

本研究では、ヒトへの JEV 感染の危険性を調べることを目的として、ヒトと生活を密にしているイヌとネコの JEV 感染状況を調査した。

## B. 研究方法

### 1. 血清

ネコの血清: 1997 年から 1999 年および 2004 年から 2005 年にかけて山口県周辺の動物病院に来院したネコそれぞれ 215 頭と 77 頭から血清を採取した。

イヌの血清: 2005 年に山口県周囲の家畜病院に来院したイヌ 41 頭から血清を採取した。

すべての血清は 56°C で 30 分非働化した後ウイルス中和試験に供試した。

2. ウイルス: JEV Genotype I である JEV/sw/Chiba/2004(国立感染症研究所高崎智彦室長より分与)と Genotype III である JaOH0566((財)阪大微生物学研究所石川豊数先生より分与)を用いた。ウイルスの増殖には C6/36 細胞を、ウイルスの力価測定および中和試験には Vero9013 細胞を用いた。

### 3. ウイルス中和試験

一次スクリーニング: 2%ウマ胎児血清(FCS)加 EMEM(GIBCO)で 5 倍希釈した被検血清およびコントロール 100  $\mu$ l と 100PFU のウイルスを含むウイルス希釈液 100  $\mu$ l を等量混合し、37°C で 90 分間反応させた。その後、6 ウェルプレート (SUMILON) に増殖させた Vero9013 細胞に接種した。37°C で 90 分間ウイルスを吸着後、2 回 EMEM で洗浄し、2ml の 0.8% SeaPlaque Agarose (FMC Bioproduct) を含む 5% FCS 加 EMEM を重層した。4 日後に緩衝ホルマリンで細胞を固定後、クリスタルバイオレットにて生細胞を染色し、プラークを計測した。血清を含まないコントロール群と比べて 80% 以上プラークが減少しているものを JEV 抗体陽性と判定した。

二次スクリーニング: 一次スクリーニングで JEV 抗体陽性の検体について更に血清を 10 倍-1280 倍まで段階希釈し、一次スクリーニングと同様の実験を行い、80% プラークが減少している最大希釈倍率を中和抗体価とした。

## C. 結果

### 1. ネコにおける抗体保有状況の調査

1997 年から 1999 年にかけて山口周辺の動物病院に来院したネコ 215 頭中 2 頭(0.9%)が JEV/sw/Chiba/2004 に対する中和抗体を有していた(表 1)。2004 年から 2005 年には 77 頭中 1 頭(1.3%)が JEV/sw/Chiba/2004 に対する中和抗体を有していたが、JaOH0566 に対する中和抗体を有していなかった。抗体陽性ネコの抗体価は 1:10-1:20 と低かった。更に、2004 年から 2005 年の抗体陽性ネコの当時の年齢は 1 歳であることから 2003 年から 2004 年にかけて感染したものと推察された。

### 2. イヌにおける抗体保有状況の調査

2005 年に山口周辺の動物病院に来院したイヌ 41 頭中 6 頭(14.6%)に JEV/sw/Chiba/2002 と JaOH0566 両方に抗体陽性がみとめられた(表 1)。抗体陽性犬の抗体価は 1:10-1:320 とばらつきが見られたが、JaOH0566 に対する抗体価は JEV/sw/Chiba/2002 に対する抗体価よりも高い傾向が認められた(図 1)。さらに、カルテから飼育状況と性別により抗体陽性率を比較した結果、室外飼育犬は 50.0%(8 頭中 4 頭)が陽性であったのに対して、室内飼育犬は 5.6%(18 頭中 1 頭)であった(表 2)。一方、性別では、オスが 19.0% であるのに対して、メスは 10.0% が陽性であった。

## D. 考察

本研究で、ヒトとともに生活する伴侶動物に抗体陽性動物がいたことは、依然としてヒトへの

JEV 感染の可能性が高いことが示された。

これまで伴侶動物における JEV 感染の報告は数少ないが、1937 年東京地区のウマ、ブタ、ウシ、メンヨウ、ヤギの JEV に対する抗体保有率がそれぞれ 98.1%、96.1%、64.0%、57.4%、80.0%であったのに対して、イヌは 54.7%、ネコは 10.0%であった(竹内ら 1937)。また、1954-1955 年に東京地区で行われた野犬の調査でも 49.1%のイヌが JEV に対する抗体を保有していた(戸田ら、1955)。1954 と 1955 年のヒトの日本脳炎患者数はそれぞれ 1758 名、3699 名であった。本研究における屋外飼育犬の抗体保有率と戸田ら(1955)が行った野犬における抗体保有状況はほぼ同等であり、依然としてヒトへの JEV 感染の可能性は高いと推察された。

本研究では非特異反応による陽性の可能性を排除する目的で、80%ブランク減少法を採用したが、ヒトで採用されている 50%ブランク減少法で測定した場合、イヌでは 26.8%、ネコでは 1997-1998 年は 6.0%、2004-2005 年は 10.9%とより高い抗体保有率となった。これらがすべて得意反応であるか不明であるが、表 1 における以上に伴侶動物における感染は認められるものと考えられる。

ネコにおける抗体保有状況はイヌに比べて低いことが示された。これは動物病院に来院するネコの多くは室内飼育であるのが一因であると思われる。しかし、2004 年から 2005 年の調査で陽性であったネコの年齢が一歳であることから、少なくとも一年以内に感染しているにも関わらず抗体価が 1:20 であったことはネコは JEV に対する抗体産生能が低いか、あるいは産生抗体が速やかに減衰する可能性を示唆している。ネコへの JEV 感染の報告は我々の知る限り竹内らの報告(1937 年)のみであり、本研究のような大規模な調査はこれまでネコでなされたことがなく、ネコへの JEV 感染を証明した貴重なデータであると考えている。

近年、ワクチンとして用いられている Genotype III と最近新たに流行しつつある Genotype I の二種類の JEV が日本に蔓延している。本研究で血清学的に Genotype I と Genotype III 感染を識別することを目的として、2 種類のウイルスを用いて疫学調査を行った。2004-2005 年のネコでは Genotype I に対して抗体価が 1:20 であったが、Genotype III に対しては抗体価が 1:10 未満であったことから Genotype I に感染したものと推察された。しかし、イヌでは、多くが Genotype I よりも Genotype III に対して抗体価が高かった(図 1)。このことは、Genotype III も依然として流行していることを意味している。ワクチン接種しているウマで Genotype I と Genotype III に対する中和抗体価を比較した結果、多くのウマがワクチン株である Genotype III に抗体価が高いことから、血清学的にも Genotype の識別が可能であることを示している(データ未発表)。これら Genotype 間の中和抗体価の違いは現在流行しつつある Genotype I をベースにワクチンを作出する必要性を意味するのかもしれない。しかし、本研究ではそれぞれの Genotype の 1 株しか用いていないので多くの野外分離株を用いた実験が必要である。

ブタがほとんど飼育されていない山口県で、どうしてこれほどまでに JEV 感染が蔓延しているのかを考えた場合、ブタ以外の増幅動物として、イノシシおよび野鳥など他の動物が増幅動物となっている可能性も考えられる。今後は、野鳥やニワトリを含めた他の動物で同様の調査を行う必要がある。

JEV のヒトへの感染の可能性の調査として伴侶動物を用いることは、幾つかのこれまでにない利点が挙げられる。

- 1) ヒトと生活範囲をほぼ同じくする伴侶動物における感染の調査は、ヒトへの感染の可能性を証明できる。
- 2) 伴侶動物はヒトやウマのようにワクチン接種が行われていないため、抗体陽性はほぼ感

染を意味する。また、感染した Genotype も血清学的に識別可能である。

- 3) ブタのような増幅動物をおとりとして調査するのは、ウイルス拡散の機会を増やす可能性があるが、イヌやネコは増幅動物ではないため安全である。

今後は、山口以外の地域の伴侶動物および野鳥を含めた他の動物の抗体保有状況を調査する予定である。

#### E. 結論

- 1) イヌは高い抗体保有率を有していることから、生活範囲が同じであるヒトへの JEV 感染の可能性は依然として高いことが示された。
- 2) GenotypeI と GenotypeIII の流行が血清学的にも証明された。
- 3) JEV 感染のヒトへの危険性を調査するのに、イヌ(特に室外飼育犬)を用いた調査は優れている。
- 4) ネコにも JEV は感染する。

#### F. 健康危険情報

ヒトへの JEV 感染の可能性は依然として高い。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

なし(投稿予定)

##### 2. 学会発表

前田 健、河野紗紀、甲斐一成「伴侶動物における日本脳炎ウイルスの抗体調査」第 21 回中国四国ウイルス学会、2005 年 6 月(岡山)

前田 健、河野紗紀、甲斐一成、奥田 優、岩田祐之「ネコにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査」第 140 回日本獣医学会、2005 年 10 月(鹿児島)

前田 健、甲斐一成、奥田 優、岩田祐之「ネコにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況」第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月(横浜)

H. 特許出願状況  
なし

表1 日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有率

動物種	調査年	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
ネコ	1997-1999	215	2	0.9
	2004-2005	77	1	1.3
イヌ	2005	41	6	14.6

表2 室内飼育犬と室外飼育犬における抗体保有率の比較

	飼育場所				性別	
	室内	室外	両方	不明	オス	メス
検査頭数	18	8	2	13	21	20
陽性頭数	1	4	1	0	4	2
陽性率(%)	5.6	50.0	50.0	0.0	19.0	10.0

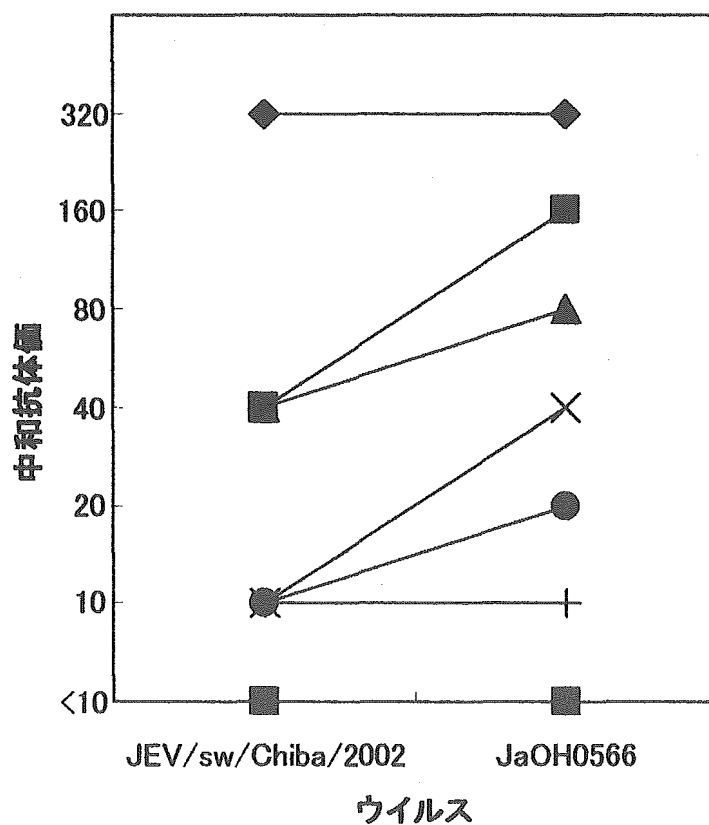


図2 ウイルス株間における中和抗体価の比較

JEV/sw/Chiba/2002(Genotype I)とJaOH0566(Genotype III)に対するイヌ血清の中和抗体価を比較した。

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

本邦の原因不明脳炎・無菌性髄膜炎における日本脳炎ウイルス関与  
に関する回顧的調査

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第1部）

協力研究者 根路銘令子、小滝 徹、倉根一郎（国立感染症研究所  
ウイルス第1部）

松井 真（金沢医科大学 神経内科）

中村龍文（長崎大学医学部 感染分子病態学講座）

阿部康二（岡山大学医学部 神経病態内科学）

寺田喜平（川崎医科大学 小児科学教室）

中嶋秀人（大阪医科大学 第1内科）

国重 誠（徳島大学医学部 神経内科）

脇口 宏（高知大学医学部 小児思春期医学）

研究要旨

広島県保健環境センターに保存されていた小児の原因不明髄膜炎症例の髄液 57 検体を nested RT-PCR 法を用いてスクリーニングした結果、2000 年の 4 症例から日本脳炎ウイルス遺伝子を検出し、2 症例は遺伝子型 1 型、2 症例が 3 型であった。本研究を発展させるため西日本の原因不明脳炎および無菌性髄膜炎症例で、保存されている髄液から日本脳炎ウイルス遺伝子の検出を試みた。長崎県では 22 例中 2 例、岡山県では 19 例中 3 例、徳島県では 4 例中 1 例、大阪府では 21 例中 1 例、京都府では 14 例中 3 例の日本脳炎ウイルス遺伝子を日本脳炎ウイルス遺伝子 E 領域に設定した nested-RT-PCR 法により検出した。総数 81 例中 10 例で陽性であり、検出率は 12.3%である。

A. 研究目的

世界的には年間 3～4 万人の日本脳炎患者の報告があるが、日本ではワクチンの定期接種によりすでに流行が阻止されている。し

かし、厚生労働省では毎年夏期に、ブタの日本脳炎ウイルス抗体獲得状況から間接的に、日本脳炎ウイルスの蔓延状況を調べている。それによると、毎夏日本脳炎ウイルスを持つ

た蚊は発生しており、日本脳炎ウイルスは日本国内の自然界で活動している。1966年の2017人をピークに減少し、1992年以降の日本脳炎患者数は10人を超えないが、わが国の医療機関における脳炎、無菌性髄膜炎のウイルスに関する病原体検索は、ヘルペスウイルス以外は、それ程実施されていない。そのため、原因不明の急性脳炎や無菌性髄膜炎のなかに日本脳炎が紛れている可能性もある。そこで、過去に原因の特定されなかった原因不明の急性脳炎や無菌性髄膜炎症例で、髄液の保存されている症例に関して、日本脳炎ウイルスの病原体検索を実施した。

## B. 研究方法

### 検査対象

- (大阪) 1993年から2005年まで、各年の6月から10月に発症した無菌性髄膜炎21例の冷凍保存髄液。
- (岡山) 2004年から2005年までの小児無菌性髄膜炎13症例。および成人無菌性髄膜炎6症例の冷凍保存髄液。
- (京都) 1991年から2004年までの原因不特定急性脳炎14症例の冷凍保存髄液。
- (徳島) 2000年および2001年までの急性脳炎および無菌性髄膜炎4症例の冷凍保存髄液。
- (長崎) 無菌性髄膜炎22症例の冷凍保存髄液。
- (高知) 回顧的調査ではないが、平成17年10月発症の5歳髄膜炎小児症例の髄液。

日本脳炎ウイルス遺伝子の逆転写PCRに用いたプライマーは、E領域に設定された下記の2種類である。

JE8K-S: 5' ATG GAA CCC CCC TTC 3'

JEER: 5' AGC AGG CAC ATT GGT CGC TA 3'

その産物の大きさは381bpである。

さらに以下のプライマーを用いればNested PCRも可能である。

JE8K inner-S: 5' ATC GTG GTT GGG AGG GGA GA 3'

JEER inner-C: 5' AGC ACA CCT CCT GTG GCT AA 3'

その産物の大きさは、326bpである。

もう一つのプライマーセットは、

JEen37s-first: AAG GAG CCA GTG GAG CCA CTT

JEen329c-first: TTC CCG AAA AGT CCA CAT CC

JEen98s-second: CAT GGC AAA CGA CAA ACC AAC

JEen301c-second: CAG TRA AGC CTT GTT TGC ACA C

である。

反応条件は、53°C・10分(逆転写)、92°C・2分(熱変性)の後、92°C・1分、53°C・1分、72°C1分を35サイクル繰り返し、72°C・5分間伸長反応を行う。反応にはAccess Quick RT-PCR System(Promega #A1702)を使用した。

Nested PCRの反応条件は、92°C5分(熱変性)の後、92°C・1分、53°C・1分、72°C・1分を25サイクル繰り返し、72°C・5分間伸長反応を行う。反応にはPureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham #27-9559-01)を使用した。

### C. 研究結果

1) 大阪医科大学からの 21 検体中 1 例より、日本脳炎ウイルス遺伝子が検出された。

症例 1 (大阪) 34 歳男性、日本脳炎予防接種歴は不明。1998 年 7 月 9 日より 38°C 台の発熱と頭痛、悪心、嘔吐が出現。7 月 13 日、大阪医科大学神経内科を受診。意識は清明。項部硬直を認め、血液検査で WBC:5340/ $\mu$ l、CRP1.27mg/ml、その他血液生化学検査に異常を認めず。髄液中に日本脳炎ウイルス (遺伝子型 3 型) 遺伝子を検出した。

2) 岡山大学からの成人無菌性髄膜炎 4 症例からは、日本脳炎ウイルス遺伝子は検出されなかった。川崎医科大学からの小児無菌性髄膜炎症例の 13 症例の 3 例から、日本脳炎ウイルス (遺伝子型 3 型) 遺伝子を検出した。

3) 原因不特定の急性脳炎 14 症例中、1991 年 11 月、94 年 8 月、99 年 9 月 (採取日) の急性脳炎 (1 例は脳幹脳炎) の 3 症例で日本脳炎ウイルス (遺伝子型 3 型) 遺伝子を検出した。

4) 徳島大学からの 4 検体中、急性脳炎 1 症例から日本脳炎ウイルス遺伝子が検出された。

症例 2 (徳島) 29 歳女性で 4/8 釣りに行った。その後、意味不明な発言、興奮状態→精神分裂病として加療するも 4/19 より 38°C 前後の発熱、徐々に意識レベル低下し、4/23 には意識障害 (痛み刺激に無反応)、筋緊張が出現した。4 月 26 日転院し、全身痙攣と呼吸停止 (入院期間: 2001 年 4 月 26 日~7 月 9 日) をきたした。

5) 長崎県無菌性髄膜炎 22 症例の髄液検体から、日本脳炎遺伝子検索を実施したと

ころ、2 例から日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。PCR 増幅産物を、遺伝子解析したところ遺伝子型は 3 型ウイルスであった。そのうち、1 例は日本脳炎特異的 IgM 抗体も陽性であった。

6) 高知大学からの小児無菌性髄膜炎症例の髄液からは、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

今回、検出した日本脳炎ウイルス遺伝子は、短い領域ではあるがいずれも日本脳炎ウイルス遺伝子型 3 型ウイルスであった (図 2、図 3)。

### D. 考 察

わが国の医療機関における脳炎、無菌性髄膜炎のウイルスに関する病原体検索は、ヘルペスウイルス以外は、それ程実施されていない。また、原因の明らかにならなかった症例の髄液が保存されていることもそれほど多くはなかった。しかし、神経内科を中心に検体が保存されている場合もあったため回顧的に日本脳炎を疑った症例 (発病時期、症状、画像診断など) で、日本脳炎ウイルス遺伝子を PCR 法で検出したところ、検出する率は約 12% とそれ程低くはなかった。したがって、わが国における日本脳炎症例が、年間 10 症例を超えないという疫学情報は、必ずしも実態を反映していないことが示唆された。しかしながら、回顧的調査では、髄液・血清がペアで保存されていない場合がほとんどであるため、今後前向き調査が必要である。

### E. 結 論

我が国の医療機関においては、ウイルス性

脳炎、無菌性髄膜炎の病原体検索は、あまり実施されていない。過去にさかのぼって原因の特定されなかった急性脳炎および無菌性髄膜炎の中で、日本脳炎ウイルスが原因であってもおかしくない症例を検討した結果、80症例中の10症例の髄液から、日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。

#### F. 健康危険情報

日本脳炎患者発生数の報告は、必ずしも我が国の日本脳炎ウイルス感染症の実態を反映していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

なし

##### 2. 学会発表

高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、沢辺京子、岸 昇、桑山勝、倉根一郎. 中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（箱根）2005年5月

濱野正敬、林 昌宏、高木弘隆、澤邊京子、桑山 勝、岸 昇、高崎智彦、倉根一郎. 広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況. 第141回日本獣医学会学術集会（つくば市）2006/3/18-20



表 1. 我が国における原因不明無菌性髄膜炎、急性脳炎症例の  
髄液における日本脳炎ウイルス遺伝子検出陽性率

県名	検査検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
長崎	22	2	9.1
徳島	4	1	25.0
岡山	19	3	15.8
大阪	21	1	4.8
京都	14	3	21.4
高知	1	0	0.0
総計	81	10	12.3%

図 1

jagarmit	1	TTATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATTAACATCGAAGCTAGCCAAAC	60
kyot	1	TCATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATCAACATCGAAGCTAGCCAAAC	60
nagasak	1	TCATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATCAACATCGAAGCTAGCCAAAC	60
okayam	1	-CATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATCAACATCGAAGCTAGCCAAAC	59
osak	1	TCATGGCAAACGCAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATCAACATCGAAGCTGTCCAAC	60
jagarmit	61	TTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTC	120
kyot	61	TTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTC	120
nagasak	61	TTGCTGAAGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTC	120
okayam	60	TTGCTGAAGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTC	119
osaka	61	TTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTC	120
jagarmit	121	GGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACGAGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCA	180
kyoto	121	GGTGCCCCACGACTGGAGAAGCCCAACAACGAGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCA	180
nagasak	121	GGTGCCCCACGACTGGAGAAGCCCAACAACGAGAAGCGAGCTGACAGTAGCTATGTGTGCA	180
okayam	120	GGTGCCCCACGACTGGAGAAGCCCAACAACGAGAAGCGAGCTGACAGTAGCTATGTGTGCA	179
osaka	121	GGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACAAGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCA	180
jagarmit	181	AACAAGGCTTCACTGA	196
kyoto	181	AACAAGGCTT-----	190
nagasak	181	AACAAGGCTTCACTGA	196
okayam	180	AACAAGGCTTCACTGA	195
osaka	181	AAC-----	183

日本脳炎ウイルス Nested RT-PCR (JEen37s-first: JEen329c-first primer および JEen98s-second: JEen301c-second primer) により、得られた増幅産物の遺伝子解析結果。

Jagarmit: JaGAR01 株の遺伝子配列。Kyoto: 京都、nagasak: 長崎、okayam: 岡山、osaka: 大阪

図 2

jagar8	1	ATCGTAGTTGGAAAGGGGAGACAAGCAGATCAACCACCATTTGGCACAAAGCTGGAAGCACG	60
osaka8	1	ATCGTAGTTGGCAAGGGGAGACAAGCAGATTAACCACCATTTGGCACAAAGGCTGGAAGCACG	60
tokushima	1	-----CAGCAGATTAACCACCATTTGGCACAAAGGCTGGAAGCACG	39
jagar8	61	CTGGGCAAAGCCTTTTCAACAACTTTGAAGGGAGCTCAAAGACTGGCAGCGTTGGGTGAC	120
osaka8	61	CTGGGCAAAGCCTTTTCAACGACTTTGAAGGGAGCTCAAAGACTGGTAGCGTTGGGCGAC	120
tokushima	40	CTGGGCAAAGCCTTTTCAACGACTTTGAAGGGAGCTCAAAGACTGGTAGCGTTGGGCGAC	99
jagar8	121	ACAGCCTGGGACTTTGGCTCTATTGGAGGGGTCTTCAACTCCATAGGAAAAGCCGTTTCA	180
osaka8	121	ACAGCCTGGGACTTTGGCTCTATTGGAGGGGTCTTCAACTCCATAGGGAAAAGCCGTTTCA	180
tokushima	100	ACAGCCTGGGACTTTGGCTCTATTGGAGGGGTCTTCAACTCCATAGGGAAAAGCCGTTTCA	159
jagar8	181	CAAGTGTTTGGTGGTGGCTTCAGAACAACCTCTTTGGGGGAATGTCCTGGATCACACAAGGG	240
osaka8	181	CAAGTGTTTGGTGGTGGCTTCAGAACAACCTCTTGGGGGAATGTCCTGGATCACACAAGGG	240
tokushima	160	CAAGTGTTTGGTGGTGGCTTCAGAACAACCTCTTGGGGGAATGTCCTGGATCACACAAGGG	219
jagar8	241	CTAATGGGGTGCCTACTACTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTTGCTTTG	300
osaka8	241	CTAATGGGGGGCCTACTACTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTTGCTTTG	300
tokushima	220	CTAATGGGGGGCCTACTACTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTTGCTTTG	279
jagar8	301	GCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCT	326
osaka8	301	GCCTTCTTAGCCACAG-----	316
tokushima	280	GCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCT	305

日本脳炎ウイルス Nested RT-PCR (JE8K, JEER primer set) により、得られた増幅産物の遺伝子解析結果。  
 Jagar8: JaGAR01 株の遺伝子配列。Osaka8 : 大阪, tokushima: 徳島

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

わが国における日本脳炎ウイルスの自然感染：  
連続血清を用いた調査

分担研究者 小西 英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

共同研究者 正田 瑞恵（神戸大学医学部医療基礎学講座）  
松永 貞一（永寿堂医院）

**研究要旨** わが国における日本脳炎ウイルス（JEV）の年間自然感染率は、1940及び1950年代のいくつかの調査で北海道を除き3-12%、2001年の調査で0.2-3.4%である。本研究では、東京都葛飾区の一医院を1-2年にわたって受診し5検体以上の血清を採取できた36名の外来患者を対象としてNS1抗体の推移を調べた。NS1はJEVの非構造タンパクの1つであり、NS1に対する抗体はワクチン接種集団における自然感染個体を識別するマーカーとなる。NS1抗体価の3管（8倍）以上の上昇が認められた場合に感染を受けたと仮定すると、全患者の延べ調査対象期間である70.5年の中で2例が該当した。すなわち、平均年間感染率は2.8%（2/70.5）と計算される。この上昇は10月（患者番号47）及び7月（患者番号48）にみられ、患者番号48の場合は38度の発熱があり不明熱と診断されていた。JEVが原因となる病態は、夏かぜ様の単なる熱性疾患から髄膜炎そして脳炎まで幅広く、日本脳炎と診断のついていない症例は比較的高い頻度で存在することが示唆された。

#### A. 研究目的

ワクチン接種の意義を論じる上で、自然感染率は不可欠の因子である。日本における自然感染率の調査は、ワクチン接種がまだ全国的に普及していない1940年及び1950年代に、一時点における抗体陽性率の年齢依存の上昇から推定する手法、または流行期前後のペア血清を調べて陽転者数の割合から計算する手法により行われた。

Sabinのグループ（Bawell et al., *Am J Hyg*, 1950; Deuel et al., *Am J Hyg*, 1950）が1946年に行った年齢別抗体保有率の調査では、年間自然感染率が札幌で0.1%、東京で5%、岡山で4%、熊本で3%及び沖縄で12%と推定した。また、1954年に埼玉県で行われたSoutham（*J Inf Dis*, 1956）の調査報告では、平均年間自然感染率は9-10%と記載している。さらに、Schererら（*Am J Trop Med Hyg*, 1959）が1956年に千葉県及び埼

玉県で行った調査では、両調査地において5%の結果を得た。

海外の流行地における報告もある。1958年の韓国 Kunsan 空軍基地におけるHalsteadら（*Am J Hyg*, 1962）の調査では自然感染率は9.3%、1972年のタイ Nham Phong空軍基地におけるBenensonら（*Am J Trop Med Hyg*, 1975）の調査では自然感染率は27%であった。

ワクチンが広く普及されると多くの検体が陽性となるため、上記の方法により自然感染率を求めることは困難となる。しかし、現行の精製不活化ワクチンが誘導するのは構造蛋白に対する抗体のみであるため、JEV非構造タンパクの1つであるNS1に対する抗体の検出により、感染が証明できる。我々は、秋田、山形、福島、山梨、長野、愛知、福岡及び宮崎県の住民血清（総数1,765検体を国立感染症研究所血清バンク

から分与)を対象にして2001年における自然感染率を調査した結果、0.2-3.4%という値を得た。

本研究では、一時点のNS1抗体陽性率から推定する手法ではなく、多数の個体におけるNS1抗体価の変動から年間自然感染率を推定する手法を試みた。

## B. 研究方法

**血清：**東京都葛飾区の一医院に2001年6月から2004年2月までの間に日本脳炎とは異なる疾患で受診した外来患者の中で、流行期が含まれるように1年以上の期間、少なくとも5検体の血清を採取できた患者36例を対象にした。患者の年齢は、1歳から86歳までで、男15例(調査開始時点での平均年齢48.0歳)、女21例(50.8歳)であった。

**NS1抗体測定法：**平成16年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書「日本における近年の日本脳炎ウイルス自然感染状況：8県の住民を対象とした調査」に記載した方法に準拠した。要約すると、抗原は、NS1発現CHO細胞と非発現CHO細胞を混合してコロニーを形成するまで培養し、エタノール固定して作製した。抗原をブロッキング液(1%正常ヤギ血清、2%カゼイン、1%ウシ血清アルブミン、0.05%Tween20添加PBS)で被覆し、ブロッキング液で希釈したヒト血清を室温で30分間反応させた。次いで、ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体、ABC試薬及びVIP基質(いずれもVector社製)を順次反応させた。顕微鏡下でNS1発現細胞と非発現細胞の染色強度の差が確認できる血清の最大希釈度を血清のNS1抗体価とした。同一血清を用いて複数回繰り返し試験を行った時の誤差は上下に最大1管(2倍または1/2)であったため、3管以上の変動を有意とした。

### (倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会により承認された。

## C. 研究結果

**NS1抗体価の経時的変化：**図1に36例で得

られたNS1抗体価の推移を示す。NS1抗体価の3管以上の上昇がみられたのは、患者番号47及び48であり、時期はそれぞれ10月及び7月であった。この有意上昇は自然感染を受けた結果と考えられ、今回対象となった36例の調査期間の総和は70.5年であるため、年間感染率が平均2.8%(2/70.5)であることを示す。なお、3管以上の低下は見られなかった。

NS1抗体価の変動がよく見られる個体もあれば、一定の値を示す個体もあった。高い抗体価が調査期間中持続した患者番号44や46のような個体もあれば、患者番号37のように1年で1:40から<1:10に低下する個体も見られた。

また、調査対象となった患者数は少ないが、年齢の高い集団ほどNS1抗体陽性率も高い傾向が認められた。神戸市における1995年の調査においても80歳代が有意に高かった。

## D. 考察

現在の日本脳炎の重要性及び日本脳炎ワクチンの意義を考える上に、自然感染率の他に不顕性感染率も重要である。JEV感染は不顕性感染率が高い特徴をもち、不顕性：顕性感染比であらわしたとき、25:1から1000:1と報告されている。この中で最も発症率が高い報告(不顕性：顕性感染比が25:1)は、上記1958年の韓国Kunsan空軍基地におけるHalsteadらの調査による。

この調査では特に高い発症率が報告されているが、非流行地(米国)から流行地(韓国)への渡航者を対象として流行期前後の比較をしているため、その他の調査より正しい姿を捉えていると思われる。すなわち、他の報告では流行地の住民あるいは流行地の住民でなくてもそれまでの流行期に滞在していたヒトをも対象としているため、たとえ調査開始時点で抗体が検知レベル未満であっても、過去に(不顕性)感染を受けたことがあるかもしれない。その場合は免疫記憶のために発症が抑えられる可能性が考えられ、本来より不顕性感染者の割合が高く見積られることが想定されるためである。

本研究では、NS1抗体測定における実験誤差を考慮して3管以上の上昇を有意とした

が、2管の上昇を示したものの中でも、感染を受けたものがあると考えられる。その場合、自然感染率はより高く推定されることになる。

JEVが原因となる病態は、夏かぜ様の単なる熱性疾患から髄膜炎そして脳炎まで幅広い。患者番号48の例では発熱しており、JEV感染の一端を捉えたのかもしれない。日本脳炎と診断のつかない症例は、比較的高い頻度で存在することが示唆された。

わが国の住民が比較的高い頻度で感染し、不顕性：顕性感染比が報告では高くても1000:1であるのに、なぜ患者数が少ないのかは未だ疑問である。しかし、無菌性髄膜炎と診断された小児の脊髄液を用いてPCRによりJEV遺伝子を検出した最近の調査で、JEVに起因した髄膜炎が見逃されていることから、本来の脳炎という病態から髄膜炎にシフトした可能性がある。また最近のJEV分離株には3'非翻訳領域に10塩基前後の欠失が多く見られ、この欠失による病原性の低下が示唆される。

## E. 結論

東京都葛飾区において連続して採取された血清を対象にしてNS1抗体価の推移を調べた結果、JEVの平均年間自然感染率が2.8%と推定された。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo: Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine* 24, 516-524, 2005

Eiji Konishi, Saori Kosugi, and Jun-ichi Imoto: Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*, in press

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Mosquito Cells Infected with Japanese Encephalitis Virus Release Slowly-Sedimenting Hemagglutinin Particles in Association with Intracellular Formation of Smooth Membrane Structures. *Microbiol. Immunol.*, in press.

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Seigo Yamamoto, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya, and Nobuhiko Okabe: Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: A nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein. *Vaccine*, in press

小西英二: 日本脳炎. *Clinical Neuroscience* 7巻、784-785頁、2005

小西英二: 日本脳炎. *Modern Physician* 25巻、591-594頁、2005

小西英二: 日本脳炎. *小児科診療* 68巻、2128-2132頁、2005

小西英二: 日本脳炎の臨床と疫学. *日本臨床* 63巻、2138-2142頁、2005

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題. *防菌防黴*, 34巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ウイルスの不顕性感染. *小児科* 47巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ワクチン接種の問題. *クリニカル プラクティス* 25巻、2006、印刷中

### 2. 学会発表

Eiji Konishi, Saori Kosugi and Jun-ichi Imoto: Development of a dengue tetravalent DNA vaccine and its evaluation in mice. Thirty-Ninth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Palo Alto 2005

石川知弘、Peter W. Mason、田島茂、根路

銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

井本淳一、小西英二：フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与：デングウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

山中敦史、小西英二：抗体依存性感染増強及び／または中和活性を示すマウス抗デング2型ウイルスモノクローナル抗体の解析。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

小西英二：ウエストナイル熱。日本防菌防黴学会第32回年次大会（2005）。

石川知弘、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：ウエストナイルウイルス感染症に対するDNAワクチンのマウスにおける評価。第9回日本ワクチン学会学術集会（2005）。

松永貞一、小西英二：東京都葛飾区の一診療所の患者からみた同地域における日本脳炎ウイルス不顕性自然感染の可能性に関する

考察。第9回日本ワクチン学会学術集会（2005）。

石川知弘、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が引き起こす培養細胞におけるウイルス増殖抑制。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

井本淳一、小西英二：タンパクワクチンとの混合投与によるデング4価DNAワクチンのマウスにおける免疫原性の上昇。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

山中敦史、小杉紗織、小西英二：マウス抗デング2型及び4型ウイルスモノクローナル抗体における抗体依存性感染増強と中和活性の関係。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

奴久妻聡一、小杉紗織、小西英二：デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NS1 抗体価

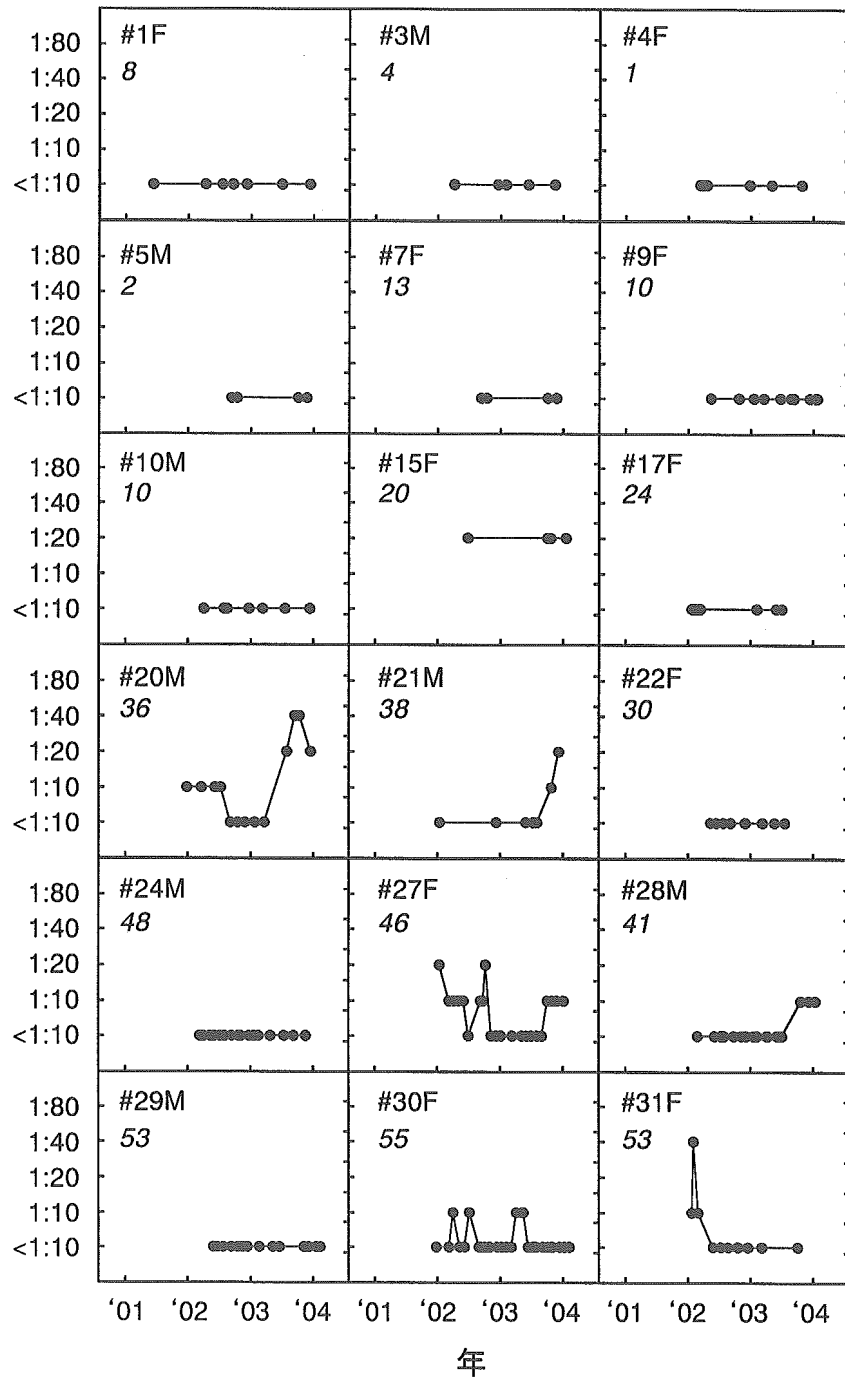


図 1a. NS1 抗体価の経時的変化。患者番号 (#で示す) の後の M 及び F は、それぞれ男及び女を示す。斜体の数字は、血液採取開始時点における患者の年齢を示す。



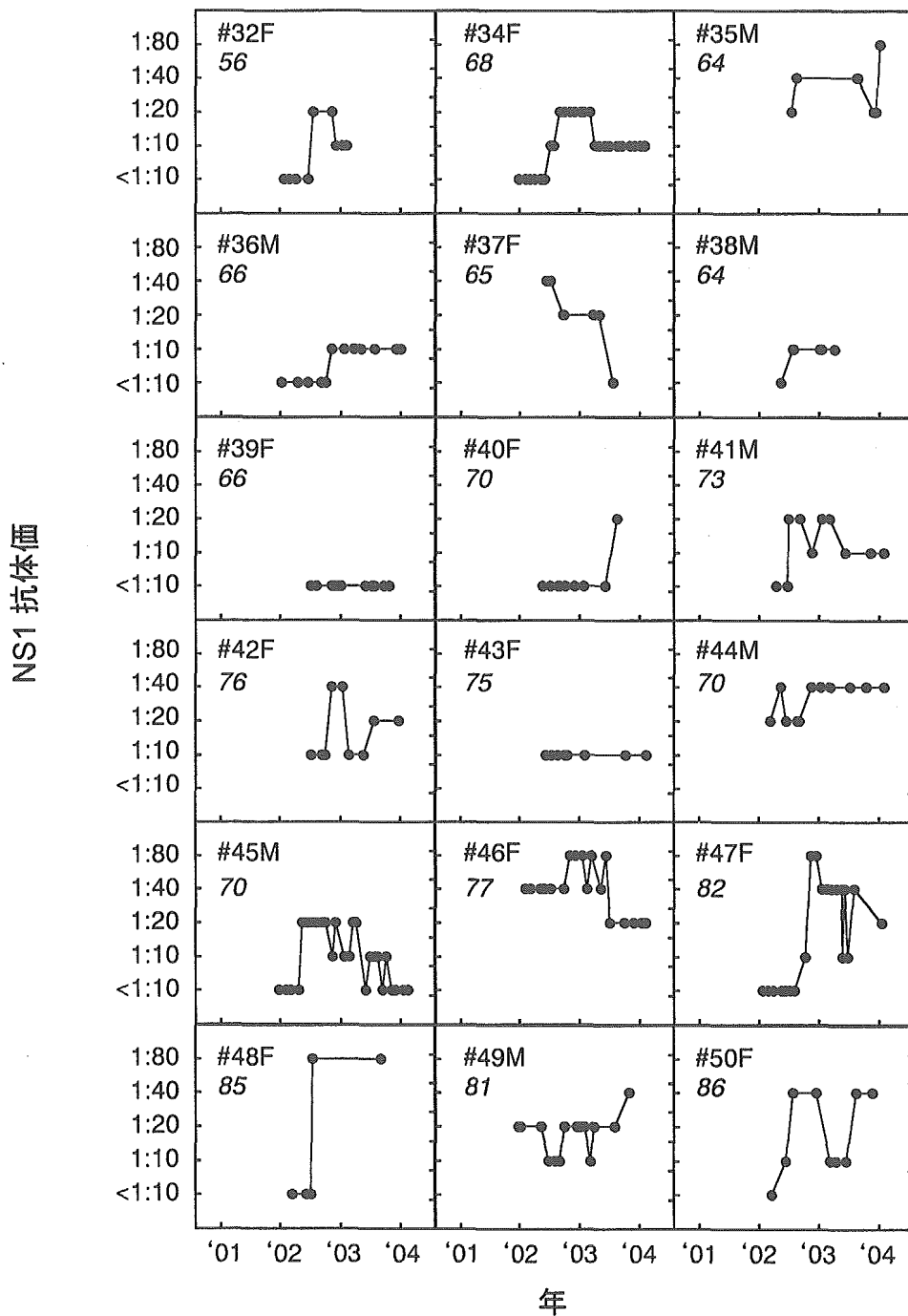


図 1b. NS1 抗体価の経時的変化。患者番号 (#で示す) の後の M 及び F は、それぞれ男及び女を示す。斜体の数字は、血液採取開始時点における患者の年齢を示す。

## 要約

過去に行われた複数の小児の急性散在性脳脊髄炎（ADEM）の調査から疫学的な特徴をまとめた。発症は6歳を頂点に広く分布し、季節性が明らかでない。日本脳炎ワクチン接種後のADEM（疑い）を含む脳炎・脳症例の解析では、接種後発症までの日数に一定の分布はみられないが、年齢が上がると相対危険率が上がる傾向を示した。日本脳炎ワクチン接種中止を継続した場合の疾患動向の予測は困難であるが、血清疫学による自然感染率の調査と分離ウイルスの神経病原性の調査研究が期待される。

## はじめに

2004年5月に現行日本脳炎ワクチンの積極的勧奨が一時中止され、さらに同年7月に第3期接種が廃止された。これには日本脳炎患者発生状況と接種後副反応症例の発生状況を総合的に勘案されたものと思われるが、日本脳炎ワクチンとADEMを含む神経系副反応との関連は特異的か、積極勧奨の中止を継続した場合、日本脳炎患者数はどうなるか、組織培養ワクチンの神経系副反応が現行ワクチンに比して低いことが治験段階で予測可能か、などの課題が残された。明確な回答はないが、現時点で用いることができる資料から上記の問題について推測したい。

## 対象と方法

わが国で過去に実施された小児の急性散在性脳脊髄炎（ADEM）およびその類縁疾患の調査には、厚生労働省免疫性神経疾患調査研究班による福岡県の悉皆調査（平成15年度、原寿郎ら）、厚生労働省水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究班（岡部班）の全国調査（平成16年度、岡部、宮崎ら）がある。それに加え、厚生労働省予防接種研究班（現ワクチン研究班）で継続的に行われてきた小児急性神経系疾患（AND）調査があり、ADEMは調査対象疾患18のうちの一つとしてあげられている。その中から1999-2004年の2調査4年間を用いた。これらの調査から小児のADEMの特徴および、日本脳炎ワクチン接種後ADEMの特徴をさぐった。

厚生労働省の予防接種後副反応調査平成16年度報告書に記載されている平成8年度から16年度の日本脳炎ワクチン等の副反応報告から中枢神経系副反応のワクチン別、年齢別危険率を推計した。

組織培養日本脳炎ワクチンの第3相試験における治験参加児の接種前抗体陽性率から、定期予防接種中止を継続した場合の疾患発生の危険率を推計した。

## 結果

表1にADEMに関する3調査をまとめた。男女比1:1.27-2.25(平均1:1.4)、平均年齢はいずれも中央値で6歳と近似し、年齢分布も類似していた(図1)。季節性は明確でなかった。参考として図3、4に他の脳炎や脳症の年齢分布と季節分布を示した。近年インフルエンザ脳症の増加に伴い報告が増えている急性脳症が、冬に多く発生し発症年齢は1歳を頂点として年齢上昇とともに減少するに比して、ADEMではやや高齢に分布し、季節的な消長が明確でなかった。ADEMの発症頻度は小児人口10万人あたり、年間0.33-0.64で、年間患者数は約60-120人程度と推測された。また、日本脳炎ワクチンの接種が比較的集中する5月~8月にADEM症例が集中することもなかった。岡部斑の報告例の内4例が発症30日以内に日本脳炎ワクチンの接種を受けていたが、うち2例は発症1週間以内の先行感染も見られた。別の2報告では日本脳炎ワクチン関連の症例はなかった。

厚生労働省による(定期)予防接種後副反応報告書における平成8年~16年度の集計をみると、日本脳炎ワクチン後の脳炎・脳症が32例で(うち、ADEMおよびその疑い例が23例とされている)、他のワクチンに比して多い。そこで定期接種の全国実施率調査(厚労省調査)により明らかにされた接種者数との関連で危険率を推計した。但し、実施率調査では接種年齢は不明であり、かつ副反応報告の年齢群と一致しないので、3-4歳を1期、5-9歳を2期、10-15歳を3期で代表させて推計したのであくまで大まかな傾向を示したものにすぎないことを注記する。

日脳ワクチンの年間の中枢神経系副反応報告率は年平均3.56人(100万接種に0.8例)であった。上記の仮定のもとに年齢別に計算すると、3-4歳では年平均1.44人(208万接種に1例)、5-9歳では年平均0.89人(90万接種に1例)、10-14歳では1.22人(53万接種に1例)となる。5-15歳を併せると2.11人(69万接種に1例)となる。1期接種(3-4歳)に比べて年齢が上昇するに従って相対危険率が上昇する傾向がみられ、3-4歳を1とすると、5-15歳では相対的に3.02倍となった。

ワクチン接種から脳炎・脳症発症までの日数は図5に示すように広く分布し一定の傾向が見られなかった。一方けいれんは3-4歳の幼児に多くみられた。

国内2社がVero細胞を用いた組織培養ワクチンの第3相臨床試験を終了し、現在承認申請中である。K社の3相試験には全国から468例がエントリーされ(治験ワクチン235名:平均月齢36.2月、対象ワクチン233名:平均月齢36.5月)、その内1例のみがワクチン接種前抗体陽性であった。従って生後36月(満3歳)までに小児が日本脳炎ウイルスの自然暴露(感染)を受ける確率は1年間で0.07%と推計された。今後の年間出生数を110万人とすると、出生してくる1出生コホートあたり、1年間に770人の幼小児が感染を受ける危険性があり、日本脳炎の顕性発症率を500-1000感染に1例とすると、年間1例程度の患者数となる。

## 考察

現行日本脳炎ワクチンはウイルス（1989年より北京株：遺伝子Ⅲ型）を感染させたマウス脳乳剤を出発材料とし高度に精製・不活化されている。一般的な副反応は局所反応であり、発熱や全身性の発疹もまれに経験される。わが国では液状ワクチンが使用されてきたが、ゼラチンによるアナフィラキシーや全身蕁麻疹の問題が顕在化した平成5年以降、ゼラチンが順次除去・減量された。また、発達障害と関連が危惧されたチメロサル（エチル水銀）は米国IOMの調査により疫学的関連性は否定されたが、水銀の潜在的危険性を除去軽減するために、チメロサル量の除去・減量や、代替品（2-フェノキシエタノール）への変更が行われた。その結果、最近の厚生労働省の副反応調査では即時型全身反応の率が減少し、予防接種後健康状況調査でも平成8-12年の同調査と比べて局所反応の発生率がほぼ半減し、ワクチン改良の効果がでてきている。米國小児科学会編 Red Book 2003では日本脳炎ワクチンのアレルギー性副反応を重視しているが、これは1989年以降、欧州などで凍結乾燥不活化日脳ワクチンの重篤なアレルギー性副反応が多発したためと思われ、含有ゼラチンが原因であった可能性が高い。

一方、中枢神経系副反応について、その詳細は必ずしも明らかでないが、厚生労働省予防接種後副反応報告（因果関係を問わないので紛れ込み事例が含まれる）によれば、脳炎脳症32例の中に急性散在性脳脊髄炎（ADEM）例とその疑い23例が含まれる。この間の日本脳炎ワクチン接種総数は3800万回を超えるので、紛れ混みを含むADEM症例の発症頻度は165万回接種に1回程度となる。接種後発症日数は広く分布しており、ワクチンとの因果関係を特定することが難しい。年齢も幅広いが、各接種時期の接種母数と報告例の関連を見ると、高い年齢層（特に3期）でリスクが高い傾向がみられた。

ADEMは小児に好発し、種々の感染症後や予防接種後などにみられる急性一過性の免疫性神経疾患である。発症年齢の平均は6~7歳で男児にやや多い。髄鞘の塩基性蛋白（MBP）や proteolipid protein（PLP）、myelin oligodendrocyte glycoprotein（MOG）、Myelin associated glycoprotein（MAG）などが抗原となって免疫学的攻撃を受け脱髄がおこるとされる。わが国では小児人口10万人あたり、ADEMは年間60-120例の発症があると考えられる。その中でワクチンと因果関係が指摘できる症例は少なく、数例の日本脳炎ワクチンに関連した症例がある、なしはADEM全体の疫学にほとんど影響を与えないと考えられる。また時間的関連性以外に、先行感染やワクチン接種とADEMとの因果関係を科学的に証明する方法もまだ見いだされていない。

国は、3期ワクチン接種後の重症ADEM症例が疾病・障害認定審査会で因果関係の論拠がある旨の答申を受け厚生労働大臣による因果関係の認定の直後、平成17年5月31日に現行日本脳炎ワクチンの積極的勧奨を一時中止した。現在、十分な説明と承諾があれば希望者には定期接種が可能であるが、実質的には接種はほとんど行われていない。中止が継続されれば感受性者が蓄積してくるので、低いながらも患者発生の危険は徐々に上昇すると思われるが、ワクチン接種が広く行われてきた現時点では小児の年齢別自然感染率が必ずしも明確でないこと、正確な脳炎の顕性発症率が明確でないことなどから、今後の患者