

機関へ配布した。

#### 検査項目及び病院にて実施する検査

無菌性髄膜炎及び急性ウイルス性脳炎の病原体検索として、医療機関で実施、もしくは外注で実施可能な検査は、各医療機関で実施することを推奨した。本調査における検査実施機関では、病原体診断上重要でかつ保険適応とならないウイルス分離や遺伝子増幅法(PCR等)を、にて実施することを原則とした。

- 本調査において検索対象とした病原体
  - 無菌性髄膜炎;日本脳炎ウイルス感染、(ウエストナイルウイルス感染)、エンテロウイルス感染
  - 急性ウイルス性脳炎;日本脳炎ウイルス感染、(ウエストナイルウイルス感染)、単純ヘルペスウイルス感染、エンテロウイルス感染、アデノウイルス感染

下記の項目については、各医療機関で実施することを推奨した。

- 必要に応じた細菌学的検索
- ペア血清による抗体価検査
- 抗単純ヘルペスウイルス IgG 抗体価の髄液:血清比検査(2-3週間程度空けたペアにて実施)

#### 各検査実施機関における検査項目と方法

- 沖縄県衛生環境研究所

##### 材料および方法

##### (1) ウイルス分離

供試材料は感染症発生動向調査(動向調査)に基づき、2005年9月15日から11月4日までに県内の7医療機関において、無菌性髄膜炎及び急性ウイルス性脳炎と臨床診断又は疑われた患者の髄液17検体及び便2検体をウイルス分離に供した。

ウイルス分離は、髄液及び便を定法に従い処理した後、単層培養した HeLa、Hep-2、RD 及び VeroE6 細胞に接種し、1週間隔で3代盲継代培養後、細胞変性効果(CPE)の有無を確認した。分離されたウイルスの型別同定は、国立感染症研究所より分与された中和用プール血清 EP95、デン

カ生研の E~G、L~N プール血清及び CoxA9 単味血清の9種類の抗エンテロウイルス血清を用いて中和試験を行った。

##### (2) ウイルス RNA 抽出

患者の髄液 15 検体の 100  $\mu$ l から QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA の抽出を行った。乾固後の RNA は 30  $\mu$ l の BufferAVE に溶解し、RNA 抽出液として用いた。

##### (3) ウイルス遺伝子増幅法(PCR法)

###### ア エンテロウイルスの検出

RNA 抽出液 5  $\mu$ l を RT-PCR Taq Mix 液 (Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq ; Invitrogen) 45  $\mu$ l に加え、48°C 30 分、94°C 2 分反応させた後 94°C 30 秒、50°C 30 秒、65°C 60 秒の条件を 35 サイクル、65°C 15 分反応させる One-Step RT-PCR 法で行った。

プライマーは 5' NCR から VP2 領域の約 650bp を増幅するプライマーペア (EVP4, OL68-1) を用いた。

###### イ 日本脳炎ウイルスの検出

1stPCR は RNA 抽出液 5  $\mu$ l を RT-PCR Taq Mix 液 (Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq ; Invitrogen) 45  $\mu$ l に加え、53°C 30 分、94°C 2 分反応させた後 94°C 60 秒、53°C 60 秒、72°C 60 秒の条件を 35 サイクル、72°C 15 分反応させる One-Step RT-PCR 法で行った。さらに、Nested PCR は 1stPCR 液 2  $\mu$ l を Nested PCR Taq Mix 液 (Premix Taq ; Takara) 45  $\mu$ l に加え、94°C 2 分反応させた後 94°C 60 秒、53°C 60 秒、72°C 60 秒の条件を 25 サイクル、72°C 15 分反応させた。

1stPCR に使用したプライマーは約 381bp を増幅するプライマーペア (JE8k, JEER) を用い、Nested PCR プライマーでは約 326bp を増幅するプライマーペア (JE8kinner-S, JEERinner-C) を用いた。

###### ウ PCR産物(テンプレート)の確認

テンプレート 8  $\mu$ l とローリングバッファー 2  $\mu$ l を混和し、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド染色液で染色した後、紫外

線照射で写真撮影し、バンドの確認を行った。

- ・ 琉球大学医学部病原生物学分野

#### (1) 患者材料

沖縄県衛生環境研究所にて保存された無菌性髄膜炎及び急性ウイルス性脳炎と診断あるいは疑われた症例の髄液をウイルス分離に供した。

#### (2) 細胞

ヒトスジシマカ由来C6/36細胞株は1mMの非必須アミノ酸、10%牛胎児血清 (FBS) を含むイーグル変法最少必須培地 (E-MEM) を用いて28°Cで培養した。ヒト咽頭癌由来HEp-2細胞株およびハムスター腎由来BHK-21細胞株は10%FBS含E-MEMを用いて37°Cで培養した。

#### (3) JEV分離

試験管培養のC6/36細胞に50から100マイクロリットルの患者材料を接種し、観察を続けながら2週間毎に計3回ブラインドパッセージした。各ブラインドパッセージの後に、培養上清の一部をBHK-21細胞に接種し、抗JEウサギ血清を1次抗体とした間接酵素抗体法にて免疫染色してJEVの検出を行った。

#### (4) その他のウイルスの分離

24 ウェルプレートに培養したHEp-2細胞に患者材料(50 マイクロリットル/ウェル)を接種し、CPEの出現を指標として2週間毎に計3回ブラインドパッセージした。

- ・ 国立感染症研究所感染症情報センター

#### (1) ウイルスDNAの検出

患者の髄液 13 検体から市販キットを用いてDNAを抽出し、ヘルペスウイルス科(単純ヘルペスウイルス1型:HSV-1及び2型:HSV-2、ヒトヘルペスウイルス6型:HHV-6 variant A及びHHV-6 variant B)についてsemi-nested PCRにより特異的増幅を試みた。PCRの反応容量及び温度条件等は「病原体検出マニュアル(国立感染症研究所/地方衛生研究所全国協議会)」に準じた。

#### (2) 抗体の検出

患者の血清 3 検体から市販キットを用いて添付の説明書に従い、単純ヘルペスウイルスに

対するIgG及びIgM抗体の検出を試みた。

#### 情報の取り扱い

- ・ 直接病院との情報(及び検体)交換は管轄保健所が行った。
- ・ 一次情報の保管、管理は全て沖縄県福祉保健部健康増進課が行った。
- ・ 結果のとりまとめ及び解析は、沖縄県福祉保健部健康増進課及び感染研情報センターが行った。

#### 法的根拠と倫理的側面

本調査は、感染症法に基づく感染症発生動向調査の報告の強化と、同法の規定に基づき実施される、感染症対策のために県が主体となり実施する調査である。そのため、文部科学省・厚生労働省発「疫学研究に関する倫理指針」の適応範囲外と位置づけられるが、一時情報(個票)は全て沖縄県福祉保健部健康増進課が管理し、本調査以外の目的では使用しない。また、発表など情報還元においては、個人が特定されないよう十分注意する。

### C. 研究結果

#### 症例報告

本調査に参加した医療機関より17症例が報告された。(表2)報告様式に記載された、報告時診断名は、無菌性髄膜炎(疑い含む)13例、急性ウイルス性脳炎(疑い)2例であった。無菌性髄膜炎(疑い)13例には、流行性耳下腺炎による髄膜炎疑い、熱性痙攣、3か月齢以下の発熱精査3名を含んでいた。7例の報告様式には髄液所見の記載がなかった。

#### 病原体検索結果

- ・ 沖縄県衛生環境研究所

#### (1) ウイルス分離状況

無菌性髄膜炎及び急性ウイルス性脳炎と臨床診断又は疑われた患者の髄液 17 検体中2検体から、HeLa及びVeroE6細胞でウイルスが分離さ

れた。分離された2株のウイルス型別同定を9種類の抗エンテロウイルス血清を用いて中和試験を行った結果、2株ともコクサッキーウイルスB2 (CB2)であった。

ウイルスが分離された2患者は、同一の医療機関で10月9日と10月8日の同時期に、無菌性髄膜炎と臨床診断された1ヵ月と2ヵ月の新生児であった。

患者の便2検体からウイルスは分離されなかった。

#### (2) ウイルス遺伝子検出状況

エンテロウイルス及び日本脳炎ウイルス遺伝子の検出を患者の髄液 15 検体からPCR法で試みたが、検出されなかった。

#### ・ 琉球大学医学部病原生物学分野

患者材料を接種したC6/36では、いずれの患者材料でもCPEは出現せず、培養上清中にもJEVは検出されなかった。

HEp-2 細胞を用いたウイルス分離では、症例#5 および症例#11 の髄液を接種した細胞でCPEが出現した。両患者材料で認められたCPEはポリオウイルスワクチン株で見られる典型的なパターンであった。CPEが現れなかった検体について、合計3回のブラインドパッセージを行ったところ、症例#1の髄液から細胞融合パターンのCPEが出現した。なお、分離されたウイルスについては同定を行っていない。

#### ・ 国立感染症研究所感染症情報センター

#### (1) ウイルス遺伝子検出状況

ヘルペスウイルス科 3 種類(HSV-1、HSV-2、HHV-6)について nested PCR を用いて遺伝子の検出を試みたが、13 検体すべてで特異的な増幅は認められなかった。また、PCR産物を用いたサザンハイブリダイゼーションについては検討中である。

#### (2) 抗体検出状況

測定した3検体の血清はすべて、HSV IgG 抗体は陽性であったが、HSV IgM 抗体は陰性であった。

#### D. 考察

本研究では、感染症発生動向調査強化のため、新たな関係機関:医療機関、公衆衛生行政、検査研究機関のネットワークが構築された。日本脳炎ウイルス感染症は、医療機関と商業衛生検査機関だけで、症例を高い精度で診断することは容易ではないと思われ、ラボと密接に繋がった今回のネットワークは極めて重要であると考えられる。

報告のあった17例では日本脳炎ウイルス感染症はいなかった。2005年の沖縄では、ブタの抗日本脳炎ウイルス抗体陽性率の上昇が例年より遅く、ブタにおける流行が早く終わったためヒトの感染機会が少なかったことが影響したのではないかと考えられた。さらに、本調査の開始が9月中旬からと遅かったうえ期間も約1か月半と短く、協力医療機関への周知期間も短かったため、発見されなかった症例がいた可能性も考えられる。

本調査は、感染症法に基づく急性脳炎、無菌性髄膜炎の強化サーベイランスと位置づけているが、報告様式記載欄の未記入項目が少なく、さらに追加報告が殆ど得られなかった事は、今後改善が必要と考える。保健所を通じた医療機関への、病原体検索結果の還元や、報告状況の還元も適切に行われてはならず、医療機関と保健所、県庁、検査協力機関との双方向のコミュニケーション強化が必要と考えられた。

さらに、臨床上流行性耳下腺炎ウイルスによる無菌性髄膜炎と診断された症例に関して、今回の三施設による病原体検索が全て行われていた事など、検査対象となる症例の再検討、効果的、効率的な報告制度の検討が必要と考えられた。

その他、2例のコクサッキーB2による無菌性髄膜炎が確認された。未同定のウイルスも分離されており無菌性髄膜炎の病原体検索の点では有効であったと考える。

沖縄県環境衛生研究所で行ったウイルス分離で、症例#5 および症例#11 からコクサッキーウイルス B2 が分離された。琉球大学が実施したウイルス分離でも、同じ検体を接種したHEp-2細胞にポリオウイルスのワクチン株で見られる典型的なCPEが出現したことから、沖縄県環境衛生研究

所で分離したのと同様のウイルスが分離されたと示唆される。症例#1 の髄液を接種した HEp-2 細胞は、接種後直ぐに CPE を現さなかったが、3 回のブラインドパッセージの末に CPE が現すようになった。このことから、今後のサーベイランスでも、材料を接種した後の観察期間を 2 週間以上として、最低 3 回のブラインドパッセージを行う必要があると思われる。また、この時の CPE は融合タイプで他の分離ウイルスによるパターンと異なること、当該症例がムンプスウイルスによる無菌性髄膜炎と臨床診断されていることなどから、エンテロウイルス以外のウイルスが分離された可能性があるため、分離されたウイルスの同定を行う予定である。

単純ヘルペスウイルス(HSV-1,2)の検討に関しては、3 血清(症例番号 1;2 血清、症例番号 10;1 血清)の HSVIgG 抗体は陽性であったが、HSVIgM 抗体や nested-PCR の結果は陰性であったことから、これらのウイルスが原因である可能性は低いと考えられる。また、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)に関しては、0-1 歳児の急性脳炎では、HHV-6 脳炎の割合が高いことが知られている。今回の検討では、髄液検体の得られた全症例で nested PCR 陰性であったことから、HHV-6 の関与も否定的であると考えられる。

現時点において、2006 年度の組織培養による日本脳炎ワクチンの導入や、定期予防接種の再勧奨に関しては不明である。本研究の強化サーベイランスは引き続き必要性が高いと考える。また、本研究で構築した新たなネットワークは、日本脳炎ウイルス感染症の把握以外においても、地域の感染症対策推進や感染症危機管理においても有益であり、積極的な強化、活用が望ましいと考える。

#### [制約]

- ・調査期間及び周知時間が短かった。
- ・基幹病院にて実施するため、全県の症例を完全に把握するものではない
- ・検索する病原体に制限があった。

#### E. 結論

2005 年の沖縄県における日本脳炎ウイルス感染症の発生状況、ウイルス性脳炎、無菌性髄膜炎の病原体把握目的で、全県的な無菌性髄膜炎・急性脳炎の強化サーベイランスを構築し、積極的な病原体検索を実施した。日本脳炎ウイルス感染は確認できなかったが、2 例のコクサッキーウイルスによる無菌性髄膜炎が把握できた。今後も、同サーベイランスの強化、改善を行い、積極的な日本脳炎ウイルス感染の把握が必要である。

#### 参考文献:

#### F. 謝辞

本研究に全面的なご協力を頂いた、下記の医療機関及び沖縄県保健所に深謝します。

- ・ 沖縄県立北部病院
- ・ 沖縄県立中部病院
- ・ 沖縄県立那覇病院
- ・ 沖縄県立南部病院
- ・ 中頭病院
- ・ 沖縄県立宮古病院
- ・ 沖縄県立八重山病院
- ・ 沖縄県北部保健所
- ・ 沖縄県中部保健所
- ・ 沖縄県中央保健所
- ・ 沖縄県南部保健所
- ・ 沖縄県宮古保健所
- ・ 沖縄県八重山保健所

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1：症例情報・検査情報と臨床検体搬送

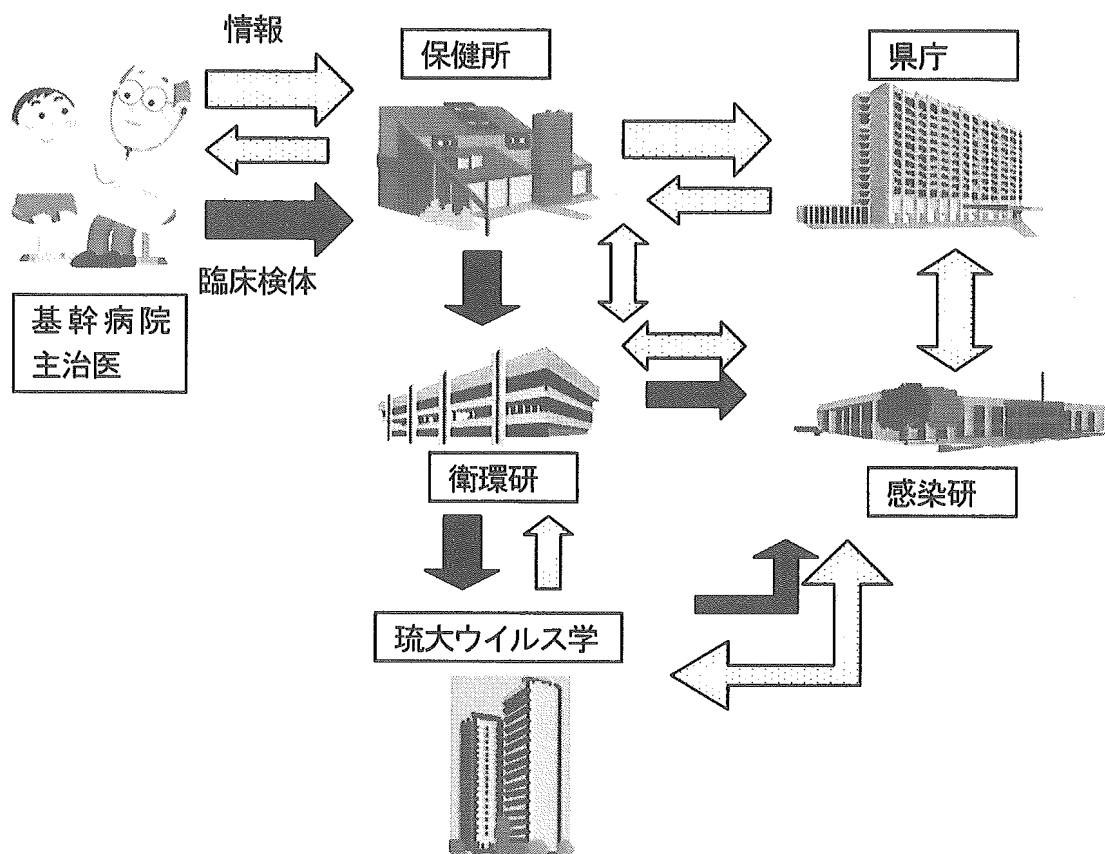


図2 報告症例一覧

症例 No.	報告診断	年齢	性別	診断	髄液の細胞上昇	症状	痙攣・意識障害	検査結果	病院施行検査	治療	転帰
1	髄膜炎	4y	男	Mumps 髄膜炎	あり(429)	熱・頭痛・嘔吐・耳下腺腫脹	なし	HEp2: CPE+		補液、解熱剤	回復
2	髄膜炎	0M	男	ウイルス感染症	なし	熱・不機嫌	なし		WBC6.4k、CRP4.98	抗菌薬 (ABPC+CTX)	回復
3	髄膜炎	40y	男	無菌性髄膜炎	あり(22)	熱・頸部硬直	なし		頭部MRI: np、HSV_IgM0.36、CMV_IgM<10、EBV VCM-IgM<10、C.pn-IgA0.3、	ABPC、GM、CTX、ACV	治療中
4	熱性痙攣、髄膜炎疑い	2y	男	無菌性髄膜炎?、細菌感染?	あり(1900) 単核優位		なし		WBC18.6k/CRP0.04		
5	髄膜炎、敗血症	2M	男	ウイルス性髄膜炎	あり(29)	熱、不機嫌	なし	CoxB2			不明
6	敗血症	1M	男	敗血症?	なし	鼻水・咳、熱	なし			CEZ、GM	
7	髄膜炎	1M	女	無菌性髄膜炎	あり(270)	熱	なし		WBC14.2k	CTM、ABPC	
8	複雑性熱性痙攣	2y	男	複雑性熱性痙攣、インフルエンザ	記載無し	熱	痙攣		インフルエンザ迅速診断陽性	シンメトリル	回復
9	髄膜炎疑い	2M	男	ウイルス感染?	記載無し	熱	なし				
10	髄膜炎、敗血症	2M	男	無菌性髄膜炎?、細菌感染?	あり(13)	熱	なし		WBC15k、	CTX、ABPC	不明
11	髄膜炎	0M	男	ウイルス性髄膜炎	記載無し		なし	CoxB2			
12	頭痛、髄膜炎疑い	5y	男	ウイルス感染症?	記載無し	頭痛、やや傾眠?	なし				
13	髄膜炎、脳炎	10y	男	ウイルス感染症?	なし	熱、頭痛、嘔吐	なし				
14	熱性痙攣	1y	男	細菌感染?	記載無し	熱、上気道炎	なし		WBC13.4k、CRP0.09		
15	髄膜炎、菌血症	3M	女	無菌性髄膜炎?、細菌感染疑い	あり(17)	熱	なし		WBC20.9k、CRP3.56	ABPC、CTX	
16	急性ウイルス性脳炎	54y	女	細菌感染疑い、(統合失調症)	記載無し	ふらつき、低Na血症	あり		WBC21.8k、CRP14.11		
17	髄膜炎	44y	男		記載無し	熱	なし		WBC9.1k、CRP8.09		

(情報は報告様式内容に基づく)

図 3: 国立感染症研究所感染症情報センターで実施したヘルペス科ウイルス検査結果一覧(暫定結果、平成 18 年 3 月 16 日現在)

ヘルペス科ウイルス(HSV-1,2,HHV-6)検査結果一覧

症例 番号	検体	抗HSV-EIA*				PCR		Southern hybridization			
		IgG index	判定	IgM index	判定	HSV	HHV-6	HSV-1	HSV-2	HHV-6 A	HHV-6 B
1	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
	血清	5.04	陽性	0.56	陰性	—	—	—	—	—	—
	血清	4.89	陽性	0.56	陰性	—	—	—	—	—	—
2	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
3	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
4	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
5	髄液	—	—	—	—	陰性	—			—	—
6	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
7	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
8	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
9	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
10	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
	血清	2.22	陽性	0.43	陰性	—	—	—	—	—	—
11	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
12	髄液	—	—	—	—	陰性	陰性				
13	髄液	—	—	—	—	陰性	—			—	—

※ IgG index :  $\geq 1.0$  陽性 /  $< 0.5$  陰性 /  $\geq 0.5, < 1.0$  保留または再測定  
 IgM index :  $> 1.2$  陽性 /  $< 0.8$  陰性 /  $\geq 0.8, \leq 1.2$  保留または再測定

## 資料1:感染症法における報告基準

### 日本脳炎

#### 《定義》

フラビウイルス科に属す日本脳炎ウイルスの感染による急性脳炎である。ブタが増幅動物となり、蚊が媒介する。

#### 《臨床的特徴》

感染後1～2週間の潜伏期を経て、急激な発熱と頭痛を主訴として発症する。その他、初発症状として全身倦怠感、食欲不振、嘔気、嘔吐、腹痛も存在する。その後、症状は悪化し、項部硬直、羞明、意識障害、興奮性の上昇、仮面様顔貌、筋硬直、頭部神経麻痺、眼振、四肢振戦、不随意運動、運動失調、病的反射が出現する。知覚障害はまれである。発熱は発症4～5日に最も高くなり、発症後1週間程度で死亡する例が多い。熱はその後次第に低下する。致命率は約25%、患者の50%は後遺症を残して回復、25%はほぼ完全に回復する。

#### 《届出基準》

- 診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたもの
  - ・病原体の検出  
例、血清、髄液からの日本脳炎ウイルスの分離など
  - ・病原体の遺伝子の検出  
例、PCR 法など
  - ・病原体に対する抗体の検出  
例、血清または髄液中の日本脳炎ウイルス特異的IgM 抗体の存在  
血清抗体価の上昇(IgG 抗体価がペア血清で4倍以上の上昇)など

### 急性脳炎(ウエストナイル脳炎及び日本脳炎を除く)

#### 《定義》

ウイルスなど種々の病原体の感染による脳実質の感染症である。炎症所見が明らかではないが同様の症状を呈する脳症もここには含まれる。

#### 《臨床的特徴》

多くは何らかの先行感染を伴い、高熱に続き意識障害やけいれんが突然出現し、持続する。髄液細胞数が増加しているものを急性脳炎、正常であるものを急性脳症と診断することが多いが、その臨床症状に差はない。

#### 《届出基準》

- 意識障害を伴って24時間以上入院した者、あるいは24時間未満に死亡した者で、かつ、以下の一つまたはそれ以上の症状を有するもの
  - ・38度以上の発熱
  - ・何らかの中樞神経症状



・先行感染症状

- 熱性けいれん、代謝疾患、脳血管性疾患、脳腫瘍、外傷など、明らかに感染性とは異なるものは除外する。
- 可能な限り病原体診断を行い、明らかになったものは病原体名、検体の種類及び検査方法を記載する。なお、上記基準に該当する脳症も含める。

《備考》

- ・ 他の届出基準に該当する感染症(インフルエンザ、手足口病、流行性耳下腺炎等)による急性の脳炎・脳症についても、急性脳炎としての届出が必要となる。その際には、二重の届出となる(脳症を発症したインフルエンザについて、定点医療機関においては、インフルエンザ及び急性脳炎の届出が必要となり、定点医療機関以外では急性脳炎のみが届出の対象となる等)。
- ・ ウエストナイル脳炎又は日本脳炎の診断がついている場合には、急性脳炎としての届出は必要ない。ただし、急性脳炎の届出後に、ウエストナイル脳炎又は日本脳炎の診断がついた場合には、ウエストナイル脳炎又は日本脳炎としての届出が必要となり、結果として二重の届出となる。

ウエストナイル熱(ウエストナイル脳炎含む)

《定義》

フラビウイルス科に属するウエストナイルウイルスによる感染症で、蚊によって媒介される。

《臨床的特徴》

2～14日の潜伏期の後に高熱で発症する。発熱は通常3～6日間持続する。同時に頭痛、背部の痛み、筋肉痛、食欲不振などの症状を有する。約半数で発しんが胸部、背、上肢に認められる。リンパ節腫張通常認められる。症状は通常1週間以内で回復するが、その後倦怠感が残ることも多い。特に高齢者においては、上記症状とともにさらに重篤な症状として、激しい頭痛、方向感覚の欠如、麻痺、意識障害、痙攣等の症状が出現し脳炎、髄膜脳炎を発症することがある。特に米国では重篤な例で筋力低下が約半数に認められている。

《届出基準》

- 診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたもの
  - ・病原体の検出  
例、ウエストナイルウイルスの血液や脳脊髄液からの分離
  - ・病原体の遺伝子の検出  
例、PCR法等によるウエストナイルウイルス遺伝子の血液や脳脊髄液中での検出
  - ・抗体の検出  
例、ウエストナイルウイルス特異的IgMの血液や脳脊髄液中での検出  
ウエストナイルウイルス特異的IgGの検出とペア血清における4倍以上の上昇

## 無菌性髄膜炎

### 《定義》

種々のウイルス感染による髄膜の感染症である。

### 《臨床的特徴》

発熱、頭痛、嘔吐を主な特徴とするが、新生児や乳児などでは臨床症状が明らかではないことが多い。項部硬直、Kernig 徴候、Brudzinski 徴候などの髄膜刺激症状が見られるが同じく新生児や乳児などではこれらが明らかではないことも多い。

### 《届出基準》

- 診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の2つの基準を全て満たすもの
  - 1.以下の臨床症状を呈するもの
    - ・発熱、頭痛、嘔吐を主な特徴とする
    - ・項部硬直、Kernig 徴候、Brudzinski 徴候などの髄膜刺激症状  
(いずれも新生児や乳児などでは臨床症状が明らかではないことが多い)
  - 2.以下の検査所見を有すること
    - ・髄液細胞数の増加(単核球優位であることが多い)かつ、髄液蛋白量、糖量が正常であるもの
- 上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断によって当該疾患と診断されたもの

### 《備考》

原因となる病原体が病原体診断や血清学的診断によって判明した場合には、病原体の名称についても併せて報告すること

資料 2: 症例届け出様式

通し番号
(県庁記入欄)

**無菌性髄膜炎・急性ウイルス性脳炎**(いずれか一方に○) **症例報告様式**  
**第一報・第二報・第( )報**(いずれかひとつに○)

医療機関名	主治医名	記載者名	記入日
症例情報		症例イニシャル	病院の症例ID
生年月日	性別	居住市町村	

**曝露要因・既往歴等**

予防接種歴(接種済みは○、未接種は×をつける。母子手帳等を参照すること)	日本脳炎( )回(最終の接種日: 年 月)		
麻しん(接種日: 年 月)、風しん(接種日: 年 月)、流行性耳下腺炎(接種日: 年 月)			
発症前1か月の海外渡航歴	あり(渡航先: 、年 月)・なし	職業	
推定される感染源や類似症例との接触歴	あり(詳細: )・なし		
基礎疾患	あり( )・なし	発症前1か月服用薬	あり( )・なし

**症状・経過**

発症日	年 月 日	臨床診断・鑑別診断名			
現病歴	初診時バイタル				
初診時症状	発熱 あり(最高 °C)・なし	痙攣 あり(全身性、局所型;持続時間: 分)・なし	意識レベル	JCS( )	GCS( )
その他症状と経過					
治療	*抗ウイルス剤については必ず記載のこと				
画像所見 脳波所見					
転帰	回復・後遺症( )・死亡				

**検査情報**

	月日	血液血清													尿		髄液			
		WBC(分画)	Hct	Plt	CRP	アンモニア	GOT	GPT	CPK	血糖	総蛋白(Alb)	BUN	Cre	PT	RBC	蛋白	細胞(多:単)	糖	蛋白	
初診時	/																			
入院時	/																			
経過時	/																			
髄液血液同時採取	/																			

病院で実施もしくは外注した病原体検査結果(ヘルペス抗体価の髄液/血清比、他ウイルス抗体価など)

--

\*スペースが足りない場合は別紙を添付のこと、退院時サマリー等の添付も可

### 資料 3: 沖縄県におけるウイルス性脳炎・髄膜炎強化サーベイランス検体採取及び搬送ガイドライン

無菌性髄膜炎や急性ウイルス性脳炎の病原体診断を正確に行うためには、病原体の検出(ウイルス分離、遺伝子増幅法によるウイルス遺伝子の検出)が特に重要であるが、そのカギとなるのは、良い臨床検体の確保である。特に髄液中は、そのウイルス量が非常に少ない上、失活・変成しやすく、温度管理がポイントとなる。具体的には、検体採取後すぐに冷蔵すること、完全な低温(冷蔵)管理下で検体を搬送すること、検体採取から 48 時間以内に検体を分注すること、分注した検体は-80 度で一気に冷凍すること(-20℃では冷凍しない)、凍結融解は最小限とすること、などである。

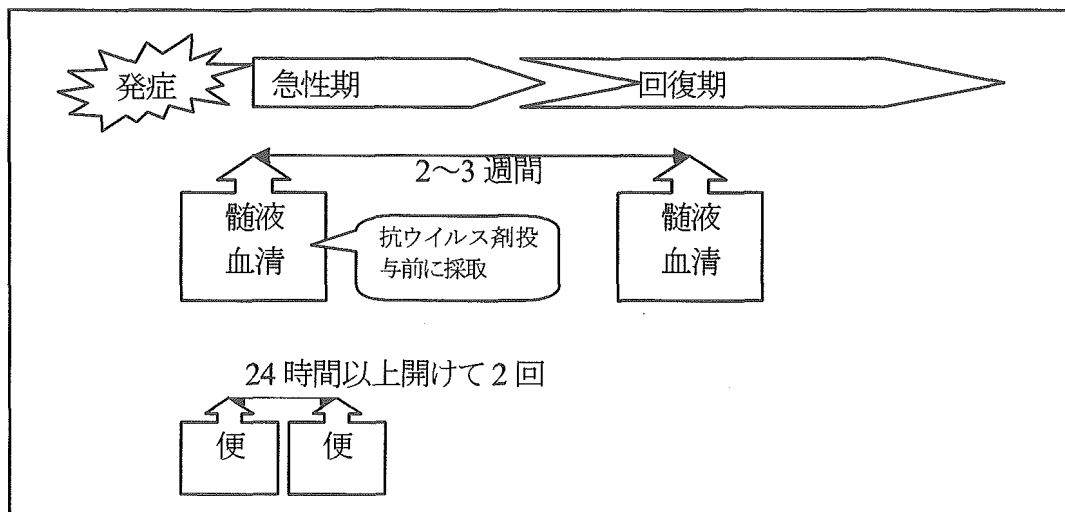
今回、無菌性髄膜炎、急性ウイルス性脳炎の診断精度を少しでも高め、患者診療や公衆衛生向上に役立てるために、本ガイドラインを作成した。医療機関、保健所、県衛環研においては、本ガイドラインを参照に、臨床検体取り扱いには十分注意して頂きたい。

#### 本ガイドラインの対象となる検体

「沖縄県におけるウイルス性脳炎・髄膜炎強化サーベイランス」において、協力検査実験機関(沖縄県衛生環境研究所(以下、県衛環研)、琉球大学医学部感染分子生物学講座病原生物学分野(旧ウイルス学講座、以下、琉大ウイルス学)、国立感染症研究所感染症情報センター(以下、感染研情報センター))で検査を実施する臨床検体、ペア髄液、ペア血清、便検体がこれに当たる。

尚、保険診療で実施可能な検査(単純ヘルペス IgG 抗体価の髄液/血清比、血清ウイルス抗体価(ペア IgG、IgM)など)は、可能な限り医療機関で実施すること。

#### 推奨される検体採取スケジュール



急性期と回復期(急性期採取日から 2-3 週間後)に髄液と血清を採取する。急性期検体は可能な限り抗ウイルス剤投与前に採取する。また、便は急性期に 2 回、24 時間以上間隔を開けて採取する。

#### 検体採取時の注意点(医療機関向け)

下記の検体のうち、髄液は、特に注意深い温度管理とより迅速な搬送が必要となる。採取後直ちに冷却、冷蔵、保健所を経由し直ちに搬送し、採取から 48 時間以内に県衛環研で分注、-80℃で急速凍結する必要がある。他の検体と同時に搬送できれば合理的であるが、必ずしも同時搬送にこだわらず、適切な温度管理の下迅速な搬送が重要である。

### 1. 髄液

- ・採取量: 3ml 以上採取が望ましい。
- ・採取直後の検体は直ちに冷蔵する(採取直後のスピッツを氷中で冷却するのが望ましい)
- ・通常の冷凍庫やドライアイスなどで冷凍しない
- ・冷蔵庫等で保管し、直ちに最寄りの保健所へ連絡する。

### 2. 血清

- ・採取量: 3~5ml 以上採取が望ましい。
- ・髄液採取日と同日に採血する。
- ・採取直後の検体は、速やかに冷蔵する。
- ・通常の冷凍庫やドライアイスなどで冷凍しない
- ・冷蔵庫等で保管し、直ちに最寄りの保健所へ連絡する。

### 3. 便

- ・保健所から供与の容器にて採取する。
- ・採取直後の検体は、速やかに冷蔵する。
- ・通常の冷凍庫やドライアイスなどで冷凍しない
- ・冷蔵庫等で保管し、直ちに最寄りの保健所へ連絡する。

### 検体の取り扱いと搬送に関して(保健所向け)

搬送において重要な点が、温度管理と迅速性である。全ての検体について、患者からの採取から 48 時間以内に県衛環研に届ける事が可能な場合には、検体採取後直ちに冷蔵庫に保存し、4℃(保冷剤入り)で輸送する。48 時間以上輸送することが不可能な場合は、検体採取後(血清、髄液は 3 本以上に分注の上)直ちに施設内で-70℃以下の冷凍庫に保存し、冷凍(ドライアイス)にて輸送する。ドライアイスは密閉した容器に入れられないこと。梱包の方法は県衛環研に照会する。

- ・髄液や血清を採取時刻から 48 時間以内に衛環研に届けることができない場合は、保健所にて 3 本以上のクライオチューブに分注(できれば各 1ml 以上)し、-80℃で急速冷凍すること。一旦-80℃で冷凍後の搬送は、ドライアイスを用いた冷凍搬送を行うこと。
- ・便検体は分注の必要はない。

### 県衛環研での検体の取り扱い

髄液、血清を分注、-80℃で凍結した上で、琉球大学医学部旧ウイルス学講座只野助教授へ連絡し、髄液と血清を各一本分与する。また、髄液、血清各一本ずつをドライアイスとともに、国立感染症研究所感染症情報センター第三室多屋馨子室長宛に着払いで送付する。

### 検体のラベル確認

検体の取り違えが行わないように、検体搬送の各段階において、ラベルの確認を行うこと。ラベルには、病院名、患者名(患者 ID)、採取日、検体名が書かれていること。

厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)

分担研究報告書

2005年に国内で捕集されたコガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出

分担研究者 小林 睦生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長)  
協力研究者 星野 啓太 (同・昆虫医科学部 流動研究員)  
伊澤 晴彦 (同・昆虫医科学部 研究員)  
佐々木年則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)  
比嘉 由紀子 (同・昆虫医科学部 流動研究員)  
津田 良夫 (同・昆虫医科学部 室長)  
澤邊 京子 (同・昆虫医科学部 室長)

**研究要旨:** 日本脳炎(JE)ウイルスの活動は国内において依然として活発であるにも関わらず、ワクチン接種の勧奨の中止に関する議論がなされている。本研究では、国内の蚊集団におけるJEウイルスの感染状況を把握するために、2005年4県、6地点でコガタアカイエカを捕集し、蚊からのJEウイルス遺伝子の検出とウイルス分離を行った。

2005年8~9月に長崎、高知、富山県で捕集されたコガタアカイエカは、最高20個体までを1プールとして蚊ホモジネートを作成しウイルス検出に用いた。RT-PCRの結果、7~10%の蚊プールがJEウイルス遺伝子陽性であった。同時にC6/36細胞に接種し3代盲継代した後、同様にウイルス遺伝子を検出したところ、陽性蚊プール率は53~95%と上昇し、JEウイルスが高率に分離された。次いでenvelope遺伝子および3'非翻訳領域(3'UTR)の全塩基配列を解析し、上記3県から分離されたウイルス株はすべてgenotype Iであることを確認した。以上の結果から、養豚場、牛舎などの周辺で捕集されたコガタアカイエカはJEウイルスを高率に保有していることが示唆された。

2005年、富山、高知、長崎の3県では、6月下旬から8月にかけて豚の赤血球凝集抑制(HI)法および2-メルカプトエタノール(2-ME)感受性抗体(IgM抗体)陽性率が上昇し、ウイルス陽性蚊も検出された。一方、秋田県では9月下旬に豚の抗体価が上昇したが、8月に捕集されたコガタアカイエカからはウイルスは検出されなかった。このように、ウイルス血症を示す家畜の周辺に生息するコガタアカイエカが、ある時期ウイルスを保有することは明らかであり、地域や時期によってはJEウイルスがコガタアカイエカから人へ媒介される可能性があると言える。わが国におけるJEウイルスの活動状況を考慮しても、日本脳炎に対するワクチン接種の重要性は明らかであり、接種事業は継続して行われるべきであると結論された。

## A. 研究目的

近年、わが国において日本脳炎 (JE) として報告される患者数は 10 名以下を推移しているが、毎年患者は発生している。また、急速な遺伝子検出技術の向上を背景に、原因不明の脳炎や無菌性髄膜炎、あるいは意識障害などの患者の中に、JE ウイルスが関与している症例が少なからずあることが明らかになってきた (桑山ら, 2005)。さらに、豚における JE ウイルス抗体価は西日本を中心に毎年ほぼ同時期に上昇し、蚊からもウイルスが分離されている。これらのことは、JE ウイルスの活動は国内において依然として活発であり、都市部の蚊も含めた野外捕集蚊からのウイルス保有状況調査が継続して行われる重要性を示唆している。そこで、蚊集団における JE ウイルスの感染状況を把握するために、2005 年国内で捕集したコガタアカイエカからの JE ウイルスの分離を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 蚊の捕集

コガタアカイエカは、捕虫網、CDC 型背負い式電動吸引機、吸虫管、CDC 型ドライアストラップを用いて捕集した。血液を有する蚊は少なくとも 1 週間ケージ内で飼育し血液を消化、あるいは産卵させた後に最高 20 個体を 1 プールとし、蚊ホモジネートを作成した。2005 年、国内 4 県で行った蚊の捕集日および捕集地 (ウイルス検出と分離に用いた個体数およびプール数) は以下の通りである (図 1)。

- 1) 8 月 10 日、秋田県大仙市 (4 個体 1 プール)、秋田市畜舎 (21 個体 2 プール)
- 2) 8 月 8～10 日、長崎県諫早市畜舎 (1,200 個体 60 プール)
- 3) 8 月 16～17 日、高知県安芸市内 (172 個体 9

プール)、幡多郡大月町豚舎 (596 個体 30 プール)

- 4) 9 月 7～21 日、富山県中新川郡上市町牛舎 (290 個体 15 プール)

### 2. 細胞培養およびウイルス分離

蚊プールは MEM 培養液中で細胞破砕機 MM300 (QIAGEN) を用いて破砕し、軽く遠心回収した後、培養上清を C6/36、あるいは Vero (Vero9013 株) および BHK (BHK21 株) 細胞を用いて 3 代盲継代を行った。細胞変性効果 (CPE) は適宜観察し、最終培地上清からウイルス RNA を抽出し、RT-PCR でウイルス遺伝子の検出を行った。

### 3. ウイルスゲノムの検出および解析

ウイルス RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、NS5 領域の 2 箇所を標的に RT-PCR を行った (プライマーセット: FU1F-CFD2R および FU2f-CFD3R の 2 セット、Kuno ら, 1998 から引用、配列は省略)。その後同領域の nested-PCR (プライマー配列は省略) を行い、得られた PCR 産物は遺伝子解析により JE ウイルスであることを確認した。RT-PCR は、Takara RNA PCR Kit (AMV) により、53°C 30 分、92°C 2 分、(92°C 1 分 → 53°C 1 分 → 72°C × 1 分を 40 回繰り返した)、72°C 10 分の条件で行った。

C6/36 細胞接種により得られた分離株からも同様にウイルス RNA を抽出し RT-PCR を行った。次いで、prM、envelope、NS5 領域および 3' 非翻訳領域 (3' UTR) の遺伝子解析を行い、各遺伝子の全塩基配列を得た。PCR 産物からの遺伝子解析は、PE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用い、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) および GENETYX-WIN ver.6 により構造解析を行った。

系統樹作成にはMEGA ver.2.1を用いた。

### C. 結果

2005年、コガタアカイエカを捕集した長崎、高知、富山県の3県はいずれも、2004年豚での赤血球凝集抑制(HI)法によって得られた抗体陽性率が80%を超え、JEウイルス感染率の非常に高い県であった(図1)。一方、秋田県では、2004年豚での抗体価上昇は見られなかった。

表1に各検出過程でのウイルス陽性プール率を示した。ウイルス分離はC6/36細胞による3代盲継代の結果である。秋田県捕集蚊(合計25個体2プール)はすべての検出過程でウイルス陰性であった。富山県捕集(290個体15プール)の6.7%からJEウイルス遺伝子が検出され、細胞培養を経た最終陽性プール率は60%であった。高知県捕集蚊(合計768個体39プール)は大月町でプール陽性率10%、安芸市からは遺伝子は検出されなかったが、細胞培養後のプール陽性率は53%と78%に上昇した。長崎県捕集蚊(1,200個体60プール)も同様に、蚊からのウイルス遺伝子の検出は10%のプール陽性率であったが、細胞培養後は95%に上昇した。nested-PCRから得られたプール陽性率は、すべての蚊プールで1st RT-PCRの結果を上回り、細胞接種後のウイルス分離率に近い値が示された。

C6/36細胞による継代培養後、富山、高知、長崎の捕集蚊プールから分離株を得た(それぞれToyama6.57、Kochi12.10、Nagasaki8.37と記した)。VeroあるいはBHK細胞による培養系においてもC6/36細胞系と同程度の分離率が得られた(結果は省略)。各分離株のenvelopeおよび3'UTRの全長解析を行った結果、3株ともgenotype I (G1)であることが確認された。Envelope遺伝子の塩基配列をもとに近隣結合法(NJ法)により分子系統樹を作成したところ

(図2)、3株ともgenotype II (G2)およびIII (G3)とは異なるクラスターに位置し、その中でも、2002年以降に西日本を中心に分離されたgenotype I と遺伝的に近いことが示唆された。3'UTRの翻訳停止コドン以下の配列を比較したところ(図3)、Ishikawa株(1994年分離)に代表される13塩基の欠損が2005年分離の3株すべてに見られ、さらに2箇所の特徴的な欠損も認められた。

### D. 考察

近年、ワクチン接種の勧奨の中止に関する議論がなされているが、本結果は、地域や時期によってはJEウイルスに感染したコガタアカイエカが人へウイルスを伝播する可能性があることを示唆しており、ワクチン接種は継続して行われるべきであると結論された。

2005年、著者らがコガタアカイエカを捕集した場所は主に養豚場、牛舎などで、JEウイルスの増幅動物が飼育されている周辺であるが、一部近隣に住宅が迫っている環境も存在した。また、ウイルスが分離された富山、高知、長崎県の3県では、豚のHIおよび2-メルカプトエタノール(2-ME)感受性抗体(IgM 抗体)陽性率が上昇し始めて3週間以上は経過しており、ウイルス血症を起こしたであろう時期の豚を吸血したコガタアカイエカからJEウイルスを分離したことになる。従って、本結果のように高率にコガタアカイエカがウイルスを保有していても不思議ではない状況であった。一方、秋田県でも8月に蚊の捕集を行ったが、ここでの豚のHI、2-ME感受性抗体価が陽転したのは9月下旬であり、当然のことながら8月の捕集蚊からはウイルスは検出も分離もされなかった。コガタアカイエカは本来、牛、豚など大型の動物を好んで吸血するが、蚊体内の血液中の動物由来



の DNA を解析した結果、鳥類および人からも吸血することが認められ、コガタアカイエカが人に JE ウイルスを伝播する可能性が示唆された。

我々はこれまでに、畜舎周辺のコガタアカイエカ以外に、都市部住宅地において捕集されたアカイエカとヒスジシマカから JE ウイルス遺伝子を検出している。このことは、JE ウイルスの感染環は畜舎周辺だけで完結しているのではなく、豚以外の増幅動物の存在、あるいはコガタアカイエカ以外の蚊種の媒介能などを含めて、人への JE ウイルスの感染経路を改めて見直す必要性を示唆した。

#### E. 結論

1) 2005 年 8～9 月に長崎、高知、富山県で捕集されたコガタアカイエカの 7～10%の蚊プールからそれぞれ JE ウイルス遺伝子が検出された。

2) C6/36 細胞接種後 3 代盲継代を行った結果、陽性蚊プール率は 53%～95%と上昇し、非常に高いウイルス分離率が得られた。

3) Envelope 遺伝子および 3'非翻訳領域の全長解析結果から、分離されたウイルス株はすべて genotype I 型であることが確認された。

4) 養豚場、牛舎などの周辺で捕集されたコガタアカイエカは JE ウイルスを高率に保有していることが明らかになり、地域や時期によっては JE ウイルスがコガタアカイエカから人へ伝播される可能性が示唆された。

謝辞：蚊の捕集およびウイルス検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力をいただいた。

ここに深謝する。井上真吾・鍋島武・木下一美・森田公一(長崎大学熱帯医学研究所・分子構造解析)、川田均・砂原俊彦・前川芳秀・高木正洋(長崎大学熱帯医学研究所・生物環境部門)、永野博明・藤井猪一郎(長崎県中央家畜保健衛生所)、千屋誠造(高知県衛生研究所)、渡辺護(富山県衛生研究所)、高崎智彦・小滝徹(国立感染症研究所・ウイルス第1部)、斎藤一三、中口 梓(国立感染症研究所・昆虫医科学部)

#### F. 健康危険情報

地域によって JE ウイルスを保有したコガタアカイエカが高率に検出されることから、ワクチン接種の勧奨は必要と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 中口梓, 佐々木年則, 比嘉由紀子, 津田良夫, 高崎智彦, 小滝徹, 井上真吾, 森田公一, 川田均, 高木正洋, 永野博明, 藤井猪一郎, 千屋誠造, 渡辺護, 斎藤一三, 小林睦生. 2005 年国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの分離. 第 58 回日本衛生動物学会. 4 月, 長崎市(2006) 予定

#### H. 私的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許情報

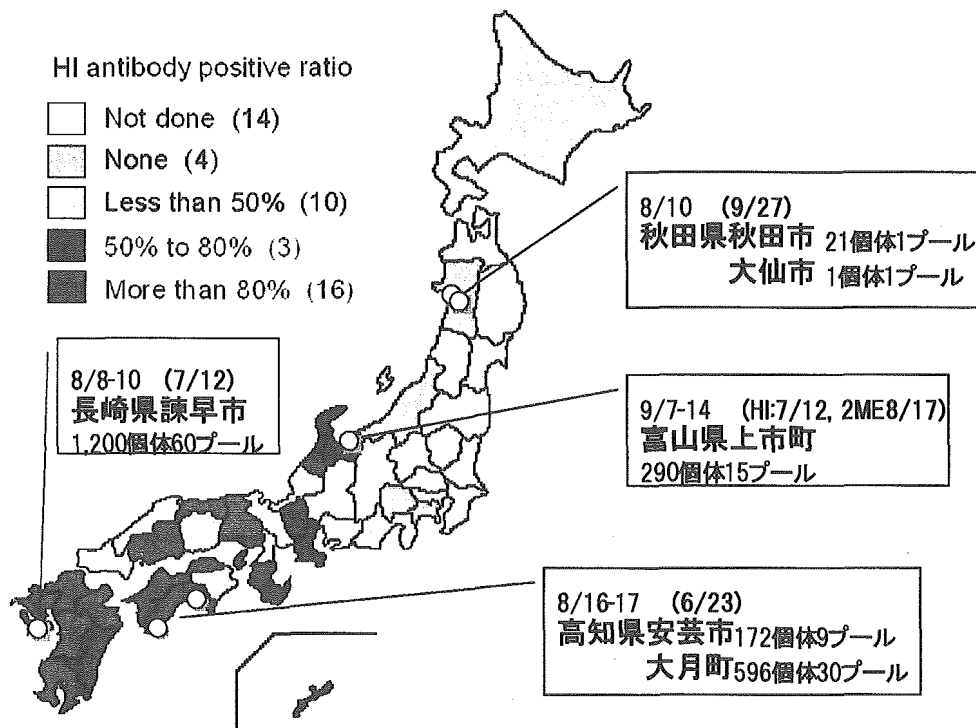
なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



(内は2005年HIおよび2-ME感受性抗体陽性ブタが認められた日  
豚の日本脳炎感染状況2004年)は全国日本脳炎ブタ情報(感染症情報センター)を

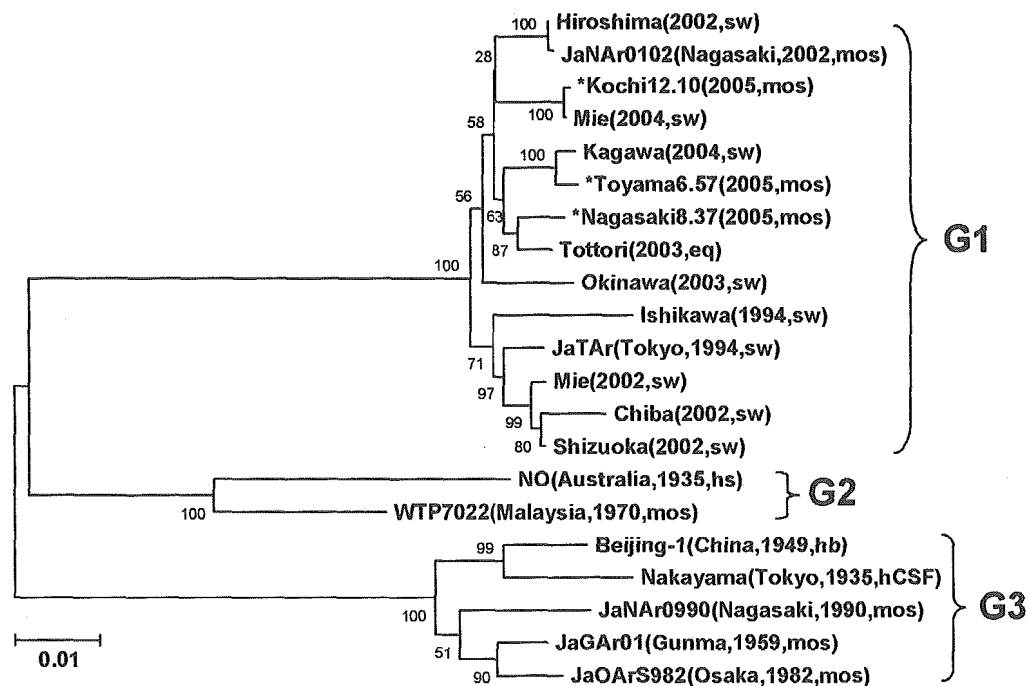
参照

図1 豚のJE感染状況(2004年)と2005年蚊の捕集地および捕集数

表1 捕集蚊におけるJEウイルス陽性プール率

採集地	供試虫数	プール数	RT-PCR 陽性%	nested PCR 陽性%	ウイルス* 分離%
秋田県 秋田市	21	1	0	0	0
大仙市	4	1	0	0	0
富山県 上市町	290	15	6.7	86.7	60.0
高知県 大月町	596	30	10.0	86.7	53.3
安芸市	172	9	0	66.7	77.8
長崎県 諫早市	1,200	60	10.0	65.0	95.0

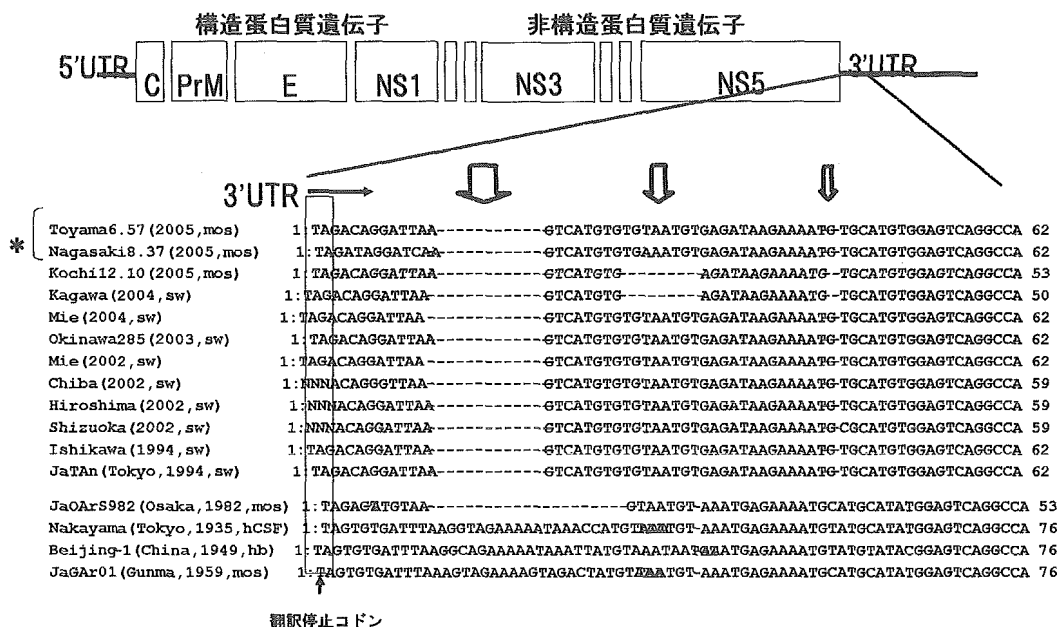
\* C6/36細胞による3代盲継代後NS5遺伝子部分配列をRT-PCRにより確認



\* 2005年分離株

sw:swine serum, mos:mosquito pool, eq:equine serum, hs:human serum, hb:human brain, hCSF, human CSF

図2 NJ系統樹 (envelope領域 1,500bp)



翻訳停止コドン

\* 2005年分離株

sw:swine serum, mos:mosquito pool, hb:human brain, hCSF, human CSF

図3 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に見られる欠損

厚生労働省科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

伴侶動物の日本脳炎ウイルス感染状況

分担研究者 倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第一部)

協力研究者 前田 健(山口大学農学部家畜微生物学教室)

研究要旨

日本脳炎ウイルス(Japanese encephalitis virus, JEV)はおとり豚を用いた疫学調査により関東以南を中心に毎年夏から秋にかけて蔓延しているにも関わらず、ヒトの発症報告は数例程度である。これには幾つかの理由が挙げられているが、都市化に伴いブタの飼育場所が都市部より離れてきたことがその一因と考えられる。本研究ではヒトへのより直接的な JEV 感染の危険性を調べるために、ヒトと生活を密にしているイヌとネコにおける JEV 感染状況を調査した。抗体の検出には日本に現在流行している二種類の Genotype I と III のウイルスを用いた 80% のプラーク減少法にてウイルス中和試験を実施した。その結果、2005 年に山口県周辺の動物病院に来院したイヌ 41 頭中 6 頭(14.6%)、1997-1999 年のネコ 215 頭中 2 頭(0.9%)、2004-2005 年のネコ 77 頭中 1 頭(1.3%)が JEV に対する抗体を保有していた。イヌにおいては室外飼育犬 8 頭中 4 頭(50%)が抗体陽性であるのに対して、室内飼育犬は 18 頭中 1 頭(5.6%)のみが陽性であった。以上の結果より、伴侶動物とヒトとの生活範囲の密接さを考えると、依然としてヒトへの JEV 感染の危険性が存在すると推察された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)は夏季に蔓延し、ヒトやウマに脳炎を引き起こす。日本ではヒトの発症は毎年数例報告されるのみである。しかし、関東以南のブタでは毎年約 80% が JEV に感染している。ブタにおける JEV の陽性率とヒトにおける日本脳炎発症数に大きな開きがある理由は、1) ヒトはワクチン接種により発症が有効に防御されている、2) ブタの飼育場所がヒトの生活場所から隔離されているため、ブタを吸血したカがヒトを吸血する機会が少なくなった、3) カが発生が少なくなった、などが考えられている。

JEV は典型的な節足動物媒介ウイルスであり、日本では JEV 感染したブタの血液を吸うことによ

りカが感染し、そのカがヒトやウマ、その他の多くの動物への吸血の際に JEV を感染させている。しかし、ヒトやウマの多くは JEV に対するワクチンを接種しているため、発症を免れるのみならず感染してもワクチンにより抗体が誘導されたのか、感染により抗体が誘導されたのかを血清学的に調べるのが困難である。そのため、ヒトやウマでの感染状況を正確に把握するのが困難となっている。

日本では JEV の感染状況を把握するためおとり豚を用いた調査が行われている。しかし、ブタの飼育場所とヒトが居住する都市部は離れており、ブタの感染状況とヒトへの JEV 感染の危険性の相関は未だ不明な点が多い。