

# 学位論文要旨

氏名 下田 宙

題 目 : Epidemiological studies on Japanese encephalitis virus

## 論文要旨 :

日本脳炎ウイルス (JEV) はフラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスで、国内では第4類感染症に指定されている。JEVはブタを増幅動物とし、カを媒介し、ヒトやウマに重篤な脳炎症状を引き起こす。世界中で年間約50000名の患者、約10000名の死者が報告されているが、国内ではワクチン接種の効果、養豚場の隔離、媒介蚊の減少などにより近年では年間10名以下に抑えられている。しかし、ブタにおける毎年の調査では西日本を中心に依然として高い抗体陽性率が認められ、いまだにJEVは国内で蔓延していると考えられる。

本研究はJEVの生態を解析することを目的とし、全5章より構成される。

### 第1章 伴侶動物におけるJEVに対する抗体保有状況の調査

毎年JEV抗体調査が実施されている豚は人の生活空間から隔離されているため、人への感染リスクを示しているかは明らかではない。そこで、本章では人と生活空間を共有する伴侶動物においてJEVの抗体保有状況の調査を中和試験にて実施した。

山口県内のイヌやネコの調査では、100頭中17頭(17%)のイヌ、292頭中3頭(3%)のネコがJEV抗体陽性となった。この結果より、イヌの方が陽性率が高く、感受性が高いと考えられたため全国調査をイヌで実施することとした。

全国のイヌ652頭の血清を用いて実施した結果、164頭(25%)のイヌが陽性と判定された。地方別にみると、北海道や東北地方ではそれぞれ0%と9%と、他地域と比較して有意に低い陽性率が示された。一方で四国、九州地方ではそれぞれ61%と47%と、他地域と比較して有意に高い陽性率が示された。また、都市部のイヌや(21%)や室内飼育犬(8%)でも陽性個体が多く認められた。

以上より、西日本を中心として未だにJEVが蔓延していることが本章で明らかとなった。室内飼育犬でも陽性が認められたことから、あまり外出しないお年寄りや乳児にも感染のリスクがあると考えられる。犬における調査では豚では調査することのできない、室内や都市部におけるJEVの感染リスクを評価することが可能であり、調査対象として有用であると考えられる。

### 第2章 イヌにおけるJEVの感染実験

本章ではJEVの蔓延状況の調査におけるイヌの安全性および有用性の評価、またイヌにおける

(別紙様式第 3 号)

JE 発症の有無を調べるためにイヌに対して JEV の感染実験を実施した。

ビーグル(2 か月齢、メス)3 頭に対して Ja0H0566 (遺伝子型 III、 $1 \times 10^7$ PFU)を静脈内および皮下接種後、毎日体重と体温の測定と臨床症状の観察を行った。採取した血液を用いて血液生化学検査、全血球算定、白血球数の算定、中和試験、ウイルス分離・検出を行った。

その結果、実験感染犬では発熱などの臨床症状は認められなかった。血液検査では炎症マーカーである C-反応性蛋白 のみ上昇が認められたが、その他の血液検査項目では異常が認められなかった。中和抗体価は 7 日目には上昇し、21-28 日目で最も高い値となり、実験終了の 70 日目まで持続していた。血液からウイルスは分離・検出されなかった。

今回の結果より、イヌは JEV 感染後、ウイルス血症を起こさず不顕性感染し、中和抗体が長期間持続することが示された。イヌはヒトへの JEV 感染のリスクを調査する際に安全かつ有用な対象であると考えられる。

### 第 3 章 簡便で有用な新たな JEV 抗体診断系の確立

前章までに日本脳炎ウイルスの蔓延状況を調査する上でイヌが有用であることを申請者らは示した。しかし、これまで実施してきた中和試験は手技が煩雑、生のウイルスを使用、多量の血清を使用するなど多くの欠点がある。そこで、本研究では簡便で有用な抗体調査手法とし ELISA 法による新たな診断系の確立を試みた

ワクチン用不活化 JEV 抗原(Beijing01)を抗原として ELISA 法を確立した。実験感染犬の血清を用いて条件検討(血清 500 倍希釈)を行い、カットオフ値 ( $OD > 0.211$ )を設定するために JEV の流行がない北海道のイヌの血清を用いた。九州地方のイヌで調査を実施し、中和抗体価と値を比較したところ、有意な相関性(相関係数:  $0.813$  [ $p < 0.001$ ])が認められた。また、ELISA の感度は 82%、特異性は 98%であった。

確立した ELISA の系を用いて、タイの首都であるバンコクのイヌについて抗体の保有状況の調査を実施した。調査した全 70 頭のうち 30 頭(43%)で JEV 抗体陽性と判定された。

以上のことより、本章では簡便で有用な新たな抗体診断系の確立に成功し、結果は中和試験の結果と相関していた。タイのバンコクで約半数のイヌが JEV 抗体を保有しており、タイでは都市部でも JEV にヒトが感染するリスクが高いということが明らかとなった。本章で確立したイヌにおける JEV 抗体検出系はヒトへの JEV 感染のリスクを調査する上で有用であると考えられた。

### 第 4 章 サルにおける JEV 抗体保有状況の調査

本章では第 3 章で確立した ELISA 系を用いて、ヒトと近縁な霊長類であるニホンザルにおいて抗体の保有状況を調査した。二次抗体には様々な動物の抗体に結合する HRP 標識 Protein A/G を用いた。

カットオフ値 ( $0.444$ )は中和抗体陰性の母親から生まれた 0 歳齢のサル 18 頭から算出した。そして、愛知県の霊長類研究所で飼育されているニホンザル 332 頭を調査した結果、146 頭(44%)で陽性が認められた。研究所で生まれた個体に限定すると、131 頭中 35 頭(27%)で陽性となり、

(別紙様式第 3 号)

年間感染率を算出したところ、13%となった。

以上のことから、本章では多くのニホンザルが JEV に感染していることが明らかとなり、ヒトへの感染リスクが十分存在することが示された。

#### 第 5 章 JEV に対する単クローナル抗体の作製とその性状解析

本章では日本脳炎ウイルスの遺伝子型 1 の株に対する単クローナル抗体を作製し、その性状解析を行った。

JEV/sw/Chiba/88/2002 (遺伝子型 I) をマウスに免疫し、その脾細胞よりハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングには中和試験もしくは間接蛍光抗体法 (IFA) を用いた。スクリーニングの結果、18 個のハイブリドーマで単クローナル抗体の産生が認められた。

ハイブリドーマをマウスに接種することで得られた腹水またはハイブリドーマの培養上清を用いて、単クローナル抗体の性状解析を実施した。IFA により、すべての抗体が日本脳炎ウイルスの構造蛋白である E 蛋白または prM 蛋白を認識していることが明らかとなった。また、18 個中 2 個の抗体が中和活性を有していた。その抗体に対する中和回避変異体を作製し、エピトープの同定を試みたところ、2 個の抗体とも共通の部位 (E 蛋白の 52 番目) に変異が認められた。

様々なフラビウイルスに対する抗体の反応性を IFA にて評価した。その結果、5 個の抗体が調べたすべてのフラビウイルスに対して反応性を示した。一方で 2 個の抗体が日本脳炎ウイルスに、1 個が日本脳炎ウイルス血清群に対して特異的な反応性を示した。

本章で作製に成功したこれらの単クローナル抗体を用いることで、特異的、簡便かつ高感度の疫学調査手法の開発が可能となると考えられる。

本研究ではネコ、イヌ、サルにおける JEV 感染状況を調査することで、日本国内では依然として JEV が蔓延していることが明らかとなった。また、タイにおいては都市部でバンコクで高い陽性率が示されたことから、ヒトへの JEV 感染リスクは高いと考えられる。今回、確立した ELISA 系は簡便で有用であり、HRP 標識 Protein A/G を二次抗体として用いることで様々な野生動物に対して適用可能であると考えられる。さらには、作製した単クローナル抗体は JEV 特異的あるいはフラビウイルス共通の抗原・抗体検出系が開発に有用であると考えられ、今後の発展が期待される。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	下田 宙
審査委員	主 査：山口大学 教授 前田 健
	副 査：鹿児島大学 教授 高瀬公三
	副 査：鹿児島大学 教授 望月雅美
	副 査：動物衛生研究所 上席研究員 山川 睦
	副 査：山口大学 准教授 渡邊理恵
題目	Epidemiological studies on Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルスの疫学的調査
<p>審査結果の要旨：</p> <p>日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、国内では第 4 類感染症に指定されている。JEV は豚を増幅動物とし、蚊が媒介し、人や馬に重篤な脳炎症状を引き起こす。世界中では年間約 50,000 名の患者、約 10,000 名の死者が報告されている。</p> <p>本研究は JEV の生態を解析することを目的とし、全 5 章より構成される。</p> <p>【第 1 章】 伴侶動物における JEV に対する抗体保有状況の調査</p> <p>本章では人への JEV 感染リスクを評価するために、人と生活空間を共有する伴侶動物において JEV の抗体保有状況の調査を中和試験にて実施した。その結果、西日本を中心に依然として JEV が蔓延していることが明らかとなった。室内飼育犬で陽性が認められたため、あまり外出しないお年寄りや乳児にも感染のリスクがあると考えられる。このように犬では室内や都市部における JEV の感染リスクを評価することが可能であることを証明した。</p> <p>【第 2 章】 犬における JEV の感染実験</p> <p>本章では JEV の蔓延状況の調査における犬の安全性および有用性の評価、また犬における JEV 発症の有無を調べるため、犬に対して JEV の感染実験を実施した。その結果より、犬は JEV に不顕性感染し、中和抗体が長期間持続することが示された。犬は人への JEV 感染のリスクを調査する際に安全かつ有用な対象であると考えられた。</p> <p>【第 3 章】 簡便で有用な新たな JEV 抗体診断系の確立</p>	

これまで実施してきた中和試験は手技が煩雑、ウイルスを使用、多量の血清を使用するなど多くの欠点がある。本章では日本脳炎ウイルス精製抗原を用いた新たな ELISA 診断系の確立に成功した。それを用いてタイのバンコクの飼育犬を調査した結果、約半数の犬が JEV 抗体を保有しており、タイでは都市部でも JEV に人が感染するリスクが高いということが明らかとなった。本章で確立した犬における JEV 抗体検出系は人への JEV 感染のリスクを調査する上で有用であると考えられた。

#### 【第 4 章】 猿における JEV 抗体保有状況の調査

本章では第 3 章で確立した ELISA 系を用いて、ヒトと近縁な猿において抗体保有状況を調査した。ここでは二次抗体に ProteinA/G を用いることにより多種類の哺乳動物に应用可能な ELISA 系を作製し、猿に应用した。その結果、多くの猿が JEV に感染していることが明らかとなり、猿における JE の発症のリスク、さらには人への感染リスクが十分存在することが示された。

#### 【第 5 章】 JEV に対する単クローナル抗体の作製とその性状解析

本章では JEV の遺伝子型 I の株に対する 18 種類の単クローナル抗体を作製し、その性状解析を行った。これらの単クローナル抗体を用いることで、特異的、簡便かつ高感度の疫学調査手法の開発が可能となり、その応用事例も示した。

一連の研究において犬、猿における JEV 感染状況を調査することで、日本国内には依然として JEV が蔓延していることが明らかとなった。また、タイにおいては都市部で高い陽性率が示されたことから、人への JEV 感染リスクは高いと考えられた。本研究で確立した ELISA 系は簡便で有用であり、HRP 標識 Protein A/G を二次抗体として用いることで様々な野生動物に対して応用可能であると考えられる。さらには、作製した単クローナル抗体は JEV 特異的あるいはフラビウイルス共通の抗原・抗体検出系の開発に有用であると考えられ、今後の発展が期待される。

これら一連の研究は、近年の日本脳炎ウイルスの蔓延状況を示すものであり、2005 年に国内でワクチン接種が中止された際は、日本脳炎ウイルスに対するワクチン接種の重要性を証明し、ワクチン接種の再開に貢献したことが高く評価された。更に、一連の研究手法は日本脳炎ウイルスのみならずウイルス全般に応用でき、学術的価値は高く、獣医学・医学分野の研究の発展に大きく貢献する事が期待される。以上により、本論文は博士（獣医学）の論文として、妥当なものであると判断された。