

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510030

研究課題名(和文) 沖縄島の日本脳炎ウイルスの変遷－ウイルス侵入リスクと健康影響評価への試み

研究課題名(英文) Change of Japanese encephalitis virus in Okinawa Island, Japan. -trials for risk assessment of viral invasion and health effectiveness

研究代表者

斉藤 美加 (SAITO, Mika)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90235078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄の日本脳炎ウイルス(JEV)の歴史的変遷を遺伝学的、生物学的に概観した。沖縄島分離株の分子系統解析から、沖縄には古くから大きく3系統、cluster I (1971-1982, 遺伝子型(G)3), II(1986-1992, G3), III(1998-2008, G1)が確認され、約15年ごとに系統の出現と消失が見られた。国内外株との関係から類推される侵入経路は九州を通り南下するルートが強く示唆された。本研究から沖縄では土着と侵入の両機序により感染環を維持していることが明らかになった。cluster IIIのマウス神経侵襲性毒性が明らかに低く、抗原性は株により多様であった。

研究成果の概要(英文)：Japanese encephalitis viruses (JEV) isolated on Okinawa Island were genetically and biologically examined. Okinawan strains are phylogenetically classified into three major clusters: cluster I (1971-1982, genotype (G) 3), II (1986-1992, G3), and III (1998-2008, G1). These appear and disappear around every 15 years. Phylogenetic analysis of Japanese and foreign strains strongly suggested that JEV invaded through Kyushu from north to south. The present study demonstrated that the transmission cycles of JEV were maintained by indigenous and invading viruses. Antigenicity varied with the clusters. The neuroinvasiveness of cluster III in mice was significantly lower than that of the other clusters.

研究分野：ウイルス学

キーワード：沖縄 新興再興感染症 リスク評価 日本脳炎ウイルス 系統樹 進化 病原性 抗原性

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルス(JEV)は沖縄でかつて恐れられた致死率の高い日本脳炎の病原体である。ワクチンは存在するが、特異的治療法はなく、その生態学的特徴から環境の影響を受けやすく、サーベイランスとそれに基づくリスク評価、健康影響評価が大変重要である。

研究代表者らは沖縄島でJEVの遺伝子型3から1への置換と抗原性の変化を初めて報告し(Am J Trop Med. 2007)、外来ウイルスが沖縄へ侵入している事が明らかとなった。また、現行ワクチン株が全て遺伝子型3であり、抗原性の変化と効果に関しての検討が必要と考えられた。Nabeshimaら(2009)はJEVが東南アジアから中国内陸と海岸経由で日本に頻繁に侵入している事を報告しているが、島嶼という地理的特徴を持つ沖縄への侵入ルート、侵入頻度、また、沖縄島における自然界の感染環の維持機構は不明であった。

また、遺伝子型1での病原性が低いと報告されているが、沖縄島でのJEVの病原性、及び抗原性がどのように多様であるかを把握した上で、リスク評価をし、対策を講じる事が重要である。

2. 研究の目的

沖縄島でのJEVの歴史の変遷を遺伝学的、生物学的多様性と変遷から概観する事を目的とする。分離した約130株の日本脳炎ウイルスのenvelope蛋白領域の塩基配列を決定、データベースを作成する。既にGenBankに登録されている同領域の沖縄分離株、時代の異なる国内外株を加え系統樹解析する。これにより国内外との関係性、時代との関係性を解析する。(1)JEV侵入ルート(2)JEV侵入頻度(3)侵入後の遺伝子進化・多様化や均一化を解明する。これらより、生物学的に島嶼における進化と系統淘汰をJEVを通して俯瞰する。また、生物学的特徴である抗原性と病原性の変化、多様性を調べ、今後の外来性JEV侵入リスクの評価、及び健康影響評価へつなげる応用可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)当教室に保管されている日本脳炎ウイルス(JEV)沖縄分離株の分離年月日、由来、材料採取場所のデータと保管ウイルスの整理、データベース作りを行なった。また、既に我々がGenBankに登録した沖縄株、沖縄県環境衛生研究所とその他機関が登録したデータを整理し、塩基配列データはFASTA形式で保存した。

(2)当教室に保管されている1971-2004年の日本脳炎ウイルス株96株の感染細胞C6/36培養上清からRNAを精製し、エンペロー蛋白領域をコードする1500塩基をdirect sequence法で決定した。GenBankに登録されているJEV沖縄株30株、年代の異なる国内外株34株を含め

系統樹解析を行なった。解析には解析ソフトclustal X、BEAST2を用い、NJ法、MCMC法で作成した。

(3)(2)で明らかになった沖縄株の系統ごとの平均非同義置換・同義置換率(dN/dS)を解析ソフトDatamonkeyで算出し、負の選択圧から、アミノ酸置換速度を推定した。

(4)(2)で明らかになった沖縄株の各系統からウイルス株を選択しそれぞれのマウス高度免疫血清(MHIS)を作成した。各系統の抗原性を、MHISとの交差中和、及び既に性質が調べられているJEV単クローン抗体抗原性パネル(故保井好太郎博士から分与)との中和反応を指標として比較した。

(5)(4)で選択した各系統のウイルス株の病原性をマウス神経毒性(ICR、乳のみマウス3日令に異なる感染価のウイルスを脳内接種し、3週間観察しLD₅₀を求める)、マウス神経侵襲性毒性(ICRマウス、♀3週令、4週間観察、LD₅₀)を指標として比較した。

(6)沖縄島でのJEV感染リスク評価の一環で、沖縄島未就学児0-5才164名を対象としたJEV抗体保有状況を調査した。

(7)沖縄島で発症した輸入デング患者から分離したデングウイルスの系統樹解析と血清反応を調べた。

(8)JEVの土着による維持機構解明の森林地区での土着による感染環の維持機構解明へとして紀伊半島シカのJEV抗体保有率を調査した。

4. 研究成果

(1)系統樹解析を行なった沖縄分離株126株の内訳：①1986-92年沖縄南部C村豚舎の蚊分離株90株②1971-82年分離株24株(豚、蚊)③1998-2012年沖縄島全域豚血清分離株12株

(2)系統樹解析

NJ法による系統樹解析で、沖縄島では少なくとも大きく3系統が確認された。即ち年代が古くから

cluster I (genotype3(G3)); 1970's-1980's 前半 cluster II (G3);1980's 後半-1990's 前半、 cluster III (G1);1990's 後半-2000's 後半があり、cluster IIはさらにcluster IIA、IIB、IICに分けられた。

2012年分離株はG1に属するが、cluster IIIと異なる系統に属しており、新しいclusterの出現が強く示唆された。

1970以降、沖縄島の日本脳炎ウイルスは主系統の置換が少なくとも2回起き、約15年毎にその現象が見られた。また、国内外

の株との近縁関係から、沖縄へ JEV が何らかの機序で九州地方から南下する経路で移入される事が強く示唆された。また、沖縄に移入された後、cluster II と III は沖縄独自の系統を形成し、その後、他地域で見られることはない。沖縄では移入と土着の両機序により感染環が維持されている事が明らかとなった。

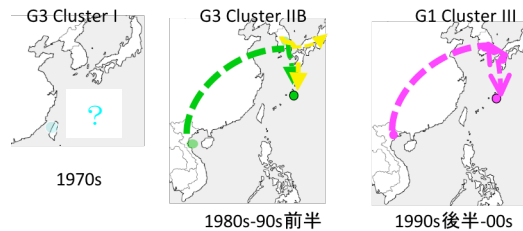


図1 系統樹から類推した侵入経路

(3) 選択圧

平均 dN/dS は cluster I と比較すると cluster III が 3.12 倍 cluster II は 0.84 倍で近年の cluster III の負の選択圧がかかった。cluster IIB、IIC と負の選択圧が低く、1990's 以降、アミノ酸置換速度の上昇が見られた。

(4) 抗原性

JEV 北京株エンベロップ蛋白に対する単クローン抗体の各系統から選択した JEV 株に対する中和抗体価を上段に、Balb/C マウス高度免疫血清の交差中和能をそれぞれ中和抗体価で示した (表 1)

Mab	Genotype 3							Genotype 1					
	Cluster							Cluster I					
	Cluster I IIA		Cluster IIB		Cluster IIC		Cluster III		Cluster III		Cluster III		
	Nakayama	Beijing-1	Nago22	C307	C550	C371	P19	Ok431S	Ok568S				
301	1	740	450	280	280000	43000	3300	15	100	<10			
401	3	<10	320	54	14	18	14	140	135	13			
302	4	115	40	130	<10	130	150	16	125	22			
204	5	<10	140	<10	<10	(enhance)	<10	<10	<10	<10			
201	6	<10	<10	<10	<10	19	<10	<10	40	<10			
402	7	440	190	110	<10	46	700	400	<10	<10			
503	8	100000	2300000	98000	15000	24300	58000	17000	37000	21000			
Balb/C anti													
Nago22 I		1800	3200	170	270	8000	6800	170	1500	2800			
C307 IIA		550	470	86	800	4000	2000	200	660	1000			
C550 IIB		1100	5000	380	500	4400	2000	2700	1100	1700			
C371 IIC		2800	1100	340	1300	3500	8400	1160	1300	1200			
P19		560	210	10	200	1900	3500	500	760	800			
Ok568S III		980	3200	340	3600	5000	23000	110	6000	4000			

表1 JEV 系統間の抗原性比較

上段：中和抗体価の高いものほど濃い色で示した。

下段：ホモの株に対する抗体価よりも高い抗体価を示した場合濃い緑、低い場合水色で示した。

高度免疫血清の交差中和反応から、系統に関係なく沖縄株は、北京グループ、Nakayama グループではない、その他の抗原グループに属した。さらに、単クローン抗体との反応では、系統に共通した特徴はなく、株間での多様性が見られた。

(5) 病原性

各系統から選択した株の神経毒性と神経侵襲性毒性を LD₅₀ を指標として比較した神経毒性は全ての系統が 10⁻³ ffu 以下から 10⁰ ffu の間にあり、系統間で明確な特徴は見られなかった。神経侵襲性毒性では cluster I、II は 10⁰ 以下から 10¹ ffu、cluster III の 2 株は

10⁶ ffu 以上で明らかに低かった。神経侵襲性毒性の低い 2 株を同じく GI で侵襲性が 10¹ ffu の高い病原性の P19 株とアミノ酸配列を比較したところ、エンベロップ領域に 4 カ所の変異が見られた。そのうち一カ所は Cluster III のみに特徴的であり、極性の変化を伴った。

(6) 沖縄島未就学児の JEV 抗体保有状況

ワクチン接種歴有群の中和抗体価は、現行ワクチン株 Beijing-1 に対し 97.0% であるが、cluster III の沖縄株 Ok431S 株に対し 70.0% であり、分布する沖縄株に対し中和をできない小児がある割合存在する。抗体価は Beijing-1 に対しいずれの小児も高かった。1 才未満の接種歴無群の 37.1% が中和抗体価を有しており、その中和反応性から移行抗体の可能性が強く示唆された。1-5 才の接種歴無群の 22.1% が中和抗体を有しており、自然感染による獲得免疫である可能性が示された。

(7) 2014 年 2 月インドネシア渡航歴が有り沖縄で発症した輸入デング患者から分離したウイルスは 2014 年東京代々木公園を中心に流行したデングウイルスと同じデングウイルス 1 型、遺伝子型 1 であった。

(8) 紀伊半島大台ヶ原シカの JEV 抗体保有状況

大台ヶ原は森林地区でありシカの生息域周辺に豚舎と水田がなく、コガタアカイエカの採集報告はない。この地域のニホンジカの 10.3% (87 頭中 9 頭) に日本脳炎ウイルスの中和抗体が確認された。年齢依存性に抗体保有率が上昇しているため、大台ヶ原は JEV の活動は低い、常在している地域である事が強く示唆された。大台ヶ原にはイノシシが生息し、古い調査ではヤマトヤブカの採集報告がある。ヤマトヤブカは JEV 媒介能が示唆されており、大台ヶ原では JEV が森林特有の感染環で維持されている可能性を示した。

(9) 統括

沖縄島では系統の消失と置換が約 15 年ごとに生じており、外来ウイルスがある頻度で移入されている。年をまたぎ同系統が確認され、土着による越冬機序も存在することも明らかとなり、移入と土着の両機序で JEV が維持されている。近年の G1、cluster III の負の選択圧が弱く、アミノ酸置換速度の上昇が認められた。環境変化とおもわれる JEV 活動の顕著な低下と速度の上昇が時期を同じくしており、その関連は興味深い。cluster III が明らかに病原性の低い系統である可能性があり、系統による異なる病原性を示唆した。2012 年の G1 は cluster III と異なっており、新しい系統の出現が、沖

縄での 2011 年の患者発生、2012、2014 の豚の死産発生に關与する可能性もあるため、今後注意が特に必要であり監視の継続が求められる。JEV が進化速度の速い RNA ウイルスであり、近年その上昇がみられており、新たな生態、病原性、抗原性をもつ JEV が出現する可能性がある。このことから、今までの JEV の生態や抗原性、病原性をもとにした蚊の対策、ワクチンに依存する対策を常に再考し、新たなロジックによるリスク評価と対策にむけた取り組みが必要と考える。

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 7 件)

①Saito M., Tamayose, M., et al., 他 5 名, 1 番目, An imported dengue case occurring in Okinawa, Japan in 2014, Japanese Journal of Infectious Diseases, 査読有, 印刷中, 2015

②齋藤美加, 荒木良太, et al., 他 2 名, 1 番目, 紀伊半島大台ヶ原ニホンジカの日本脳炎ウイルス抗体保有状況, 日本野生動物医学会誌, 査読有, 印刷中, 2015

③Saito M, Soukaloun D, 他 3 名, 1 番目, Epidemiological study of Japanese encephalitis virus in Vientiane, Lao PDR, in 1990s. The Scientific World Journal, 査読有, doi: 10.1155/2015/235934, 2014

④Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, 他 6 名 A bio - nanocapsule containing envelope protein domain III of Japanese encephalitis virus protects mice against lethal Japanese encephalitis virus infection. 査読有, Microbiol Immunol, 57:470-77, 2013.

⑤Tafuku S, Miyata T, Tadano M, 他 5 名. Japanese encephalitis virus structural and nonstructural proteins expressed in Escherichia coli induce protective immunity in mice. 査読有, Microbes and Infection, 2012, 14:169-76.

⑥砂川富正, 齋藤美加, 他 3 名, 2 番目, 日本脳炎ウイルス感染のリスク評価指標設定および実施に関する研究—沖縄本島における日本脳炎ウイルス感染リスク評価—沖縄島在住の未就学児童を対象とした, 日本脳炎ウイルス抗体保有状況調査報告, 国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究, 査読無, 平成 23 年度 総括・分担研究報告書

⑦吉野智生、遠藤大二、大沼 学、長 雄一、齋藤美加、桑名 貴、浅川満彦. 北海道におけるアイガモの寄生蠕虫類検査, 査読無, 獣疫学会誌, 15(19), 2011

[学会発表] (計 7 件)

①當銘玲央ら, 中和抗体価の確認とウイル

ス学的検討が行えたデングウイルス感染症の 1 例, 第 309 回日本内科学会九州地方会例会, 2015 年 5 月 30 日, 久留米大学医学部筑水会館, 久留米

②齋藤美加ら, 沖縄島の日本脳炎ウイルスの変遷, 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2015 年 5 月 16-17 日, ホテル京都エミナース, 京都

③齋藤美加ら, 紀伊半島大台ヶ原のニホンジカ *Cervus nippon* の日本脳炎ウイルス抗体保有状況, 第 20 回日本野生動物医学会大会, 2014 年 9 月 16 -19, つくば国際会議場, つくば

④齋藤美加ら, 沖縄島で 1971 年から 2004 年にかけて分離した日本脳炎ウイルスの遺伝的多様性とその変遷, 第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月 3-5 日, 長崎ブリックホール, 長崎

⑤齋藤美加ら, 沖縄島の日本脳炎ウイルスの変遷, 第 53 回日本熱帯医学会大会, 2012 年 9 月 5-6 日, とちぎプラザ, 帯広

⑥齋藤美加、浜端宏英、伊佐真之、神谷元、砂川富正、谷口清州、沖縄島在住未就学児の日本脳炎に関する血清疫学的検討—ワクチン接種歴の有無と中和動態の差異, 第 52 回日本熱帯医学会大会・第 26 回日本国際保健医療学会学術大会, 合同大会, 東京大学本郷キャンパス, 東京

⑦Saito M, Soukaloun D, Phonsavath K, Phommasack B, Insisiengmay S, Makino Y, Geographic distribution of subclusters of Japanese encephalitis virus genotype 1, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan

[図書] (計 2 件)

①D Ruzek ed. InTech Book Open Access Publisher, Flavivirus Encephalitis, 478, Saito M, Ito T, Amano Y, Takara J, Nakata K, Tamanaha S, Osa Y, Yohino T, Onuma M, Kuwana T, Ogura G, Tadano M, Endoh D, Asakawa M, Trials for Risk Assessment of Japanese encephalitis Based on Serologic Survey of Wild Animals, 査読有, Chapter 12, 427-438, 2011

②木村 哲、喜田 宏 編, 改訂人獣共通感染症, 医薬ジャーナル, 2011. 2改訂

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://smc-japan.org/?p=3314>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 美加 (SAITO, Mika)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90235078

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

只野 昌之 (TADANO, Masayuki)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80179712