

日本における日本脳炎検査は、検査会社に依頼されることが多いが、このような事情から HI（赤血球凝集抑制）法あるいは CF（補体結合反応）法が用いられている。CF 法は感度の面から問題があり、HI 法は抗体価が 40 倍以上であれば、2-mercaptoethanol（2-ME）処理することによって、有意に抗体価が低下すれば IgM 抗体陽性と判定することができるが、発症早期で HI 抗体価が低い場合は IgM 抗体の有無を判定できない。したがって、我が国の日本脳炎血清診断も世界標準に適応する必要がある。今後、感染研の *in house* IgM 捕捉 ELISA キットをいかに普及させていくかが課題である。

E. 結語

アジアの日本脳炎流行地域の日本脳炎実験室診断の技術は、WHO のサポートもあり確実に向上している。感染研の *in*

house IgM 捕捉 ELISA キットは、米国 CDC から評価されているキットである。しかし、日本国内の日本脳炎検査の多くは検査会社に依頼され、HI 法あるいは CF 法で実施されている。この状況を変えて IgM 捕捉 ELISA 法に変更する必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

図 1

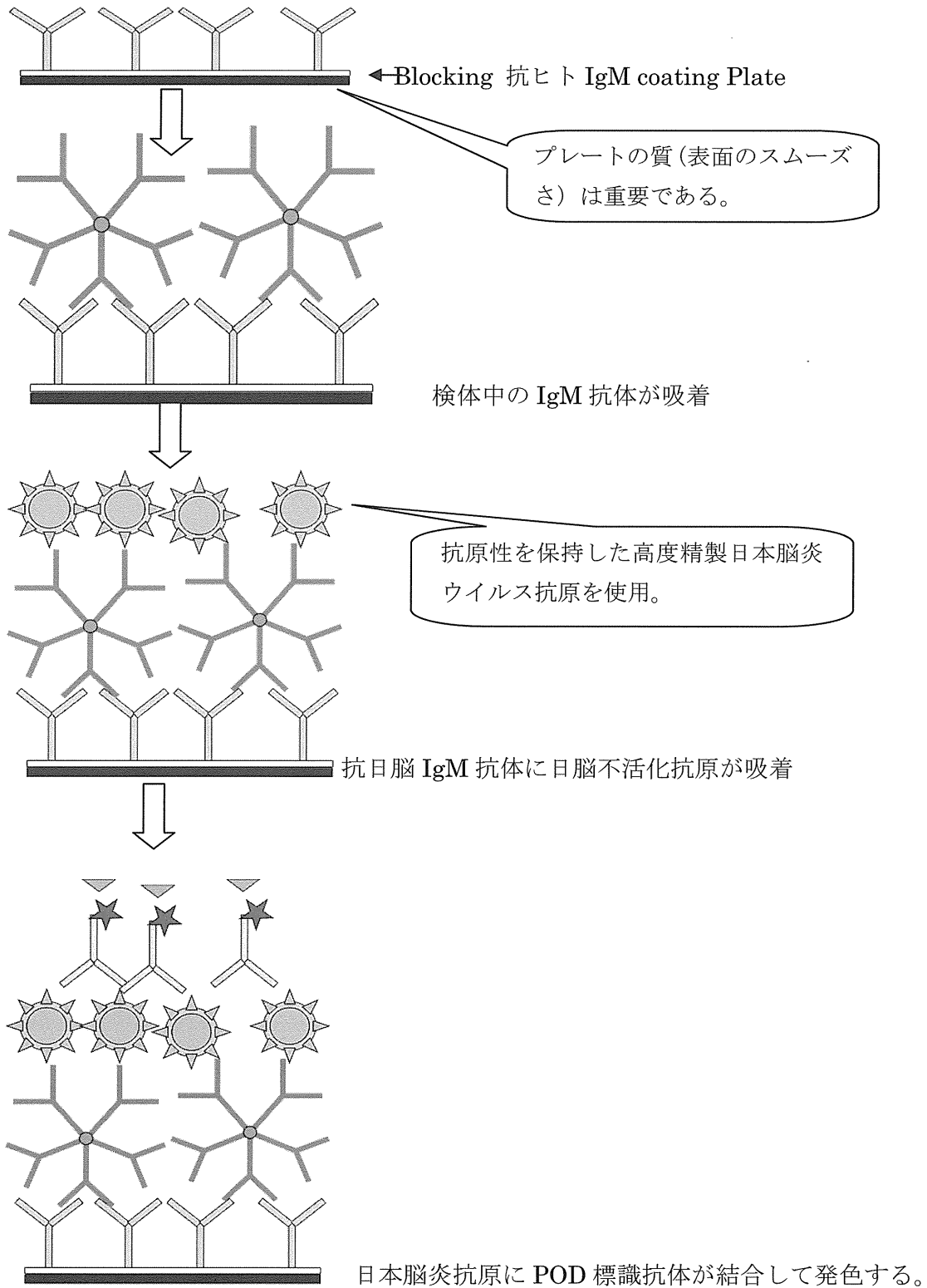


表1 ラオスの検体に関する確認検査

Lao PDR and NIID 2013	
Total testing sample number	14
Agreement sample number	13
Agreement rate	92.9

表2 ベトナムの検体に関する確認検査

Vietnam NIHE and NIID 2013		
Total testing sample number	58	
Agreement sample number	57	
Agreement rate	0.982758621	98.3

表3 デングウイルス、日本脳炎ウイルス感染との鑑別

NPHL Cambodia						NIID Japan					
Sample ID	OD JE	Index JE	OD Den	Index DEN	Ratio JE/DEN	Decision	<i>JE</i>	dengue	Decision	Panbio	Ratio JE/DEN
							P/N ratio				
168	0.39	6.2	0.28	4.6	1.35	Negative	14.02	3.45	JE	Negative	4.1
329	0.22	4.2	0.79	21.2	0.20	dengue	2.25	0.67	JE	DEN	0.3
330	0.39	7.4	1.02	27.5	0.27	dengue	8.69	2.97	JE	DEN	0.7
464	0.20	3.7	1.23	24.0	0.15	dengue	2.41	0.59	JE	DEN	0.3

岡山大学小児科関連施設における急性脳症 66 例の検討

研究分担者 森島恒雄 岡山大学大学院小児医科学 教授
研究協力者 八代将登 岡山大学大学院小児医科学 助教

研究要旨

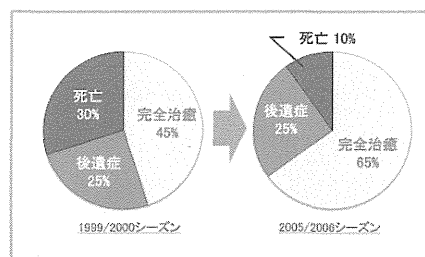
急性脳症の現状調査として、当施設における検討を行った。2006 年から 2013 年に当院での入院加療および関連施設との診療協力を行い、急性脳症と診断した 66 例（0～13 歳、M:F=26:40）を検討した。44 例で病原体が判明した。インフルエンザウイルス 13 例（A 型：11 例、B 型：2 例）、HHV6, 7 型 21 例（6 型：20 例、7 型：1 例）、ロタウイルス 4 例、ムンプス 2 例、O-157 2 例、RSV 1 例、アデノウイルス 1 例であった。54 例を以下の病型に分類した。出血性ショック脳症 (HSES)/急性脳腫脹型 (ABS) 2 例、急性壊死性脳症 (ANE) 4 例、痙攣重積型脳症 (AESD) 27 例、脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎/脳症 (MERS) 3 例であった。原因病原体と病型を評価した。ABS はロタウイルス脳症 2 例、ANE は HHV-6 脳症 2 例、AESD は、HHV-6 脳症 10 例、インフルエンザ脳症 2 例、ムンプス脳症 1 例であった。治療はほぼ全例で、インフルエンザ脳症ガイドラインに準じて行われていた。予後は、死亡 4 例、重度後遺症 11 例、軽度後遺症 18 例、後遺症なし 33 例であった。死亡例は、ABS（ロタウイルス）2 例、ANE（病原体不明）1 例、分類不能（HHV6）1 例であった。インフルエンザ脳症についてはガイドライン施行後、致死率は改善してきているが後遺症を残す例は決して少なくなく、今後の治療法の確立が急務である。

A. 研究目的

2005年に公表されたインフルエンザ脳症ガイドラインは、日本国内で幅広く使用されている。ガイドラインの普及に伴い、以前は無治療では約30%であった致死率が、近年は10%以下に低下してきている。しかし後遺症を残す例は決して少なくはなく、更なる治療法の確立が望まれている。今回、急性脳症の現状調査として、岡山大学小児科および関連施設に

おける急性脳症66例について後方視的に検討した。

インフルエンザ脳症の予後の変化



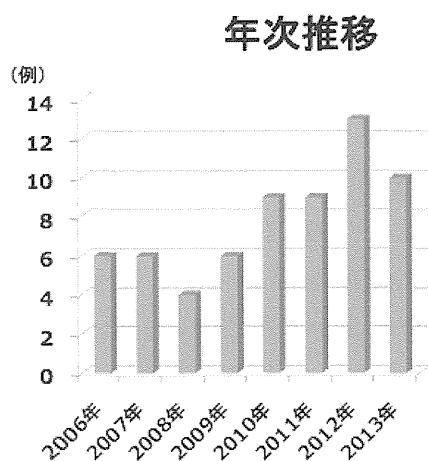
B. 研究方法

2006年～2013年に岡山大学病院での入院加療および関連施設との診療協力を行い急性脳症と診断した66例（0～13歳（中央値2歳0か月）、M:F=26:40）を後方視的に検討した。関連施設は、岡山赤十字病院、日本鋼管福山病院、岩国医療センター、高地医療センターの4病院である。

C. 研究結果

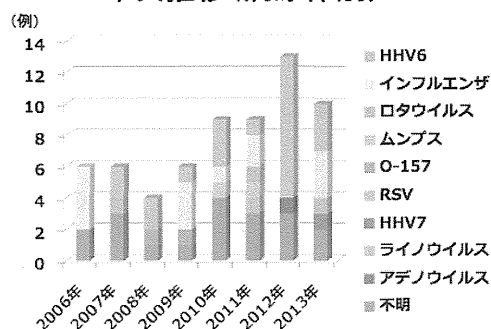
急性脳症症例数の年次推移

症例数は2010年以降増加傾向を認めている (Fig. 1)。理由として、当科では real-time PCR システムを用いてヘルペス属ウイルスの定量化を行っており原因不明の病原体の検索などの検査依頼が増加したことや、当院での重症感染症に対する治療方針が確立しており、良好な転機を示す症例が増えたことなどが推察される。



病原体別では、インフルエンザと HHV6 で約半数を占めている (Fig. 1)。インフルエンザではサイトカインストームを伴う重症例の紹介が多かった。HHV6 では二相性脳症を呈した症例に加え、病原体の検索依頼にて HHV6 感染が判明した症例を含んでいる。

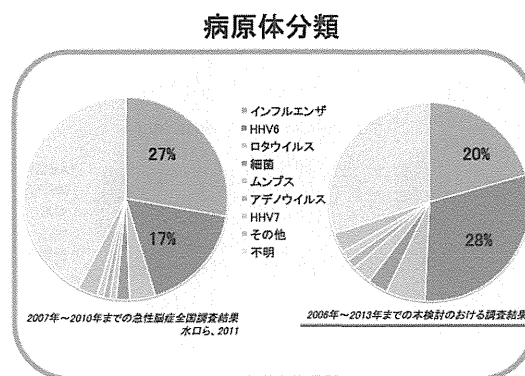
年次推移 (病原体別)



岡山大学病院および当院関連施設（以降、「当院」と記載）での傾向を知るために、以降のデータを全国調査（水口雅ら、2011）と比較を行った。

病原体分類

全国調査と比較して、当院ではインフルエンザ脳症の割合が低く、HHV6 脳症の割合が高いが、それ以外はほぼ同様の傾向を示している。



病型分類

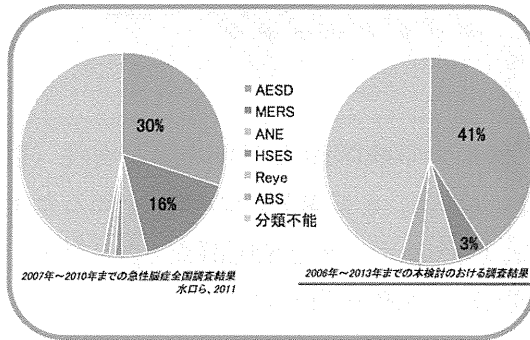
全国調査と同様に病型を以下の通りに分類した。

- ・ 遅発性拡散低下を呈する急性脳症 (AESD)
- ・ 可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎・脳症 (MERS)
- ・ 急性壊死性脳症 (ANE)
- ・ Hemorrhagic shock and encephalopathy 症候群 (HSES)

- ・ 急性脳腫脹型 (ABS)
- ・ ライ症候群 (Reye)

当院では、AESD の割合が高く、MERS の割合が低かった。これは軽症である MERS の紹介例が少なかったためと考えられる。

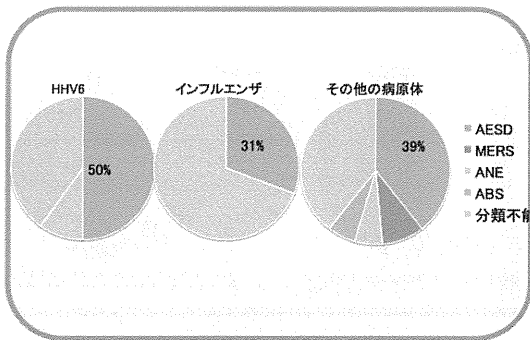
病型分類



病型分類 (病原体別)

病原体別に病型分類の評価を行った。HHV6 脳症では他の病原体と比較して、AESD の割合が有意に高かった。

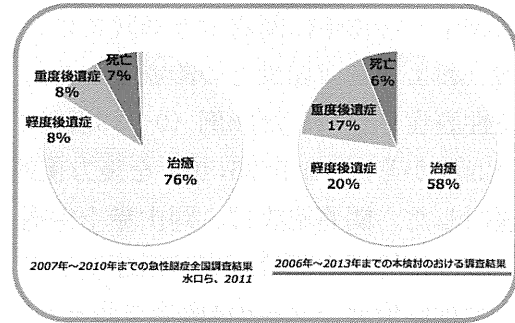
病型分類 (病原体別)



予後

当院では、後遺症を呈する割合を多く認めた。これは、当院への紹介に重症例が多かったことを反映していると考えられる。

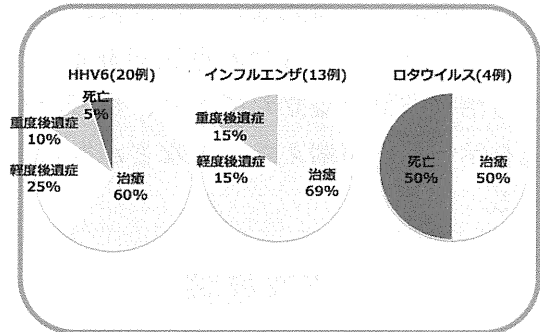
予後



予後 (病原体別)

インフルエンザ脳症に比較し、HHV6 脳症の予後が若干不良であった。またロタウイルス脳症では致死率が 50%と高かった。

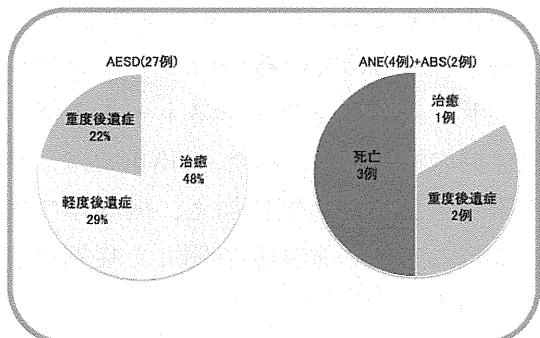
病原体別予後



予後 (病型別)

AESD では死亡例は認めなかったが、後遺症を残す頻度が高かった。当院では AESD の頻度が高かったことが、全体の後遺症率を上昇させたと考えられた。また ANE と ABS は急激な経過を取り致死率が高い。

病型予後



重症例の検討

死亡例 4 例の検討を行った。何れも急性期（48 時間以内）に不可逆的な神経学的障害を認めていた。ABS、ANE では、死亡例・重度後遺症例に進行するものが多く見られた。AEBSD では死亡例は認めなかったが、22%が重度後遺症に進行した。

重症例

死亡4例

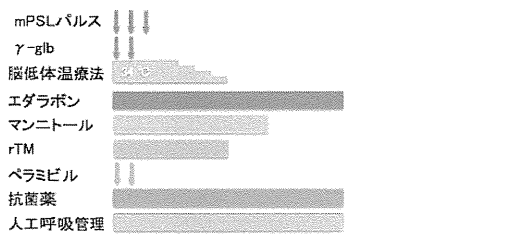
年齢	性別	病原体	病型
0歳9か月	F	ロタウイルス	ABS
1歳4か月	F	ロタウイルス	ABS
1歳0か月	F	HHV6	分類不能(高K血症)
5歳1か月	F	不明	ANE

当院における急性脳症治療（急性期）

当院における急性脳症治療（急性期）を示す。原則としてインフルエンザ脳症ガイドラインに準じて行っている。意識障害が持続している症例では脳低温療法を施行している（34℃を48時間施行。その後40時間かけて復温。）。脳低温療法中は、頭部の画像評価が困難であるため、脳圧モニターによる脳圧管理を行い予後改善につなげていく予定である。

当院における重症インフルエンザ脳症治療法の一例

岡山大学小児科



今後は脳圧モニターによる脳圧管理を導入することで、脳低温療法におけるより適切な脳圧管理を行い、予後改善につなげていく予定。

D. 考察

当院への紹介症例にはMERSなどの軽症

例が少なく、重症例の紹介が多く含まれていた。HHV6に多く見られる痙攣重積型が、神経学的な予後不良の要因として重要である。死亡例は、いずれも急性期早期に不可逆的な変化を来していた。今後の展望として、当施設では重症例に対する早期からの脳低温療法や脳圧モニタリングなどを導入しており、今後有効性を評価する予定である。

E. 結論

ガイドラインの普及に伴い、多くの施設で急性脳症の治療が一般化されてきており、専門施設に重症例が集まってきている。ガイドライン公表後8年が経過し、痙攣重積型脳症などの予後向上などさらなる治療法の確立が急務である。

F. 研究発表

1. 論文発表

• Tsuge M, Yashiro M, Morishima T. et. al: Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A (H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. J Neurovirol. 2014 Feb;20(1):73-84.

• Momonaka H, Morishima T, Ichiyama T. et al: High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy.

Brain Dev. 2013 Jul 29. pii: S0387-7604(13)00207-6

• Okada S, Hasegawa S, Morishima T, Ichiyama T. et. al: Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013 Aug;63(2):194-200.

- Yamashita N, Yashiro M, Morishima T. et. al: Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int.* 2013 Oct;55(5):572-7.
 - Tsukahara H, Fujii Y, Yashiro M, Morishima T. et. al: Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. *Pediatr Int.* 2013 Aug;55(4):461-4.
 - Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Yashiro M, Morishima T. et. al: Clinicoepidemiologic status of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr.* 2013 Jan;52(1):27-31.
 - Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. et. al: Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med.* 2013 Jan;41(1):171-81.
 - Hasegawa S, Morishima T, Ichiyama T. et. al: Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2013 Aug;35(7):626-9.
 - Okumura A., Morishima T. et. al: Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol.* 56(1):25-30, 2013
2. 学会発表
- Yashiro M., Morishima T. et. al: Difference in the profile of locally produced cytokines/chemokines in pneumonia and encephalitis of mice 16th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting, March, 2013, Singapore
 - 藤井洋輔、八代将登、森島恒雄ら：インフルエンザ感染における局所サイトカイン・ケモカインの動態. 第116回日本小児科学会. 2013年4月／広島
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

日本発の細菌性髄膜炎における新たな診療ガイドラインの構築

研究分担者 亀井 聡 日本大学医学部神経内科学 教授

研究要旨

細菌性髄膜炎(BM)は Neurological Emergency であり、患者の有するリスクと年齢別の起炎菌頻度、抗菌薬の耐性化率を考慮し抗菌薬選択する。起炎菌や耐性菌の頻度は地域で異なり、国により初期選択薬は異なっている。【目的】本邦 BM の疫学的現況を把握し、日本の現況に沿った新たな診療ガイドラインの作成をおこなった。【方法】日本神経学会・日本神経治療学会・日本神経感染症学会の3学会合同で作成委員会を組織(作成委員長 亀井 聡)し、Minds に準拠してガイドラインを作成した。【結果】1.主要起炎菌と耐性菌の頻度: 現在本邦における市中感染成人例では、50歳未満で肺炎球菌が約6~7割、インフルエンザ菌が続く。50歳以上では、肺炎球菌の他に、腸内細菌、緑膿菌が検出され、ブドウ球菌も多い。2.治療(1)抗菌薬選択:免疫能が正常な16~50歳の成人例では、本邦 BM から分離された PRSP の MIC90 は、パニペネム・ベタミプロン(PAPM/BP)が最も低く、メロペネム(MERP)とバンコマイシン(VCM)が続いている。従って、カルバペネム系抗菌薬(PAPM/BP または MERP)を推奨する。50歳を超える症例および慢性消耗疾患や免疫不全を有する成人例は、肺炎球菌が多く、しかも耐性化していること、また MRSA などブドウ球菌やリステリア菌も念頭おき、アンピシリン(ABPC)、VCM、および第3世代セフェムの併用を推奨する。(2)副腎皮質ステロイド薬併用: 医療資源の整っている先進国では本薬併用は有用と考える。しかし、ブドウ球菌が多い外科的処置後の BM では、ブドウ球菌の本薬の評価は全くなく、この場合の併用については原段階では推奨できない。【考察】今回の診療ガイドラインの全面改訂に際し、現時点の日本に於ける細菌性髄膜炎の疫学的現況を把握することから始め、この現況を踏まえて診療ガイドラインを構築することを試みた。つまり、単に欧米の診療ガイドラインを参考にして作成するのではなく、本症についての「日本発」の「日本における」診療ガイドラインの構築が極めて重要との認識に立脚し作成作業をおこなった。【結論】本邦 BM の疫学的現況を把握し、日本の現況に沿った新たな診療ガイドラインの作成をおこなった。

A. 研究目的

細菌性髄膜炎(BM)は Neurological Emergency であり、患者の有するリスクと年齢別の起炎菌頻度、抗菌薬の耐性化率を考慮し抗菌薬を選択する必要がある。起炎菌や耐性菌の頻度は地域で異なり、国によりその初期選択薬の推奨は異なっている。今回、本邦における BM の疫学的現況を把握し、日本の現況に沿った新たな診療ガイドラインの作成をおこなった。

B. 研究方法

日本神経学会・日本神経治療学会・日本神経感染症学会の3学会合同で作成委員会を組織(作成委員長 亀井 聡)し、Minds (Medical Information Network Distribution Service)の指針に準拠しガイドラインを作成した。

C. 研究結果

1. 主要起炎菌と耐性菌の頻度

現在の本邦における市中感染成人例の主要起炎菌は、50歳未満の起炎菌は、肺炎球菌が約6~

7割、インフルエンザ菌が続く。BMの肺炎球菌は耐性化が進み、成人例のペニシリン結合蛋白遺伝子解析では、2000~2012年における肺炎球菌性髄膜炎において、ペニシリン高度耐性肺炎球菌(PRSP)40%、中等度耐性(PISP)が45%を示し、ペニシリン感性(PSSP)は15%のみである。

本邦における慢性消耗性疾患および宿主免疫不全を有するBM成人例の起炎菌では、MRSA10.3%、PISP12.8%、PRSP10.3%を占めている。

50歳以上では、肺炎球菌の他に、大腸菌やクレブシエラなどの腸内細菌、緑膿菌を含むブドウ糖非発酵菌が検出され、黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌も多い。しかも耐性化している場合が多く、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)をカバーする治療が必要といえる。

一方、脳室ドレナージやシャントなどの外科的侵襲に伴うBM成人例の検討では、ブドウ球菌族が55.3%と多く、しかも85%が耐性菌であった。

2. 治療

(1) 抗菌薬選択

免疫能が正常な16～50歳の成人例では、本邦BMから分離されたPRSPの90%最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration: MIC)は、パニペネム・ベタミプロン(PAPM/BP)が最も低値で、2管差でメロペネム(MERP)とバンコマイシン(VCM)が続いている。従って、MICが低く、耐性菌までスペクトラムがあり、かつ髄液移行も比較的良好である「カルバペネム系抗菌薬であるPAPM/BPまたはMERP」を推奨する。16～50歳の成人例の選択薬にカルバペネム系を第一選択とした理由を説明する。米国のガイドラインで推奨されている「第3世代セフェムとVCMとの併用」は、抗菌スペクトルとしては十分である。しかし、VCMが広く使用されている米国では、VCM耐性の腸球菌や肺炎球菌性BMが報告されている。VCMの使用が米国のように広く使用した場合、VCM耐性菌の増加が危惧され、本邦にてこの状況をできる限り抑制したいとの考えに立脚し、16～50歳の成人例の選択薬にカルバペネム系抗菌薬を第一選択薬とした。

50歳を超える症例および慢性消耗疾患や免疫不全状態を有する成人例における抗菌薬選択は、起炎菌として肺炎球菌が多く、しかも耐性化していること、その他としてMRSAなどブドウ球菌やリステリア菌も念頭におかなければならない。MRSAを念頭においた抗菌薬選択となると、VCMを中心に選択せざるをえない。従って、「アンピシリン(ABPC)、VCM、および第3世代セフェムの3剤併用」を推奨する。

(2) 副腎皮質ステロイド薬併用

医療資源の整っている先進国では副腎皮質ステロイド薬併用は有用と考える。肺炎球菌はエビデンスがあるが、その他の菌については慎重な意見もある。しかし、最近の副腎皮質ステロイド薬の定量評価によれば、髄膜炎菌やインフルエンザ菌は症例数に限りがあり有意ではないが、その相対リスクはいずれも1より低い。つまり、肺炎球菌以外にて副腎皮質ステロイド薬が無効というエビデンスがあるわけではない。従って、抗菌薬投与開始の10～20分前にdexamethasoneを0.15 mg/kg・6時間毎で2～4日間の短期投与とする。しかし、外科的処置後のBMではブドウ球菌が多い。ブドウ球菌における副腎皮質ステロイド薬の評価は全くなく、従ってこの場合の副腎皮質ステロイド薬併用については原段階では推奨できない。

D. 考察

本症の治療は、基本的に肺炎などの他の感染症と異なり、数時間で意識清明から昏睡になり死亡する場合もあり、その緊急性と病態を理解して臨

む必要がある。基本的に本症の治療は、その地域における年齢階層別主要起炎菌の分布、耐性菌の頻度および宿主のリスクを考慮し、抗菌薬選択をおこなうことが必要である。実際に、海外における本症の診療ガイドラインにおける治療選択は、その国の疫学的現況を背景に作成されており、国により推奨されている治療が異なっている現状がある。

このような現状を踏まえ、今回の診療ガイドラインの全面改訂に際し、我々ではできる限り、現時点の日本に於ける細菌性髄膜炎の疫学的現況を把握することから始め、この現況を踏まえて診療ガイドラインを構築することを試みた。つまり、単に欧米の診療ガイドラインを参考にして作成するのではなく、本症についての「日本発」の「日本における」診療ガイドラインの構築が極めて重要との認識に立脚し作成作業をおこなった。

E. 結論

本邦BMの疫学的現況を把握し、日本の疫学的現況に沿った新たな診療ガイドラインの作成をおこなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<原著論文>

なし

<総説>

- 1) 亀井 聡:「神経・精神疾患診療マニュアル」V. よく見られる神経疾患B. 感染性・炎症性疾患. 髄膜炎. 日本医師会雑誌 142・特別号(2): S166-S169, 2013.
- 2) 亀井 聡: 髄膜炎診療ガイドライン. 感染症道場2(4), 32-36, 2013.
- 3) 亀井 聡: 抗NMDAレセプター抗体と辺縁系脳炎. Current Insights in Neurological Science 19-20: 22-23, 2013.
- 4) 亀井 聡: 抗NMDA受容体脳炎の診断と治療. 日本臨床 71(5), 904-912, 2013.
- 5) 亀井 聡: 抗NMDA受容体脳炎. ペインクリニック 34(7), 977-985, 2013.
- 6) 亀井 聡: 細菌性髄膜炎. 臨牀と研究 90(12): 1717-1722, 2013.

<著書>

- 1) 亀井 聡: 化膿性髄膜炎(水澤英洋, 鈴木則宏, 梶 龍兒 ほか編). 今日の神経疾患治療指針第2版, 医学書院, pp. 418-425, 東京, 2013.

- 2) 亀井 聡: 細菌性髄膜炎(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2195-2199, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 3) 亀井 聡: 結核性髄膜炎(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2199-2200, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 4) 亀井 聡: 脳膿瘍(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2200-2202, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 5) 亀井 聡: 静脈洞感染症(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2202, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 6) 亀井 聡: 脊髄硬膜外膿瘍(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2203-2204, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 7) 亀井 聡: その他の細菌感染症(矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか編). 内科学第10版, pp. 2204-2205, 朝倉書店, 東京, 2013.
 - 8) 亀井 聡: 成人の急性細菌性髄膜炎. 感染症症候群(第2版) 下巻, pp. 93-98, 日本臨床社, 大阪, 2013.
 - 9) 亀井 聡: 成人の細菌性髄膜炎. 神経症候群(第2版) I, pp. 725-730, 日本臨床社, 大阪, 2013.
 - 10) 亀井 聡: 単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1), 2型(HSV-2). 神経症候群(第2版) I, pp. 536-540, 日本臨床社, 大阪, 2013.
 - 11) 亀井 聡: 結核菌. 神経症候群(第2版) I, pp. 812-816, 日本臨床社, 大阪, 2013.
 - 12) 亀井 聡: 嗜眠性脳炎(平田幸一ほか編). 南山堂医学大事典, 南山堂, 東京, 2014(印刷中).
 - 13) 亀井 聡: 髄膜炎(平田幸一ほか編). 南山堂医学大事典, 南山堂, 東京, 2014(印刷中).
 - 14) 亀井 聡: 化膿性髄膜炎(平田幸一ほか編). 南山堂医学大事典, 南山堂, 東京, 2014(印刷中).
 - 15) 亀井 聡: 真菌性髄膜炎(平田幸一ほか編). 南山堂医学大事典, 南山堂, 東京, 2014(印刷中).
 - 16) 亀井 聡: 脳真菌症(平田幸一ほか編). 南山堂医学大事典, 南山堂, 東京, 2014(印刷中).
 - 17) 亀井 聡: 単純ヘルペス脳炎. 今日の診断指針(第7版)(水澤英洋ほか編), 医学書院, 東京, 2014(印刷中)
 - 18) 亀井 聡: 2. 髄膜炎・脳炎・脳症. 概説. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 19) 亀井 聡: 2-1. 化膿性髄膜炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 20) 亀井 聡: 2-2. ウイルス性髄膜炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 21) 亀井 聡: 2-3. 結核性髄膜炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 22) 亀井 聡: 2-4. クリプトコッカス髄膜炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 23) 亀井 聡: 2-5. その他の亜急性髄膜炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 24) 亀井 聡: 2-6. 単純ヘルペス脳炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 25) 亀井 聡: 2-7. 日本脳炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 26) 亀井 聡: 2-8. 他の急性脳炎. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 27) 亀井 聡: 2-9. 脳膿瘍. (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
 - 28) 亀井 聡: 2-10. 神経梅毒(脳梅毒). (平山恵造監修. 廣瀬源二郎, 田代邦雄, 葛原茂樹編). 臨床神経内科学改訂6版, 南山堂, 東京, 2014 (印刷中).
2. 学会発表
- <シンポジウム>
- 1) 亀井 聡: 単純ヘルペス脳炎の新たな治療展開 (シンポジウム: 小児の急性脳炎・脳症). 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013. 4.
 - 2) 亀井 聡: 髄膜炎治療の基本と pitfall. 第31回日本神経治療学会総会, 東京, 2013. 11.
 - 3) 亀井 聡: 我が国における細菌性髄膜炎の治療動向(教育セミナー9). 第41回日本集中治療医学会学術集会, 京都, 2014. 2.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当事項無し。

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

日本脳炎の実験室診断と IgM 捕捉 ELISA 法の改良

研究分担者	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長
研究協力者	田島 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部	主任研究官
研究協力者	中山絵里	国立感染症研究所ウイルス第一部	研究員
研究協力者	モイメンリン	国立感染症研究所ウイルス第一部	研究員
研究協力者	小滝 徹	国立感染症研究所ウイルス第一部	非常勤職員

研究要旨

日本脳炎の検査依頼は、平成25年には21件があった。そのうち、6症例が日本脳炎であった。6例の内訳は京都2例、兵庫1例、三重1例、徳島1例、岡山1例であった。日本全体の日本脳炎報告数は9症例で、残り3症例はいずれも九州地方（熊本2例、長崎1例）であった。国立感染症研究所で検査を実施した日本脳炎6例の診断根拠となったのは、IgM抗体陽性6件、ウイルス遺伝子検出2件であった。我が国で急性脳炎患者を診察した場合、日本脳炎を疑われるまでにかかりの日数が必要とされる現状が反映されている。発症早期の検体が得られないことが多い現状で、髄液中の抗日本脳炎IgM抗体検出が非常に重要である。一方で、少なくとも関東以西の夏期の急性脳炎症例では、日本脳炎の検査を実施する必要があることの啓発活動も必要である。

A. 研究目的

日本脳炎（日脳）の実験室診断は、髄液・血清からのウイルス遺伝子検出とIgM抗体検出を実施する。ウエストナイルウイルスやデングウイルスなど他のフラビウイルス感染症と鑑別が必要な場合は、中和抗体検査を実施する。日本脳炎の場合、脳炎症状を呈した後すみやかに髄液中にIgM抗体を検出することができる。我が国の日本脳炎実験室診断は、検査会社ではHI（赤血球凝集抑制）法あるいはCF（補体結合反応）法が用いられているが、感度の点からIgM捕捉ELISA

法が優れており、IgM捕捉ELISA法が世界的に標準法とされている。また、髄液からのウイルス遺伝子検出は、脳炎発症後早期のものでない限り検出は困難なことが多いが、検出感度を上げるためNested逆転写PCR法を用いた場合は、非特異反応や偽陽性を来すことがあるため、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCR法（TaqMan法）を用いて、国内で見逃されている日本脳炎症例の掘り起こしを行なった。

B. 研究方法

1) 日本脳炎ウイルス遺伝子検出
日脳ウイルス遺伝子 3、5 型共通検出用 (NS5 用) として
JENS5s269AF092550:

GCCACCGGATACTGGGTAGA、
JENS5r330AF092550:
TGTTAACCCAGTCCTCCTGGAA、
JENS5p294AF092550:

FAM-CTGCCTGCGTCTCA-MGB
を用いた。

遺伝子 1 型検出用 (E 領域) として
JE1&3en1052s-1082:
ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT、
JE1en1119c-1082:

GGGAGCGTTTGGAGTTACAGTAA、
JEen1082pb:

FAM-CTC AAG CAG CAAA-MGB。
遺伝子 3 型検出用 (E 領域) として、
JE1&3en1052s-1082:

ATGGGAATTAYTCAGCGCAAGT、
JE3en1119c-1082:
AGGAGCATTGGGTGTTACTGTAAA、
JE3en1082pb:

FAM-CCCAGGCGCAAAA-MGB
を用いた。

2) 抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体検査

抗ヒト IgM 抗体単クローン抗体を 96
穴 ELISA プレートにコーティングし、ブ
ロッキングの上、100 倍希釈した血清を
検査検体とし、1 時間室温で反応させた後、
プレート洗浄後、そこに細胞培養不活化
日本脳炎ウイルス抗原を加え、2 時間室温
で反応させる。プレートを洗浄後、ペル
オキシダーゼ標識抗フラビウイルス IgG
抗体を 30 分間室温で反応させプレート

を洗浄した後、TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) ペルオキシダ
ーゼ基質液を加え遮光下に 8 分間反応さ
せ、1 規定硫酸を等量加えて反応を停止し、
ELISA リーダーにより測定した。

C. 研究結果

国立感染症研究所で検査を実施した日
脳患者 6 例 (No.3、5、6、7、8、9) の
うち、4 例 (No.5、7、8、9) はいずれも
発病後 1 ヶ月以上たってからの検査依頼
であった。いずれも西日本とは言え本州
に位置する府県であった。したがって、
診断根拠となったのは IgM ELISA 法に
よる抗日脳 IgM 抗体検出であった。No.9
に関しては、脳生検による脳組織からの
遺伝子も検出 (研究分担者、片野らによ
り実施) できた。一方、三重県 (No.3)、
徳島県 (No.8) の症例では急性期の髄液
から日脳ウイルス遺伝子が検出され、さ
らに血清および髄液から抗日脳ウイルス
IgM 抗体を検出した。また、長崎県、三
重県も感染研と同じ IgM 捕捉 ELISA 法
を用いている。

日本脳炎陰性の急性脳炎は、14 症例で
あった。日本脳炎ウイルス感染リスクの
低い 2 月、3 月発症例が各 1 例であり、
15 歳以下の小児が 6 例であった。60 歳以
上が 4 例、40 歳代が 3 例、50 歳代が 1
例であった。いずれの症例も、リアルタ
イム RT-PCR により日本脳炎ウイルス遺
伝子陰性、抗日本脳炎 IgM 抗体陰性であ
った。本研究班で検査依頼のあった原因
不明症例はすべてこの陰性群に含まれて
いる。

D. 考察

2013年の日本脳炎患者発生は、例年と異なり近畿地方で5例（京都2例、兵庫1例、三重1例、岡山1例）発生した。徳島県でも1例発生したことを考えるとこの地域で日脳ウイルスの活動が活発であったと考えられ、感染症流行予測調査一歩タの日本脳炎抗体保有状況一の傾向と相関する。日本脳炎は、地域によってはすでに過去の感染症であるという認識が強いのか、急性脳炎を診察しても日本脳炎が鑑別診断として想起されないようである。したがって、日本脳炎の診断にはウイルス遺伝子検出よりも、抗日脳IgM抗体検出が重要である。特に、日本脳炎では脳炎発症後早期に髄液中にIgM抗体が出現し、「髄液中のIgM抗体陽性」は中枢神経系で日脳ウイルスが増殖したことを間接的に示唆するものであることを医療関係者に啓発する必要がある。

一方、日本脳炎患者が発生した場合、九州、四国地方では報道発表することが多いが、昨年のように近畿地方で発生しても報道発表されることは稀である。しかし、報道発表がなされていれば、9例目の日脳症例の様に診断まで3ヶ月を要することはなかった可能性が高い。日本脳炎患者が1例発生した場合、300～1000人の不顕性感染者がいることを考えれば、

感染蚊に対する警鐘の意味でも報道発表、ホームページ等での公表が必要ではないかと考えられる。

E. 結語

2013年の日脳患者発生状況は、近畿地方で5症例報告された。近年、医師が急性脳炎患者を診察した場合に、必ずしも日本脳炎の可能性を考えない。そのため急性期の髄液の入手が困難な症例が多く、発症からある程度経過した髄液中のIgM抗体検出が診断上重要である。

また、日本脳炎症例が報告された場合は、公表の上すみやかに警鐘を発出する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 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

特になし。

表1 平成25年、日本脳炎症例とその発病日、検体採取日および診断根拠

	府県名	診断根拠	検体採取日 下線は髄液	発病 日	検体受 理日 (感染 研)	年齢 (代)	転帰
1	熊本県	HI	NA	8/16	—	60-65 歳	
2	長崎県	IgM ELISA 陽性	NA	9/7	—	80-85 歳	死亡
3	三重県	IgM ELISA 陽性 RT-PCR 法	9/10, <u>13</u>	9/10	NA	70-75 歳	
4	熊本県	HI (IgM+)	NA	9/3	—	85-90 歳	
5	岡山県	IgM ELISA 陽性	9/5,6,12,14,17	9/5	10/8	75-80 歳	
6	京都府	IgM ELISA 陽性	9/26	9/22	10/2	65-70 歳	
7	兵庫県	IgM ELISA 陽性	10/7	8/30	10/8	65-70 歳	
8	徳島県	IgM ELISA 陽性 rt RT-PCR(+)	9/18, <u>11</u>	9/6	10/17	75-80 歳	後遺症
9	京都府	遺伝子検出(脳 組織)&IgM ELISA 陽性	10/2, 11/12,15 <u>10/2, 11/12</u>	8/25	11/20	70-75 歳	死亡

表2 平成25年、日本脳炎陰性であった原因不明急性脳炎、髄膜炎症例の検査結果

ID	都道府県	年齢	発症日	検体種類	検体採取日
1	島根県	63	2/1	血清、髄液	2月21日
2	新潟県	43	3/24	血清	4/17, 5/7
3	福岡県	1	5/7	血清、髄液	5/10&22, 5/16
4	鹿児島県	62	6/7	血清・血液、髄液	6/10, 6/8
5*	岡山県	67	7/10(7/24**)	血清、髄液	7/24
6	福岡県	12	8/5	血清、髄液	8/12
7	山口県	40	8/26	血清、髄液	8/26, 8/27
8	東京都	42	9/18	血清	9/18
9	東京都	1m	8/15	血清・髄液	8/16
10	東京都	1m	8/25	血清・髄液	8/26
11	東京都	3	9/18	髄液	9/26
12	沖縄県	新生児	10/14	血清、臓器	10/15, 20
13	兵庫県	57	8/17	血清、髄液	11/14
14	岡山県	47	11/13	血清、髄液	11/14, 12/2

不明脳炎症例におけるウイルスの網羅的検索

研究分担者	片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部	室長
研究協力者	福本 瞳	国立感染症研究所感染病理部	協力研究員
研究協力者	高橋健太	国立感染症研究所感染病理部	研究員
研究協力者	保科しほ	国立感染症研究所感染病理部	協力研究員
研究協力者	佐藤由子	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
研究協力者	中島典子	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
研究協力者	長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部	部長
研究協力者	黒田 誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター	センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官
研究協力者	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長

研究要旨

原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、その原因を究明すべく、ウイルスの網羅的検索を行った。本年度は国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた不明脳炎の解析結果をまとめるとともに、本研究班で収集された不明脳炎サンプルにつき、ウイルスの網羅的解析を行った。2006年以降、国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた32例の不明脳炎例につき、163種類のウイルスを同時に網羅的に検出可能な **multivirus real-time PCR** を用い、原因ウイルスの同定を試みた。結果、10例で原因ウイルスが同定され、原因として検出されたウイルスは、単純ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、コクサッキーウイルス、日本脳炎ウイルスなどであった。一方、当研究班で収集したサンプルは9例であり、その全例につき、**multivirus real-time PCR** を施行した。1例からコクサッキーウイルス B3 が同定されたが、中枢神経系のサンプルの解析ができず、脳炎の判定はできなかった。2例については内因性コントロールであるヒト遺伝子が検出されず、解析に十分な検体ではなかった。ウイルスの網羅的検出法で有意な病原体が得られないサンプルは次世代シーケンサーに供され、2例からコクサッキーウイルス B4 が検出されている。解析に不十分なサンプルが見られたことから、サンプルの採取法や保存、輸送方法について、提言を行なった。現在、ウイルスの網羅的検出法の改良を重ね、その感度と特異性を改善することで、原因ウイルスの同定率の向上を目指している。

A. 研究目的

感染症法では急性脳炎（ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く）は5類感染症に分類され、診断した医師は7日以内に最寄りの保健所に届け出なければならない。年間、100例から300例程度の報告があり、そのほかに、単純ヘルペスウイルス1型による脳炎が年間300例程度あると推定されている。急性脳炎の症例では、近年では単純ヘルペスウイルスのほかに、インフルエンザウイルスやムンプスウイルス、ロタウイルスなどさまざまなウイルスが原因とされて

いるが、その半分以上は原因不明とされている。また、原因不明の脳炎では日本脳炎の検索をしている症例は少なく、日本脳炎の症例がどれだけ紛れ込んでいるかも不明である。そこで、本研究班では、原因不明の急性脳炎・脳症、予防接種後急性脳炎・脳症、急性散在性脳脊髄炎（**acute disseminated encephalo myelitis; ADEM**）症例から検体を収集し、日本脳炎を鑑別すると共に、網羅的な病原体検索を行い、脳炎・脳症、ADEMの実態・病因解明に資することを目的とする。

平成25年11月22日付で、厚生労働省結核感染症課から全国の感染症対策課へ「日本脳炎及び予防

接種後を含む急性脳炎・脳症等の実態把握について」の事務連絡がなされ、感染症法に基づき医療機関から届出のあった急性脳炎症例のうち、地方衛生研究所等において病原体が確認されない場合、又は、地方衛生研究所等での検査が困難と判断された場合、研究班において詳細な解析を行う旨が連絡された。この事務連絡により、全国の医療機関、地方衛生研究所より、原因不明の脳炎のサンプルが当研究所へ送られ、解析に供されることとなった。当研究所に送付された検体は、まず、日本脳炎の検索が研究分担者 高崎智彦室長（ウイルス 1 部）によりなされ、陰性の場合、real-time PCR 法によるウイルスの網羅的検索を感染病理部で行う。有意なウイルスが検出されなかった場合はさらにこれらのサンプルは、研究分担者 黒田誠 病原体ゲノム解析研究センター長に送付され、次世代シーケンサーによる網羅的病原体遺伝子検索を行う。

これとは別に、国立感染症研究所感染病理部では原因不明の感染症を疑う病理検体が全国の病院などから年間数件、コンサルトされている。このうち、原因不明の脳炎、脳症の検体は 2006 年以降 2013 年末までで 30 例を超える。これらの症例につき、real-time PCR 法によるウイルスの網羅的検索を実施している。これまで 32 例の不明脳炎の解析を行っており、この解析結果についても検討を行った。

B. 研究方法

1) 臨床検体

検体収集の方法と、感染研における検査の役割分担は研究代表者多屋と研究分担者黒田の報告書に詳しい。感染研に到着した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）は、日本脳炎ウイルス（研究分担者：高崎智彦）→real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法（研究分担者：片野晴隆）→次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査（研究分担者：黒田誠）の順に実施する。

2) 核酸抽出

髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便のそれぞれの検体から DNA, RNA を抽出した。DNA はおもに DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) で、RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) で行った。また、パラフィン切片からの DNA, RNA 抽出は QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), PureLink FFPE RNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いた。

3) real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法

ヒトに病原性を持つと考えられる 163 種類のウイルスを 96 穴プレート上で一度に検出できる real-time (RT-)PCR システムを本研究室で独自に開発し、これにより RNA および DNA サンプルからウイルスの検出を試みた(Katano H et al. J Med Virol 2011)(表 1, 図 1)。定量的 PCR は MX3005P (ストラタジーン社)、または ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認済である (H25/9/25 No.445)。試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられた状態で感染研に送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する (連結可能匿名化)。したがって、検査実施者が試料提供者個人を特定することはできない。

C. 研究結果

1) 感染病理部リファレンス症例における脳炎、脳症の解析

感染病理部の病理学的検査業務(リファレンス業務)には全国の医療機関から多くの不明感染症例の病理検体が寄せられ、原因の究明のための病理学的解析を行っている。脳炎、脳症のサンプルも年間数件が寄せられ、2006 年からは前述の multivirus real-time PCR を使い、不明病原体の検索を行っている。2006 年から 2013 年末までに multivirus real-time PCR で解析した症例は 32 例であり、このうちの 10 例(31%)で、本検査系によりはじめて、病原微生物の同定に至っている。検出されたウイルスの内訳は単純ヘルペスウイルス 1 型が 4 例、単純ヘルペスウイルス 2 型が 1 例、ヒトヘルペスウイルス 6, JC ウイルス、パレコウイルス 3 型、コクサッキーウイルス A6, 日本脳炎ウイルスが各 1 例である。multivirus real-time PCR では、TTV やヒト内因性レトロウイルスの遺伝子が検出される例が少なくないが、これらのウイルス遺伝子はヒトの健常者や健常部位からも検出されるものであり、有意な病原体として捉えていない。感染病理部に寄せられる検体のほとんどは病理検体であり、脳炎であれば、脳生検組織か剖検の脳組織である。上記、ウイルスの多くは脳組織(生検、剖検)において、免疫組織学的に確認されたもので、病理学的に原因と考えられるウイルスのみを挙げている。単純ヘルペスウイルス 1

型の頻度が高かったが、理由として、臨床では抗体のみの検査が行われ、PCR 検査が行われなかったこと、PCR 検査は行われたが、血液などのサンプルを用いていたもの、髄液サンプルでも採取時期がアシクロビルを導入した後であり、PCR 検査が陰性になったことなど、理由はさまざまである。

研究分担者の黒田センター長らはこれらの検体から改めて、次世代シーケンサーによる解析を行い、multivirus real-time PCR の結果を確認すると共に感度の比較等を行った。詳細は黒田らの報告書を参照されたい。

2) 本研究課題で収集した急性脳炎・脳症検体の病原体検索

これまで9件の解析依頼があり、当部ではこのうちの1例でコクサッキーウイルス B3 を病因として同定したものの、他の8例については原因病原体の同定には至らなかった(表 2)。その後の次世代シーケンサーによる解析で、2例についてはコクサッキーウイルス B4 が同定されている。なお、日本脳炎は全例で陰性であった。9例中、2例については内因性コントロールであるヒト遺伝子が検出されず、遺伝子解析用のサンプルとしては問題があることが推定された。

Multivirus real-time PCR でコクサッキーウイルス B3 が同定された患者(P5)については、血清にくわえ、剖検時に凍結保存された心臓、腎臓、肝臓の凍結組織が送付されてきたが、脳組織や髄液サンプルはなく、脳炎の解析は不可であった。血清と心、肝、腎の3臓器から抽出した核酸をサンプルに Multivirus real-time PCR を行ったところ、pan-enterovirus のプローブ、プライマーセットが陽性となり、コクサッキーウイルス B3 を含む、他のエンテロウイルス系のプローブ、プライマーセットでは、陽性シグナルは得られなかった。そこで、pan-enterovirus のプライマーセットを用い、RT-PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により、その PCR 産物の塩基配列を決定した(図 2)。その結果、得られた核酸配列はコクサッキーウイルス B3 の配列と一致した。臓器別にウイルス量を real-time RT-PCR で計測したところ、心臓に高コピー数のウイルスが検出された。各臓器のパラフィン切片について、病理組織学的な検討を行ったところ、心臓にはリンパ球を主体とした炎症性細胞浸潤が認められ、心筋束の断裂や浮腫が著明であった。コクサッキーウイルス B3 に対する免疫組織化学で、傷害を

受けた心筋細胞に陽性シグナルを認めたことから、コクサッキーウイルス B3 による心筋炎が確定した。免疫組織化学では腎の尿細管上皮や副腎髄質の一部にも陽性シグナルが認められたが、肝臓は広範な壊死が認められたものの、明らかな免疫染色陽性像は見られなかった。以上を総合すると、本症例はコクサッキーウイルス B3 の全身感染であり、急性心筋炎がその主たる病変と考えられるが、脳などの中枢神経系の検索ができなかったことから、脳炎の有無は評価ができなかった。

D. 考 察

脳炎の病理診断には脳実質に炎症性細胞浸潤を伴うことが必要である。炎症や形態的な変化がほとんど認められないのにもかかわらず、臨床的に脳炎様の症状がある場合、その多くは脳症に分類される。ウイルス性脳炎の症例では、脳にウイルスが侵入、増殖し、器質的な変化を起こすことで、脳炎症状を起こすと考えられる。一方、脳症では、ウイルス感染などにより誘導されたリンパ球やマクロファージが一部のサイトカインを大量に発現し、著しく不均衡なサイトカインバランスが生じることが脳症の発症に関与すると推察されている。

今回、解析した病理の症例は、臨床的にも病理学的にも脳炎の診断がなされたものであり、HE 染色などで明らかな封入体を示す症例も含まれている。不明脳炎の中でも、単純ヘルペスウイルスがもっとも頻度の高いウイルスであったが、これらの症例は臨床経過中、PCR 検索がされていないなど、不十分な検索により不明脳炎の範疇に入れられたものも含まれる。改めて、ヘルペス脳炎の診断基準(日本神経感染症学会編 単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン)に沿ったウイルス検索法が徹底されることが望まれる。

本研究班で収集されたサンプルは、医療機関から地方衛生研究所の検査を経て、原因不明と考えられる脳炎サンプルである。multivirus real-time PCR で原因が確定できた例は1例にすぎないが、次世代シーケンサーによる解析ではさらに2例の症例で病因ウイルスが検出されており、班としての病原体検出率は1/3である。Multivirus real-time PCR は一度に多くのウイルスを迅速に検出することから、大変有用ではあるが、いくつかの問題点も明らかにされている。本研究班で、コクサッキーウイルスが検出された3例はいずれも Multivirus real-time PCR ではコクサッキーウイルスは同定されていない。

コクサッキーウイルス B3 も B4 も Multivirus real-time PCR のリストには含まれているものの、症例 5 (P5)は pan-enterovirus のみが陽性であり、コクサッキーウイルス B3 は陰性であった。コクサッキーウイルス B4 の症例については pan-enterovirus も陰性であった。これは、エンテロウイルスが常に変異を繰り返し増殖するために、ウイルスの変異により、検出できなくなったものと考えられる。変異の多いウイルスでも検出できるよう、プローブ、プライマーの改良が必要であろう。

さらに、今回輸送されたサンプルのうち、2つの症例では内因性のコントロールであるヒト遺伝子も検出されず、遺伝子検索には適切なサンプルとはいえない状態であった。脳炎の診断には適切なサンプル採取と輸送が必要であり、遺伝子検索に必要なと思われるサンプルの条件をまとめた。(参考資料)特に保存、輸送法については、サンプルの質を左右する重要なポイントであり、参加施設に徹底することで、脳炎、脳症の診断効率が向上することが期待される。

脳炎、脳症の発症メカニズムは不明な点が多く、病原体が関与しない症例も多く含まれると思われる。病原体の検索から脳炎、脳症の普遍的なメカニズムの解明につながるかもしれない。その解決には多くの症例の集積と、集学的な解析が必要であろう。

E. 結 論

原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、その原因を究明すべく、ウイルスの網羅的検索を行った。

32 例の不明脳炎の病理検体では、10 例から原因ウイルスの同定が可能であり、単純ヘルペスウイルスの頻度が高かった。当研究班で収集したサンプルの 9 例では、1 例からコクサッキーウイルス B3 が同定されたが、中枢神経系のサンプルの解析ができず、脳炎の判定はできなかった。本検索に必要なサンプルの採取法や保存、輸送方法について提言を行った。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1) 論文発表 なし

2) 学会発表

- (1) 中島典子、片野晴隆 定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法と病理検体への応用 シンポジウム 3 病原体の新しい診断法 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会 宮崎 2013 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 該当なし

表 1 Multivirus real-time PCR で検出可能なウイルスの一覧

DNA viruses
Polyomavirus: JC virus, BK virus, Simian virus 40 Papillomaviruses: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,56,58,59, 66, 68, 73 Parvoviruses: adeno-associated virus 1,2,3 and 5; parvovirus B19; human bocavirus; adenovirus A–F Herpes viruses: HHV 1–8, B virus Poxviruses: variola virus, monkey pox virus, molluscum contagiosum virus Anellovirus: TTV Hepadnavirus: Hepatitis B virus Others: mimivirus
RNA viruses
Filoviruses: Ebola virus, Marburg virus Bunyaviruses: Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, hemorrhagic fever with renal syndrome virus (Hantaan, Dovrava, Puumala, and Seoul), Rift valley fever virus, sin nombre virus Arenaviruses: Lassa virus, Junin, Guanarito, Machupo and Sabia viruses Togaviruses: equine encephalitis virus (Venezuelan, Eastern, and Western), Sindbis virus, Mayaro virus, Getah virus, Chikungunya virus, rubella virus Enteroviruses: enterovirus 68 and 71; poliovirus 1–3; coxsackievirus A2–A6, A8–A10, A16, A21, A24, B1–B6; echovirus 5, 6, 7, 9, 11, 13–18, 25, 30; parechovirus 1 and 3; rhinovirus A and B; rotavirus; reovirus 1–4; Melaka virus; Colorado tick borne fever virus Flaviviruses: dengue virus 1 and 2; Japanese encephalitis virus; Murray Valley encephalitis virus; St. Louis encephalitis virus; West Nile virus; Tick-borne encephalitis virus; yellow fever virus Orthomyxoviruses: influenza virus A–C and H5N1 Paramyxoviruses: parainfluenza virus 1–3; Hendra virus; mumps virus; measles virus; Sendai virus; RS virus A and B; metapneumovirus; Nipah virus Rabdoviruses: rabies virus, lyssavirus 5 and 6, Chandipura virus, Duvenhage virus Coronaviruses: coronavirus OC43, 229E and NL63; SARS virus Caliciviruses: sapovirus, Norwalk-like virus 1 and 2 Hepatitis viruses: hepatitis A virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, hepatitis E virus, GB virus Retroviruses: human immunodeficiency virus 1, human T cell leukemia virus 1 and 2 Others: astrovirus, Borna disease virus

表 2 本研究班で収集された脳炎サンプルの解析結果

患者 No	検体の種類	臨床的事項			Multivirus PCR 結果
		性別	診断時年齢	感染研受付日	
P1	髄液、血清	男	42 歳	2013/10/24	有意なウイルスは無し。
P2	髄液、血清	男	1 ヶ月	2013/10/25	有意なウイルスは無し。
P3	髄液	女	1 ヶ月	2013/10/25	有意なウイルスは無し。
P4	髄液、血清	男	3 歳	2013/10/25	有意なウイルスは無し。
P5	血清、臓器（脳、髄液は無し。）	男	0 ヶ月	2013/10/31	<u>coxsackievirus B3</u>
P6	全血（溶血）	女	9 歳	2013/12/18	有意なウイルスは無し。
P7	髄液、咽頭ぬぐい液、便、血清	女	2 歳	2013/12/27	有意なウイルスは無し。内因性コントロール陰性
P8	髄液、咽頭ぬぐい液、便、血清	女	8 ヶ月	2013/12/27	有意なウイルスは無し。内因性コントロール陰性。
P9	髄液、咽頭ぬぐい液、便、血清、尿	女	3 歳	2014/1/9	有意なウイルスは無し。