

岡山県の都市部および農村部における日本脳炎のリスク調査

分担研究者 川崎医科大学小児科 寺田喜平
研究協力者 川崎医科大学小児科 赤池洋人、川畑順子
津山中央病院小児科 梶俊策
さとう記念病院小児科 内田立志
神戸大学医学部医療基礎学講座 小西英二
国立感染症研究所 高崎智彦、倉根一郎

要旨

日本脳炎汚染地区である岡山県の都市部と農村部に行ける血清抗体（HI法とEIA法）の疫学調査から不顕性感染がどの程度あるのかを検討した。2008年、2009年の7月から11月において農村部241名、都市部351名の血清における日本脳抗体価を測定した。HI法は感度が低く、EIA-IgG法は感度が高く、両群間に有意差を認めず。HI法では3歳未満での抗体陽性はおらず、3歳以降では2～5%の不顕性感染があり、農村部と都市部とで有意差はなかった。EIA-IgMの抗体陽性者はいなかった。しかし、EIA-IgG抗体では3歳未満で33～70%、3歳以降でも51～77%の不顕性感染者が存在し、有意に都市部よりも農村部に不顕性感染が多かった。農村部だけではなく都市部にも不顕性感染が存在しており、都市部でも日本脳炎予防接種の積極的勧奨の必要性が示唆された。

A. 研究目的

岡山県は2005年成人2例の日本脳炎例を認め、リスクのある地域と思われる。我々は2006年岡山県で都市部と農村部における日本脳炎のリスク調査として、脳炎3例と無菌性髄膜炎17例の髄液を収集し、RT-PCRで髄液中の日本脳炎ウイルス遺伝子を調べた。都市部である県南部では0/7例と陽性例はなかったが、農村部である県北部では無菌性髄膜炎の3/12例で陽性を認めた。2010年4月1日から日本脳炎ワクチンの3歳児への積極的勧奨が再開されたが、2005年からの日本脳炎ワクチンの積極的な接種勧奨差し控えによる期間により、今後日本脳炎の発生が増加してくる可能性がある。今回岡山県で都市部と農村

部における血清抗体の疫学調査から不顕性感染率を調べたので報告する。

B. 研究方法

川崎医大倫理委員会の承諾を得て、2008年、2009年の7月から11月にかけて県北農村部の津山市にある津山中央病院（津山）、勝央町にあるさとう記念病院（さとう）、県南都市部の倉敷市にある川崎医大（川崎）で外来または入院し、インフォームドコンセントを取った患者の残血清から日本脳炎ウイルス抗体（HI法）とその患者の日本脳炎ワクチン接種歴を調査した。2009年度のさとう記念病院は小児科が閉鎖したため検体採取ができなかった。患者血清はSRLでHI抗

体を測定した。HI 抗体 10 倍以上を陽性とした。また国立感染症研究所で、日本脳炎 IgG および IgM 抗体 (EIA) を測定した。2009 年度は都市部川崎医大の検体を NS1 抗体 (EIA 法) で測定した。大量ガンマグロブリン療法を受けていた川崎医大の患者 2 名は対象から除外した。

C. 研究結果

農村部 (津山) で 2008 年度 58 名、2009 年度 61 名、農村部 (さとう) で 2008 年度 122 名、都市部 (川崎) で 2008 年度 149 名、2009 年度 202 名、計 592 名から血清を収集できた。

1) HI 法

HI 抗体は、生後 12~36 ヶ月では農村部、都市部すべてで陰性であった。生後 37 ヶ月以降でワクチン未接種者の陽性率は、2008 年度農村部 (津山) 1/18 (5.6%)、農村部 (さとう) 1/23 (4.3%)、都市部 (川崎) 0/28 (0%) であった。2009 年度農村部 (津山) 1/16 (6.2%)、都市部 (川崎) 1/27 (3.7%) であった。生後 37 ヶ月以降の既接種者では、2008 年度農村部 (津山) 6/15 (40%)、(さとう) 16/28 (57.1%)、都市部 (川崎) 3/12 (25%) であった。2009 年度農村部 (津山) 7/14 (50%)、都市部 (川崎) 7/24 (29.1%) であった。そのうち 2009 年農村部 (津山) の 6 歳児がワクチン未接種で 80 倍と高値であったが、2-ME 処理による有意な減少はなかった。

2) EIA 法

2008 年度は EIA - IgM 抗体を評価した。P/N 値 2.0 以上の陽性例はなかった。疑陽性 (P/N 値 1.5 ~2.0 未満) は、12 ヶ月未満では農村部 (津山) 0/8、農村部 (さとう) 0/15、都市部 (川崎) 1/18 (5.5%)、12~36 ヶ月では農村部 (津山) 0/13、農村部 (さとう) 3/28 (10.7%)、都市部 (川崎) 1/41 (2.4%)、37 ヶ月以降未接種者では、農村部 (津山) 2/18 (11.1%)、農村部 (さとう) 2/23 (8.7%)、都市部 (川崎) 0/28 であった。37 ヶ月以降既接種者およびワクチン接種不明ではす

べて陰性であった。

EIA-IgG 抗体陽性は経胎盤以降抗体があるため 12 ヶ月以降で検討した。

2008 年度では 12~36 ヶ月の EIA-IgG 抗体陽性率は、農村部 (津山) 12/13 (92.3%)、農村部 (さとう) 25/28 (89.2%)、都市部 (川崎) 31/41 (75.6%)、37 ヶ月以降未接種者では農村部 (津山) 16/18 (88.8%)、農村部 (さとう) 20/23 (86.9%)、都市部 (川崎) 23/28 (82.1%) であった。37 ヶ月以降既接種者では、農村部 (津山) 14/15 (93.3%)、農村部 (さとう) 28/28 (100%)、都市部 (川崎) 12/12 (100%) であった。

2009 年度では 12~36 ヶ月の EIA-IgG 抗体陽性率は、農村部 (津山) 5/19 (26.3%)、都市部 (川崎) 5/67 (7.4%)、37 ヶ月以降未接種者では農村部 (津山) 8/16 (50%)、都市部 (川崎) 5/27 (18.5%) であった。37 ヶ月以降既接種者では、農村部 (津山) 9/14 (64.2%)、都市部 (川崎) 14/24 (58.3%) であった。

3) NS1 抗体

2009 年度の都市部 (川崎) で抗体陽性例はなかった。

D. 考察

検査法に関して通常の病院から依頼できる HI 法と国立感染症研究所でのみ評価できる EIA 法には検出率に大きな差があった。抗体の陽性率が高いと思われるワクチン接種群をみみると、HI 法の陽性率 39/93 に対し EIA 法では 76/92 (両群に有意差 $p < 0.0001$ 、 χ^2 検定) であり、EIA と比較し HI 抗体は著明に検出率が悪かった。日本脳炎が疑われる場合初回の HI 抗体陰性でもペア血清での測定や NT 法、EIA 法での測定が望まれる。

日本脳炎ワクチンは通常 3 歳以降に接種されるので、生後 13~36 ヶ月と 37 ヶ月以降のワクチン未接種者における抗体陽性者は、不顕性感染と推定される。EIA-IgM 抗体はすべて陰性であり、

検査時に不顕性感染をおこしている例はなかった。EIA-IgG 抗体に比較して感度の悪い HI 法では、12～36 ヶ月ではすべて陰性で、37 ヶ月以降の未接種者の陽性率は、農村部 3/57 (5.2%)、都市部 1/55 (1.8%) であった。37 ヶ月以降の既接種者の陽性率は 29/57 (50.8%)、都市部 10/36 (27.7%) であった。また農村部では抗体価が 160 倍と高くブースターがかかっていると思われる症例もあった。これらより HI 法では 3 歳未満では抗体陽性者がおらず、3 歳以降では 2～5% の不顕性感染者があり農村部と都市部に有意差はなかった。

一方、感度の良い EIA-IgG 抗体では、12～36 ヶ月の農村部抗体陽性率は 42/60 (70.0%)、都市部は 36/108 (33.3%) (両群に有意差 $p=0.01$ 、 χ^2 検定) であった。37 ヶ月以降未接種者では農村部 44/57 (77.1%)、都市部 28/55 (50.9%) (両群に有意差 $p=0.04$ 、 χ^2 検定) であった。

これらにより、EIA-IgG 抗体では 3 歳未満で 33～70% の不顕性感染者が存在し、3 歳以降でも 51～77% の不顕性感染者が存在し、有意に都市部よりも農村部の不顕性感染が多かった。37 ヶ月以降のワクチン既接種者における抗体陽性率は、HI 抗体で 27～51%、EIA-IgG 抗体で 72～89% であり、都市部と農村部に有意差はなかった。

日本脳炎 HI 抗体の陽性率はワクチン接種をしている群でも 42% と著明に低く感度が低いと考えられる EIA-IgM、IgG の商業ベースへ早期移行が望まれる。

2009 年度の都市部で NS 抗体を測定しているが陽性例はなく、EIA-IgG との間にギャップが生じた。疑陽性の率が高い可能性が考えられ、EIA-IgG 法のさらなる検出キットの微調整が望まれる。

高知県では 1 歳の日本脳炎患者が報告されており、岡山県でもワクチン未接種で EIA-IgG 抗体陽性の 12 ヶ月～36 ヶ月の児がいるため、12 ヶ月からの日本脳炎ワクチン接種勧奨も検討していく必要がある。

E. 結論

全体の抗体陽性率は、農村部のほうが高いが、都市部でも HI 法および IgG-EIA 抗体で不顕性感染が認められた。岡山県では農村部だけでなく都市部でも日本脳炎の発生が予想される。農村部でも都市部でも日本脳炎ワクチンの接種勧奨をおこなっていく必要がある。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

寺田喜平. 日本脳炎. 小児内科 40 増刊 1188-1190, 2008

2. 学会発表

寺田喜平、梶俊作、内田立志、ほか. 岡山県県南および県北部にける抗体による日本脳炎のリスク調査. 第 41 回日本小児感染症学会学術集会 (福井市) 2009 年 11/14～15

赤池洋人、寺田喜平、ほか. 岡山県県南および県北部にける抗体による日本脳炎のリスク調査. 第 41 回日本小児感染症学会学術集会 (仙台市) 2010 年 11/14～15

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

対象

	都市部(川崎医大)	農村部(津山中央)	農村部(さとう記念)
2008年度 計(名)	149	58	122
0～11ヵ月	19	7	9
12～36ヵ月	41	13	28
37ヵ月以降			
ワクチン接種あり	12	15	28
37ヵ月以降			
ワクチン接種なし	28	18	23
37ヵ月以降			
ワクチン接種不明	49	5	32
2009年度 計	202	61	
0～11ヵ月	31	10	
12～36ヵ月	67	19	
37ヵ月以降			
ワクチン接種あり	24	14	
37ヵ月以降			
ワクチン接種なし	27	16	
37ヵ月以降			
ワクチン接種不明	53	2	

都市部(川崎医大)まとめ

	12-36 ヵ月	37ヵ月 以降		
ワクチン 接種	なし	なし	あり	不明
2008年	0/41	0/28	3/12	9/49
HI	(0%)	(0%)	(25%)	(18%)
2009年	0/67	1/27	7/24	7/53
HI	(0%)	(3%)	(29%)	(13%)
2008年	31/41	23/28	12/12	40/49
ELISA	(75%)	(82%)	(100%)	(81%)
2009年	5/67	5/27	14/24	17/53
ELISA	(7%)	(18%)	(58%)	(32%)

農村部(津山中央病院)まとめ

	12-36 ヵ月	37ヵ月 以降		
ワクチン 接種	なし	なし	あり	不明
2008年	0/13	1/18	6/15	0/4
HI	(0%)	(5%)	(40%)	(0%)
2009年	0/19	1/16	7/14	1/2
HI	(0%)	(6%)	(50%)	(50%)
2008年	12/13	16/18	14/15	4/4
ELISA	(92%)	(89%)	(93%)	(100%)
2009年	5/19	8/16	9/14	1/2
ELISA	(26%)	(50%)	(64%)	(50%)

農村部(さとう記念病院)まとめ

	12-36 ヵ月	37ヵ月 以降		
ワクチン 接種	なし	なし	あり	不明
2008年	0/28	1/23	16/28	11/32
HI	(0%)	(4%)	(57%)	(34%)
2008年	25/28	20/23	28/28	31/32
ELISA	(89%)	(87%)	(100%)	(96%)

「わが国における日本脳炎の現状と今後の戦略に関する研究」
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

発熱、片麻痺で発症した日本脳炎の1女児例

分担研究者 川崎医科大学小児科 寺田喜平

研究協力者 山口赤十字病院小児科 名西悦郎 (現;福岡東医療センター)

門屋亮

西郷謙二郎

寺地真一

大淵典子

山口県環境保健センター 戸田昌一、調恒明

要旨

山口県都市部に住む日本脳炎ワクチン未接種の6歳の女児が、片麻痺と発熱を契機として、日本脳炎と確定診断された。9月上旬、発熱と右片麻痺から精査治療入院となった。右片麻痺とバビンスキー反射が陽性、その後後部硬直、傾眠傾向、発語低下、脳波で高振幅徐波、MRIで基底核や視床に異常を認め、日本脳炎を疑うに至った。日本脳炎に対するHI抗体の有意な増加、EIA-IgM抗体陽性、髄液のPCR陽性によって診断できた。MRIおよび脳波でも正常に改善し、後遺症なしまで改善した。

A. 研究目的

2010年4月1日から日本脳炎ワクチンの3歳児への積極的勧奨が再開されたが、2005年からの日本脳炎ワクチンの積極的な接種勧奨差し控えによる期間により、今後日本脳炎の発生が増加してくる可能性がある。日本脳炎を正しく診断することがサーベイランス上重要なことであるので、自験例のような興味ある症例を知ることは、鑑別診断や診断方法を知るためにも重要なことである。

B&C. 症例報告

症例は6歳、女児。主訴は発熱と右上下

肢の麻痺であった。現病歴は9月4日から発熱。翌日も39度台の発熱あり。軽度の頭痛に加え、ズボンが上げられない、フォークがうまく持てないなどの訴えがあったが、ふざけているかと思い経過観察していた。9月6日明け方にトイレに行った際に、「ティッシュが巻けない」と訴え、家族は右上肢がうまく使えていないことに気づき、救急外来を受診した。幼稚園通園中。自宅は山口市内中心部。海外渡航歴なし。夏休みに牧場へ行ったことがあった。日本脳炎ワクチンの接種歴はなかった。

来院時の所見は、体重19kg、意識清明、全身状態まずまず、バイタルサイン; BT

39.9°C, BP 122/59mmHg, 心拍数 129bpm, 呼吸数 30/min, SpO₂ 97%、頭頸部；項部硬直なし、咽頭発赤軽度、白苔なし。頸部リンパ節腫脹なし、胸腹部；呼吸音清明、心雑音なし、腹部平坦・軟、四肢；末梢冷感なし、皮膚；皮疹なし。神経系は脳神経系；明らかな異常なし。運動系；右上下肢の筋力低下あり（MMT 4、歩行時に右側によるめく、右握力低下あり）、反射；DTR 全体に亢進（2+程度）、明らかな左右差なし、右 Babinski 反射陽性、感覚系；明らかな異常なし、小脳失調症状；なし、高次脳機能障害；なし。

入院時検査は、16500（好中球 89%）、CRP 8.54、髄液検査は、細胞数 136/ μ l（好中球 41%）、左視床、頭頂葉皮質に拡散強調画像で高信号域あったが、T1, T2, FLAIR では確認できなかった。脳波では、中心、頭頂、後頭部に左>右の高振幅徐波あり。刺激による開眼時にも高振幅徐波を認めた。

入院後経過は髄膜脳炎と診断し、細菌性髄膜炎や HSV 脳炎も考慮して、CTR_X、ACV の投与を開始した。7日には高熱、片麻痺に加え、項部硬直、傾眠傾向、発語量低下（GCS E2V4M5）あり。脳波では左優位の高振幅徐波あり。8日には発語を認め、トイレに座るなど、症状は軽度回復した。MRI では左基底核に加え右側にも病変が出現した（造影効果なし）。CRP は 2.7 と低下した。麻痺や高熱が続き、MRI で新規病変を認めたため、IVIG（400mg/kg）投与を開始した。以後は明らかに解熱傾向となり、9日には言語の保続などの高次脳機能障害はあるが、意識はほぼ清明、右片麻痺も改善傾向となった。9日も IVIG 投与し、10日には体温は 37 度台で経過、意識は完全に

清明となり高次脳機能症状も消失した。15日には神経学的異常はほぼ消失し、右半身の軽い筋力低下のみとなった。リハビリテーションを開始後、18日に退院となった。MRI 画像より日本脳炎を疑い、抗体を測定したところ、HI 法のペア血清で 10 倍から 80 倍に増加し、EIA-IgM 抗体も陽性、髄液の PCR でも陽性であった。

D. 考察

日本脳炎の確定診断された症例数は全国で 10 例を越えることがなくなり、2006 年まで小児の報告例はほとんどなかった。しかし、2005 年から 2010 年まで積極的な勧奨の差し控えによって実質上日本脳炎ワクチンは中止されている状態であった。それに伴い、2009 年 2 名（高知県と熊本県）の小児日本脳炎が報告されており、今後日本脳炎患者の増加が危惧されてくる場所である。しかしながら、正しく診断できなければ正しいサーベイランスができないことになってしまう。小児の日本脳炎は少なく、医師における診断能力は必ずしも高くないと思われるので、自験例のような症例報告が重要な意味を持つてくると思われる。

日本脳炎ウイルスに感染しても、日本脳炎となるのは 1/100~1/1000 くらいである。多くは不顕性感染、あるいは無菌性髄膜炎となる。また髄膜脳炎のタイプと少ないが脊髄炎のタイプがある。髄膜脳炎では細菌性髄膜炎と治療されるが、髄液から細菌が培養されず、解熱後も意識障害が続くなどの症例が多い。今回の症例は麻痺から始まり、その後髄膜炎症状が発症し、多くの症例とパターンが異なる。しかしながら、MRI において基底核、両視床へ病変が特徴的で

あった。この症例では、左中心前溝脳表の病変を認めたため、麻痺症状が発症したと思われた。また幸い、9/21にはMRI所見は改善しほぼ消失し、臨床的に後遺症を残さず、改善を認めた。今後も発達遅滞や情緒障害など、年齢的に発見しがたい後遺症が遅れて出現する可能性もあるため、長期フォローが必要と考える。

今回、治療はガンマグロブリンによる治療が効果的なように感じられた。日本製のグロブリンには日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を含んでいるが、自然経過と一致したのか、効果があったのか、判断が難しいと思われ、今後の検討が必要と思われた。

E. 結論

日本脳炎の症例にはさまざまな症例があり、その一つとして片麻痺から始まった小児例を経験した。日本脳炎ワクチンは未接種であり、実質上ワクチンの中止が続いていたので、早急な勧奨が必要である。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

寺田喜平. 日本脳炎. 小児内科 40 増刊 1188-1190, 2008

2. 学会発表

寺田喜平、梶俊作、内田立志、ほか. 岡山県県南および県北部にける抗体による日本脳炎のリスク調査. 第41回日本小児感染症学会学術集会(福井市) 2009年11/14~15

赤池洋人、寺田喜平、ほか. 岡山県県南および県北部にける抗体による日本脳炎のリスク調査. 第41回日本小児感染症学会学術集会(仙台市) 2010年11/14~15

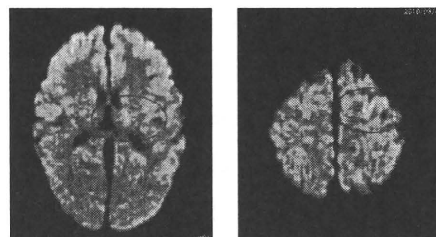
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

検査結果

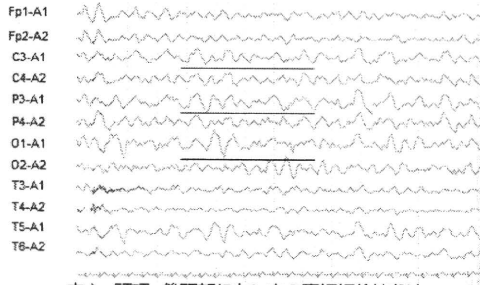
<血算>	<生化学>	<尿>
WBC 16500/μL	TP 7.3 g/dl	SG 1.005, pH 5.5, prot(-)
IN 89% Lym 7%	ALB 4.2 g/dl	sugar(-), OB(+), ketone(2+)
Hb 12.8g/dL	AST 31 U/L	NO3(-), WBC(-)
Pit 25.1万/μL	ALT 14 U/L	
	LDH 297 U/L	<髄液>
	CK 41 U/L	無色透明
	BUN 8 mg/dl	cell 136/μL (P 41%, M 59%)
	Cr 0.4 mg/dl	Prot 25mg/dl
	Glu 96 mg/dl	Glu 56mg/dl
<凝固>	Na 131 mEq/L	
PT-INR 1.29	K 4.3 mEq/L	<胸部レントゲン> 異常なし
APTT 32.7sec	Cl 95 mEq/L	<CT> 異常なし、脳浮腫なし
Fib 396mg/dl	Ca 9.4 mg/dl	<微生物>
FDP 4.4 μg/mL	IP 3.9 mg/dl	インフルエンザ、アデノ
D dimer 1.2μg/mL	CRP 8.54 mg/dl	ロタウイルス迅速検査:陰性
	IgG 660mg/dl	
	NH3 23.3 μg/dl	

頭部MRI



左視床、頭頂葉皮質に拡散強調画像で高信号域あり (T1, T2, FLAIRでは確認できず)

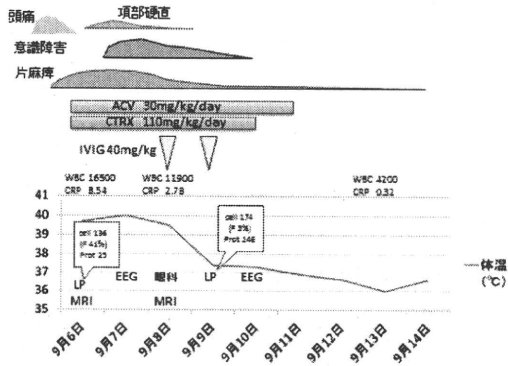
脳波(9/7)



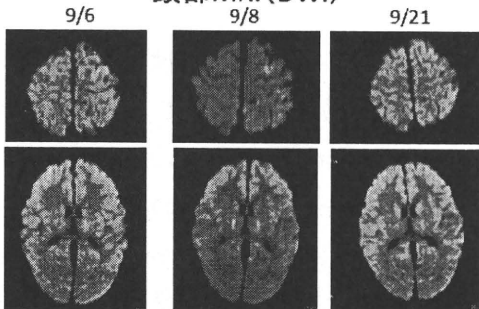
中心、頭頂、後頭部に左>右の高振幅徐波あり
刺激による開眼時にも高振幅徐波あり

日本脳炎関連検査

抗体価(HI);
 9月9日 JaGAR株 10倍、2ME n.d
 (IgM補足ELISA法; 血性・髄液ともに陽性)
 9月21日 JaGAR株 40倍、2ME 20倍
 10月21日 JaGAR株 80倍、2ME 40倍
 抗体価(Ni);
 9月6日 <10倍
 9月9日 20倍
 9月13日 80倍
 髄液(9/6); 日本脳炎ウイルスPCR陽性



頭部MRI (DWI)



9/8こま両視床へ病変は拡大し、左中心前溝脳表の病変もやや拡大。造影効果なし。
 9/21こまMRI所見は改善し、1こま消失した。

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等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

『日本脳炎と細胞培養（新）ワクチンに関する意識調査』

研究分担者 脇口 宏（高知大学小児思春期医学 教授）

協力研究者 前田明彦（高知大学小児思春期医学 講師）

研究要旨

2005年以降の日本脳炎ワクチン積極的勧奨差し控え以降、日本脳炎感受性者が蓄積している現状があり、小児日本脳炎患者の発生が目立つ傾向にあることを前年度に報告した。新たに開発された細胞培養不活化ワクチンが2009年6月から接種可能となり、2010年4月1日から、1期の勧奨接種が再開された。今回、ワクチン接種の現状と問題点を把握し、ワクチン接種を有効に進めるための方策を探ることを目的に、2010年4月に質問紙法で保護者に対する意識調査を行った。結果は以下の通りであった。①日本脳炎の病像や感染経路に対する理解は比較的正確であった。②新しい細胞培養ワクチンの存在については73%が知らず、公費で受けられることも広く知られていなかった。③子どもにワクチンを受けさせると答えた親も1/3にとどまっていた。ワクチン不足への懸念からPRを控えた影響が調査時点では根強く残っており、啓発が不十分であった。今後、積極的な広報活動がなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

A. 研究目的

旧マウス脳由来日本脳炎ワクチンは、WHOが認める世界で唯一のものであった。しかし、定期接種後に発症した急性散在性脳脊髄炎（ADEM）重症例を契機に、2005年5月30日に厚生労働省 健康局結核感染症課が、「日本脳炎ワクチンの積極的勧奨差し控え」を通達し、同時に3期の接種を中止した。1期と2期の日本脳炎ワクチン接種は定期で継続され、同意書を得れば実施可能であったが、接種率はそれまでの1/10以下に激減した。

ADEMは不活化ワクチンのみならず自然感染など種々の免疫反応によって起きる二次性脳炎であり、原因がワクチンと証明するのは困難で、状況証拠的にADEMと診断される。およ

そ100万接種に1例の頻度とされ、1991年度以降、因果関係が否定できないもの13例（うち重症例4例）が副反応として認定され救済されている。マウス脳由来のワクチンという、半世紀ものあいだ引きずってきた二次性脳炎の理論的リスクへの危惧が背景にあって、重症ADEM例発生で、2005年の通達に到ったのであった。多くの小児科医師やワクチンの専門家にとって寝耳に水で、困惑の事態を招いた。

物議を醸した日本脳炎ワクチンの積極的勧奨差し控えであったが、新たに開発された細胞培養不活化ワクチンが2009年6月から接種可能となった。供給体勢が整った2010年4月1日から、1期初回接種に限定して勧奨接種が再開となった。5年間のワクチン接種率低下で感

染感受性者が増加しているため、日本脳炎の小児患者が増加することがないか厳重な監視を必要とする時期にある。また、ここ数年は小児患者の発症が目立つ印象があり、定期での接種率を回復させ、感染感受性者をこれ以上増やさない施策が必要である。

そこで、今回、一般市民とくに子をもつ親の世代の者を対象に、日本脳炎という疾患および新ワクチンについて意識調査を行ったので報告する。

B. 対象と方法

高知県0歳・1歳児を対象とした大規模健康診査会（第80回赤ちゃん会；2010年4月18日に高知市と四万十市で開催）参加者の両親にアンケート調査を行った。自宅に郵送されたアンケート用紙に回答してもらい審査会場で回収した。

対象は0歳2ヵ月～1歳8ヵ月の児をもつ保護者で自発的に参加を希望する者2,455名にアンケート用紙を郵送で配布した。

C. 結果

大規模健康診査会に参加した2,271名のうち2,111名（高知県年間出生数の37%に相当）について回収し、解析を行った。アンケート回収率は86.0%であった。

回答者の住所分布を表1に示す。高知市への若い世代が人口集中している現状を反映していた。

回答者はほとんどが両親で、祖父母が回答したケースも少数含まれていたが、誰が回答したのかについては明記させなかった。回答者の世代を推測するために両親の年齢を集計した。父親は、30歳前半が最多で、20歳代後半、30歳代後半、40歳代後半の順で

あった。50歳以上はごく少なかった。母親も、30歳前半が最多で、20歳代後半、30歳代後半、20歳代前半と続いた。

日本脳炎を知っているかとの問いには81%が「はい」、18%が「いいえ」と回答した（表2）。

日本脳炎の症状について、複数選択可能としてたずねた。日本脳炎は、①高熱を呈し、②重い脳障害を残す、もしくは③致命的で、④痙攣、⑤意識障害、⑥頭痛、⑦嘔吐などを起こす疾患であることを表3に示す頻度で回答した。激しい咳や血尿を選択するものはほとんどなく、疾患の性質についてはかなり正確に把握していることをうかがわせた。

感染経路について質問した（表4）。日本脳炎を媒介するものが蚊であることについても9割近くの者が認識していた。ブタとの関連も約20%が理解しているようであった。

高知県で発症した日本脳炎の1歳児例を2009年度に報告した。この事例については広く報道され、当該地区ではワクチンを1歳過ぎから打ちたいという希望が保護者から出るなどの影響がみられた。高知県でどれくらい認知されているのか、またそれが予防接種への動機づけに関連している可能性を考えて、「高知県で日本脳炎の小児患者が発生していることを知っていますか？」と質問した。知っている者はわずか22%に過ぎなかった（表5）。

「日本脳炎ワクチンは無料で受けられますか？」との問いに対し、59%が「はい」、37%が「いいえ」と答え、有効回答なしが4%であった（表6）。公費で接種できることさえ、41%が認知していないのが現状で

あった。

「新しい日本脳炎ワクチンについてご存じですか？」との質問に「知っている」と答えたのは23%にとどまった(表7)。接種開始10ヶ月後の時点でも新しく接種できるようになった細胞培養ワクチンの存在自体、23%しか認知されていなかった。

「日本脳炎ワクチンを子どもさんに受けさせますか？」との質問に、33%が「はい」と答えたにとどまり、23%が「いいえ」と答えた(表8)。

アンケートの最後に「新しいワクチンについてもっと知りたいとお感じですか？」との質問に対し、96%がはいと答え、今回のようなアンケート調査が啓発の目的でも有用である可能性が示された。

D. 考察

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、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。今後も日本脳炎の発症動向に注意が必要である。

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。2009年に高知県で1歳児、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。

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スタートした。2010年4月から1期の勧奨接種が再開され、2011年4月からは接種できなかった世代のキャッチアップ接種が開始される旨通達された。

日本脳炎の細胞培養ワクチンの勧奨接種再開にともなって、ウイルスが蔓延し、小児患者の発生がみられる高知県で、親の意識についてアンケート調査した。

日本脳炎の病像やベクターに対する理解は比較的正確であった。にもかかわらず、新しいワクチンの存在については73%が知らず、公費で受けられることも広く知られていなかった。子どもにワクチンを受けさせると答えた親も1/3にとどまっていた。

ワクチン不足の懸念からPRを控えた影響が調査時点では根強く残っており、啓発不足が関連していることは明らかと思われる。今後、積極的な広報活動がなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

E. 結論

今後、新しい細胞培養不活化日本脳炎ワクチン接種に関して、積極的な広報活動、動機づけの強化がなされなければ、2005年以来の日本脳炎感受性者増加にはストップがかけられないことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

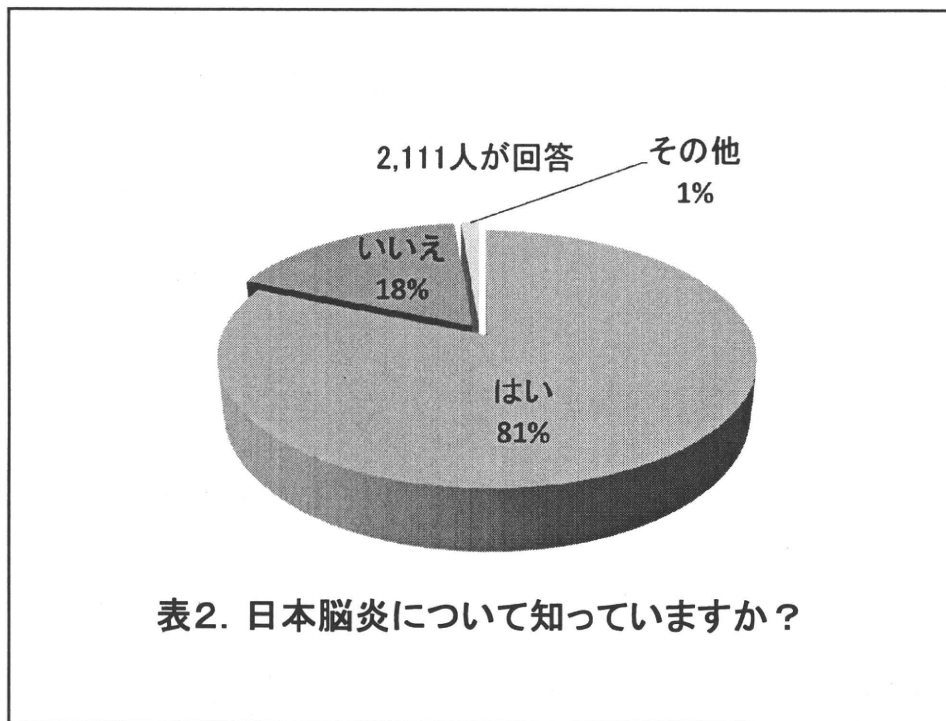
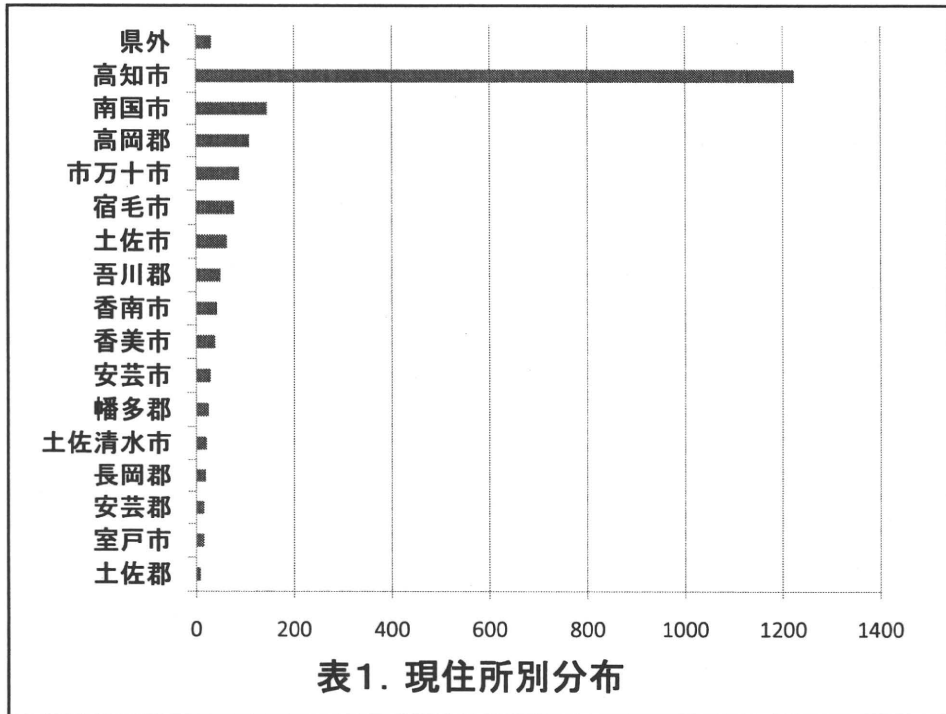
前田明彦、脇口 宏：特集 新時代のワクチン戦略について考える 各論 1. 勧奨接種のワクチン—現行ワクチンの問題点と将来に向けて 2) 日本脳炎. 臨床検査 54: 1882-1367, 2010

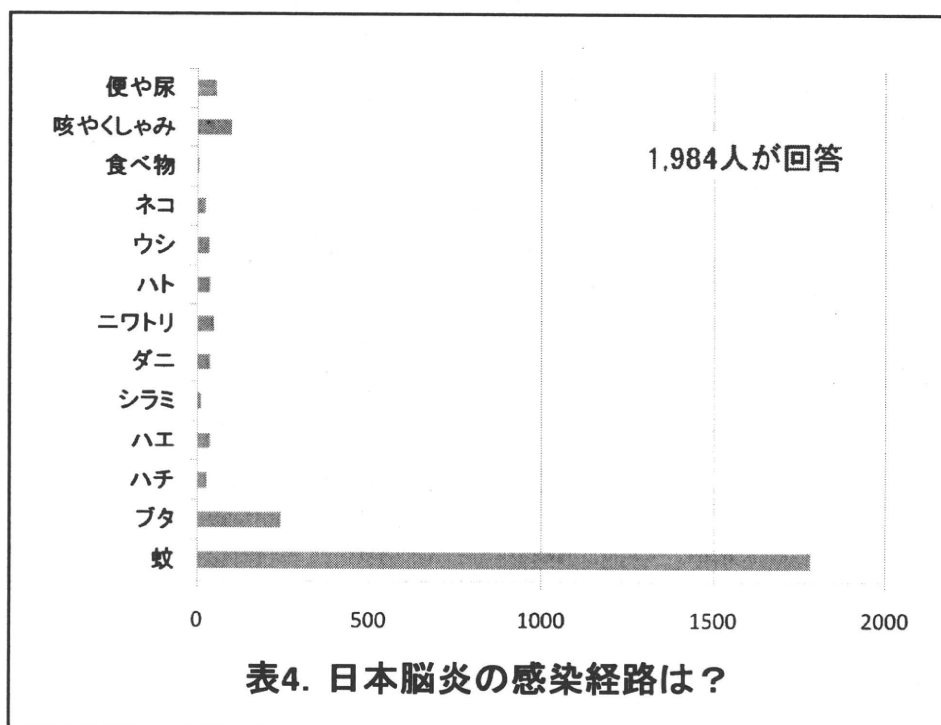
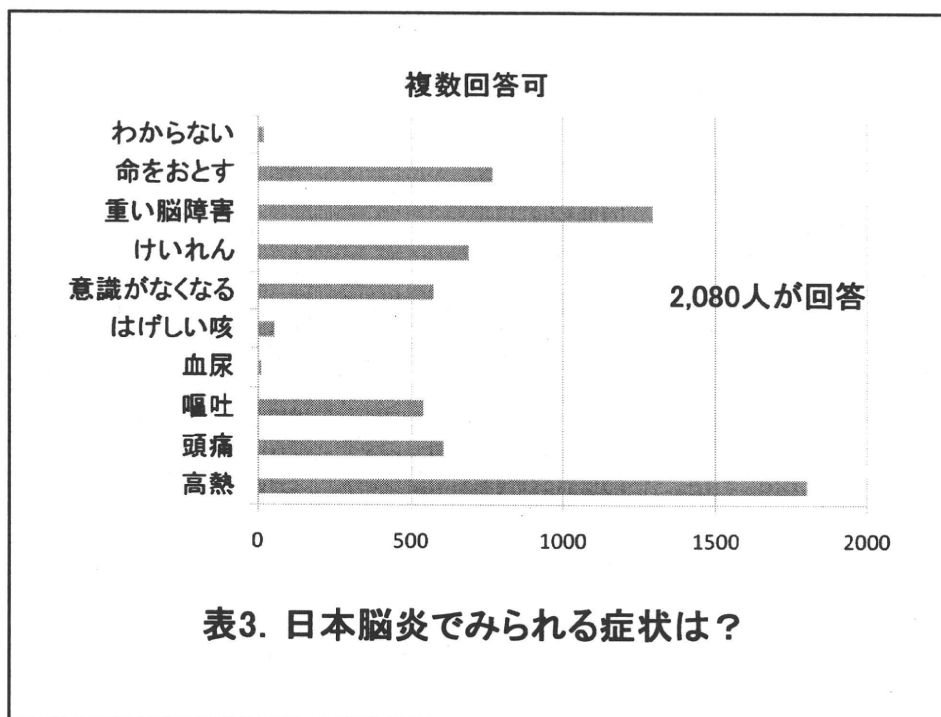
2. 学会発表

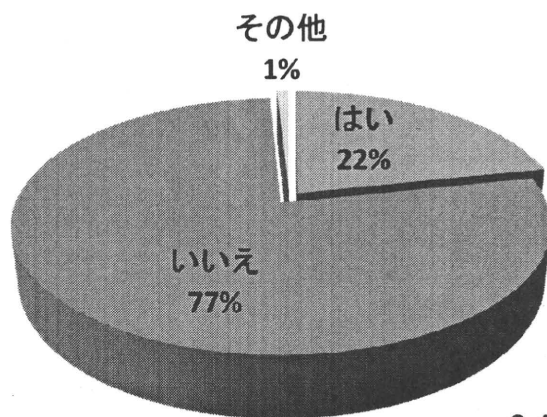
前田 明彦、脇口 宏：総合シンポジウム1 「世界と日本のワクチンギャップpart1: 勧奨接種ワクチン」どう勧めるか、日本脳炎ワクチン. 第113回日本小児科学会学術集会2010年4月 岩手

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

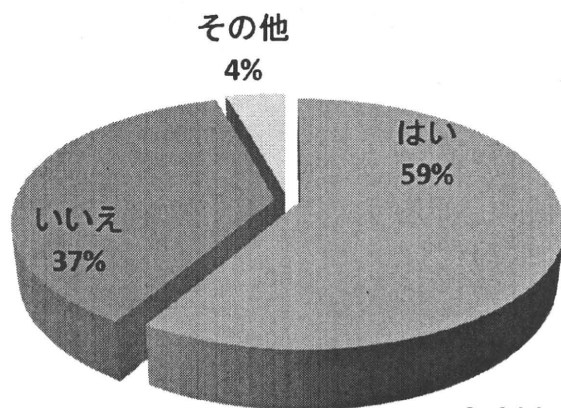






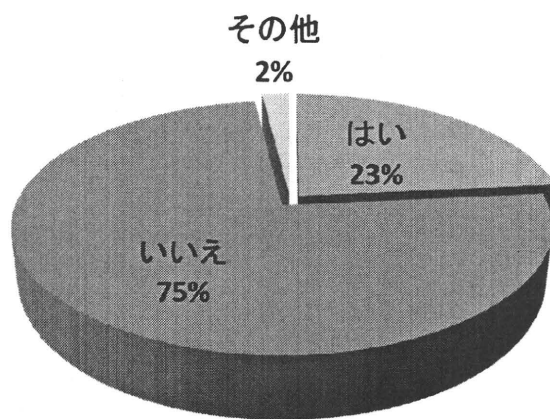
2,111人が回答

表5. 高知県で日本脳炎の小児患者が発生していることを知っていますか？



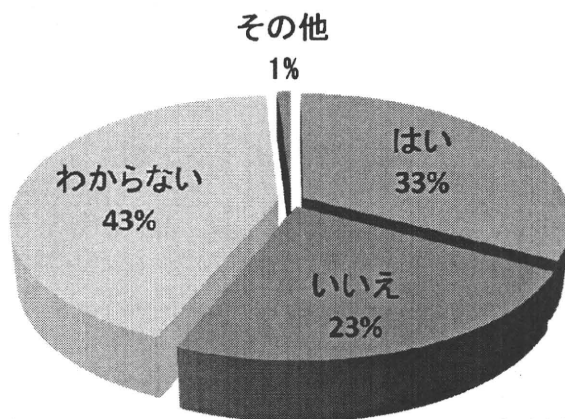
2,111人が回答

表6. 日本脳炎ワクチンは無料で受けられる？



2,027人が回答

表7. 新しい日本脳炎ワクチンをご存知ですか？



2,111人が回答

表8. 日本脳炎ワクチンをお子さんに受けさせるか？

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)
研究協力者 下島昌幸 (山口大学農学部獣医微生物学教室・准教授)
下田 宙 (山口大学農学部獣医微生物学教室)
長尾裕美子 (山口大学農学部獣医微生物学教室)

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上で、犬が優れた歩哨動物となることを示してきた。本年度は日本脳炎ウイルスを犬に実験的に接種し、病原性、抗体上昇とその持続、ウイルス血症の有無を調べた。その結果、日本脳炎ウイルスは犬に感染するが病気を引き起こさず、ウイルス血症も起こらないことが示された。更に、抗体価の上昇が認められ、その抗体価は最低 56 日間持続することが確認された。このことは犬での調査が都市部および室内における JEV 媒介蚊の侵入を知るための安全で優れた指標となることが示している。また、馬に致死を引き起こした genotype I の JEV/eq/Tottori/2003 株のマウスにおける病原性を genotype III と比較した結果、脳内接種では病原性が同じであったにもかかわらず、腹腔内接種では病原性が弱かった。加えて、これまでの野生動物の調査でシカに JEV 抗体保有率が高いことから、同じ偶蹄類の牛での抗体保有率を 2000 年から 2005 年の保存経過血清と比較した。その結果、牛も 11 月には約 70% が JEV に感染するがその流行には 8 月前後で年度により違いが認められることが分かった。

A. 研究目的

本年度は動物における日本脳炎ウイルス (JEV) 感染状況の調査を目的に 3 種類の調査研究を行った。

①2008-2009 年度の調査で、犬での JEV 抗体保有率の調査は、豚の調査では不可能な都市部や室内における JEV 感染の可能性を調べることができることを報告してきた。本年度は、JEV の犬での病原性、抗原性、ウイルス血症の有無を調べることにより、犬が安全で有用な調査対象となるかを調査した。

②2003 年に馬に致死を引き起こした株 JEV/eq/Tottori/2003 の全塩基配列を決定した結果、最近国内で主流の典型的な genotype I であった。この馬に致死を引き起こす genotype I の病原性をマウスで比較検討した。

③前年度までの調査で偶蹄類である鹿に高い JEV 抗体保有率が認められた。そこで、同じ偶蹄類でありアルボウイルス感染症の疫学調査のために保存されている“おとり

牛”の過去血清を調べることにより、豚以外の動物(牛)での JEV 感染状況の調査が可能であるかを調べた。

B. 研究方法

1. 犬への JEV 感染実験

動物: JEV に対する抗体陰性を確認したビーグル犬(2カ月齢、雌)3匹を株式会社ナルクより購入し、一週間馴致した後、実験に供した。なお、動物実験は山口大学農学部動物実験安全委員会の承認のもと、規則に則って行った。

接種ウイルス: JEV genotype III である JaOH0566 株(阪大微生物病研究会より分与)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。

感染実験: 2%FCS 加 DMEM で 1×10^7 PFU/ml に調整した JaOH0566 株を 0.5ml 皮下及び 0.5ml 静脈内に接種した。感染後毎日体重・体温測定、臨床症状の観察を行った。感染後 2 週間は毎日採血を行い、血清を回収し

た。更に週二回 2ml の EDTA 加血液より、リンフォプレップ (コスモバイオ) を用いて末梢血単核球 (PBMC) を回収し、セルバンカー (日本全薬工業) を加えた後、使用まで -80°C で保存した。

全血球数測定 (CBC) は Sysmex KX-21 (Sysmex, Japan) で測定し、ヘマトクリット (Ht) と血球容量 (PCV) はヘマトクリット管を用いて遠心後に測定した。total protein (TP) は比重系を用いて血漿より測定した。Creatine phosphokinase (CPK), creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) は DRI-CHEM 7000V (Fujifilm, Japan) を用いて測定した。C-reactive protein (CRP) は Laser CRP-2 (Arrows, Japan) を用いて測定した。

ウイルス中和抗体価の測定: 2% ウマ胎児血清 (FCS) 加 EMEM (GIBCO) で 5 倍から 2 倍階段希釈した被検血清およびコントロール 100 μ l と 100PFU のウイルスを含むウイルス希釈液 100 μ 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% 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。

ウイルスゲノムの検出: 血清 140 μ l から QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出後、QIAGEN one-step RT-PCR kit を用いて RT-PCR を行った。プライマーは JEV (2927-2947) 5' -GGA ACA GCA TGC AAA TCG AAG-3' と JEV (3578-3558) 5' -ACC AGA AGG CCC AGC TGA AAA-3' を用いた。この RT-PCR の検出感度は 1.7 PFU であることが確認されている。

ウイルス分離: PBMC および血清を Vero 細胞および C6/36 細胞に接種し、細胞変性効果 (CPE) を指標に 3 回盲継代を繰り返した。

血清を 3 日齢の乳のみ BALB/c マウス (SLE) に 20 μ l 接種し、接種マウスの致死を指標にウイルス分離を試みた。

2. JEV/eq/Tottori/2003 の病原性の検討

接種ウイルス: 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 細胞で継代・増殖した。また、対象として genotype III である JaOH0566 株 (阪大微生物病研究会より分与) を用いた。

感染実験: C57BL/6 マウス (4 週齢、雌) に希釈したウイルス液を腹腔内および脳内に接種した。腹腔内接種は 200 μ l、脳内接種は 20 μ l で行った。接種後は致死を指標に病原性を判定した。

3. ウシでの日本脳炎抗体保有率の調査

ウシの血清: ウシのアルボウイルス感染症の流行調査のために各県で“おとり牛”を準備し、血清を回収・保存している。山口県に保存されていた 60 頭の 2000 年から 2005 年にかけて 6 月・8 月・11 月に回収された血清を山口県中部家畜保健所より分与していただいた。

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。

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。

ウイルス中和試験: 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 μ l と 100PFU のウイルスを含むウイルス希釈液 100 μ 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。

C. 研究結果

1. 犬への JEV 感染実験

Genotype III である JaOH0566 株を経皮と静脈内接種で同時接種し、その後の体重、体温、臨床症状を観察した (図 1)。体重においては感染後 2 - 3 日目に No. 1 と No. 3 で減少傾向が認められたが、その後は順調に体重が増加した (図 1A)。一方、体温においては犬の発熱の指標とされる 39.5°C を上回る個体が見られなかった (図 1B)。臨床症状における異常は認められなかった。

血液検査の結果においては CRP のみが異常値を示した (図 2)。犬の異常値の指標である 1.5mg/dl 以上を No. 1 は感染後 1 - 4 日、No. 2 は感染後 2 - 4 日に検出された。No. 3 では異常値を超えることがなかったが、感染後 2 日目で 1.05mg/dl まで上昇がみられた。全ての個体において 7 日目以降は感染前と同じレベルまで CRP が戻っていた。

一方、ウイルス中和抗体価は感染後 14 日目には上昇が始まり、感染後 21 - 28 日目には抗体価がほぼ上限に達した。その後は少なくとも感染後 56 日目まで抗体価は維持された (表 1)。

また、血清および PBMC からのウイルス遺伝子の検出および分離できなかった。

2. JEV/eq/Tottori/2003 の病原性

脳内接種の場合、JEV/eq/Tottori/2003 株の 10 PFU の投与によりすべてのマウスが死亡した。JaOH0566 株でも 10 PFU の投与ですべてのマウスが死亡したが、死亡までの日数は JEV/eq/Tottori/2003 株の方が JaOH0566 株 (genotype III) より 2-3 日長かった (図 3)。

腹腔内接種の場合、JEV/eq/Tottori/2003 株を 10,000 PFU 投与しても 4 匹中 1 匹しか死亡しなかった。JaOH0566 株では 1,000 PFU の投与によりすべてのマウスが死亡した (図 4)。

3. ウシでの日本脳炎抗体保有率の調査

毎年 60 頭の牛から 6 月、8 月、11 月に血清を経時的に回収し、中和抗体の有無を検討した結果、日本脳炎の流行が終了する 11

月には 63 - 75% のウシが JEV に対する抗体を保有していることが分かった (図 5)。しかし、日本脳炎の流行前と思われる 6 月にも 22 - 49% の抗体保有率が認められた。これは移行抗体の影響だと考えている。しかし、2000 年、2002 年、2005 年の 8 月は 11 月並みに抗体保有率が高いのに対して、2001 年、2003 年は抗体保有率が 6 月並みであった。

D. 考察

1. 犬への JEV 感染実験

犬は JEV に感染し、炎症反応は伴うものの、臨床症状は示さないことが確認された。更に、JEV に対する抗体価は 56 日以上持続すること、ウイルス血症を引き起こさないことが確認された。これら感染実験の結果と前年度までの調査結果により、犬は日本脳炎感染状況を血清学的に調査するための安全で優れた対象となることが示された。

2. JEV/eq/Tottori/2003 の病原性

Genotype I に属し、動物に致死的な病気を引き起こした JEV/eq/Tottori/2003 株は予想に反して、マウスの腹腔内接種においてほとんど致死を誘導しないことが示され、genotype III と大きく病原性が異なることが確認された。一方、脳内接種では致死の誘導においてはほぼ同等であることが確認され、マウスにおける末梢での増殖あるいは中枢神経への伝播において genotype III と異なることが示された。同様の結果は、genotype I の JEV/sw/Chiba/88/2003 株でも観察されており、genotype I はマウスの末梢接種では病原性が低いことが再確認された。今後は、JaOH0566 株と JEV/eq/Tottori/2003 株のマウスの腹腔内接種の致死率を指標に、genotype 間の病原性の比較が可能となった。

3. ウシでの日本脳炎抗体保有率の調査

本研究の最大の利点は過去の経過血清が残されている牛での調査であり、それも夏を経験していない 0 歳子牛の調査であることから、JEV 抗体陽性率はすなわちその夏の JEV 感染率を示すことである。牛での調査は毎年 70% 近くの牛が感染していることが確認され、以前のシカでの結果とともに

偶蹄類は JEV に対して感受性が高いことが示された。しかし、移行抗体の影響と考えられる6月の約20-30%の抗体保有率は実際の JEV 感染率の判定を困難にした。その結果、抗体価を求め、4倍以上の抗体価の上昇を検討する必要があることが分かった。

E. 結論

前年度までの結果と総合的に判断して、多くの野生動物・伴侶動物・生産動物が JEV に感染していることが再確認され、依然として JEV は我が国で蔓延していることが分かった。特に、犬は JEV に感染しても発症せず、ウイルス血症にもならず、抗体も持続していることから、都市部や室内における JEV 媒介蚊の存在を知るための安全で優れた指標となることが分かった。また、現在、国内で主流の genotype I はマウスにおける神経侵襲性が genotype III よりも低いことは、両ウイルスの病原性を考える上で興味深い。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimoda H, Ohno Y, Mochizuki M, Okuda M, Iwata H, Maeda K. Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2010 Jul;16(7):1137-1139.

Shimajima M†, Nagao Y†, Shimoda H, Tamaru S, Yamanaka T, Matsumura T, Kondo T, Maeda K. Full genome sequence and virulence analyses of the recent equine isolate of Japanese encephalitis virus. *Journal of Veterinary Medical Science* (In press) (†Equally contributed)

前田 健:野生動物、伴侶動物、生産動物、昆虫、人が関与する日本脳炎ウイルス. *Journal of Veterinary Medicine* (獣医畜産新報)(文永堂)2010

2. 学会発表

下田 宙、奥田 優、岩田祐之、望月雅美、前田 健、下田 宙、長尾裕美子、下島昌幸、鈴木和男、酒井 宏治、水谷哲也「野生動物における日本脳炎ウイルス抗体保有状況とイノシシからのウイルス分離の試み」第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2010年5月(東京)

下島昌幸、長尾裕美子、下田 宙、田丸精治、山中隆史、松村富夫、近藤高志、前田 健「日本脳炎発症馬から分離されたウイルスの全塩基配列の決定と病原性」第25回中国四国ウイルス研究会、2010年6月(岡山)

下島昌幸、長尾裕美子、下田 宙、田丸精治、山中隆史、松村富夫、近藤高志、前田 健「日本脳炎発症馬から分離されたウイルスの全塩基配列の決定と病原性」第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月(帯広)

下田 宙、長尾裕美子、鈴木和男、下島昌幸、前田 健「コウモリを含む在来種における日本脳炎ウイルス抗体保有状況とウイルス分離の試み」第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月(帯広)

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