., Kim H.C., Tippayachai B., Kengluetcha A., Klein T.A., Lee W.J., Grieco J., Evans B.P. 2011. Emergence of Japanese encephalitis virus genotype V in the Republic of Korea. *Virology*,

8: 449.

- 2) Li M.H., Fu S.H., Chen W.X., Wang H.Y., Guo Y.H., Liu Q.Y., Li Y.X., Luo H.M., Da W., Duo Ji D.Z., Ye X.M., Liang G.D. 2011. Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging. PLoS Negl. Trop. Dis., 5(7): e1231.
- 3) Mohammed M.A. et. al. 2011. Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of Muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype. Infect. Genet. Evol., 11(5): 855-862.

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表 (学術誌)

- ① T. Takasaki, A. Kotaki, C.K. Lim, S. Tajima, T. Omatsu, M.L. Moi and I. Kurane. Journal of Disaster Research, 4(5): 322-328 (2009)
“Arbovirus Infections: the challenges of controlling an ever-present enemy.”

(2) 口頭発表

- ① 加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦明、高崎智彦、倉根一郎：第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2010)
「3’NTR 内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体の *in vitro* における増殖および病原性解析」
- ② 高崎智彦：第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会シンポジウム「JEV と媒介蚊に関する未解決な問題」(2010)
「冬季イノシシから分離・検出された日本脳炎ウイルス」

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

今後、将来の温暖化傾向が JEV の活動に影響を与え、リスク地域が拡大する事の啓発に

努めるとともに、将来の V 型 JEV の侵入に備える。