

事業区分	経常研究(基盤)	研究期間	平成 25 年度～平成 27 年度	評価区分	事後評価
研究テーマ名 (副題)	長崎県における日本脳炎発症患者由来日本脳炎ウイルスの性状解析 (日本脳炎発症に関わるウイルス側要因の謎を解明する)				
主管の機関・科(研究室)	研究代表者名	環境保健研究センター・保健科 吉川 亮			

### <県総合計画等での位置づけ>

長崎県総合計画	Ⅲ.安心で快適な暮らしの実現 7.安全・安心の確保向上プロジェクト ②危機管理体制の充実・強化
長崎県科学技術振興ビジョン	(1)豊かな生活環境のための科学技術振興
環境保健研究センター運営計画	【重点目標 5】「感染症の究明・拡大防止」を図る ①感染源の解明等に関する研究

### 1 研究の概要(100 文字)

2010、11 年に発生した日本脳炎の患者由来日本脳炎ウイルス(JEV)のウイルス性状を明らかにし、最先端解析技術により既存・現行株と比較解析して JEV の病原性の特性を明らかにし、患者発生予防に寄与する	
研究項目	①患者より分離・検出した株(患者株)と JaGAr01 株など以前から保存されている分離株(既存株)、県内で現在浸淫・蔓延している株(蔓延株)の全ゲノムの解読および比較解析 ②患者株、既存株および蔓延株の感染性 cDNA クローンおよびレプリコンの作製 ③患者株と既存株、蔓延株のウイルス性状(増殖性、ゲノム複製能、タンパク質合成能、抗原性、神経病原性)の比較解析 ④病原性に関する責任遺伝子領域の探索・解析

### 2 研究の必要性

1) 社会的・経済的背景及びニーズ	<p>先行研究から JEV は、本県では、流行地である中国から毎年飛来する株と常在する株が混在して分布し、7、8 月流行期以降活動が低下する他の地域とは異なり、11 月中旬頃まで活発に活動し続けていることを明らかにした。さらに、ブタ以外に野生動物のイノシシが本ウイルスの新たな増幅動物となることを解明し、患者発生を懸念する多くの素地が蓄積されていることを明らかにしてきた。このため患者発生の予防対策として、日本脳炎への注意喚起発令に関する長崎県独自の基準を 2010 年に設け、注意喚起を行ってきた。しかしながら、不幸にも 9 年ぶりに本県では日本脳炎患者が 2010 年 1 名、2011 年 2 名と 2 年連続して発生し、いずれの患者も重篤な後遺症を呈し、本人を含め家族にとって非常に厳しい生活を余儀なくされているなど憂慮される事態に至っている。よって、このような事例が再発しないためにも発症に導いた JEV の詳細な解析研究ならびにこれに基づく一層の患者発生予防対策が必要である。</p>
2) 国、他県、市町、民間での実施の状況または実施の可能性	<p>国内での患者分離株は近年皆無で、さらに臨床経過を正確に把握されている株は非常に貴重である。患者株と現在県内に蔓延している JEV 株を比較して、病原性に関するウイルス要因を明らかにできるのは、現状では当センターだけである。</p>

### 3 効率性(研究項目と内容・方法)

研究項目	研究内容・方法	活動指標	H					単位	
			25	26	27	28	29		
①	患者株・既存株・蔓延株の全ゲノム解析及び比較解析	達成率	目標	50	50				%
			実績	50	30	10			
②	患者株・既存株・蔓延株の感染性 cDNA クローン・レプリコンの作製	達成率	目標	80	20				%
			実績	40	20	10			
③	患者株と既存株・蔓延株のウイルス性状の比較解析	達成率	目標	30	40	30			%
			実績	20	20	20			
④	病原性に関する遺伝子領域の探索・解析(リバーシジェネティクス 1)患者株の感染性 cDNA クローンによるキメラウイルス・キメラレプリコンの構築 2)キメラウイルス・キメラレプリコンを用いたウイルス性状変化の解析による責任遺伝子領域の探索	達成率	目標		50	50			%
			実績		10	10			

1) 参加研究機関等の役割分担

- ①長崎大学熱帯医学研究所：感染動物実験施設の提供および実験協力
- ②大阪大学微生物病研究所：JEV 感染性 cDNA クローン構築および免疫学的解析に関する協力
- ③国立感染症研究所：ウイルス株の分与、JEV 感染性 cDNA クローン構築の協力
- ④食肉衛生検査所、市町等関係機関：豚・イノシシの血液採取協力、保存、送付

2) 予算

研究予算 (千円)	計 (千円)	人件費 (千円)	研究費 (千円)	財源			
				国庫	県債	その他	一財
全体予算	35,174	27,840	7,334				7,334
25 年度	11,816	9,280	2,536				2,536
26 年度	11,833	9,280	2,553				2,553
27 年度	11,525	9,280	2,245				2,245

※ 過去の年度は実績、当該年度は現計予算、次年度以降は案

※ 人件費は職員人件費の見積額

(研究開発の途中で見直した事項)

4 有効性

研究項目	成果指標	目標	実績	H 25	H 26	H 27	H 28	H 29	得られる成果の補足説明等
①	注意喚起発令	3 回	3 回	○	○	○	○	○	年 1 回
②	学会発表	2 回	4 回		○	○	○	○	日本脳炎患者株と蔓延株との遺伝子比較解析、病原性に関する発表を行う
③	論文	1 報	1 報				○		科学的な根拠に基づいた情報発信をすることにより患者発生防止を図る

1) 従来技術・先行技術と比較した新規性、優位性

日本脳炎発症に関わるウイルス側要因の謎を解明するうえで、以下の新規性・優位性を有する。

- ①近年、国内で分離例がない日本脳炎患者材料より直接分離したウイルス株を既に保有
- ②先行研究で得られた 2001 年以降の県内に蔓延、常在する株も保持
- ③先行研究や日本脳炎流行予測調査により本県のブタ・イノシシにおける浸淫状況等のデータを豊富に蓄積
- ④先行研究により今後の流行株を確保する体制(サンプルの入手)の確立
- ⑤JEV の感染性 cDNA クローンおよびレプリコン作製技術を確立

2) 成果の普及

■研究成果の社会・経済への還元シナリオ

- ①先行研究で確立した長崎県独自基準に基づいた早期の日本脳炎に対する注意報発令
- ②長崎県感染症情報センターや関係機関を通して日本脳炎に対する注意喚起やワクチン接種の奨励
  - ・日本脳炎を発症させたウイルスが強毒株であれば、その分布状況を調査し、その地域には重点的に注意喚起、ワクチン接種の奨励
  - ・強毒株に対するワクチンの有効性の確認
  - ・常在・蔓延するウイルス株と同様であれば、より一層の注意喚起、ワクチン接種の奨励
- ③研究者および医師等の専門家に対しては、論文・学会発表を通して研究成果の周知を図る
- ④ 2 年連続して管内で日本脳炎患者が発生し、日本脳炎対策を重点事業とする県央保健所に協力して患者発生地域の調査、臨床医への啓発

■研究成果による社会・経済への波及効果の見込み

- ①注意喚起による県民の日本脳炎の脅威に対する意識向上・ワクチン接種による患者発生防止
- ②経済効果: 患者発生に伴う甚大な社会的損失の抑止
 

日本脳炎を発症した場合、死亡率(20-40%)が高く、2010 年と 2011 年に報告された患者のような麻痺等重篤な後遺症を残す疾病である。特に小児および免疫能の低下した高齢者での死亡率、後遺症が残る確率は高いため、発症した患者の著しい QOL の低下およびその家族の負担の増大や経済的損失は甚大である
- ③保健所を通じ、臨床医への原因不明脳炎の早期検体提出の呼びかけおよび原因究明と、見逃されてきた髄膜炎症例の掘り起こしによる臨床医等への情報提供; 日本脳炎に対する意識向上および早期発見

(研究開発の途中で見直した事項)

	<p>・総合評価 S</p> <p>先行研究で得られた成果や臨床経過を正確に把握されている貴重な患者分離株を最先端の技術を駆使して病原性に関与する責任遺伝子領域の探索・解析を行うことにより、本県における日本脳炎のリスクを正確に把握することが可能になり、研究を推進するなかで迅速な注意喚起やワクチン接種奨励を積極的に行うなど患者発生予防ひいては治療薬開発にむけて十分に寄与する研究である。</p>	<p>・総合評価 A</p> <p>現に県内で患者が発生しており、大陸に近い長崎県ならではのテーマである。また、非常に独自の研究であり、県民の健康維持に資する研究内容であると考えられ、その成果を疾病予防、治療に結びつけられるよう期待する。</p>
	対応	<p>対応</p> <p>遺伝子解析は、関係機関の協力を得ながら先行研究の中でも進めており、引き続き解析を進めていく。</p>
途中	<p>( 年度)</p> <p>評価結果 (総合評価段階: )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性</li> <li>・効率性</li> <li>・有効性</li> <li>・総合評価</li> </ul>	<p>( 年度)</p> <p>評価結果 (総合評価段階: )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性</li> <li>・効率性</li> <li>・有効性</li> <li>・総合評価</li> </ul>
	対応	対応
事後	<p>( 28 年度)</p> <p>評価結果 (総合評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 S</li> </ul> <p>2010年に1名と2011年に2名の重篤な後遺症を呈する患者が発生した後も本県では2013年に20年ぶりの死亡事例が報告されおり、依然として本県における日本脳炎の脅威は減弱していない。</p> <p>また、千葉県では6ヶ月の小児患者が報告され、小児をはじめ、これまで患者報告の多い高齢者に対しては、一層の患者発生予防対策が必要である。</p> <p>このような事例の再発防止に向けた研究は、いまだに患者発生が多い大陸に近いという長崎県の特異性からも必要である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・効率性 B</li> </ul> <p>患者株の全遺伝子解析について一部しか解読できなかったため他機関と連携した効率的な研究が十分にできなかったものの、長崎大学熱帯医学研究所との緊密な連携により感染性cDNAクローンの構築に加えて、新規ウイルス株の登録や中国大陸からのウイルス侵入に関する知見得られ効率的な研究を行うことができた。</p> <p>患者株については次世代シーケンサーによる解</p>	<p>( 28 年度)</p> <p>評価結果 (総合評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 S</li> </ul> <p>一旦発症すると重篤な後遺症を呈し死亡率も高い日本脳炎において、原因ウイルスの特性を明らかにし発生予防に役立てることは、地球温暖化に伴う感染期間の延長や、患者発生が多い大陸に近く、日本脳炎の脅威が衰えない長崎県において必要性の高い研究であった。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・効率性 A</li> </ul> <p>患者株の全遺伝子解析、ウイルス性状の比較解析や病原性に関与する遺伝子領域の探索・解析等は十分に達成されたとは言い難い面もあるが、限られた検体数を用いて一定の計画は達成したと評価する。</p> <p>結果に客観性を持たせるためには、他県での発症に関しても何らかの比較が必要と思われる。</p>

種類	自己評価	研究評価委員会
事前	<p>( 24 年度) 評価結果 (総合評価段階: S )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 S 先行研究から患者発生を懸念する多くの素地が蓄積されていることを明らかにし、その患者発生の予防対策として、日本脳炎への注意報発令に関する長崎県独自の基準を 2010 年に設け、注意喚起を行ってきたが、本県では患者が 2 年連続 3 名の患者が発生し、いずれの患者も重篤な後遺症を呈し、本人を含め家族にとって非常に厳しい生活を余儀なくされているなど憂慮される事態に至っている。よって、このような事例が再発しないためにも発症に導いた JEV の詳細な解析研究ならびにこれに基づく一層の患者発生予防対策が必要である。 <p>また、近年皆無で非常に貴重である臨床経過を正確に把握されている患者分離株と現在県内に蔓延している JEV 株を比較して、病原性に関与するウイルス要因を明らかにできるのは、現状では当センターだけである。</p> <li>・効率性 A 全ゲノム解析、感染性 cDNA クローン・レプリコンの作製、キメラウイルス・キメラレプリコンの構築、これらを用いたウイルス性状の探索など先行研究をベースに行いつつ、これらの技術を生かして長崎大学熱帯医学研究所、大阪大学微生物病研究所および国立感染症研究所の協力を得て効率よく研究を行う。</li> <li>・有効性 S 日本脳炎発症に関わるウイルス側要因の謎を解明するうえで、近年、国内で極めて分離例が少ない日本脳炎患者材料より直接分離した貴重なウイルス株を既に保有し、先行研究等で得られた 2001 年以降の県内の蔓延、常在株の保持、本県のブタ・イノシシにおける浸淫状況等のデータを豊富に蓄積、サンプル入手の確立、JEV 感染性 cDNA クローン・レプリコン作製技術を確立といった新規性・優位性を有する。 <p>研究成果の社会・経済への還元シナリオとして、長崎県独自基準に基づいた早期の日本脳炎に対する注意報発令を生かし、県民に対して長崎県感染症情報センター等を通して日本脳炎に対する早期の注意喚起やワクチン接種の奨励を行い、専門家に対しては、論文・学会発表を通して研究成果の周知を図るとともに、実際に 2 年連続して患者発生があった県央保健所に協力し、患者発生地域の調査、臨床医への啓発を行うことで新たな患者発生の防止に極めて有効である。</p> </li> </li></ul>	<p>(24 年度) 評価結果 (総合評価段階: A )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・必要性 S 県内において 2 年連続で日本脳炎が発生しており、患者は重篤な後遺症を残している。大陸に近いという長崎県の特殊性を踏まえると、必要性の高い研究である。また、その原因であるウイルスの性状および発症メカニズムを解明し、流行の予防に資することは、安全・安心な県民生活の基盤を支える目的からも重要な研究である。</li> <li>・効率性 A 環境保健研究センターは、県内で発症した患者より分離したウイルスの貴重な試料を保有しており、効率的な研究が展開できるものと期待できる。また、研究活動体制等についても既に環境保健研究センターで有する技術が活用でき、方法論も明確である。</li> <p>なお、遺伝子の解析には時間がかかるので、関係機関の連携等、事前準備が大切と思われる。</p> <li>・有効性 A 病原性に関与する遺伝子領域を特定し、発症メカニズムが解明できれば、他の神経性疾患の病態や治療法に寄与できる可能性があり、有効性は高い。また、重篤な疾病を予防する上で重要な知見が得られるものと考えられ、ひいては現在のワクチンの有効性や新たなワクチン開発にもつながることが期待できる。</li> </ul>

<p>析を行ったが、従来法と同様の結果しか得られなかった。</p> <p>・有効性 A      今回、以下の研究成果が得られており、③と④については論文により公表済みであり、①と②についても今年度学会発表を行い、専門家に対して研究成果の普及を図る予定である。</p> <p>①病原性の強いウイルスにより患者発生が起きているわけではなく、例年流行している遺伝子型 1 型の日本脳炎ウイルスで患者発生がおきている。</p> <p>②例年流行している日本脳炎ウイルスは、ワクチン接種で得られる免疫で十分に対応できる。</p> <p>③今後の研究等に広く役立てるように今回の研究で用いた日本脳炎ウイルス 47 株を GenBank(世界的な公共の塩基配列データベース)に登録した。</p> <p>④長崎大学熱帯医学研究所との共同研究により本県では患者発生の多い中国大陸から頻繁にウイルスが侵入している。</p> <p>県民に対しては、今回の成果が示したようにワクチン接種の奨励や迅速な注意喚起について、県医療政策課や保健所を通して継続的に行い、新たな患者発生防止につなげることができる。</p> <p>・総合評価 A      今回の研究により患者発生予防につながる以下の成果が得られた。</p> <p>①先行研究等の成果である迅速な注意喚起や積極的なワクチン接種奨励の必要性があらためて確認された。</p> <p>②本県における日本脳炎のリスクを正確に把握することができた。</p> <p>③上記リスクに対しては、現行のワクチン対策が有用であることも確認できた。</p> <p>これまで再三試みられ達成されなかった国内発生の日本脳炎患者由来ウイルス株の全遺伝子配列決定について本研究で挑戦したが、過去の報告に比べ大幅な改善が得られず、新たな工夫が必要である。</p>	<p>・有効性 A      病原性の強いウイルスにより患者の発生が生じるわけではなく、例年流行している日本脳炎ウイルスは、現行のワクチン接種で得られる免疫で十分に対応できること、ウイルス侵入経路の解明など有用な知見が得られたことから、一定度の有効性は得られたと考える。</p> <p>今後は感染国との人的交流が活発化すると考えられ、対策にどう反映させていくのかも考慮願いたい。</p> <p>・総合評価 A      計画どおりの成果が得られたとは言い難いが、本症の発生予防に繋がる有用な情報を得ることができた点で評価に値する。</p> <p>本県の地理的特性からも日本脳炎ウイルスの性状や病原性の特性を明らかにして、患者の発生予防に寄与するため更なる取組みを期待したい。</p>
<p>対応</p>	<p>対応</p> <p>他県での発症に関しては、2010 年に山口県で発生した患者から検出された JEV 遺伝子は、2010 年の諫早のブタから検出したものと一致しており、今回の成果を支持するものとする。</p> <p>しかしながら、現在、国内では年間 10 例未満の患者数であることから患者情報を含めた JEV に関する知見は決して多くないため、今後は今回の成果を学会等で発表し、JEV の患者発生に関する知見の集積が進むように取り組みたい。</p> <p>感染国との人的交流に伴う対策として、日本脳炎はヒト-ヒト感染はなく、あくまで媒介蚊からの感染による</p>

ものであるため、蚊もしくは感染環をなすブタを調査することが効率のよい方法である。

韓国では媒介蚊の発生状況が指標となっているが、国内では 1960 年代からブタの感染状況が指標となっており、長崎県も長年のデータの蓄積があることから、今後もブタの感染状況を指標に長崎県独自の迅速な注意喚起を継続していきたい。

また、若年層や免疫が低下しているおそれがある中高年層の方々にワクチン接種を行政を通して勧奨することを提言する。

現在、日本脳炎は患者発生数が少ないため医師をはじめ県民の多くは過去の疾患ととらえられている。実際 2011 年、2013 年および 2016 年の症例は当初診断がつかず、当センターで判定した。

日本脳炎に対する意識を向上させるためには確実に患者を診断し、注意喚起を行っていくことが重要である。本研究のなかでも患者診断と注意喚起を継続的に行ってきたが、残念ながら 2016 年には対馬で 4 名もの患者が発生した。

さらなる患者発生防止のためにも、今後は、シンポジウム等を開催し、県民に広くアピールを行ってきたい。