

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21610024

研究課題名（和文） 日本脳炎ワクチン未接種乳幼児の感染リスクの予見：基礎データ収集

研究課題名（英文） Infection of the children who are not inoculating the Japanese encephalitis vaccine is foreseen.

研究代表者

村上 学 (MURAKAMI MANABU)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：00288309

研究成果の概要（和文）：2009-2012年に石川県内で捕獲した蚊から日本脳炎ウイルスが毎年確認されています。ワクチン接種はもちろん、蚊に刺されないよう注意が必要です。また、気候変動により蚊の発生時期や発生数が変わっているかもしれません。

研究成果の概要（英文）：Mosquito surveys were carried out in ishikawa from 2009-2012. Female mosquitoes were screened and found to be positive for Japanese encephalitis virus genomic RNA. It does not contact with a mosquito and vaccination are very effective defense. Climate change will have a profound impact on the life circle of a mosquitoes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：子ども学（子ども環境学）

キーワード：ウイルス、感染症、昆虫

1. 研究開始当初の背景

2007年、石川県で日本脳炎患者が2名発生した。通常、日本脳炎患者の発生は地域差があり、国内では温暖な沖縄、九州、中国や四国地方で大部分が発生している。豪雪地帯である石川県での患者発生は注目すべき事案であり、さらに北陸地方近県（福井県や富山県）で患者は発生しなかった。これらの原因究明が急務と考えられた。

さらに、厚生労働省は平成17年5月に定

期予防接種として、「日本脳炎ワクチン接種の積極的な勧奨を差し控え措置」を行い、現状では新生児～3歳までの大部分の子どもがワクチン未接種の状態であった。

副作用の少ない新型ワクチンの開発、承認にはまだ時間がかかることから、今後、子どもや高齢者の患者の増加、今までほとんど患者が発生していない地域での患者発生が懸念されていた。

本研究の目的は日本脳炎ウイルス（JEV）の遺伝的変異による毒性や増殖速度の変化、JEV 分布域の変化、媒介蚊（ウイルスを運ぶ役割をする）の分布と発生時期の変化を明らかにし、特にワクチン未接種の子ども達が JEV に感染するリスクを予見する基礎データとすることであった。

私達は本助成を受ける前に小規模ながら 1998～2008 年にかけて、日本脳炎ウイルス媒介蚊（コガタアカイエカ）を採集し、日本脳炎ウイルスの分離を行っていた。

助成申請時までに判明していた結果を下記に示す。

- ・ 1994 年に石川株（遺伝子型 1）を豚単核球より分離、野外蚊からは 1998 年に石川-U1 と U2 株（遺伝子型 3）、2005 年に石川-K05 株（遺伝子型 1）、計 4 種の JEV 分離に成功し、E 蛋白遺伝子解析を行い、それぞれが異なるアミノ酸配列をもつことを確認していた。
- ・ 石川-K05 株は培養細胞（Vero）感染では増殖速度が非常に遅いにもかかわらず、マウスに感染させると強い毒性を示すことがわかっていた。

これらの結果からも、JEV は日本国内に生息していることが判明していた。

これまで患者数が少なかったのはワクチン接種の徹底と生活環境向上による蚊との接触機会の減少が考えられる。しかし、ワクチン接種という 1 つの防壁が無くなったことにより、今後、患者（特に乳幼児）の増加が懸念された。

2. 研究の目的

日本脳炎ウイルス（JEV）の遺伝的変異による毒性や増殖速度の変化、JEV 分布域の変化、媒介蚊（ウイルスを運ぶ役割をする）の分布と発生時期の変化を明らかにし、特にワクチン未接種の子ども達が JEV に感染する

リスクを予見する基礎データとする。

さらに、近年、問題視されている温暖化による気候変動により、蚊の発生時期変化、生息エリア等の変化拡大、外来種の侵入等を定点長期モニタリングで観察監視し、感染症のエンデミック、エピソード、パンデミックやアウトブレイク時対策法の一つである、媒介動物駆除の基礎データとしても活用できるように備える。

3. 研究の方法

(1) 気候変動（温暖化、ヒートアイランド現象）と媒介蚊生息状況の関係

CDC512 型電池式捕虫器（蚊、蠅などの飛翔羽虫を捕獲できる）＋ドライアイス 1kg を 6～10 月にかけて石川県内の豚舎周辺、小学校、幼稚園や公園など 7 か所に設置し、1 週間に 1 度、夕刻 5-6 時頃、設置、翌朝 9-11 時頃回収して野外蚊を採集し、種、匹数を査する。

気象庁発表の気象統計情報から気温、湿度、風向や風速データを得て、気象条件と野外蚊の種、匹数、生息場所、発生時期の関係を統計的に分析する。

(2) 野外蚊から分離される JEV の毒性や増殖速度等の変化と遺伝子の関係

毎年、2 回（8 月と 9 月）に蚊帳とドライアイスを用いて、コガタアカイエカを収集する。野外蚊からはウイルス RNA を RT-PCR 法（E と NS4 のタンパクコード領域、2 種のプライマーを使用、JEV 関連産物を検出、ヌクレオチド配列を解析する）で検出し、陽性サンプルは細胞に感染させ、ウイルスを増殖させる。新規 JEV が分離できた年度には細胞感染実験、動物感染実験、遺伝子解析を行う。

ウイルス分離できる時期は不明なので常に各項目を実験できるように実験分担

者と連携を密にする。

(3)増幅動物（ブタ）の抗体保有状況

国立感染症研究所のホームページ：日本脳炎「ブタ」の抗体保有状況（<http://idsc.nih.go.jp/yosoku/index.html>）で情報収集できるので本申請には関係なく、無期限でデータを蓄積する。

これら3項目のデータを各年度で集計し、各項目間での相関関係や年度間での相違や相関関係も調査し、蚊の生息状況（種、数、発生時期、外来の有無）を明らかにする。さらに、新分離 JEV の増殖性や毒性の変化と遺伝子構造との関係を同時進行で明らかにする。

4. 研究成果

日本脳炎ワクチン未接種乳幼児の感染リスクを予見する目的で平成21-24年度にかけて石川県内7ヶ所（豚舎周辺3ヶ所と民家4ヶ所）、計10地点に蚊捕集器を設置し、蚊（特にコガタアカイエカ）発生状況をモニタリングし、ウイルス保有率を監視してきた。

豚舎周辺の水田では優占種のコガタアカイエカが多数採集され、2009年：1サンプル、2010年：12サンプル、2011年：1サンプルと2012年：3サンプルのウイルスRNAがRT-PCR法で検出された（表1. 参照）。

国内での日本脳炎患者数は各年10名以下で推移しているが、自然界ではブタ⇄蚊で日本脳炎ウイルスは存在し、蚊によって運ばれていることが確認できた。

さらに2012年には季節外れのコガタアカイエカ大発生が豚舎周辺の水田で確認された。例年、コガタアカイエカは7月前期-9月前期に多く発生し、ピーク期は7月中旬と8月中旬であることが多い。しかし、2012年は7月前期-9月前期の発生数が非常に少なかったが9月中旬（9月13日）に大発生が確認された。

教科書的にはコガタアカイエカの主発生源

は水田とされているが北陸地方では9月13日にはすでに稲刈りが終了し、水田は乾燥状態であるのが一般的である。事実、トラップ回収時には目視で来る範囲の水田は乾燥状態であった。本来、発生が抑制される条件下での大発生の原因究明（気候変動、蚊の生活環境の変化）が必要である。

表1. ドライアイス+CDCトラップでのコガタアカイエカ採集数（頭）

	2009	2010	2011	2012
豚舎AB	533	958	1813	3900
豚舎CD	403	3272	2906	3657
豚舎EF	530	3457	2649	2297
総数（頭）	1533	7767	7368	9854
北陸の夏期 天候*	冷夏	猛暑	例年 並み	猛暑 少雨
ブタ日本 脳炎HI抗体 保有状況** (石川最終)	10%	50%	0%	10%
RT-PCR陽性 サンプル数	1/33 3%	12/86 14%	1/89 1%	3/209 1%
ウイルス 分離	0	0	0	0

* 気象庁報道発表資料

** 国立感染症研究所 感染症情報センター
発表データ

次に、乳幼児との接触頻度が高い民家周辺での蚊発生数は昭和30-40年代と比較して種類、個体数共に減少している事が明らかになった。これは住宅品質向上（建築技術の向上、家電等による生活環境の変化等）、住宅地のインフラストラクチャー向上（上下水道整備、土木工事技術の向上等）等によるものと考えられる。

表2. 石川県内民家設置トラップの蚊捕獲数

年	2009		2010		2011	
	都市部	郊外	都市部	郊外	都市部	郊外
アカイエカ群	196	93	106	144	70	45
コガタアカイエカ	17	53	3	79	5	68
ヒトスジシマカ	10	44	14	46	15	38
オオクロヤブカ	0	0	1	0	0	0
総数	223	190	124	269	90	151

以上の結果から家屋内や都市部でのヒトと蚊の接触頻度は減少しているが、郊外では依然かなりの数で蚊が発生しており(表2. 参照)、さらにウイルスの存在も毎年確認できることから、蚊発生状況やウイルス保有率の監視は患者数の少ない現在でも必須であり、この継続監視は外来ウイルスの侵入時にも有用であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①村上学、高田尊信、前田雅代、竹上勉、石川県内の民家周辺における蚊の発生状況調査(2009-2011年)、Urban Pest Management、査読有、Vol 2 (No.2)、2012、109-113

[学会発表] (計 18 件)

①村上学、石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査と日本脳炎ウイルス分布(2009-2012年度)、第65回日本衛生動物学会大会、2013年4月6日、酪農学園大学(北海道)

②村上学、石川県内豚舎周辺で採集したコガタアカイエカからの日本脳炎ウイルス分離(2005-2012年度)、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日、グランキューブ大阪(大阪)

③村上学、石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査(2009-2012)、第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2012年11月12日、大阪大学中之島センター(大阪)

④村上学、石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査、第30回北陸病害動物研究会、2012年6月30日、三国文化未来館(福井)

⑤村上学、石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査と日本脳炎ウイルス分布、第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2012年5月25日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本)

⑥ Manabu Murakami、Isolation and characterization of Japanese encephalitis virus from mosquitoes in Ishikawa, Japan in 2010、International Union of Microbiological Societies 2011 Congress、13 Set. 2011、Sapporo Convention Center (Hokkaido)

⑦村上学、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(2009-2011)、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011年11月11日、国立感染症研究所(東京)

⑧村上学、石川県内豚舎近辺で行ったドライアイストラップによるコガタアカイエカ採集と JEV 分離、第66回日本衛生動物学会西日本支部大会、2011年10月8日、アートシアター石川(石川)

⑨村上学、石川県内豚舎近辺で行ったドライアイストラップによる蚊の採集と JEV 分離、第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2011年5月21日、金沢白鳥路ホテル(石川)

⑩村上学、石川県内の水田近辺で行ったドライアイストラップによる蚊の採集と日本脳炎ウイルス分離の結果(2009-2010)、第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月15日、一橋記念講堂(東京)

⑪村上学、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、2010年12月10日、国立感染症研究所(東京)

⑫村上学、石川県内水田近辺で採取したコガタアカイエカからの日本脳炎ウイルス分離(2009-2010年度)、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日、あわぎんホール(徳島)

⑬村上学、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、2010年5月29日、国立感染症研究所(東京)

⑭村上 学、石川県内の水田近辺で行ったドレイアイストラップによる蚊の採集と日本脳炎ウイルスの分離の結果、第 62 回日本衛生動物学会大会、2010 年 4 月 4 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島）

⑮村上 学、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学術集会、2009 年 10 月 26 日、都市センターホテル（東京）

⑯村上 学、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、2009 年 10 月 24 日、戸山サンライズ（東京）

⑰村上 学、石川県で採集したコガタアカイエカより分離された日本脳炎ウイルスの細胞と実験動物での毒性、第 27 回北陸病害動物研究会、2009 年 6 月 27 日、金沢医科大学（石川）

⑱村上 学、石川県分離 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、2009 年 6 月 20 日、丸駒温泉旅館（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 学 (MURAKAMI MANABU)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：00288309

(2) 研究分担者

竹上 勉 (TAKEGAMI TSUTOMU)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：10113490

(H21→H23 年度)

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：20232275

(H21→H23 年度)