

## 病原体およびワクチン関連急性脳炎・脳症の病因診断手法ならびにデータベースの利便性・有用性に関する検討

研究分担者 倉根 一郎 国立感染症研究所 副所長  
研究協力者 森野紗衣子 国立感染症研究所 感染症疫学センター 研究員  
研究協力者 多屋 馨子 国立感染症研究所 感染症疫学センター 室長

**研究要旨** 急性脳炎・脳症は様々な要因、機序によって発症するが、原因が究明されていない症例も多い。何らかの病原体の感染は急性脳炎・脳症の発症要因の一つであり、その原因検索は重要と考える。しかし、原因検索は合理的かつ系統的に実施される必要がある。原因となる病原体が判明し、臨床症状、検査所見、その他の疫学情報が得られることで、患者の治療に貢献できる。更に公衆衛生的な意義も大きい。

研究分担者は厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会副反応検討部会の委員として、予防接種後の副反応（有害事象）に関する検討ならびに解析を行っているが、本研究班ではその中から急性脳炎・脳症を取り上げて、詳細な解析を実施した。

感染症が関与していると考えられる急性脳炎・脳症については、病原体の検出頻度から有効な検査アルゴリズムを提案することで、原因検索に活用する。ワクチンの関与が考えられた症例については、因果関係の検証を行うためのデータベースの利便性・有用性を検討することを目的として、海外文献を基に検討した。

大規模な副反応（有害事象）報告システムは稀な事象の検出に有用であり、その視覚化の有効性が論じられていた。今後わが国でも応用していきたい。

### A. 研究目的

急性脳炎はさまざまな要因、機序によって発症するが、依然原因不明の症例が多い。感染症は急性脳炎・脳症の主な原因であり、発症機序としては、病原体の中枢神経への直接的な浸潤によるものや、免疫学的機序によるものなどが考えられている。

本研究班では、感染症に由来する急性脳炎・脳症に特化して、原因究明を目的に研究が実施されている。既知の病原体の検出とその頻度を検討することに加えて、新たな病原体の検索を行い、得られた検査結果から、急性脳炎・脳症発症に病原体がどのように関与していたかの評価を含めた病因診断を行うことが必要と考える。

本研究では、感染症あるいは予防接種後に発症した急性脳炎・脳症に関する最近の知見を収集するとともに、病因診断・評価の手法について検討することを目的とした。また、今後の急性脳炎・脳症の原因検索をより効果的に、もれなく行うことができるような評価・解析システムの確立を目的とした。

### B. 研究方法

最近報告された学術論文から、病原体およびワクチンに関連したとされる急性脳炎・脳症の病因診断手法を検討した。

### C. 研究結果

#### ① 急性脳炎・脳症の原因究明の手法

1) Diagnostic Strategy Used To Establish Etiologies of Encephalitis in a Prospective Cohort of Patients in England. 2011; 49(10): 3576-83. Ambrose, H.E. et al.

現在、報告によっては60-85%の急性脳炎・脳症が原因不明とされている。急性脳炎・脳症の病原体診断の具体的な実施方法を検討し、臨床検体からの病原体検出頻度を前方視的に検索した。未確認の病原体の評価を加え、診断のアルゴリズム構築に活用することが検討された。

この論文では2005～2008年に英国の24医療機関で脳炎が疑われた268症例から採取された検体(髄液、血液・血清、尿、糞便、咽頭スワブな

ど)1,500検体が用いられた。

患者の111例(55%)は、単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘-帯状疱疹ウイルス(VZV)、エンテロウイルス、パレコウイルス、アデノウイルスに加えて、旅行歴などの病歴に基づいた追加検査によって病因診断がなされた。さらにインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ノロウイルスについても検討された。

急性散在性脳脊髄炎(ADEM)症例では、神経画像検査、脳炎関連自己抗体検査が追加された。また、髄液中の抗体検査が99例で行われ、オリゴクローナルバンド(tOCB)の確認と、微生物特異的抗体のスクリーニングが実施された。

具体的に検索の標的とした微生物は、サイトメガロウイルス、HSV、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、VZV、風疹ウイルス、トキソプラズマ、マイコプラズマ、EBウイルス、アデノウイルスなどであった。その他、HSV、VZVについては血清抗体価、また近年その関連が指摘されてきたHEVのRNA、抗体検査が実施された。

これらの検査及びその後の検査と、個別の症例レビューに基づいて、さらに17例(8%)が診断され、このうち12例(71%)が免疫性、5例(29%)が感染性であった。75例は原因不明であった。203例のうち16例(8%)は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体抗体または電位依存性カリウムチャンネル複合体抗体と関連していることが確認された。

最も多く特定されたウイルスは、HSV(19%)およびVZV(5%)であり、細菌では結核菌であった(5%)。

99例の患者から得られた139検体を用いて、髄液(CSF)中の抗体を検査する診断価値を評価したところ、37例46検体から何らかの抗体が検出された。入院14~28日目に採取した検体は、0~6日目に採取した検体よりも陽性になりやすかった。一方で、入院から髄液検査実施日までの時間を統計学的に解析すると、原因が既知のものとは不明なもので初回検査までの日数に有意差はなかった。PCR法で陰性であったHSVによる脳炎症例3例は、中枢神経系(CNS)のウイルス特異的抗体の存在により診断された。

著者らは、検査アルゴリズムとして初期臨床検査の推奨項目に、HSV、VZV、エンテロウイルスを含め、流行期にはインフルエンザウイルス、非ウイルス性病原体としては、肺炎球菌、結核菌、肺炎マイコプラズマ、髄膜炎菌、トキソプラズマ(免疫不全者)を挙げ、免疫性脳炎の原因についての検査を診断アルゴリズムに入れることが重要とした。

髄液中の抗体測定も推奨され、原因不明の患

者の20%において、CNS内に限局性の免疫活性化のエビデンスが認められた。しかし、新規のウイルスDNAやRNA配列は認められなかった。これらは、新規の原因を特定するための対象として期待される。

## ②ワクチン接種後の急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の疫学研究

2) Acute Disseminated Encephalomyelitis  
Onset: Evaluation

Based on Vaccine Adverse Events Reporting Systems. Plos one 2013; 8(10): e77766.

Pellegrino, P.

薬剤サーベイランスシステムのデータを用いた検討によって、ワクチン接種後の急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の疫学的特徴の評価を試みた文献である。

ワクチン有害事象報告システム(VAERS)データベースおよびEudra Vigilance市販後報告モジュール(EVPM)を検索し、ワクチン接種後のADEM症例を特定し、疫学的特徴解析がなされた。EVPMとVAERSデータベースから、それぞれADEM症例205例および236例を抽出し、このうち404例のワクチン接種後ADEM症例の疫学的解析および因果関係評価について検討がなされた。患者の半数は18歳未満であり、男性の方がやや多かった。ワクチン接種からADEM発現までの期間は、症例の61%が2~30日間であった。ADEMともっとも多く関連していたのは、季節性インフルエンザワクチンとヒトパピローマウイルスワクチンであり、全症例の約30%を占めていた。VAERSデータベースの2005~2012年の平均年間報告数は40±21.7例であった。

本研究は、10億人超に起きた有害事象に関する情報に基づいているため、疫学的検出力が高い。使用したサーベイランスのデータベース固有の弱点により、厳密な症例確認はできていない。小児期のADEMの有病率に関する過去の報告とは異なり、どの年齢でもワクチン接種後にADEMが生じる可能性があることが示された。

## ③有害事象発生報告システムの有用性の検討

3) Adverse events following vaccination with an inactivated, Vero cell culture-derived Japanese encephalitis vaccine in the United States, 2009- 2012. Vaccine. 2015: 33; 708-712. Rabea, I. B.

日本脳炎ワクチンの有害事象としての神経症状の発症と、承認後の大規模な市販後調査の有用性の両者を知りうる文献である。

2009年に承認された成人用の日本脳炎ワクチ

ンJE-VCの市販後調査による結果から、その有害事象の発症頻度とともに、それらが承認前臨床試験の知見と一致していたことが示されたことから、JE-VCの安全性プロファイルが優れていることが示された。

2009年5月～2012年4月に日本脳炎ワクチン(JE-VC)を受けた成人(17歳以上)に関して米国ワクチン有害事象報告システム(VAERS)へ報告された有害事象について検討がなされた。

対象の3年間でJE-VCは275,848本が出荷され、これに対して、接種後の有害事象42例がVAERSへ報告された(全報告率はワクチン100,000本あたり有害事象15.2例)。計42例の報告のうち5例(12%)は重篤に分類され、報告率は出荷されたワクチン100,000本あたり1.8例であった。死亡例はなかった。もっとも多く報告された有害事象の種類は過敏症反応(N=12)であり、出荷されたワクチン100,000本あたり4.4例であった。アナフィラキシー症例は報告されなかった。中枢神経系の有害事象3例が報告され(脳炎1例、痙攣発作2例)、報告率は100,000本あたり1.1例であった。いずれもJE-VCとその他のワクチンを同時接種した後に発生した。

承認後の安全性データについて、重篤または稀な有害事象のエビデンスがないかを引き続きモニタリングすべきと述べられている。

4) Novel Algorithms for Improved Pattern Recognition Using the US FDA Adverse Event Network Analyzer. e-Health - For Continuity of Care. 2014: 1178-82. Botsis, T.

米国では医薬品の有害事象報告を医学的に精査するために、US Vaccine Adverse Event Reporting System(米国ワクチン有害事象報告システム; VAERS)などの自発報告システムにデータが保存されている。VAERSデータを解析するために、FDA Adverse Event Network Analyzer(有害事象ネットワークアナライザー; AENA)を開発し、データからの情報を抽出するための3つの新しいネットワーク解析アプローチを開発した。新しいアプローチには、報告と同時に生じるトリプレットに基づいた重み付けスキーム、アイランド・アルゴリズムを参考にした視覚化レイアウト、さらに修正を加えて行くためのネットワーク成長法が含まれている。1999年に生じたRotaShieldワクチン(RV)投与後に腸重積症(IS)が生じたhistorical signalを解析することでこのアプローチを検討し、妥当性を確認した。医薬品の安全性やその他の臨床データにおけるパターン認識にFDA Adverse Event Network Analyzer(有害事象ネットワークアナライザー

一; AENA)を用いることは有用としている。

#### D. 考察

1) の文献では、急性脳炎症例で検索すべき項目と、検査時期に関して、一定の指針が示された。すなわち、急性脳炎症例においては、感染症が疑われるものについてはアルゴリズム化した検索が有用であった。第一段階の検査として、脳炎症例で検出頻度の高い病原体の検討、旅行歴などの病歴に合致した検査項目を順次実施することで、病原体診断が行える例が多かった。一方、微生物の病原性によらない免疫学的な原因についても検討が必要である。原因が不明なものについては、原因特定において髄液検査の実施時期に有意差はなかった。むしろ既知の病原体以外の原因についても検証対象に位置づけられており、本研究班の研究内容に沿うものであった。

次に、ワクチンに関連したADEMに関する検討では、さまざまなワクチン接種後にADEMの報告があり、今後の更なる知見の蓄積が望まれる。

2)～4) の文献では大規模データベースを使用した脳炎の疫学調査についての検証が評価、検討された。脳炎は稀な事象であるため、大規模なデータベースでの検証が必要である。その手法として、米国で実施されているワクチン有害事象報告システム(VAERS)や市販後調査のシステムを活用する事で、疫学調査の実施の妥当性と有用性が、これらの文献で示された。問題点としては、大規模なデータベースであるが故に、個々の症例検討が困難であることが挙げられている。

有害事象へのワクチンの寄与を評価する方法として、FDA Adverse Event Network Analyzer(有害事象ネットワークアナライザー; AENA)で用いられた重み付けを行う解析アプローチが新しい手法として提案されており、実際のシステムに適応可能かどうか、課題と考えられた。

#### E. 結論

急性脳炎・脳症の実態把握のため、病原体検索と疫学調査に関して、その方法論および最近の知見について海外の文献を中心に検討を行った。

病原体検索においては、アルゴリズム化が有用であると考えられた。

データベースの検討においては、大規模な有害事象報告システムは有用であり、さらにそれを活用するための新しいアプローチとして、視覚化のメリットが提案された。

今後わが国における急性脳炎・脳症の病原体

検索ならびに有害事象報告システムの検討に活用可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 特記事項なし
2. 実用新案登録 特記事項なし
3. その他 特記事項なし

## ウイルスゲノムの検出と病態への関与

研究分担者 森島恒雄 (岡山大学大学院小児医科学 特命教授)  
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

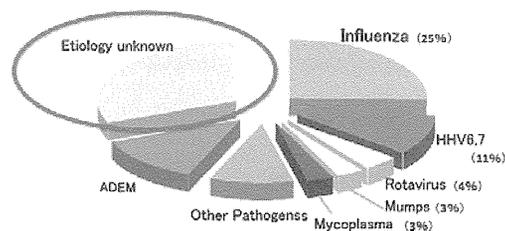
急性脳炎脳症は病因別に重症度や予後などの所見が異なっている。ゆえに病因を検索することは非常に重要である。病因検索に最も確実なのはゲノムの検出であるが、検出されたゲノムが病態へ関与したかどうかの判定には注意を要する。これまでの報告や我々が行った研究結果から判定への注意点を考察する。HBV キャリアでは、通常時において血液以外の体液（唾液、涙液、汗、尿）でも HBV が検出されている。HSV は脳炎を引き起こすが年齢によって病態が異なる。インフルエンザは脳症を引き起こすが、中枢神経内ではウイルスの増殖は認めない。HHV6 で発症する中枢神経障害は宿主の状態により病態が異なる。健常時でも血液は血液脳関門を通じて脳内（髄液）へ漏出しているが、炎症時にはこの漏出はさらに激しくなる。以上のように、高感度検出法により病原体を検出した場合の解釈には注意を要する。病因診断には、その病原体特有の病態を把握しておくことと、臨床現場の所見を参考にすることが重要となる。

### A. 研究目的

小児の脳炎・脳症では不明症例が多くを占めている（図1）。急性脳炎脳症は病因別に重症度や予後などの所見が異なっているため、脳炎・脳症の病因を検索することは、治療方針の決定のみならず、予後や合併症などの予測においても非常に重要である（図2）。病因検索に最も確実なのはゲノムの検出であるが、検出されたゲノムが病態へ関与したかどうかの判定には注意を要する。これまでの報告や我々が行った研究結果から判定への注

意点を考察する。

Etiology of Acute Encephalitis/Encephalopathy in Children  
(1,020 cases reported)



⇒ Annual Incidence could be ca. 1,000 cases/year

図1, 森島恒雄. 小児の急性脳炎・脳症の現状. ウイルス 2009; 59: 59-66. より

急性脳炎・脳症の病因・病態検索は重要である。

- **ロタウイルス脳症:**
  - ・頻度が高い。
  - ・予後が悪い。
  - ・痙攣が難治性。
  - ・多臓器不全・肺水腫に注意。
- **HHV-6脳症:**
  - ・頻度が高い。
  - ・痙攣の合併頻度が高い。
  - ・血流障害を生じやすい。→SPECTのチェックをー
- **マイコプラズマ脳症:**
  - ・精神・神経症状を示しやすい。
  - ・呼吸器症状の極期からずれることが多い。→病因として見逃すー
- **麻疹(後)脳炎:**
  - ・成人麻疹の増加で年長児にも起る。
  - ・一次脳炎と二次脳炎がある。

図 2, 森島恒雄. 小児の急性脳炎・脳症の現状. ウイルス 2009; 59 : 59-66. より

B. 方法

これまでの報告や我々が行った研究結果からHBV, HSV, HHV6, インフルエンザ, ロタなど、ウイルス別による病態の変化や、炎症性サイトカインによる血液脳関門の破壊機序を検討し、ウイルス感染症における病院判定の注意点を考察する。

C. 結果

**HBV**

B 型肝炎の母子感染および水平感染の把握とワクチン戦略の再構築に関する研究(平成 21 年~23 年 : 森島班)において、網羅的全国調査を実施した結果、母親以外の同居者、その他からの感染が 26%あることが判明した。このことより HBV は水平感染が多いことがわかってきた。さらに HB キャリアでは各体液(唾液、涙、汗、尿)を調べると、いずれからも HBV が検出された(図 3)。血液の中にウイルスがいると特に病気がなくても体液からでることが判明した。

HBVの水平感染経路: キャリア体液中のHBV DNA量

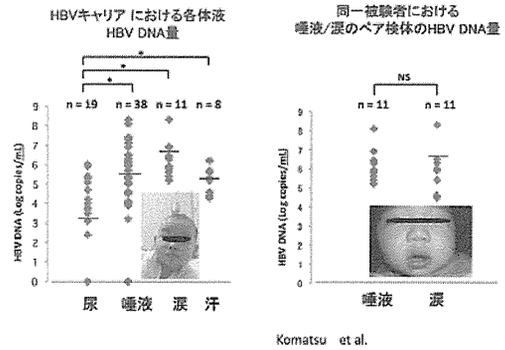


図 3, HBV キャリア体液中の HBV-DNA 量

**HSV**

HSV は脳炎を引き起こすが年齢によって病態が異なっている。年長児の単純ヘルペス脳炎では髄液中の HSV-DNA は高値を示すが血液中の HSV-DNA は陰性のことが多い。これに対し新生児の単純ヘルペス脳炎(中枢神経型の新生児ヘルペス)では髄液中の HSV-DNA は同様に高値であるが、血液中の HSV-DNA も高値を示す(図 4)。これは年長児の単純ヘルペス脳炎ではウイルスが神経にそって脳内に移行するのに対し、新生児の単純ヘルペス脳炎ではまずウイルス血症を引き起こし、BBB を破壊し脳内にウイルスが移行するためである。年長児や成人の単純ヘルペス脳炎では前頭葉・側頭葉での増殖が多く、新生児の単純ヘルペス脳炎では後頭葉での増殖が多いのも、感染経路の違いによるためと考えられている。

判明しているHSV DNAの局在

- 年長児の単純ヘルペス脳炎
  - 髄液中HSV DNA 陽性
  - 血液中HSV DNA 陰性
- 新生児ヘルペス中枢神経型
  - 髄液中HSV DNA 陽性
  - 血液中HSV DNA 陽性

図 4, 判明している HSV-DNA の局在

## インフルエンザ

インフルエンザ脳症の代表的な型の 1 つが、サイトカインストーム型である。これらの血液中では炎症性サイトカインの著明な上昇を認めている (図 5)。発症機序として、インフルエンザ感染を契機に何らかの遺伝的素因のためサイトカインを制御できない状態が生じ、その結果、血管内皮の障害・血管透過性の亢進・blood brain barrier の破壊が引き起こされ、脳浮腫・細胞死に至ると推察されている (図 6)。インフルエンザ脳症では気道上皮にはウイルスの増殖を認めるが脳内にウイルスの増殖は認めない。すなわちサイトカインストームなどにより感染臓器とは別の臓器の障害は生じる。これらの病態はインフルエンザにかぎらず、ロタやエンテロなどにおいても説明できる (図 7)。

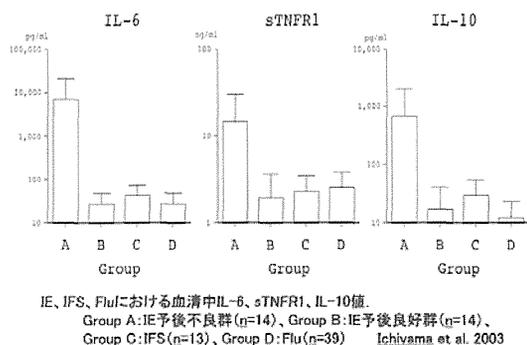


図 5, 各中枢神経障害疾患における血清中サイトカイン

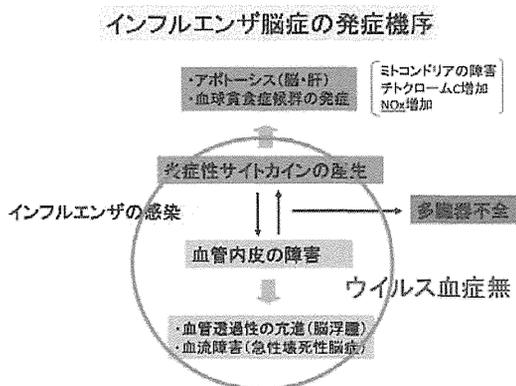


図 6, インフルエンザ脳症の発症機序

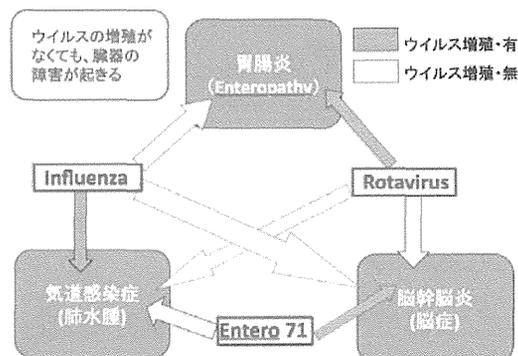


図 7, ウイルスの増殖がなくとも、臓器の障害は生じる

## HHV6

突発性発疹症罹患時に合併する急性脳症を HHV6 脳症という。HHV6 脳症では血液中の HHV6-DNA は高値を示すが髄液中の HSV-DNA は陰性のことが多い。HHV6 はヘルペス属の 1 種であり潜伏感染をするため、免疫不全状態では再活性化し脳炎を引き起こす事がある。免疫不全状態で起きる脳炎では血液中の HHV6-DNA は高値を示し、髄液中の HSV-DNA も同様に高値を示す (図 8)。HHV6 脳症では HHV6 の脳内での増殖は認めないが、HHV6 脳炎では HHV6 は脳内で増殖を認める。同一の病原体であっても宿主の状態が異なることにより、異なる病態を呈し得る。

### HHV-6ウイルスの中枢神経での動態

急性脳症(突発性発疹脳症) HHV6の脳内での増殖なし

血中ウイルス量 多 vs 髄液中ウイルス量 少/感度以下

免疫不全状態で起きる脳炎 HHV6の脳内での増殖あり

血中ウイルス量 中一多 vs 髄液中ウイルス量 中一多

図 8, HHV6 の中枢神経での動態

### 血液脳関門 (BBB) の障害

健常時でも血液は血液脳関門を通じて脳内（髄液）へ漏出している。炎症時にはこの漏出はさらに激しくなる。新生児ヘルペスではウイルスは血液から髄液へ移行する。血液と髄液の HSV 抗体価の比を取り、差が縮まってくると脳炎と診断した。HSV 脳炎では発症後に経時的に抗体価比の上昇を認めた。これに対しコントロールに用いたパラインフルエンザウイルスの抗体価比は急性期のみ軽度上昇していた（図 9）。このことは脳炎急性期には BBB の破壊に伴い血液中の抗体が髄液に流入したことを示している。我々は Evans blue 色素を用いて、抗サイトカインにより BBB が破壊されることでアルブミンが脳内に漏出することを証明した（図 10）。このようにウイルス血症を呈する疾患は BBB の破壊に伴い血液が髄液へ漏出するため、脳内でウイルスが増殖している病態との鑑別が困難である。この場合、経時的に経過を評価したり、ウイルス量によって判定をおこなったりする必要がある。高感度検出法により病原体を検出した場合の解釈には注意を要する。

単純ヘルペス脳炎：脳内抗体産生とBBBの障害

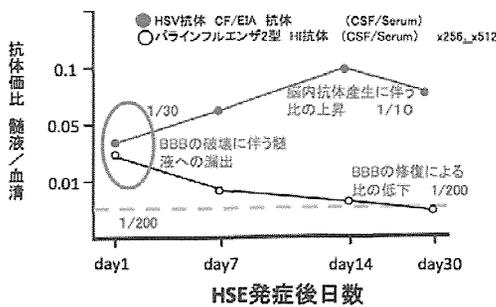


図 9, HSV 脳炎における、脳内抗体産生と BBB の障害

Evans blue色素を用いた血管透過性の定量

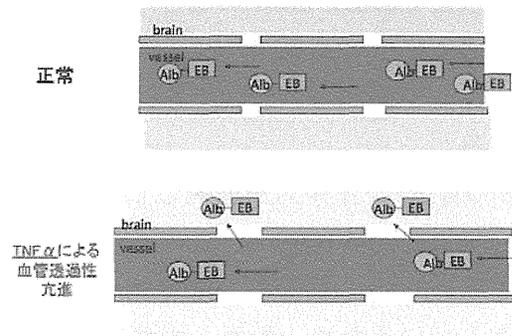


図 10, Evans blue を用いた血管透過性の定量

#### D. 考察

原因不明の脳炎・脳症が疑われた場合に病因解明のために各種検体が採取される。原因病原体の違いにより治療方針や予後予測が異なるため、判定は非常に重要な役割を担っている。適切な状態で検体が採取されていれば、「検出されなかったウイルスは病態には関与していない」ことは証明される。しかし「病原体が検出された」場合、それだけでそのウイルスが脳炎・脳症の病因と断定することはできない。

ウイルスが検出された場合は、「どの臓器（検体）」から「どのくらいの量」が検出されたかが重要となる。ウイルスの分布を確認することで侵入経路を推察することができる。障害臓器でウイルス増殖を認めていれば臓器障害の原因と考えられる。上記の評価には、5点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）の検体採取が重要となる。

上記条件を満たした上において、病因の判定には以下の2点に注意が必要である。

1つ目は「ウイルスの増殖がなくとも臓器障害に関与する。」場合である。インフルエンザ脳症は代表的な例であり、中枢神経に病原体が検出されなくても中枢神経障害を来たしうる。サイトカインスト

ームの有無など、その疾患毎の病態の把握が重要である。HHV6 の場合など、宿主の状態に応じて病態（ウイルスの増殖パターン）が異なるケースにも注意が必要である。

2 つ目は「ウイルスが増殖していても臓器障害には関与しない。」場合である。HBV キャリアでは各体液中に HBV-DNA が常に存在しているため、脳炎・脳症を発症した場合、各種検体から HBV-DNA が検出されたとしても、HBV 由来の脳障害と断定することはできない。HSV や HHV6 などのヘルペス族のウイルスは潜伏感染であるため、宿主のストレス下では少量が血液中に検出されることが稀ではない。その他にも不顕性感染や常在化した病原体、環境中存在する病原体のコンタミなど、採取検体中に病原体が検出されることは多々ある。検出感度が上がるほどにこれらの頻度も上がるのでより一層の注意が必要である。

上記の問題点を解決法として以下の 2 点が挙げられる。

1 つ目は、「病原体が引き起こす病態を把握すること。」である。潜伏感染や持続感染をするかどうかは重要な情報である。2 つ目は「臨床現場と連携をとること」である。感染症検査以外の所見（臨床症状、各種検体検査、画像検査）は、検出された病原体と臨床像が合致するかどうかの判断材料となる。

原因不明の病原体の検索を行うには、その病原体の特性と病原体が関与する状態を詳細に把握する必要があるが、稀な病原体、新たに発見された病原体などでは情報不足で判定困難である。これを補填するためには、詳細な臨床情報と照らしあわせて、検出された病原体が病態にどのように関わったのかを慎重に判定する必要がある。

## E. 結論

高感度検出法により病原体を検出した場合の解釈には注意を要する。病因診断には、その病原体特有の病態を把握しておくことと、臨床現場の所見を参考にすることが重要となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・Ishida Y, Kawashima H, Morishima T, et al: Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009--associated encephalopathy in children. *Neuropediatrics*. 2015 Feb;46(1):20-5.

・Igarashi T, Ito S, Morishima T, et al;

Guidelines for the management and investigation of hemolytic uremic syndrome. Study group for establishing guidelines for the diagnosis and therapy of hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2014 Aug;18(4):525-57.

・Hasegawa S, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):206-10.

・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. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1

influenza-associated encephalopathy.

Brain Dev. 2014 Jun;36(6):484-8.

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 日本脳炎ならびに予防接種後を含む急性脳炎・脳症と 鑑別を要する疾患の実態・病因解明に関する研究

研究分担者 氏名 亀井 聡 日本大学医学部 内科学系 神経内科学分野 主任教授

### 研究要旨

【目的】高用量のメロペネム (MEPM) は、penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) や beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) による細菌性髄膜炎に対する治療薬として用いられている。1994年にDaganらが小児例を対象としてMEPMの髄液移行性について報告しているが、成人の細菌性髄膜炎患者を対象としてMEPMの髄液移行性を検討した報告はない。このため、日本人成人細菌性髄膜炎患者を対象としMEPM 2gを8時間ごとに静脈内投与した際の髄液中のMEPM濃度を検討した。

【方法】書面での同意が得られた成人細菌性髄膜炎患者を対象とし、MEPM 2gを8時間ごとに14日間静脈内投与し、髄液中のMEPM濃度を測定した。

【結果】成人細菌性髄膜炎患者5名(平均年齢60.6歳)が登録され、全ての患者で14日間MEPMによる治療が行われた。治療期間の平均は22.6日であった。全ての患者で髄液から起炎菌が同定され、その内訳は *Streptococcus pneumoniae* (3患者)、*Staphylococcus aureus* (1患者)、*Streptococcus salivarius* (1患者)であった。髄液中のMEPM濃度は0.27~6.40 µg/mlに分布し、4/5患者でMEPM投与3時間後の髄液中濃度は1 µg/ml以上であった。全ての患者において、MEPM投与3時間後の髄液中のMEPM濃度は起炎菌に対する最小発育阻止濃度を上回っていた。

【結論】成人細菌性髄膜炎患者を対象として、初めて、MEPMの髄液移行性を確認した。

### A. 研究目的

日本脳炎ならびに予防接種後を含む急性脳炎あるいは脳症と鑑別を要する疾患として、細菌性髄膜炎が挙げられる。

本邦において、細菌性髄膜炎の発生率は年間100万人当たり12.4と推計され、その約7割を小児が占める。細菌性髄膜炎の転帰は、死亡率が11~25%、後遺症率が15~34%と、抗菌薬の進歩にもかかわらず未だ満足すべき成績ではない。細菌性髄膜炎では、患者の有するリスクと年齢階層別の起炎菌頻度、予想される起炎菌の抗菌薬に対する耐性化率を考慮した上で抗菌薬が選択されるが、起炎菌の頻度や耐性菌の割合が地域により大きく異なるため、諸外国で公表されている診療指針をそのままあてはめることができない。本邦における細菌性髄膜炎の起炎菌の頻度や耐性菌の割合を踏まえた治療指針として、日本神経学会・日本神経治療学会・神経感染症学

会の3学会合同による細菌性髄膜炎の診療ガイドラインが2007年に公表された。その中で、50歳未満の市中感染の細菌性髄膜炎に対して、「第3世代セフェム、バンコマイシンの併用」と「カルバペネム系抗菌薬(パニペネム・ベタミプロロン合剤やメロペネム)」が同列で推奨されていたが、成人の細菌性髄膜炎例を対象とし、メロペネムの髄液移行性を検討した既報はなかった。一方で、高用量のメロペネムは、penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) や beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) による細菌性髄膜炎に対する標準的な治療薬として用いられている。成人の細菌性髄膜炎患者を対象としてMeropenem (MEPM) の髄液移行性を検討した報告はないため、日本人成人細菌性髄膜炎患者を対象としMEPM 2gを8時間ご

とに静脈内投与した際の髄液中のMEPM濃度を検討した。

## B. 研究方法

日本人成人細菌性髄膜炎患者を対象としMEPM 2gを8時間ごとに静脈内投与した際の髄液中のメロペネム濃度を検討した。具体的には、書面での同意が得られた成人細菌性髄膜炎患者を対象とし、MEPM2gを8時間ごとに14日間静脈内投与し、髄液中のMEPM濃度を測定した。

本研究は日本大学医学部附属板橋病院の共同治験審査委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究結果

書面での同意が得られた成人細菌性髄膜炎患者5名(平均年齢 60.6歳)が登録され、全ての患者で14日間MEPMによる治療が行われた。治療期間の平均は22.6日であった。全ての患者で髄液から起炎菌が同定され、その内訳は*Streptococcus pneumoniae* (3患者)、*Staphylococcus aureus* (1患者)、*Streptococcus salivarius* (1患者)であった。髄液中のメロペネム濃度は0.27~6.40  $\mu\text{g/ml}$  に分布し、4/5患者でMEPM投与3時間後の髄液中濃度は1  $\mu\text{g/ml}$  以上であった。全ての患者において、MEPM投与3時間後の髄液中のMEPM濃度は起炎菌に対する最小発育阻止濃度を上回っていた。

## D. 考察

1994年にDaganらが小児例を対象としてMEPMの髄液移行性について報告している。この検討では、MEPMの一回投与量を20mg/kg群と40mg/kg群の2群に分け髄液MEPM濃度を検討し、髄液MEPM濃度は0.1~6.5  $\mu\text{g/ml}$  の間に分布していたと報告している。また、このデータのサブ解析からMEPMが、用量依存性に髄腔内へ移行することが示唆されている。細菌性髄膜炎の治療に適した抗菌薬の条件として、耐性菌を含めたスペクトラムを有する、MICが低い、髄液への移行性が良好であることが挙げられるが、成人においてもMEPMはこれらの条件を満たす薬剤であると考えられた。

本研究結果は、成人細菌性髄膜炎患者を対象として、初めてMEPMの髄液移行性を確認した報告であり、この研究結果から2013年12月に細菌性髄膜炎成人例におけるメロペネム 6 g/日の適応拡大が承認され、2

014年末に公表された細菌性髄膜炎の診療ガイドライン2014では、メロペネムが最近の外科的手術・手技および外傷の既往のない免疫能が正常な16~50歳未満の菌未確定の細菌性髄膜炎に対して単独で推奨された。

## E. 結論

成人細菌性髄膜炎患者を対象として、初めて、MEPMの髄液移行性を確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ishikawa H, Kamei S: Revised Japanese guidelines for the clinical management of bacterial meningitis. *Rinsho Shinkeigaku* 54(12):1021-1023, 2014.
2. Ishihara M, Ogawa K, Suzuki Y, Kamei S, Ochiai T et al: Adult-onset Satoyoshi syndrome with prominent laterality of clinical features. *Intern Med* 53(24):2811-2816, 2014.
3. Teramoto H, Morita A, Ninomiya S, Shiota H, Kamei S: Relation between freezing of gait and frontal function in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20(10):1046-1049, 2014.
4. Takahashi T, Tamura M, Osabe K, Tamiya T, Miki K et al: A rare case of Parkinson's disease with severe neck pain owing to crowded dens syndrome. *Case Rep Neurol* 6(2):149-155, 2014.
5. Morita A, Kamei S, Minami M, Yoshida K, Kawabata S et al: Open-label study to evaluate the pharmacodynamics, clinical efficacy, and safety of meropenem for adult bacterial meningitis in Japan. *J Infect Chemother* 20(9):535-540, 2014.
6. Ogawa K, Ishikawa H, Suzuki Y, Oishi M, Kamei S: Clinical study of the visual field defects caused by occipital lobe lesion. *Cerebrovasc Dis* 37(2):102-108, 2014.
7. 塩原恵慈、石川晴美、高橋恵子、齋

- 藤磨理、亀井聡：薬剤性パーキンソニズムを契機に診断された肥厚性硬膜炎の66歳男性例 日大医学雑誌 73:199, 2014.
8. 亀井聡：細菌性髄膜炎における治療動向 成人例を中心に 日本化学療法学会雑誌 62:451, 2014.
  9. 二宮智子、森田昭彦、寺本紘子、原誠、楠進 他：自律神経障害が主体のギラン・バレー症候群に経静脈的免疫グロブリン療法が奏効した41歳男性例 神経治療学 31:639, 2014.
  10. 亀井聡：症候と画像から捉える脳炎のclinical management 神経治療学 31:556, 2014.
  11. 原誠、亀井聡：【やさしくわかる神経内科これだけ7疾患】 感染性疾患 脳炎、髄膜炎、脳膿瘍. Brain Nursing 30(12):1265-1267, 2014
  12. 亀井聡：細菌性髄膜炎診療ガイドライン2014の作成. 神経治療学 31(4):371-374, 2014
  13. 森田昭彦、秋本高義、石川晴美、荒木俊彦、亀井聡：見逃されやすい神経救急・集中治療病態の鑑別と治療 傍腫瘍性辺縁系脳炎と鑑別を要した1例 日本神経救急学会雑誌 27:37, 2014.
  14. 森田昭彦、原誠、亀井聡：抗N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) 脳炎. 日本神経救急学会雑誌 26(2):1-3, 2014
  15. 江橋桃子、二宮智子、齋藤磨理、森田昭彦、南正之 他：小脳を中心に辺縁系まで病変の広がりを認め、マイコプラズマ感染が疑われた急性脳炎の22歳女性例 臨床神経学 54:846, 2014.
  16. 高橋輝行、田村正人、村上円人、亀井聡、高須俊明：感冒様症状の後に激しい後頸-後頭部痛で発症した急性石灰沈着性頸長筋炎の稀な若年女性例 神経免疫学 19:178, 2014.
  17. 高橋輝行、田村正人、三木健司、山口舞、亀井聡 他：精神症状で発症した化膿性脳室炎の稀な高齢男性例 神経免疫学 19:147, 2014.
  18. 齋藤磨理、原誠、秋本高義、塩原恵慈、高橋恵子 他：extreme delta brushを呈するも積極的な免疫療法が奏功した抗NMDA受容体脳炎の1例 神経免疫学 19:90, 2014.
  19. 塩原恵慈、石川晴美、高橋恵子、齋藤磨理、亀井聡：薬剤性パーキンソニズムを契機に診断されIgG4との関連が疑われた肥厚性硬膜炎の1例 臨床神経学 54:685, 2014.
  20. 亀井聡：ニューロ・サイエンスにおける新たな挑戦 抗NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) 受容体脳炎の確立とその動向. 日大医学雑誌 73(2):103-105, 2014
2. 学会発表
    1. 森田昭彦、亀井聡、南正之、吉田一人、河端聡、黒田宙、鈴木靖士、荒木信夫、岩崎泰雄、小林麗、林直毅、平山哲之、落合淳、上田美紀、山岸由佳、丹羽淳一、進藤克郎、福嶋由尚、田北智裕、佐藤貴之、佐藤滋、三嶋廣繁、岩田敏：成人細菌性髄膜炎におけるメロペネム (MEPM) の髄液移行性について 第55回日本神経学会総会、福岡、2014.5
    2. 寺本紘子、森田昭彦、亀井聡：パーキンソン病患者におけるすくみ足と遂行機能障害との関連についての検討 第55回日本神経学会総会、福岡、2014.5
    3. 江橋桃子、二宮智子、齋藤磨理、森田昭彦、南正之、塩田宏嗣、大石實、亀井聡：小脳を中心に辺縁系まで病変の広がりを認め、マイコプラズマ感染が疑われた急性脳炎の22歳女性例 第209回日本神経学会関東甲信越地区地方会、東京、2014.6
    4. 寺本紘子、森田昭彦、二宮智子、塩田宏嗣、亀井聡：定量脳波を用いたParkinson病患者におけるすくみ足の検討 第17回日本薬物脳波学会、静岡、2014.6
    5. 齋藤磨理、原誠、秋本高義、塩原恵慈、高橋恵子、森田昭彦、石川晴美、塩田宏嗣、大石實、亀井聡：extreme delta brushを呈するも積極的な免疫療法が奏功した抗NMDA受容体脳炎の一例 第19回日本神経感染症学会学術集会、金沢、2014.9
    6. 見附和鷹、齋藤磨理、原誠、森田昭彦、南正之、塩田宏嗣、大石實、亀井聡：亜急性の小脳失調で発症し、

抗Yo抗体陽性を認め、腹膜癌による傍腫瘍症候群と考えられた63歳女性例 第210回日本神経学会関東甲信越地区地方会，東京，2014.9

7. 二宮智子，森田昭彦，寺本紘子，原誠，楠進，中根俊成，樋口理，亀井聡：自律神経障害が主体のギラン・バレー症候群に経静脈的免疫グロブリン療法が奏効した41歳男性例 第32回日本神経治療学会総会，東京，2014.11

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当事項無し。
2. 実用新案登録  
該当事項無し。
3. その他  
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  
日本脳炎ならびに予防接種後を含む急性脳炎・脳症の実態・病因解明に関する研究  
分担研究報告書

## 日本脳炎の実験室診断と急性脳炎

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）  
中山絵里（国立感染症研究所 ウイルス第一部・研究員）  
モイ メンリン（国立感染症研究所 ウイルス第一部・研究員  
／長崎大学熱帯医学研究所）  
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26年度には本研究班を通じての検査依頼（22症例）も含めて25件があった。そのうち、1症例が日本脳炎であった。日本全体の報告数は2例の内訳は兵庫1例、熊本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1例の診断根拠は、次世代シーケンサーにより日本脳炎ウイルス遺伝子断片が検出されたことがきっかけであった。

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）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

ープ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:

GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA、

JENS5r330AF092550:

TGT TAA CCC AGT CCT CCT GGA A、

JENS5p294AF092550:

FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB を用いた。

遺伝子 1 型検出用 (E 領域) として

JE1&3en1052s-1082:

ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T、

JE1en1119c-1082:

GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA、

JEen1082pb:

FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB。

遺伝子 3 型検出用 (E 領域) として

JE1&3en1052s-1082:

ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T、

JE3en1119c-1082:

AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA、

JE3en1082pb:

FAM-CCC AGG CGG CAA A-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) ペルオキシダーゼ気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 1 例は、次世代シーケンサーを用いて遺伝子検出を試みたところ日本脳炎ウイルス遺伝子の断片が検出されたため、抗日本脳炎 IgM 抗体検査を実施したところ陽性であり、ペア血清にて上昇を確認した。熊本県の症例は、検査会社において HI 抗体の上昇で確定したが、国立感染症研究所において検体の確保には至らなかった。

## D. 考察

2014 年の日本脳炎患者発生は、本研究班で診断した早春の兵庫県の日本脳炎症例と、熊本県の成人症例のみであった。兵庫県の小児症例は、2013 年に報告された日本脳炎患者居住地と十数キロという距離に居住していたこともあり、野生動物等で越冬した日本脳炎ウイルスが、春先に蚊に感染して感染蚊となり、たまたま人を刺した結果であった可能性が高い。本症例のような 4 月発症の急性脳炎も日本脳炎の可能性を考えて検査提出していただく必要があると思われる。

## E. 結語

2014年の日脳患者発生状況は、兵庫県で1症例、熊本県で1症例であった。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。特に4月発症の急性脳炎ではなおさらである。関東以西で4月から10月の急性脳炎患者の場合、日本脳炎に関する検査の必要性を医師に周知する必要がある。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

なし

### 2) 学会発表

#### 国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan 2014. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov. 26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

#### 国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第25回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成26年2月22日(東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第11回渡航医学実用セミナー

「海外赴任前健康ガイダンス」平成26年6月30日(東京)

3. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成26年9月12日(東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行(特別講演). 平成26年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応—デング熱の基礎と疫学—. 第46回日本小児感染症学会. 平成26年10月18-19日(東京)
6. 高崎智彦. 緊急企画: 70年を経ての再来—デング熱国内流行2014. 第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成26年10月23-25日(岡山市)
7. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱—今年の国内流行」. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10-12日(横浜市)
8. MoiMeng Ling, 白井顕治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10-12日(横浜市)
9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング1型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影

- 響. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10～12日(横浜市)
10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. Fc $\gamma$ R発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10～12日(横浜市)
11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るために～忍び寄る地球温暖化～」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成26年11月16日(東京都多摩市)
12. 高崎智彦. 「市民公開講座」デング熱 これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成26年12月1日(東京、日本獣医生命科学大学)
13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第8回看護部会セミナー. 平成26年12月13日(東京 東医健保会館)
14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ～70年の時を経て～(特別講演). 第21回リケッチア研究会. 平成26年12月20～21日(東京 国立感染症研究所)
15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成26年度阪神地区感染症懇話会 平成27年1月26日(大阪市 大阪府病院年金会館)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし.

## 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、高橋健太、峰宗太郎、佐藤由子、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）、黒田 誠、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）、高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

### 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。これまでの本研究班で収集された不明脳炎症例は合計 45 例であり、そのほぼ全例につき、multivirus real-time PCR を施行した。そのうちの 5 例は原因と考えられる病原体が検出され、その内訳はコクサッキーウイルス B3、ヒトヘルペスウイルス 6、パレコウイルス 3、EB ウイルス、ノロウイルスであった。このほかに multivirus real-time PCR を施行しなかった 1 例について、次世代シーケンサーにより日本脳炎が検出されている。HHV-6 陽性例では血清抗体検査から 5 歳近くでの初感染が証明された。ノロウイルス検出例では便からの簡易検査でもウイルス感染が証明された。これらの結果は日本の脳炎症例における微生物学的なエビデンスを提供するばかりでなく、脳炎検体の取り扱い、輸送法や必要な検査項目について、参考となる情報を提供するものと期待される。

### A. 研究目的

感染症法で 5 類感染症に分類される急性脳炎（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、日本全国で年間、数百の症例が存在すると推定されている。原因はインフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルスなどが挙げられているが、3 割から半分程度は、有意な病原体が同定されず、原因不明とされている。また、原因不明とされる脳炎の症例のなかに日本脳炎の症例がどれだけ含まれるかも不明である。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 日付の厚生労働省結核感染症課からの事務連絡「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」により、全国の医療機関、地方衛生研究所から、原因不明の脳炎のサンプルが当研究所へ送られ、解析に供されている。本分担研究では、当研究所に送付された検体につき、real-time PCR 法によるウイルスの網羅的検索を行い、原因となるウイルスの同定を試みる。日本脳炎の解析は研究分担者であるウイルス 1 部 高崎智彦室長が行い、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。

### 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の報告書を参照されたい。感染研に到着した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）は、原則として日本脳炎ウイルス（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 QIAamp MinElute Virus Spin Kit（キアゲン社）を用い DNA と RNA を混和した形で抽出した。後の次世代シーケンサーの検索に適するよう、carrier RNA は使用していない。

## 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約 170 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

2013 年 10 月から 2015 年 1 月までに 45 件の解析依頼があり、当部ではこのうちの 5 例で multivirus real-time PCR により原因ウイルスを同定した (表 2)。コクサッキーウイルス B3 の

症例は昨年の報告書に記載したので参照されたい。

P12: 4 歳 女児。急な発熱から意識障害を発症した例であり、髄液細胞の有意な上昇がなく、迅速診断でインフルエンザウイルスなどの各種ウイルス感染が否定されていた。Multivirus real-time PCR により、HHV-6 が検出され、HHV-6 の real-time PCR では発症時の血清サンプルのみから HHV-6 が検出され、HHV-6 のサブタイプは HHV-6B であった。その後の検索で、HHV-6 の血清抗体の seroconversion が認められたことから HHV-6 初感染が確定した。経過中、突発性発疹としての定型的な発疹は見られなかった。

P29: 4 歳女児。約 40 度の発熱、頭痛、項部硬直、意識障害、異常行動、けいれん、感冒様症状、咳嗽あり。同時期に妹が手足口病。アデノウイルス、エンテロウイルス、マイコプラズマが陰性。髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿を multivirus real-time PCR で検索し、便からパレコウイルス 3 を検出。

P35: 60 歳代 女性。発熱、意識障害。頭部 MRI にて両側前頭葉から左島皮質に DWI で淡い高信号域。数日の経過で中脳、頸髄まで及び、橋融解症候群。自発呼吸なし。HSV, VZV, EBV, CMV, HHV6 の DNA, 日本脳炎 RNA、細菌培養、結核培養も陰性。髄液、血清からは multivirus real-time PCR で有意なウイルスは検出されていないが、髄液から低コピー数の EBV を検出した。後に患者は死亡、剖検となり、脳の壊死組織から PCR で EBV が検出された。

P42: 4 歳 男児。発熱、嘔吐、下痢、意識障害。母と弟にも嘔吐症状あり。アデノウイルス陰性、インフルエンザウイルス陰性、ノロウイルス陰性 (簡易検査)、ロタウイルス陰性。Multivirus real-time PCR で便から高コピー数の Norovirus G2 が検出された。その後、再度簡易検査を施行し、ノロウイルス感染が確認された。

## D. 考察

本年度は 2015 年 1 月末までに 33 件の不明脳炎の検体を検索し、昨年度と合わせると 45 件の解析を行った。そのうちの 5 件については multivirus real-time PCR での検索が原因ウイルスの同定に貢献した。これまでの同定率は約