

厚生労働省科学研究費補助金・新興再興感染症研究事業  
「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究」班  
分担研究報告書

『2009年に高知県で発生した日本脳炎の1歳児例』  
分担研究者 脇口 宏 高知大学小児思春期医学

研究要旨

高知県で発生した予防接種歴のない日本脳炎の1歳6カ月女児例を報告した。発熱、嘔吐で発症し、経過中に意識障害、痙攣重積を認めた。診断に重要なことは、日本脳炎が過去の病気ではないことを認識し、積極的に疑うことである。2005年以降の予防接種勧奨差し控え以降、接種率低下による日本脳炎ウイルス感受性者蓄積に伴い、日本脳炎の小児患者が増加することが危惧され、日本脳炎の動向に監視することが重要な時期にある。事実、近年は年少児例の発症が目立ってきている。自験例のような例を増やさないためにも、2009年6月に使用可能となった組織培養ワクチンを勧奨接種に切り替え、定期接種時期を逃した小児を対象としたキャッチアップ接種などの施策が望まれる。とくに浸淫地域では1歳すぎからの日本脳炎ワクチン接種も推奨されてよいであろう。

脇口 宏 高知大学医学部  
小児思春期医学 教授  
前田明彦 同上 講師  
満田直美 同上 医員  
菊地広朗, 大石拓, 森田英雄  
高知県立安芸病院小児科  
島崎洋成 田野病院小児科

A. 研究目的

昨年度の本研究班報告書で、2001年に高知県西部で発生した日本脳炎の小児例を報告した。この例は予防接種歴のない11歳女児であった。

日本脳炎ワクチンは制度の上では定期接種が継続されているが、2005年5月30日以降は厚生労働省健康局結核感染症課からの通達にしたがって、積極的な接種勧奨を差し控えることになった。2009年の6月から、細胞培養により作製されたワクチンが接種可能となったが、

ワクチン不足への懸念から、勧奨差し控えは継続となって、低い接種率に低迷したままで2010年2月現在に至っており、感染感受性者が増加している。今後、日本脳炎が増加しないか監視することがきわめて重要な時期である。今回、我々は2009年に日本脳炎ワクチン接種歴のない1歳6カ月女児の日本脳炎患者を経験したので報告する。

B/C. 症例報告

症例は、高知県東部に位置するT町に在住の1歳6カ月女児。日本脳炎の予防接種歴なし。主訴は発熱、嘔吐、意識障害。2009年8月19日から38℃までの微熱を認めていたが、活気は保たれていた。24日に39℃の発熱、嘔吐・経口摂取不良もあり、25日に近医を受診した。輸液中に顔色不良、呼びかけに対する反応低下を認めたため、県立安芸病院に入院した。近所に豚舎があり、よく蚊に刺されていた。

入院時、体温39.8℃、心拍数154/分、血圧100/60mmHg、呼吸数36/分、酸素飽和度99%意識レベルJCS 10で呼びかけに反応はあり、視線はかろうじて合う程度であった。心・肺・腹部に異常なく、咽頭発赤なし。神経学的所見は、対光反射正常、項部硬直なく、ケルニツヒ徴候陰性であった。

入院時検査(表1)は、末梢血白血球数15,170 /mm<sup>3</sup> (桿状球8%、分節球74%、リンパ球12%、単球6%)と増多を認め、CRPは1.04mg/dlと上昇は軽度であった。8月26日(第8病日)に30分間の全身間代性痙攣を起こした。髄液検査で細胞数 355/3mm<sup>3</sup>、(単核球56%、多核球44%)と増加し、蛋白27mg/dl、糖88mg/dlと正常であった。髄液単純ヘルペスウイルスDNA-PCRは陰性であった。8月27日(第9病日)の頭部MRI拡散強調画像で大脳前頭葉皮質に高信号域を認めた(図1)。この時点でウイルス性髄膜脳炎と診断した。

近所に養豚業者ができたこと、よく蚊に刺されていたという情報を得たので、日本脳炎血清抗体をHI法で調べたところ、急性期1:20、回復期1:160と有意な上昇を認めた。さらに、第8病日に採取した髄液を国立感染症研究所の高崎智彦博士に送付し、髄液中日本脳炎IgM抗体をELISA法で調べた。患児髄液の陰性対照とのOD値の比率(P/N比)が2.34と高値で(P/N ratio 2.0以上を陽性と判定)、日本脳炎ウイルスIgM抗体陽性であった。髄液ウエストナイルウイルスIgM抗体は陰性(患児のIndex 0.11、1.1以上が陽性、0.9未満が陰性)、日本脳炎ウイルス遺伝子はTaqMan法、nested RT-PCR法ともに陰性であった。以上の結果、日本脳炎と確定診断した。

抗菌薬、アシクロビル静注、グリセオールで加療した(図2)。痙攣は反復せず、意識障害

は3日間持続したが、徐々に清明となった。有熱期間は計15日間で徐々に解熱した。13病日の頭部MRIでは明らかな異常を認めず、診察上も神経後遺症は認めず9月12日(入院19日目)に退院、外来フォローとした。

#### D. 考察

自験例の臨床経過は、発熱、嘔吐で発症し、意識障害、痙攣を伴った。中等度の髄液細胞増多と頭部MRIで一過性の大脳皮質巣状病変を認めた。幸い明らかな神経後遺症は遺さなかった。発達遅滞や情緒障害、発達障害など年齢的に感知しがたい後遺症がおくられて出現する可能性が否定できず、長期の外来フォローアップを行う予定である。

日本脳炎のMRI所見について、2007年に縄田は(縄田昌浩: 日本脳炎のMRI所見. 京都医学会雑誌, 54: 123-127, 2007)、MRI検査でT2強調像における視床、大脳基底核などの高信号は、日本脳炎に特徴的な所見であると報告している。Prakashらは(Prakash M, et al.: Diffusion-weighted MR imaging in Japanese encephalitis. J Comput Assist Tomogr 28: 756-61, 2004)、日本脳炎における拡散強調画像の有用性を報告している。さらに、Dungらは、本症の病変は、視床、大脳皮質の順に頻度が高いとし、視床病変はJEVに比較的特異的な病巣であった(Dung NM, et al.: An evaluation of the usefulness of neuroimaging for the diagnosis of Japanese encephalitis. J Neurol, 2009)と報告している。患児でみとめられた大脳皮質の病巣は日本脳炎に特異的とはいえませんが、比較的多い所見といえる。

急性脳炎(髄膜脳炎)で、視床下部病変があれば日本脳炎である確率が高いが、特異的な画像所見がなくても、つねに本症を疑うこと

が重要である。日本脳炎は決して過去の病気ではなく、予防接種率の低下した2005年以降は、とくに注意して監視すべき疾患である。流行期である7月から11月までに発症した例では、積極的に日本脳炎を疑い、血清および髄液抗体を検索する必要性を改めて痛感した。

高知県ではブタを対象とした調査を毎年実施しているが、7～9割が日本脳炎ウイルスに感染を受けており、浸淫地域である。自験例は、自宅近所に養豚業者があり、また、蚊に刺されることが多かったため日本脳炎ウイルスに感染するリスクが大きかった。年齢が1歳6カ月であり、日本脳炎ワクチンの定期接種の推奨年齢である3歳以前の年少時発症であった。

国立感染症研究所感染症情報センターからの報告によると(表2)、1991年～2009年の我が国の日本脳炎報告患者数は計96人である。ワクチンが積極的勧奨差し控えとなった2005年以降の年次推移は、7人/年、8人/年、9人/年、3人/年、3人/年で、2000～2004年の7人/年、5人/年、8人/年、1人/年、5人/年と比べて、患者増加はきわだったものではない。しかし、年少例が増加傾向にある可能性がある。

日本脳炎の好発年齢のピークは60—70歳代で、5歳未満は自験例を含めて2例(2.1%)のみで、5～9歳と10～19歳がそれぞれ3例(3.1%)であった(表2)。高齢者の患者が多いことは、日本、韓国、台湾など予防接種が徹底されている地域に共通の疫学的特徴であり、予防接種導入が遅れているアジア諸国で小児期にピークがある(Kumar R, Tripathi P, Singh S, Bannerji G.: Clinical features in children hospitalized during the 2005 epidemic of Japanese encephalitis in Uttar Pradesh, India. Clin Infect Dis 43:123-31, 2006)ことと対照的である。1歳6カ月の自験例は、過去19年

は最年少例であった。2006年に熊本県で3歳児が、2009年におなじく熊本県で7歳児例が報告されており、ワクチン接種率が低下した2005年以降は、年少例の報告が目立つ。

2005年5月30日から、重篤なADEM例発生をきっかけに積極的な日本脳炎ワクチン予防接種勧奨を差し控えている。2009年6月に新しく細胞培養で作製されたワクチンが接種可能となったが、対象者が殺到しワクチンが不足するかもしれないとの懸念から、勧奨差し控えは継続のままで現在に至っている。予防接種率低下のために感染感受性者が増加し、小児例の増加が危惧される。今後も引き続き日本脳炎の発症動向に注意が必要である。

ブタの調査結果は昔同然のウイルス蔓延を示唆しており、定期接種を中止ししてもよいとする根拠は見当たらない。接種可能となった細胞培養ワクチンは、接種券が配られていない市町村が多く、接種券を求めなくても消極的な声掛けがなされ、接種を見合わせる者も少なくない。当初不足が予想された新ワクチンも市場でだぶついているのが現状と聞く。「ワクチン接種率低下→疾病増加→予防接種再開」の歴史は繰り返したくない。より科学的かも知れないが人道的とはいえないからである。勧奨接種の再開、市民への啓発と、キャッチアップ接種など積極的施策が望まれる。

自験例のような1歳児の日本脳炎症例は、過去30年をふりかえっても多いわけではない。予防接種推奨年齢をただちに現状の3歳から引き下げるべきかどうかについては、慎重に評価すべきであろう。ただし中国では1歳、台湾では15カ月、タイでは18カ月で接種している(Mackell SM: Vaccinations for the pediatric traveler. Clin Infect

Dis. 37:1508-16, 2003)。日本においても、特に浸淫地域においては、1歳で接種することは、定期接種の枠であるし、免疫応答も3歳時と遜色ないと推測されるので、推奨されてよいと考える。

## E. 結論

予防接種歴のない日本脳炎の1歳6カ月女児例を報告した。診断に重要なことは、日本脳炎が過去の病気ではないことを認識し、積極的に疑うことである。2005年以降の予防接種勧奨差し控えに対し、WHO(2006)は、「日本で政策を変更したことは望ましいことではない」という見解を表明した。接種率低下による日本脳炎ウイルス感受性者蓄積に伴い、日本脳炎の小児患者が増加することが危惧され、日本脳炎の動向に監視することが重要な時期にある。日本脳炎ワクチン勧奨差し控え。2009年6月以降に組織培養ワクチンが使用可能となったので勧奨接種を再開し、定期接種時期を逃した小児を対象としたキャッチアップ接種など施策が望まれる。とくに浸淫地域では1歳すぎからの日本脳炎ワクチン接種も推奨されてよいであろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

脇口 宏：小児の無菌性髄膜炎。今日の治療指針2009(山口徹，北原光夫，横井次矢・総編集)：1039-1039，医学書院2009

脇口 宏：小児感染症のすべて。II 感染症の原因微生物別に小児感染症を考える。1

3. サイトメガロウイルス，EBウイルス。化学療法の領域 25(増)：1095-1104，2009

前田明彦，藤枝幹也，脇口宏：世界標準にはるかに及ばないわが国の予防接種体制-水痘ワクチンの2回接種の必要性。日本医師会雑誌 138：694-696，2009

DOHNO S, MAEDA A, ISHIURA Y, SATO T, FUJIEDA M, WAKIGUCHI H: Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. *Pediatr Internat* (in press)

## 2. 学会発表

前田明彦，佐藤哲也，堂野純孝，脇口宏：シンポジウム：炎症疾患をどう理解するか「EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)」。第41回日本小児感染症学会 2009年11月福井

三浦紀子，前田明彦，高杉尚志，佐藤哲也，武市知己，脇口宏：Haemophilus parainfluenzaeによる中枢神経感染症の2例。第41回日本小児感染症学会 2009年11月福井

佐藤哲也，玉城 渉，前田明彦，木原一樹，山遠 剛，高杉尚志，堂野純孝，佐藤哲也，藤枝幹也，小倉英郎，脇口 宏：妊婦健診で母の梅毒血清反応が陰性であった先天梅毒の1例。第41回日本小児感染症学会 2009年11月福井

## H. 知的財産権の出願・登録状況

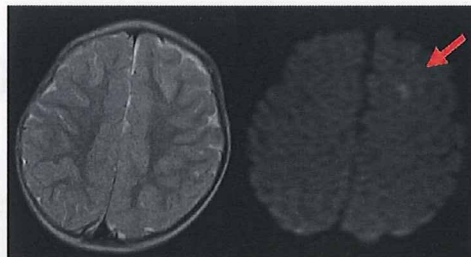
1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

### 表1. 入院時(8月25日)検査

RBC	442 × 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	CRP	1.04 mg/dl	検尿	
Hb	11.2 g/dl	TP	6.9 g/dl	蛋白	—
Ht	33.1 %	T-bil	0.45 mg/dl	潜血	—
Plt	22.0 × 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	AST	35 IU/l	糖	—
WBC	15,170 /mm <sup>3</sup>	ALT	9 IU/l	ケトン	1+
Band	8 %	LDH	279 IU/l	WBC	—
Poly	74 %	CK	38 IU/l	リコール (8月27日)	
Ly	12 %	BUN	4.8 mg/dl	細胞数	355/3 mm <sup>3</sup>
Mono	6 %	Cr	0.20 mg/dl	単核	56 %
		Na	135 mEq/l	多核	44 %
		K	4.13 mEq/l	蛋白	27 mg/dl
		Cl	97 mEq/l	糖	88 mg/dl
				HSVPCR	陰性

8月27日



9月1日

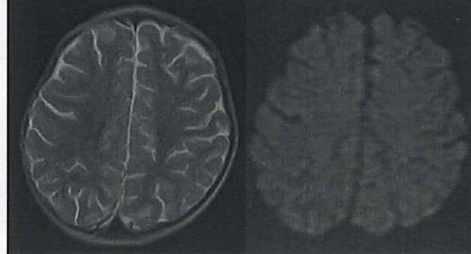


図1. 頭部MRI



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

急性脳炎患者への $\gamma$ -グロブリン製剤投与と日本脳炎血清診断

代表研究者 高崎智彦（ウイルス第一部第二室・室長）

協力研究者 脇口 宏（高知大学医学部小児思春期医学）

山遠 剛（国立病院機構高知病院小児科）

石井亜紀子（筑波大学臨床医学系神経内科）

研究要旨：急性脳炎の患者に対する治療として、時に $\gamma$ -グロブリン製剤が使われることがある。急性脳炎患者への $\gamma$ -グロブリン製剤投与という治療法に関しては異論もあるが、この報告書においては、日本脳炎の血清診断に対する影響について報告する。日本国内で製造されている $\gamma$ -グロブリン製剤は、日本脳炎ウイルスに対する抗体が陽性である場合が多い。しかしながら、ロットごとにその抗体は測定されていない。日本脳炎抗体陽性の $\gamma$ -グロブリン製剤を3日間、投与された小児症例では、抗体が陰性から陽性となり、日本脳炎が疑われたが中和抗体価が40倍と低く、6ヵ月後の血清では日本脳炎抗体陰性となり、 $\gamma$ -グロブリン投与による抗体上昇であったと結論された。一方、やはり、日本脳炎抗体陽性の $\gamma$ -グロブリン製剤が5日間投与された成人症例では、保存されていた髄液中のIgM抗体が確認されたことで日本脳炎であったことが確認された。髄液中の日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系における増殖により誘導されるものであり、実験室診断として非常に重要である。また、 $\gamma$ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、 $\gamma$ -グロブリン投与による影響を考えなければならない。

A. 研究目的

急性脳炎症例の治療に $\gamma$ -グロブリン製剤が使用された場合、我が国の $\gamma$ -グロブリン製剤には、抗日本脳炎抗体陽性の製剤があり、このような製剤の投与により日本脳炎抗体価が上昇すると誤診断を生じる可能性がある。 $\gamma$ -グロブリン製剤を投与された急性脳炎症例について検討した。その可能性およびそのような急性脳炎症例においての誤診断の生じない日本脳炎実験室診断法について

検討した。

B. 研究方法

$\gamma$ -グロブリン製剤を投与された急性脳炎2症例について検討した。症例は発病時期としては、5月下旬および11月上旬に発病した症例であり、日本脳炎の発病時期としては比較的稀であるが、可能性はある時期であり、日本脳炎に関する抗体が実施された。

（症例1）

患者は6歳女児、2008年11月3日に

嘔吐・下痢で発病し、11月10日に痙攣等神経症状を呈し、反応が低下し救急搬送後入院となった。意識障害が持続し急性脳症として治療開始、11月11日から13日まで3日間 $\gamma$ -グロブリン計7.5gが投与された。入院時の日本脳炎抗体（CF法）は4倍未満と陰性であった。

（症例2）患者は64歳男性。2008年5月27日発症、5月30日から6月3日まで $\gamma$ -グロブリン（5g/day）を連日5日間投与した。8月に日本脳炎抗体（HIおよびCF）上昇を確認した。本患者の髄液は5月29日から7月23日まで6回にわたり経時的に採取保存されていた。髄液中のウイルス遺伝子検査および日本脳炎特異的IgM抗体検査を実施した。

### C. 研究結果

症例1、投与された $\gamma$ -グロブリン製剤は中和抗体価640倍、IgG ELISA抗体価は1280倍以上とかなり高い抗体価であった。また、IgM抗体は検出されなかった。患者の抗体検査結果は、中和抗体が<10xから40倍に上昇し、IgG抗体は陽性となった。IgM抗体はIgM捕捉ELISA法によりP/N比2.2（2.0以上を陽性と判定する）と弱陽性を示した。発病約半年後の2009年5月27日の血清では、中和抗体およびIgG抗体、IgM抗体いずれもが陰性となった。本症例に関しては日本脳炎は否定され、日本脳炎抗体陽性の $\gamma$ -グロブリン投与による抗体上昇と考えられた。

本症例に投与された $\gamma$ -グロブリン製剤の同一ロットは、IgG抗体価1280倍以上、中和抗体価640倍であった。

症例2、8月に日本脳炎抗体（HIおよびCF）上昇を確認した。 $\gamma$ -グロブリン投与前はCF法にて4倍が8月には16倍となった。5月29日から7月23日まで6回にわたり経時的に保存されていた髄液に関してウイルス遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR法）は陰性であったが、日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体が5月29日から6月19日までが陽性であり、P/N比は6月4日の髄液においてピークをしめし、6月27日の髄液で陰性となった（表2）。髄液中の日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系における増殖を意味することから日本脳炎と結論された。

本症例に投与された $\gamma$ -グロブリン製剤の同一ロットの日本脳炎抗体価は、IgG抗体価640倍、中和抗体価160倍であった。

### D. 考察

高い日本脳炎抗体を含有する $\gamma$ -グロブリン製剤を急性脳炎患者に投与した場合、日本脳炎抗体価が上昇することがある。特に投与前の抗体が陰性であった場合、抗体陽性になったことから、日本脳炎であると判定する可能性が高い。したがって、 $\gamma$ -グロブリンの投与のあった急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、 $\gamma$ -グロブリン投与による影響を考えなければならない。この場合、さらに1ヵ月後、2ヵ月後の抗体を測定し抗体価（中和抗体、HI抗体、CF抗体、ELISA法によるIgG抗体）の低下傾向の有無を確認する必要がある。もし、低下傾向が認められれば $\gamma$ -グロブリン投与による影響を考慮しなければならない。もちろん急性期に上昇し、その後低下する



IgM 抗体はこの範疇にはない。症例 1 においては、脳炎発症後 9 日目の血清で IgM 抗体が弱陽性を示したが、IgM 抗体は P/N 比 2.0 以上を陽性と判定するが、日本脳炎患者では通常もっと高値を示す場合が多い。γ-グロブリン製剤中にわずかに抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体が含まれていた可能性あるいは何らかの非特異反応である可能性も否定できない。教科書的には IgM 抗体は、ワンポイントの検査で陽性であれば確定診断が可能であるとされている。しかしながら、血清中の IgM 抗体陽性は数週間から数ヶ月続く場合があること、非特異反応をきたす場合もあることを考慮すると 2 ポイント、できればペアー血清によって診断されることがのぞましい。

髄液中の日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系における増殖により誘導されるものであり、実験室診断として非常に重要である。また、γ-グロブリン製剤の投与にも左右されない。日本脳炎の場合、髄液中からウイルス遺伝子を検出できる可能性は、脳炎発症後 1-2 日以後急激に低下する。しかし、髄液中からウイルス遺伝子が検出されなくとも IgM 抗体検査により判定することが可能である。したがって、髄液の採取と保存は実験室診断上極めて重要である。

#### E. 結論

γ-グロブリンの投与のあった急性脳炎症例で日本脳炎抗体上昇が低い場合、γ-グロブリン投与による影響を考えなければならない。

髄液中の日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体陽性は、日本脳炎ウイルスの中樞神経系

における増殖により誘導されるものであり、実験室診断として非常に重要である。

髄液による診断ができない場合は、さらに 1-2 ヶ月後の抗体を測定し、抗体価の低下傾向の有無を確認する必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表 (英文)

- 1) Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.
- 2) Tajima, S., Nerome, R., Nukui, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. *Virology*, 396: 298-304, 2010.

##### 論文発表 (和文)

- 1) 田島茂、高崎智彦。日本脳炎。診断と診療、97 (10) 2097-2100, 2009.

##### 学会発表

- 1) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成 21 年 6 月)

- 2) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析。第57回日本ウイルス学会学術集会（平成21年10月）
  
- 3) 田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルスE蛋白質上のアミノ酸置換。第57回日本ウイルス学会学術集会（平成21年10月）
  
- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：デング1型ウイルス非構造蛋白質NS4AのN末端側領域の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会（平成21年10月）
  
- 5) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松勉、林昌宏、倉根一郎：イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第57回日本ウイルス学会学術集会（平成21年10月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1、日本脳炎抗体検査結果（症例 1）

検体	採取日	抗 JEV-IgM 抗体 (ELISA 法)	抗 JEV-IgG 抗体 (ELISA 法)	中和抗体 (プラーク減少法)
髄液	11/11	陰性	陰性	陰性 (<10x)
血清	11/10	陰性	陰性	陰性 (<10x)
血清	11/19	弱陽性 (P/N 比=2.2)	陽性 (200x)	陽性 40x
血清	2009/5/27	陰性	陰性	陰性 (<10x)

破線の間に  $\gamma$ -グロブリンが投与された。IgM 抗体は P/N 比 2.0 以上を陽性とするが、日本脳炎患者では通常もっと高値を示す場合が多い。 $\gamma$ -グロブリン製剤中にわずかに抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体が含まれていた可能性あるいは何らかの非特異反応である可能性も否定できない。また、IgG 抗体および中和抗体も弱陽性であったが、半年後（2009 年 5 月）の検査結果では IgG 抗体および中和抗体陰性となった。

表 2、日本脳炎抗体検査結果（症例 2）

検体 ID	採取日	IgM 抗体/P/N 比
08-05_csf_1	5/29	陽性 2.27
08-05_csf_2	6/4	陽性 6.13
08-05_csf_3	6/19	陽性 3.03
08-05_csf_4	6/27	陰性 1.65
08-05_csf_5	7/3	陰性 0.90
08-05_csf_6	7/23	陰性 0.85

$\gamma$ -グロブリン製剤（5g/day）は 5 月 30 日から 6 月 3 日まで投与された。

伴侶動物および野生動物における日本脳炎感染状況の調査

分担研究者 前田 健 （山口大学農学部獣医微生物学教室・教授）

**研究要旨**

ヒトへの日本脳炎ウイルスの感染の可能性を調べるために、全国で飼育されている飼育犬および和歌山県の野生動物の日本脳炎抗体保有率を調査した。その結果、(1) 日本脳炎抗体陽性率は全体で 25%、室内飼育犬で 8%、室外飼育犬で 45%であった。(2) 北海道と東北地方における陽性率はそれぞれ 0%と 9%で、東北地方の結果は他地域と比較して有意に低く、四国と九州地方の陽性率は 61%と 47%で、他地域と比較して有意に高かった。特に四国と九州地方の室外飼育犬の陽性率は 75%と 77%であり、ほとんどのイヌが日本脳炎感染歴を有することが示された。(4) 農村部のイヌは、都市部や住宅地のイヌと比較して有意に抗体陽性率が高かったが、都市部や住宅地でも日本脳炎ウイルスに感染していることが示された。(5) ユビナガコウモリの 33%が日本脳炎に対する抗体を保有していた。また、シカ、イノシシ、アナグマ、イタチ、テンにも日本脳炎感染歴が示された。特にシカは 94%の抗体保有率であった。更に、2003 年にウマに致死をもたらした JEV/eq/Tottori/2003 株の全塩基配列を決定した。現在国内で流行している genotype I である他の分離株と比較した結果、大きな違いが認められなかった。

**A. 研究目的**

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) はヒト、ウマなどに感染し、時に致死的な症状を引き起こす。国内では、ブタにおける JEV 感染の調査を実施することにより、日本脳炎の流行を定期的に把握している。しかし、養豚場の都市部からの隔離、農業形態の変化による媒介蚊の分布、地球温暖化、外来移入種の増加など様々な要因が日本脳炎ウイルスの生態に影響を与えていると考えられている。

一方、ヒトでの患者は年間 10 名以下にとどまっている。これは日本脳炎予防接種の効果であると考えられているが、現在は予防接種の積極的勧奨が取り止められており、ワクチン接種を受けていない子供が増加することから、日本脳炎患者の増加が危惧されている。更に、2003 年には北海道から移動されたワクチン未接種のウマで 18 年ぶりの日本脳炎の発生が報告されている。

本研究ではブタでの流行予測調査が国内の JEV 感染の実態を反映しているのか、現在もヒトや動物が日本脳炎感染の脅威にさ

らされているのかを、伴侶動物と野生動物の調査を実施することにより検証した。

**B. 研究方法**

**1. 血清**

イヌの血清：2006 年から 2007 年にかけて全国の動物病院に来院した飼育犬合計 652 頭から血液を採取し血清を回収した。その際に、年齢以外に飼育形態（室内飼育・室外飼育・両方）、飼育地域（農村部・住宅地・都市部）を飼い主にアンケートした。

更に沖縄県衛生環境研究所の仁平 稔先生より沖縄本島北部の動物病院で集められたイヌ血清 72 検体を分与していただいた。

ユビナガコウモリの血清：2009 年 5 月 9 日に綿山県田辺市導水路にて 50 頭のユビナガコウモリを捕獲し、血清を回収した。捕獲された 28 頭の雌のうち 25 頭が妊娠していた。ユビナガコウモリの捕獲には和歌山県知事の許可を得ている。

野生動物の血清：有害鳥獣、錯誤捕獲、交通事故等で得られた野生動物から血清を回収した。これは和歌山県田辺市ふるさと自然公園センターの鈴木和男先生のご協力に

よる。本年度は2008年から2009年にかけて捕獲した血清を調査した。

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。

(倫理面への配慮)

イノシシ・タヌキに関しては、狩猟期に捕獲あるいは交通事故により死亡したもの、アライグマは特定外来種として捕獲されたものと交通事故により死亡したものを調べた。

飼育犬に関しては、調査研究に利用する旨の承諾を飼い主に得て採血している。

## 2. ウイルス

JEV Genotype IであるJEV/sw/Chiba/88/2002株(国立感染症研究所高崎智彦先生より分与)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。

また、2003年に鳥取県で日本脳炎を発症したウマより分離されたJEV/eq/Tottori/2003株を用いた。このウイルスはマウス乳剤よりC6/36細胞で1代継代後、Vero細胞で増殖した。プラーク純化は行っていない。

## 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倍から倍まで階段希釈し、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。

## 4. 塩基配列の決定

JEV感染細胞よりRNAをQIAGEN RNA Mini Kitを用いて回収し、TaKaRa RNA LA PCR Kitを用いてRT-PCRを実施した。得られた断片をQIAGEN PCR Purification Kitで精製後、ABI Big-Dye Sequencing Kit Ver3.1にて反応を行い、塩基配列を決定した。

5'末端と3'末端の塩基配列を決定するために、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen)を用いた。

## 5. 有意差検定

得られたデータの解析には $\chi^2$ 検定を実施し、 $p < 0.05$ のものを有意差ありとした。

## C. 研究結果

### 1. 飼育犬におけるJEV抗体保有状況全国調査

2006年から2007年にかけて47都道府県の飼育犬から最低10頭ずつ採血しJEV抗体保有状況を調査した。その結果、652頭中164頭の27%がJEV感染歴を有していた。飼育形態別にみると室外飼育犬が45%であったのに対し、室内飼育犬は8%が陽性で、有意差が認められた( $p < 0.05$ )。一方、性別(オス28%、メス25%)では有意差は認められなかった。47都道府県を9地方に分類して陽性率を比較した結果、北海道(0%)と東北(9%)は他の地域と比較して有意に陽性率が低かったのに対して、九州(47%)と四国(61%)は他地域と比較して有意に陽性率が高かった(図1)。さらに、九州と四国の室外飼育犬はそれぞれ75%と77%の高い抗体保有率であった(図2)。

### 2. 飼育犬におけるJEV抗体価の比較

イヌにおける抗体価を比較した結果、室外飼育犬における抗体価は南の地域になるほど抗体価が高くなる傾向があった(図3)。一方、室内飼育犬の抗体価は非常に低く、地方別の違いは認められなかった(表2)。

### 3. 飼育地域別の抗体保有率の比較

飼い主へのアンケートにより、飼育地域を市街地、住宅地、農村に分けて、JEVの抗体保有状況を調べた。結果、農村においては飼育犬の43%がJEV抗体陽性であるのに対し、住宅地は21%、市街地は24%であり、有意差が認められた(表3)。

#### 4. 沖縄県の再調査

沖縄県は最南端であるにもかかわらず、全国調査では6%の陽性率しか認められなかった。調査した動物病院が沖縄県南部に集中していたため、本班班員の沖縄県衛生環境研究所の仁平 稔先生より分与していただいた北部のイヌ血清の抗体保有状況を調査した。その結果、72%がJEV抗体陽性であり、南部より有意に抗体保有率が高かった(図4)。

#### 5. 年齢別の比較

日本脳炎の感染する機会は年齢が高くなるのに従い多くなると考えられる。そこで、室外飼育犬を年齢別にJEV抗体保有率を比較した結果、年齢が高いほどJEV抗体陽性率が高くなる傾向はあるものの有意差は認められなかった(図5)。

#### 6. 和歌山県のコウモリを含む野生動物の疫学調査

和歌山県で2008年から2009年にかけて捕獲されたユビナガコウモリは33%、イノシシは63%、シカは94%が抗体陽性であった。それ以外にもアナグマ、テン、イタチ、キツネもJEV陽性であった(表4)。

#### 7. JEV/eq/Tottori/2003の全塩基配列

現在、国内で主に流行しているウイルスはgenotype Iに分類される。しかし、このウイルスはマウスに対して病原性が低いことが知られている。今回、2003年に鳥取県のウマに致死をもたらしたウイルスJEV/eq/Tottori/2003の全塩基配列を決定した。その結果、典型的なgenotype Iであり、他の株と異なる特徴的な変異は認められなかった(図6, 7)。系統樹解析では他の日本分離株と比べて中国の株に近かった(図6)。

#### D. 考察

1. イヌの調査により、九州・四国地方は他地域よりJEVが蔓延していることが分かった。
2. 室内飼育犬にも抗体陽性が存在し、媒介蚊の室内への侵入が示唆された。
3. 抗体価の比較により、九州・四国地方のイヌは何度もJEVに感染していることが示された。
4. 農村部は都市部や住宅地よりもJEV感染の危険性が高いことが示された。しかし、都市部や住宅地にも感染の危険性があることが確認された。
5. 沖縄県で示されるように、同じ県でも地域によりJEVの感染率が異なることから、地域別の調査が重要であることが示された。
6. Genotype Iはマウスにおいて病原性が低く、弱毒株であるという意見も多いが、ウマに致死をもたらした株は他の株と大きな違いは認められず、Genotype Iのマウスでの病原性とヒトやウマでの病原性は異なる可能性が示された。
7. コウモリは日本脳炎ウイルスの増幅動物の可能性があるとされている。そこで和歌山県で捕獲されたユビナガコウモリのJEV抗体保有率を調べた。その結果、他の野生動物に比べて、高くないものの3分の1が日本脳炎に感染していた。
8. 多くの野生動物にJEVが感染していたが、94%のシカにJEV抗体が存在した。1950年代にはウシにもJEVによる脳炎が報告されていることから偶蹄類はJEVの感受性が高いのかもしれない。

#### E. 結論

飼育犬のJEV抗体保有率の結果はブタでの日本脳炎流行予測調査結果と多くの点で一致していた。しかし、ブタがあまりいない地域でも調査可能であるという利点があり、その調査の結果、以前として、西日本を中心としてJEV感染の危険性が高いと考えられた。更に、同一県内でも地域差を考慮する必要があることが示された。室内飼育犬での調査は、室外に出ることが少ない幼児や老人も日本脳炎に対する注意喚起が必要であると考えられた。現在、日本で流行しているgenotype Iはマウスでの病原性が低いため、弱毒であると考えられがちで

あるが、ウマに致死をもたらした株も他の株とあまり異なっていないことから、より慎重な判断が必要であることが示された。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohno Y, Sato H, Suzuki K, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, Sashika M, Inokuma H, Kai K, Maeda K\*. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2009. 71(8):1035-1039.

前田 健「イヌジステンパーウイルスおよび日本脳炎の抗体保有状況と課題」兵庫県におけるアライグマの現状（兵庫県森林動物研究センター研究部編集）第6章 p55-65, 2009

##### 2. 学会発表

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、望月雅美、前田 健「イヌにおける日本脳炎ウイルス感染状況（全国調査）」第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月（北海道）

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの抗体保有状況から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」第46回山口県獣医学会、2009年8月（山口）

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの全国調査から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月（鳥取）

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、田丸精治、亀尾由紀、寺田 豊、望月雅美、前田 健「イヌの抗体保有状況から再確認された日本脳炎ウイルスの蔓延」平成21年度日本獣医公衆衛生学会[中国]、2009年10月（島根）

#### 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

表1 伴侶動物で調査する理由

ヒトと生活空間を共有する  
 陽性はヒトへの感染の可能性を間接的に示唆する  
 (特に室内飼育動物)  
 ワクチンを接種していない  
 陽性は過去の感染  
 アメリカではウエストナイルウイルスによりのイヌが  
 脳炎で死亡している  
 日本脳炎ではないのか？

表2 室内飼育犬の抗体価

都道府県	中和抗体価	
青森	1:10	
山形	1:10	1:10
福島	1:10	
栃木	1:10	
茨城	1:10	
山梨	1:20	
静岡	1:10	>1:320
京都	1:80	
鳥取	1:10	1:10
広島	1:10	
長崎	1:10	
大分	>1:320	
宮崎	1:10	1:20
鹿児島	1:10	

表3 日本脳炎抗体保有率(飼育地域)

全体	市街地		住宅地		農村	
	検査頭数	陽性率	検査頭数	陽性率	検査頭数	陽性率
北海道	0	—	8	0.0%	0	—
東北	8	12.5%	54	9.3%	12	0.0%
関東	9	22.2%	33	21.2%	6	16.7%
中部	14	21.4%	69	10.1%	54	31.5%
近畿	12	25.0%	69	18.8%	12	50.0%
中国	10	20.0%	38	21.1%	10	50.0%
四国	4	25.0%	15	73.3%	24	62.5%
九州	11	36.4%	47	38.3%	29	72.4%
沖縄	3	33.3%	9	0.0%	5	0.0%
計	71	23.9%	334	20.7%	152	42.8%

表4 和歌山県の野生動物における  
日本脳炎抗体保有率

動物種	検査頭数	陽性頭数	陽性率
ユビナガコウモリ	45	15	33%
イノシシ	27	17	63%
シカ	17	16	94%
アナグマ	4	2	50%
テン	3	1	100%
イタチ	2	2	100%
キツネ	1	1	100%
2008年度調査結果			
アライグマ	68	47	69%
イノシシ	36	30	83%
タヌキ	19	12	63%



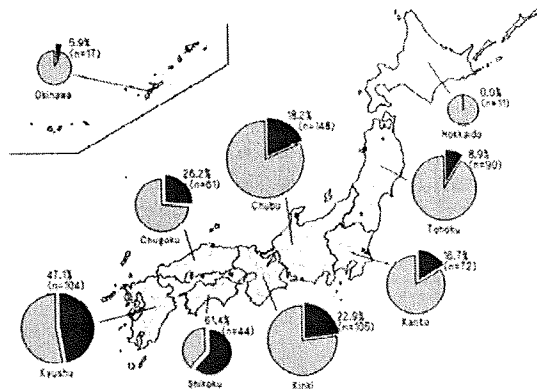


図1 飼育犬のJEV抗体保有率

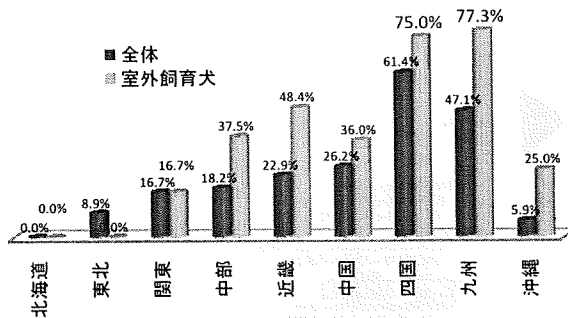


図2 室外飼育犬の日本脳炎抗体保有率

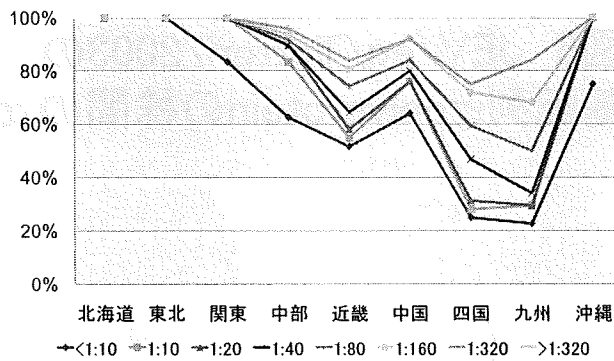


図3 室外飼育犬の抗体価

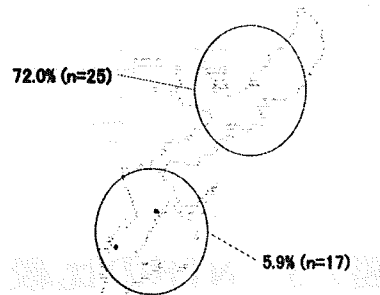


図4 沖縄県における抗体保有状況

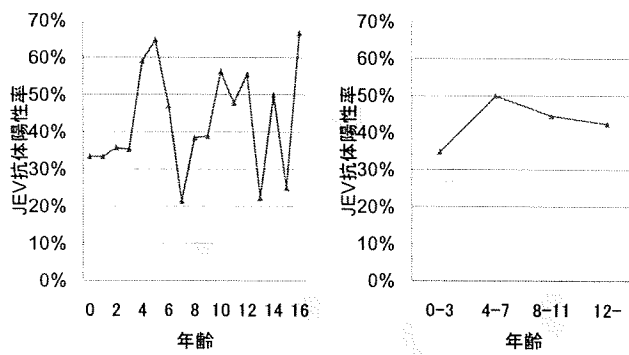


図5 年齢別の日本脳炎抗体保有率

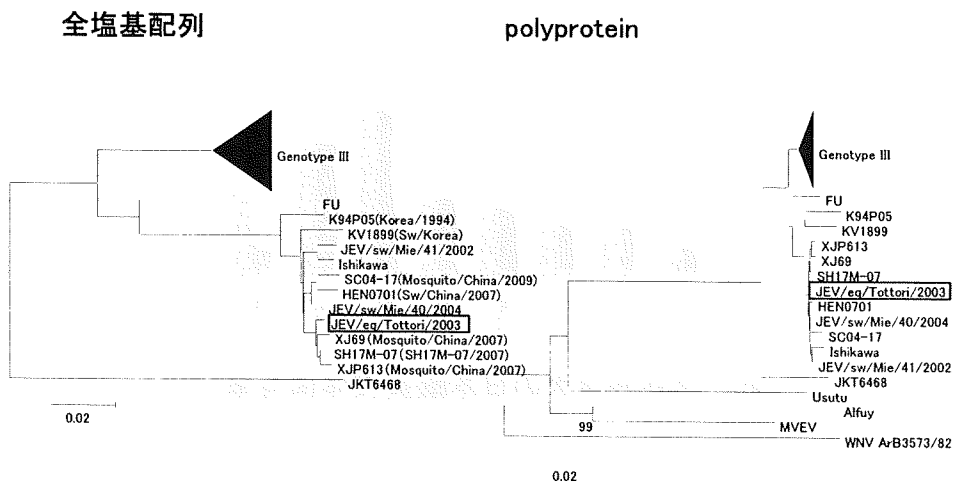


図6 JEV/eq/Tottori/2003の全塩基配列とpolyproteinの株間の比較

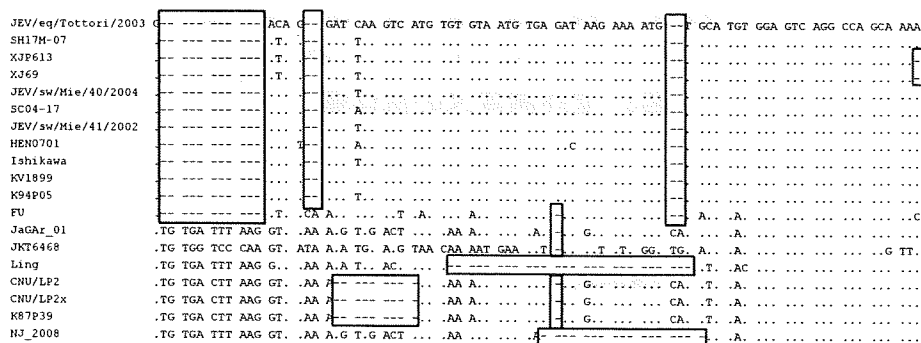


図7 3'-NTRの比較

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究

沖縄島において 1985～2009 年に実施された日本脳炎ウイルス感染源調査

研究分担者 玉那覇 康二（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班班長）

研究協力者 仁平 稔（沖縄県衛生環境研究所衛生科学班）

研究要旨：沖縄県沖縄島で実施されている日本脳炎ウイルス(JEV)感染源調査では、赤血球凝集抑制(HI)試験によりブタの JEV 抗体保有状況を調査している。1985～2009 年の調査記録から沖縄島の JEV 活動の現状と今後の調査法の改善点を検討したところ、近年の JEV 抗体陽性率の年間最高値の低下と JEV 抗体陽性率が 50%以上を示す時期の遅れが確認された。現在の調査は 4 月下旬から 8 月まで実施されているが、沖縄島の JEV 活動が最も活発になる時期に調査が行われていない可能性があることから、今後は調査期間を延長する必要があると考えられた。また、月ごとの平均 JEV 抗体陽性率および HI 価は JEV 抗体陽性率の年間最高値が低下する以前から低下しており、この期間は同じ年月内の調査でも回毎で結果に差があったと考えられた。ブタ血液の採血時に対象農家の指定は行っていなかったことから、農家や地域で JEV 活動に差があるのか、沖縄島全体で低下しているのかを明らかにするためにも、今後は採血時に農家や地域を指定することが必要である。

A. 研究目的

厚生労働省、国立感染症研究所、都道府県および都道府県衛生研究所等が協力して実施している感染症流行予測調査事業では、我が国における日本脳炎ウイルス(JEV)活動状況の把握のため、赤血球凝集抑制(HI)試験によりブタ血中 JEV 抗体保有状況を調査する JEV 感染源調査が行われている。沖縄県も当事業には参加しており、沖縄島での調査結果に基づいて日本脳炎注意報を発令、県民に JEV 感染への注意喚起を行っている。しかし近年、注意報の発令時期が遅れ、2009 年には発令がされなかった。沖縄島の JEV 活動が低下したのか、現行の調査法では JEV 活動を把握できていないのかを明らかにすることは、県民あるいは沖縄県を訪れる観光客の JEV 感染予防の点からも極めて重要である。そこで 1985～2009 年までの調査記録から沖縄島の JEV 活動の現状と調査法の改善点を検討した。

B. 研究方法

当所に記録されていた 1985～2009 年の JEV 感染源調査結果を用いた。年によって若干異なるが、調査は 4 月下旬から 8 月まで毎週 1 回実施し、検体は沖縄島北部および中南部の農家からと畜場に搬入された 5～8 ヶ月齢のブタの血液をそれぞれ 25 検体採集している。採血はと畜場の職員により行われ、採血時に農家の指定はしていない。JEV 抗体の検出は血液から血清を分離後、1:10～1:5120 まで 2 倍階段希釈し、感染症流行予測調査事業検査術式に則り赤血球凝集抑制(HI)試験により実施している。1:40 以上で陽性のものは 2-メルカプトエタノール感受性抗体(IgM 抗体)の検出を行っている。なお、2008、2009 年は中南部における調査は実施していない。

また、調査当時のブタ飼養および水田の分布状況を調べるため、沖縄県農林水産部農業関係統計を使用した。

(倫理面への配慮)

ブタ血液検体については、と畜場に搬入されたブタからと殺時に採血したものであることから、倫理面の問題はないと判断した。

### C. 研究結果

図1に北部および中南部のJEV抗体陽性率の年間最高値を示した。1985年に中南部が80%以下を示したが、1986～2004年までは北部、中南部ともに80%以上を示した。しかし、中南部において2005年に80%を、2006、2007年に50%を下回り、北部においては2007年まで80%以上を示したが、2008年に80%を、2009年に50%を下回った。図2に北部および中南部の各年で初めてJEV抗体陽性率が50%以上となった時期を示した。北部の2005～2008年、中南部の2001、2005年は7月中旬以降に初めて50%以上を示した。

図3に北部および中南部の5～9月それぞれの平均JEV抗体陽性率を示した。平均JEV抗体陽性率は各年5～9月のうち、2回以上調査が実施された月を対象に算出した。北部においては2003年以降、中南部においては2003年を除き1999年以降、7月で平均JEV抗体陽性率が50%以上を、8月で80%以上を示さなかった。また、中南部では2006年8月、9月にJEV抗体が検出されなかった。IgM抗体は北部、中南部ともに確認されない月がいくつかみられた。

図4に北部および中南部の1985～1999年と2000～2009年の各月の平均JEV抗体陽性率を示した。北部、中南部ともに各月で1985～1999年の平均JEV抗体陽性率が2000～2009年よりも有意に高かった( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.001$ )。また、1985～1999年の6～9月と、2000～2009年の7、8月で北部の平均JEV抗体陽性率が中南部よりも有意に高かった( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.05$ )。しかし、2000～2009年の5月では中南部の平均JEV抗体陽性率が北部よりも有意に高かった( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.01$ )。

図5に1985～2009年の各月の北部と中南部を合わせたHI抗体陽性検体中各HI価を示した検体の割合を示した。5月および6月においては1:10および

1:20を示した検体が多く、7月には1:1280、8月には1:640と1:1280、9月には1:640が最も多かった。表1に北部および中南部の1985～1999年と2000～2009年の7～9月のHI抗体陽性検体中HI価が1:640以上を示した検体の割合を示した。北部、中南部ともに1985～1999年の割合が2000～2009年よりも有意に高かった( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.001$ )。また、1985～1999年および2000～2009年ともに北部の割合は中南部よりも有意に高かった( $\chi^2$ 乗検定、 $P<0.01$ )。

図6に1985～2005年まで5年ごとの沖縄島のブタ飼養頭数、飼養農家数およびそれらから算出した一農家当たりの平均ブタ飼養頭数を示した。ブタ飼養頭数は1985～2000年までは290796～305015頭であったが、2000～2005年にかけて290796頭から234006頭へと減少した。飼養農家数は1985～2005年まで減少を続ける一方で、平均飼養頭数は増加を続けた。

図7に1985～2005年まで10年ごとの沖縄島の各市町村の水田面積を示した。市町村の区分けは2005年時点の30市町村による。沖縄島の水田は主に中部から北部にかけて分布していた。

### D. 考察

沖縄県沖縄島において1985～2009年に実施されたJEV感染源調査の結果から、沖縄島におけるJEV活動の現状と今後の調査法の改善点を検討した。JEV抗体陽性率の年間最高値は北部では2008年、中南部では2005年から低下し、JEV抗体陽性率が50%以上を示す時期も北部の2005～2008年、中南部の2001、2005年は7月中旬以降と例年に比べ遅れていた。沖縄島のJEV活動が活発になる時期が遅れるようになり、現在の8月までの調査期間ではJEV抗体陽性率が最も高くなる時期に調査が行われていない可能性があり、今後は調査期間を延長する必要があると考えられた。

月ごとの平均JEV抗体陽性率およびHI価はJEV抗体陽性率の年間最高値が低下する以前の2000年頃から低下していた。陽性率の平均が低下し始めてから最高値が低下するまでの期間は、同