

201517007A

**厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業**

**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**

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

**研究代表者 多屋 馨子
平成 28 (2016) 年 3 月**

目 次

I. 総括研究報告	
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	2
多屋馨子	
II. 分担研究報告	
1. 日本脳炎および原因不明の急性脳炎・脳症の実態ならびに予防接種後に報告された脳炎・脳症・急性散在性脳脊髄炎の発生動向と病原体診断のための検体の確保・搬送に関する研究	10
多屋馨子、奥野英雄、新井 智、佐藤 弘、森野紗衣子、砂川富正	
(資料1)急性脳炎・脳症～検体採取・保管に関するガイドライン～	16
(資料2)急性脳炎・脳症～検体搬送に関するガイドライン～	21
2. 2015年秋に多発した急性弛緩性麻痺症例に関する臨床・疫学研究	27
多屋馨子、吉良龍太郎、チョンピンフィー、奥村彰久、森 壘、鳥巢浩幸、安元佐和、清水博之	
(資料1)厚生労働省健康局結核感染症課事務連絡(医療機関記入様式)	36
(資料2)急性弛緩性麻痺症例(二次調査用紙)	43
3. 急性弛緩性麻痺とエンテロウイルスD68感染症に関する最近の知見の検討(海外文献より)	50
倉根一郎、森野紗衣子、多屋馨子	
4. 中国四国地区における急性弛緩性麻痺症例の網羅的調査	55
森島恒雄、八代将登	
5. 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	58
亀井 聡	
6. 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」	61
高崎智彦、田島 茂、池田真紀子	
7. 不明脳炎症例におけるウイルスの網羅的検索	64
片野晴隆、福本 瞳、保科しほ、高橋健太、峰宗太郎、長谷川秀樹、黒田 誠、関塚剛史、高崎智彦	
8. 不明脳炎症例における網羅配列解読・病原体データベースの作成	68
黒田 誠、関塚剛史、高崎智彦、片野晴隆	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	78

I . 総括研究報告書

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

研究代表者 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・脳症の原因究明には、網羅的な病原体検索が不可欠であるが、医療機関において健康保険で実施可能な検査は限られており、原因不明のまま届けられる場合も多い。予防接種後副反応として報告される症例の中には、ワクチン以外の原因によって発症した疾患が紛れ込んでいる可能性がある。日本脳炎（以下、JE）の患者報告数は毎年少ないが、日本脳炎ウイルス（以下 JEV）は西日本を中心として毎年夏季～秋にかけて活動しており、原因不明の急性脳炎・脳症の中に JE が紛れ込んでいる可能性がある。平成 27 年度は 0 歳児の日本脳炎が関東地方から報告され、国内では引き続き予防に努める必要がある。原因不明急性脳炎・脳症の病原体検索には急性期の検体確保と適切な保管・搬送が不可欠であるが、それらが適切に実施されていないことが多かったことから、検体採取・保管・搬送のガイドラインを作成した。適切な検体の確保と保管が実施できるような啓発が必要である。今年度は 2015 年 4 月～2016 年 3 月 16 日までに 51 症例について検討を行った。5 点セット（血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿）のうち 3 種類以上搬送されたのは 45 症例(88.2%)、5 種類すべて（5 点セット）搬送されたのは 30 症例(58.8%)であった。内因性 RNA コントロールが検出されない症例が 8 症例(15.7%)あった。10 例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルス A6、ヒトヘルペスウイルス 6、パレコウイルス 3、サイトメガロウイルス、パルボウイルス B19 などであった。このほかに multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった 1 例について、次世代シーケンサーにより髄液からはヒトアストロウイルス MLB 株が検出されている。他に、HHV-3、細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。また、血液、咽頭ぬぐい液、便検体の重要性が示唆された。これらの結果は本研究班での検索の有用性を示すとともに、日本の急性脳炎(脳症)症例における微生物学的なエビデンスを提供するものと期待される。

また、2015 年秋に多発した急性弛緩性麻痺（AFP）の disease burden を明らかにし、海外文献について検討するとともに、国内の臨床・疫学情報について解析を行った。2016 年 3 月までに 100 例の AFP 症例が報告された。このうち、中国四国地方での患者数から推定すると、日本国内では約 110 例の発症が推察されたことから、ほぼ全数に近い症例探知ができたことが伺える。詳細な神経学的所見、画像所見について現在、検討中である。

研究分担者

倉根一郎
国立感染症研究所 所長
森島恒雄
岡山労災病院 院長
岡山大学大学院小児医科学 特命教授
亀井 聡
日本大学医学部内科学系神経内科学 主任

教授

高崎智彦
国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
片野晴隆
国立感染症研究所感染病理部 室長
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

A. 研究目的

急性脳炎症状を示す日本脳炎、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、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱は感染症法に基づく 4 類感染症全数把握疾患であり、これら以外の急性脳炎・脳症は 5 類感染症全数把握疾患であることから、すべての医師に最寄りの保健所への届出が義務づけられている。

しかし、急性脳炎・脳症として届けられた患者の多くは原因不明となっていることから、この中に日本脳炎が紛れ込んでいる可能性があること、更に原因不明の急性脳炎・脳症、予防接種後副反応として届けられた脳炎・脳症・急性散在性脳脊髄炎（以下、ADEM）の原因究明の重要性が指摘されて、本研究班が発足した。

原因不明として届けられた急性脳炎・脳症の患者の中に、日本脳炎患者が紛れ込んでいないかについて検討するとともに、一人でも多くの急性脳炎・脳症、予防接種後に発症した脳炎・脳症・ADEM の原因究明を行うことを目的とする。そのために必要な臨床検体の採取・保管・搬送に関するガイドラインの作成を行う。

また、平成 27 年度については、秋に多発した急性弛緩性麻痺（AFP）症例の調査を行ったので、それについても臨床・疫学情報のまとめを行い、全貌を把握するとともに、次の流行に備えられるように病態解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

研究分担者の森島、研究協力者の八代、研究分担者の亀井を中心として臨床のネットワークを構築し、森島・八代は 2015 年秋に多発した AFP 症例について、中国四国地方で発症した患者について検討した。急性脳炎・脳症が感染症発生動向調査に基づく 5 類感染症全数把握疾患であることを医療関係者に周知するとともに、研究班内での連携を強化して、一人でも多くの急性脳炎・脳症の原因究明につとめる。

研究協力者の森野と、研究分担者の倉根と研究代表者の多屋は、海外で報告された AFP 症例について文献レビューを行い、国内での調査に資する検討を行う。

研究協力者の奥野と、研究協力者の新井と研究協力者の砂川、研究代表者の多屋は、5

類感染症全数把握疾患として感染症発生動向調査に基づいて報告された急性脳炎（脳症を含む）の中から、原因不明として届けられた急性脳炎・脳症について保健所に問い合わせを行うなど連携を密にし、研究班で実施している病原体検索について情報提供を行うとともに、保健所・地衛研・医療機関との連携を密にして、原因不明として届けられた急性脳炎・脳症の原因究明に必要な臨床検体が適切な方法で感染研に届けられるよう調整する。届けられた急性脳炎（脳症）症例について集計し、解析を行うとともに、検体採取・保管・搬送のガイドラインを作成した。

研究代表者の多屋と、研究協力者の吉良、研究協力者のチョン、研究協力者の奥村、研究協力者の森、研究協力者の安元、研究協力者の鳥巢、研究協力者の清水は、2015 年秋に発生した AFP 症例の多発についての臨床・疫学情報について一次調査のまとめ、詳細な二次調査の実施と、その解析を行った。

研究分担者の高崎と研究協力者の田島、池田は、研究分担者の片野、黒田との連携を密にして、日本脳炎ウイルス特異的 IgM 抗体の測定、日本脳炎ウイルス遺伝子の検出等の方法で、日本脳炎の紛れ込みがないかについて検討し、わが国の日本脳炎の disease burden について検討する。

研究分担者の片野と研究協力者の福本、保科、高橋、峰、長谷川は、研究分担者の高崎、黒田との連携を密にして、原因不明として研究班に届けられた急性脳炎・脳症・ADEM 症例の症状・所見について検討し、届けられた臨床検体から RNA, DNA を抽出し、Multiplex PCR 法等の方法を用いて網羅的なウイルス遺伝子の検索を行う。

研究分担者の黒田と研究協力者の関塚は、研究分担者の片野、高崎との連携を密にして、Multiplex PCR 法等の方法を用いて網羅的なウイルス遺伝子検索を行ったにも関わらず、原因究明に至らなかった症例について次世代シーケンサー（以下、NGS 検査）を用いて、病原体遺伝子の検索を行う。NGS 検査では、ウイルスのみならず細菌についても検索が可能である。

研究代表者、研究分担者、研究協力者は、全国から紹介された原因不明の急性脳炎・脳症症例の担当医・担当保健所・担当地方衛生研究所（以下、地衛研）との連携を密にして、脳炎ネットワークを構築することで、一人で

も多くの原因究明につとめ、予防接種後に発症した脳炎・脳症・ADEM 症例についても、その他の疾患（病原体による）の紛れ込みについて検討する。また、2015 年度については AFP 症例の多発についても検討を行う。

（倫理面への配慮）

本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれたとしても、機密保護を徹底し、それを研究の結果として含むようなことはしない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。万が一、個人的情報が本研究の中に含まれる場合には、それに関する機密保護に万全を期する。

本研究は、「国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理委員会」で審査され承認されている（受付番号 445：平成 25 年 9 月 25 日承認）：急性脳炎・脳症。（受付番号：655，平成 27 年 12 月 24 日）：急性弛緩性麻痺（AFP）。

C. 研究結果

研究協力者の奥野、佐藤、新井、砂川と研究代表者の多屋は、2007～2015 年に感染症発生動向調査に基づいて報告された急性脳炎（脳症を含む）について検討した。この 9 年間に報告された急性脳炎（脳症）は 3,156 例であった。2015 年は 511 例であり、2013 年から 3 年連続で報告数の増加が見られた。診断時の年齢中央値は 5 歳（0～98 歳）、男女比は 1.3：1 であった。インフルエンザ脳症に関して解析した結果、2009/2010～2014/2015 シーズンに合計 748 例の報告があり、0～4 歳が最も多く報告されていた。報告された症状を年齢群ごとに比較してみると、成人例は小児例よりも症例数は少ないものの、小児例と比較して臨床症状が異なり、また、その重症度に関しても決して低くないことが示唆された。また、病原体不明のまま届け出られている症例も多く、病原体検査の重要性が示されたことから、日本国内での、急性脳炎・急性脳症の原因病原体検索のための臨床検体の採取・保管・搬送に関するガイドラインを作成した。

2015 年 4 月～2016 年 3 月 16 日までに本研究班で病原体検索をおこなったのは 51 症例で、5 点セット（血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿）のうち 3 種類以上搬送されたのは 45 症例（88.2%）、5 種類すべて（5 点セッ

ト）搬送されたのは 30 症例（58.8%）であった。内因性 RNA コントロールが検出されない症例が 8 症例（15.7%）あった。

原因不明の急性脳炎（脳症）の原因病原体検索のために必要な検体採取・保管のガイドラインと、検体搬送のガイドラインを作成した。

研究代表者の多屋と研究協力者の吉良、チヨン、奥村、森、安元、鳥巢、清水は、2015 年秋に国内で多発した急性弛緩性麻痺（AFP）症例について検討した。感染症法に基づく積極的疫学調査の枠組みで一次調査が実施された。その結果を集計すると、全国 31 都府県から 100 例の AFP 症例が報告された。2015 年 9 月に麻痺発症のピークがあり、年齢中央値は 5 歳（0 歳 1 か月～71 歳）で、男女比はほぼ同等であった。単麻痺が 37 件と最も多く、対麻痺 31 件、四肢麻痺も多く認められた（23 件）。顔面（神経）麻痺（6 件）や膀胱直腸障害（4 件）を認めた症例も散見された。一次調査では麻痺発症後に髄液細胞数増加、脊髄 MRI で異常所見を認めた症例がそれぞれ 44%、54%存在したが、検査の時期等も勘案した詳細な解析が必要である。麻痺発症前に発熱や呼吸器症状を認めた者がそれぞれ 66%、45%存在したがこれらについても二次調査の結果を詳細に解析する必要がある。二次調査結果が得られた症例の神経学的な解析から（暫定値）、急性弛緩性脊髄炎（AFM）症例が多く認められた。AFM 症例では、呼吸器症状合併が 80%、発熱の合併が 90%（発熱から麻痺発症まで約 3 日）と AFP 全体での集計より合併率が高く、髄液細胞増多も 85%の症例に認められた。約 80%の症例が単麻痺と対麻痺であったが、2～3 日以内に麻痺が完成し、約 90%の症例に後遺症を残した。MRI 画像では、脳幹・脊髄に病変が認められた。脊髄広範にわたる病変が見られるものも多く、灰白質優位に障害されていた（白質の障害もあり）。その後脊髄が萎縮する症例があり、造影効果は馬尾に多く見られた。AFM 症例の神経生理検査所見の特徴は、運動神経において M 波の振幅低下を 74%に認め、顕著な左右差を多数例に認めること、前角細胞の機能を反映する F 波の異常を 79%に認めること、感覚神経検査で異常を認めないことであった。脊髄前角細胞が傷害を受け、末梢運動神経障害が起こるには 1～2 週間の時間を要す

るが、2015年に多発したAFM症例は、ほぼ同時期に両部位に異常を認めた症例が多かった。

病原体検索は、感染症法に基づく積極的疫学調査の枠組みで現在進行中であり、今後は病原体との関連についての解析が必要である。一部の症例の呼吸器由来検体からエンテロウイルスD68 (EVD68) が検出されており、その他のエンテロウイルス、ライノウイルス等も検出された。

研究分担者の倉根と研究協力者の森野、多屋は、エンテロウイルスD68 (EV-D68) 感染と急性弛緩性麻痺 (AFP) の症例の関連について検討するために、AFPに関する海外文献検索を行い、臨床像、検査に関連する情報を収集した。米国におけるAFP症例の報告では、症状は片側麻痺症例が多く、先行する呼吸器症状を有した症例が8割以上にのぼった。そのうち検査を実施した41例中8例でEV-D68 PCRが陽性であった。これまでの報告のほとんどは呼吸器検体からEV-D68特異的PCRによって検出された症例であったが、髄液、便から検出された例もわずかながら報告があった。ある報告ではEV-D68 PCR陽性AFP症例の呼吸器症状初発時から検体採取までの期間は中央値7.8日 (範囲3.0-11.0日) であった。また免疫不全者において初発症状から最長22日に検出された報告があった。

研究分担者の森島と研究協力者の八代は、2015年8月以降、本邦において小児を中心に症例が相次いだ原因不明の急性弛緩性麻痺 (AFP: Acute Flaccid Paralysis) について、中国四国地区における網羅的実態調査を行うことでAFP症例のより正確な実態を把握するとともに、国立感染症研究所へのAFP症例の報告の喚起を行った。対象は中国四国地区において小児科を標榜するすべての病院 (195カ所) とした。調査方法はまず一時調査票を郵送し、症例を認めた病院には二次調査票 (厚労省の事務連絡: 医療機関記入様式) を電子メールにて依頼した。一次調査の回収率は95.4% (186/195) であり10施設10名の報告を認めた。中国四国地区の小児 (0-14歳) 総人口は150万人であり症例数は10名であった。全国の小児総人口は1670万人であるため、日本国内では約110例の発症が推察された。

研究分担者の亀井は、本邦における結核性髄膜炎の予後因子を検討した既報は限られているため、自施設とその関連施設に入院した成人結核性髄膜炎患者28例を対象として転帰影響要因について検討した。来院時の重症度と水頭症、投薬までの日数、初回髄液ADA、ADA最高値が転帰影響要因として同定された。結核性髄膜炎では早期診断と早期治療が最も重要であり、髄液ADAが結核性髄膜炎の診断だけではなく予後予測因子となる可能性が示唆された。

研究分担者の高崎と、研究協力者の田島、池田は、近年、日本国内で分離される日本脳炎ウイルス (JEV) は遺伝子型I型株であるが、現行ワクチン株は遺伝子型III型株である。現行の日本脳炎ワクチンはI型に対して有効であることは確認されているが、V型ウイルスに対する有効性はやや劣ることが報告されていることから、V型について検討した。V型ウイルスは2009年に中国で、2010年に韓国で検出同定され、韓国では2012年から2014年にかけて毎年蚊から検出されていることが、The 6th Informal Consultation on WHO Global & Regional Specialized JE Laboratories in the Western Pacific Region の会議において情報を得た。今後日本脳炎ウイルスV型株の国内への侵入を注意深く監視していくとともに、蚊での媒介能力など詳細な性状解析が必要であるため、日本脳炎ウイルスV型検出法を地方衛生研究所に提示しV型ウイルス検出サーベイランスに対する協力を求めた。

研究分担者の片野と、研究協力者の福本、保科、高橋、峰、長谷川は、原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿の検体からウイルスの網羅的検索を行った。今年度に検討を行った症例は平成28年2月末までで43例であり、全例につき、multivirus real-time PCRを施行した。9例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルスA6、ヒトヘルペスウイルス6、パレコウイルス3、サイトメガロウイルス、パルボウイルスB19などであった。このほかにmultivirus real-time PCRで有意なウイルスが検出さ

れなかった 1 例について、次世代シーケンサーによりヒトアストロウイルス MLB 株が検出された。

研究分担者の黒田と、研究協力者の関塚は、急性脳炎・脳症の原因究明を目的とした次世代シーケンサー (next-generation sequencing: NGS) による網羅的病原体検索を担当した。本年度は 23 例の原因不明脳炎・脳症患者について、検査を行った (P45-P89, 45 症例のうち 7 症例は NGS 検査前に当該病原体が確定、15 症例は RNA 分解等で不適当な臨床検体であったため NGS 検査未実施)。それぞれの患者髄液から Human astrovirus MLB-1, HHV-3, 細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液から Human parainfluenzavirus 4, Human parechovirus 6, Saffold virus 2 を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。血液関連検体 (血清、血漿、全血) から、主に Torque teno virus (亜種含む) を検出する症例が多く、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症にもなって再活性化している可能性が示唆された。Enterovirus 等を起因病原体として疑う場合、便検体の検査は有効である。

個別 PCR (対象配列が短く限定的) で検出できない症例においても、NGS は病原体ゲノム DNA の欠片でも検出でき、感度もおよそ 10 倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑いが濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の高度な核酸検査法であって確定検査診断ではないため、抗体検査法による IgM 陽性を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきである。

D. 考 察

感染症発生動向調査に基づく急性脳炎 (脳症を含む) として届けられた症例についての検討から、成人のインフルエンザ脳症については、症例数は少ないものの小児とは異なる特徴が認められた。

研究班で得られた結果から、原因病原体の究明には急性期の 5 点セット (血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿) の凍結保管が極めて重要であり、今後の課題である。

急性期の 5 点セットの採取と、適切な保管、ならびに搬送が重要であることがわかったため、検体採取・保管・搬送のガイドラインを作成したが、今後の検討に活かすことが期待される。

網羅的 real time PCR、次世代シーケンサーによる解析で、原因不明として届けられていた急性脳炎 (脳症) の症例の 5 人に一人の原因が明らかとなった。これらの結果は本方法による検索の有用性を示すとともに、日本の急性脳炎 (脳症) 症例における微生物学的なエビデンスを提供するものと期待される。

また、今年度は秋に多発した AFP 症例についても詳細な検討を行った。臨床的な特徴が明らかになりつつあり、全貌を把握するとともに、次に起こるかもしれない流行に備えることが重要と考えられた。

中南米を中心としたジカウイルス感染症の流行 (AFP 症状を認めるギラン・バレー症候群との関連が示唆)、海外にはまだポリオが流行している国があること等から、ポリオウイルスやジカウイルスの国内侵入の監視、エンテロウイルス D68 感染症の次の流行に向けて、AFP 症例の早期探知、病原体診断に繋げるためには、感染症法に基づく AFP サーベイランスの導入について検討する必要があると考えられた。

原因不明急性脳炎・脳症・AFP の原因究明には、臨床・基礎・疫学の各方面からの総合的な判断と研究が重要であることが明らかである。

E. 結 論

今年度は感染症発生動向調査に基づいて 0 歳児の日本脳炎が関東地方から報告され、国内では引き続き予防に努める必要があることが明らかとなった。原因不明急性脳炎・脳症の病原体検索には急性期の検体確保と適切な保管・搬送が不可欠であるが、それらが適切に実施されていないことが多かったことから、検体採取・保管・搬送のガイドラインを作成した。適切な検体の確保と保管が実施できるような啓発が必要である。今年度は 2015 年 4 月～2016 年 3 月 16 日までに 51 症例の原因不明急性脳炎 (脳症) について検討を行った。5 点セット (血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿) のうち 3 種類以上搬送されたのは 45 症例 (88.2%)、5 種類す

べて（5点セット）搬送されたのは30症例（58.8%）であった。内因性RNAコントロールが検出されない症例が8症例（15.7%）あった。10例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルスA6、ヒトヘルペスウイルス6、パレコウイルス3、サイトメガロウイルス、パルボウイルスB19などであった。このほかにmultivirus real-time PCRで有意なウイルスが検出されなかった1例について、次世代シーケンサーにより髄液からはヒトアストロウイルスMLB株が検出されている。他に、HHV-3、細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。また、血液、咽頭ぬぐい液、便検体の重要性が示唆された。これらの結果は本研究班による病原体検索の有用性を示すとともに、日本の急性脳炎（脳症）症例における微生物学的なエビデンスを提供するものと期待される。

また、2015年秋に多発した急性弛緩性麻痺（AFP）のdisease burdenを明らかにし、海外文献について検討するとともに、国内の臨床・疫学情報について解析を行った。2016年3月までに100例のAFP症例が報告された。このうち、中国四国地方での患者数から推定すると、日本国内では約110例の発症が推察されたことから、ほぼ全数に近い症例探知ができたことが伺える。詳細な神経学的所見、画像所見について現在、検討中である。

F. 健康危険情報

本研究班の検討から、原因不明の急性脳炎（脳症）として報告された症例の約20%で有意と考えられる病原体が検出された。2015年秋に多発したAFPについても特徴的な症状、神経学的所見が明らかになりつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masanori Sato, Makoto Kuroda, Masashi Kasai, Hikoro Matsui, Tetsuhiro Fukuyama, Harutaka Katano, Keiko Tanaka-Taya : Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 78 : 66-70, 2016

- 2) 多屋馨子：急性脳炎・脳症の原因究明 医療機関・保健所・地研・感染研の連携の重要性. *臨床とウイルス*. 43 (4) : 198-205, 2015

その他の研究発表については各分担研究報告書を参照のこと。

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

Ⅱ. 分担研究報告書

日本脳炎および原因不明の急性脳炎・脳症の実態ならびに
予防接種後に報告された脳炎・脳症・急性散在性脳脊髄炎の発生動向と
病原体診断のための検体の確保・搬送に関する研究

研究分担者	多屋馨子	国立感染症研究所	感染症疫学センター	第三室	室長
研究協力者	奥野英雄	国立感染症研究所	感染症疫学センター	第三室	研究員
研究協力者	新井 智	国立感染症研究所	感染症疫学センター		主任研究官
研究協力者	佐藤 弘	国立感染症研究所	感染症疫学センター	第三室	研究員
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	第三室	研究員
研究協力者	砂川富正	国立感染症研究所	感染症疫学センター	第二室	室長

研究要旨 2007～2015年に感染症発生動向調査に基づいて報告された急性脳炎（脳症を含む）は3,156例であった。2015年は511例であり、2013年から3年連続で報告数の増加が見られた。診断時の年齢中央値は5歳（0～98歳）、男女比は1.3：1であった。インフルエンザ脳症に関して解析した結果、2009/2010～2014/2015シーズンに合計748例の報告があり、0～4歳が最も多く報告されていた。報告された症状を年齢群ごとに比較してみると、成人例は小児例よりも症例数は少ないものの、小児例と比較して臨床症状が異なり、また、その重症度に関しても決して低くないことが示唆された。また、病原体不明のまま届け出られている症例も多く、病原体検査の重要性が示されたことから、日本国内での、急性脳炎・急性脳症の原因病原体検索のための臨床検体の採取・保管・搬送に関するガイドラインを作成した。

2015年4月～2016年3月16日までに本研究班で病原体検索をおこなったのは51症例で、5点セット（血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿）のうち3種類以上搬送されたのは45症例（88.2%）、5種類すべて（5点セット）搬送されたのは30症例（58.8%）であった。内因性RNAコントロールが検出されない症例が8症例（15.7%）あった。

原因不明の急性脳炎（脳症）の原因病原体検索のために必要な検体採取・保管のガイドラインと、検体搬送のガイドラインを作成した。

A. 研究目的

急性脳炎（脳症を含む）は感染症発生動向調査に基づく五類感染症全数把握疾患に指定され、診断したすべての医師に診断から7日以内の届出が義務づけられている。2007年～2015年の感染症発生動向調査から、急性脳炎（脳症を含む）の報告状況を整理し、現状分析を行った。また、本研究班に検討依頼があった症例について、搬送された臨床検体の種類と、検体の質について検討し、適切な検体採取・保管・搬送のガイドラインを作成することを目的とした。

B. 研究方法

感染症発生動向調査に基づいて2007～2015年の9年間に報告された急性脳炎（脳症

を含む）を診断週、報告都道府県、報告患者年齢別に解析し、原因病原体の集計を行った。病原体毎の集計に関しては、インフルエンザ関連脳症（以下、インフルエンザ脳症）について検討した。

本研究班で実施している病原体の検索方法は、日本脳炎の鑑別のために日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体の測定（研究分担者：高崎）、マルチプレックスReal-time PCRを用いた網羅的ウイルス遺伝子検出（研究分担者：片野）、いずれの病原体も検出されなかった場合に、次世代シーケンサーにより網羅的遺伝子検出（研究分担者：黒田）を実施した。

マルチプレックスReal-time PCRの検索は、内因性RNAおよびDNAコントロールが検出で

きた場合に検出方法が成立したとした。

日本脳炎ウイルス感染については、マルチプレックスReal-time PCRおよび次世代シーケンサーによる判定に加え、血清学的診断も実施した(研究分担者:高崎、片野、黒田)。

C. 研究結果

急性脳炎(脳症を含む):2007~2015年に感染症発生動向調査に報告された症例数は3,156例であり、診断時の年齢中央値は5歳(0~98歳)、男女比は1.3:1であった。年間患者報告数は、2007年~2008年は年間200例前後であったが、2009年には、インフルエンザA(H1N1)pdm09によるパンデミックの影響により、526例と急増した。2010年には242例と減少したが、そこから徐々に増加し、2012年および2013年は、年間に350例を越える届出があり、2014年には459例、2015年は511例であった(表1)。発熱は2,850例(90.3%)、けいれんは2,037例(64.5%)、髄液細胞数の上昇は801例(25.4%)、嘔吐は639例(20.2%)、頭痛は579例(18.3%)、項部硬直は366例(11.6%)で認められた。

2015年に報告された511例のうち、0-4歳は280例、5-19歳は124例、20-59歳は49例、60歳以上は58例であり、0-4歳で多く認められた。報告された病原体では、0-4歳ではヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)が26例、インフルエンザウイルスが21例、ロタウイルス、アデノウイルスが11例ずつと、HHV-6が最も多かった。5-19歳では、インフルエンザウイルスが33例と最も多く、続いてマイコプラズマが7例認められた。20-59歳でもインフルエンザウイルスが13例と最も多く、60歳以上ではインフルエンザウイルスが21例、続いて単純ヘルペスウイルスが16例報告されていた。しかし、各年齢群で病原体不明のまま届け出られている症例も多く、0-4歳で171例、5-19歳で68例、20-59歳で32例、60歳以上で15例が病原体不明で届け出られていた。

インフルエンザ脳症に関して、シーズン毎に分けて解析してみると、2009/2010~2014/2015シーズンでは748例の報告があった。シーズン別にみると、2009/2010シーズンが319例と最も報告が多かった。疫学週ごとにインフルエンザ脳症の報告と、定点あたりのインフルエンザ報告数を比較すると、各シーズンともに定点あたりのインフルエンザ報告数のピークとインフルエンザ脳症の報告数のピークはよく一致していた(図1)。インフルエンザ脳症の症状に関して、年齢群(0-4歳、5-19歳、20-59歳、60歳以上)ごとに届け出られた症状を検討すると、0-4歳で

はけいれんが多く見られ、5-19歳では頭痛、嘔吐が比較的多く、20-59歳では頭痛、嘔吐にくわえ、項部硬直、髄液細胞数の増加が多く見られ、60歳以上では項部硬直、髄液細胞数の増加が多く見られた。報告時に死亡日時が届け出られていた報告は、60歳以上で最も多い割合であった(表2)。

急性脳炎(脳症を含む)の病原体診断のためには急性期の検体の確保が非常に重要である。今年度(2015年4月~2016年3月16日まで)本研究班で病原体検索をおこなったのは51症例で、5点セット(血液、髄液、呼吸器由来検体、便、尿)のうち3種類以上搬送されたのは45症例(88.2%)、5種類すべて(5点セット)搬送されたのは30症例(58.8%)であった。検体から内因性RNAコントロールが検出されない症例が8症例(15.7%)あった。

研究班として、急性脳炎・急性脳症の原因病原体を検索するために必要な検体採取・検体保管・検体搬送に関するガイドラインを作成した(図2,3)。ガイドラインでは、急性期(目安として発症後1週間以内)の髄液検体、血液検体(血清、血漿、全血)、呼吸器検体(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、鼻咽頭吸引液など)、便検体、尿検体のいわゆる5点セットを確保する重要性を強調するとともに、その適切な保管方法、安全な搬送法について記載した。

D. 考察

感染症発生動向調査に基づく五類感染症全数把握疾患としての急性脳炎(脳症を含む)の報告は、A(H1N1)pdm09によるパンデミックの影響もあり2009年に急増し、その後2010年にいったん減少するものの、その後は徐々に増加している。2013年から3年連続で報告数が増加し、2015年は2009年の報告数とほぼ同じであった。

2015年はいずれの年齢群もインフルエンザ脳症が多く報告されていたが、0-4歳ではHHV6が最も多くこの年齢群の特徴をよく表していた。5-19歳ではマイコプラズマ、60歳以上では単純ヘルペスウイルスが多いなどの特徴もみられた。

インフルエンザ脳症に関しては乳幼児での報告は多いものの成人に関しては不明な部分も多い。感染症発生動向調査に届け出られた報告に関して検討すると、成人例は小児例よりも症例数は少ないものの、小児例と比較し臨床症状に異なる部分もあり、また、その重症度に関しても決して低くないことが示唆された。

一方で、やはり病原体不明のまま届け出られている症例も多く、病原体検索の重要性が示された。研究班3年目になり、研究班として求めている急性期の5点セットがすべて搬送される症例が増加してきているが、まだ内因性コントロールが検出できない症例が認められる。今回本研究班で作成した検体採取・保存・搬送のためのガイドラインが適切な急性期検体を用いた病原体検索に資することが期待される。

E. 結論

2007～2015年に感染症発生動向調査に基づいて報告された急性脳炎（脳症を含む）は3,156例であり、2015年は511例と、2013年から3年連続で報告数の増加が見られた。インフルエンザ脳症に関して検討すると、成人例では小児例よりも報告数は少ないものの、報告されている症状には違いがあり、重症度に関しても決して低くないことが示唆された。一方、原因不明のままの報告も依然として多く、急性期の5点セットがすべて搬送される症例が増加してきているが、まだ内因性コントロールが検出できない症例が認められる。急性脳炎（脳症を含む）の原因究明に必要な急性期の検体採取・検体保管・搬送に関するガイドラインを作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 奥野英雄、多屋馨子：わが国の急性脳炎（脳症を含む）の発生動向と今後の課題. 小児科. 56(6)：831-837, 2015.
- (2) 多屋馨子：急性脳炎・脳症の原因究明医療機関・保健所・地研・感染研の連携の重要性. 臨床とウイルス. 43(4)：198-205, 2015.

2. 学会発表

- (1) 多屋馨子：シンポジウム感染研・地衛研の連携：その時その場の使命 急性脳炎・脳症の原因究明～医療機関・保健所・地研・感染研の連携の重要性～. 第56回日本臨床ウイルス学会. 岡山 2015年6月
- (2) H. Okuno, T. Sunagawa, S. Morino, H. Satoh, S. Arai, K. Oishi, and K. Tanaka-Taya. Acute encephalitis and encephalopathy associated with vaccine preventable diseases in children, Japan, 2006-2013. 9th Vaccine & ISV Congress. Korea, Oct., 2015.

- (3) 奥野英雄、森野紗衣子、佐藤弘、新井智、高橋琢理、砂川富正、大石和徳、多屋馨子：成人のインフルエンザ脳症報告例の検討（感染症発生動向調査より）. 第20回日本神経感染症学会総会学術集会. 長野 2015年10月.
- (4) 奥野英雄、新井智、森野紗衣子、佐藤弘、砂川富正、大石和徳、多屋馨子：感染症発生動向調査における、急性脳炎（脳症を含む）の小児例のまとめ. 第47回日本小児感染症学会総会・学術集会. 福島 2015年10月.
- (5) 奥野英雄、砂川富正、森野紗衣子、佐藤弘、新井智、大石和徳、多屋馨子：日本国内での、小児における、ワクチンにより予防可能な疾患に関連した急性脳炎（脳症を含む）の検討～2006年から2014年までの発生動向調査より～. 第19回日本ワクチン学会学術集会. 名古屋 2015年11月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

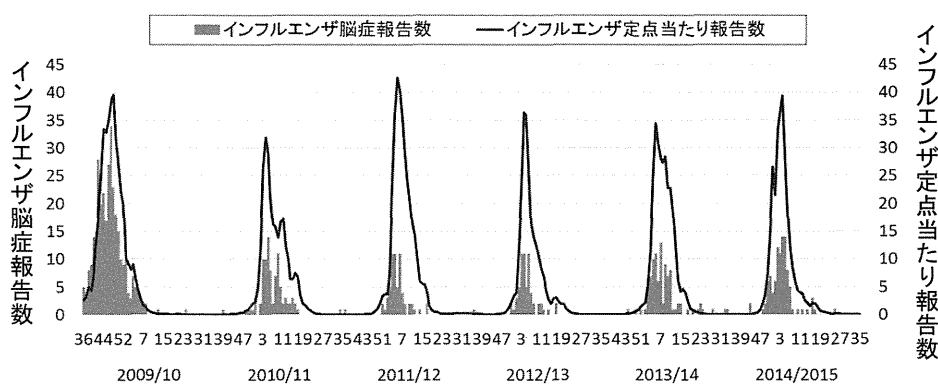
特になし

表1.急性脳炎の届出まとめ | 2007～2015年

総数 (例)		届け出られた症状	
2007年	228	発熱	2850 90.3%
2008年	192	けいれん	2037 64.5%
2009年	526	髄液細胞数増加	801 25.4%
2010年	242	嘔吐	639 20.3%
2011年	258	頭痛	579 18.4%
2012年	371	項部硬直	366 11.6%
2013年	369		
2014年	459		
2015年	511		
男女比	1.3 : 1		
年齢中央値	5歳 (範囲:0～98)		

図1.シーズンごとのインフルエンザ脳症報告数とインフルエンザ定点当たり報告数の比較

*2009/10～2014/15シーズン



(感染症発生動向調査より 2015年10月18日現在)

表2.インフルエンザ脳症の年齢群別届出症状割合

*2009/10～2014/15シーズン

年齢群(歳)	総計	発熱		頭痛		嘔吐		けいれん		項部硬直	
		あり	(%)	あり	(%)	あり	(%)	あり	(%)	あり	(%)
0-4	202	189	93.6	6	3.0	18	8.9	162	80.2	2	1.0
5-19	408	367	90.0	54	13.2	74	18.1	193	47.3	12	2.9
20-59	72	64	88.9	23	31.9	13	18.1	20	27.8	7	11.9
60-	66	63	95.5	5	7.6	8	12.1	27	40.9	11	15.2

年齢群(歳)	総計	髄液細胞数の増加		届出時死亡報告	
		あり	(%)	あり	(%)
0-4	202	4	2.0	14	6.9
5-19	408	10	2.5	20	4.9
20-59	72	13	18.1	7	9.7
60-	66	5	7.6	10	15.2

(感染症発生動向調査より 2015年10月18日現在)

図2.急性期検体採取(5点セット)+ペア血清について

髄液：最低必要量は0.2mL

脳生検検体であれば米粒大で十分だが、確実に病変部を含んでいること

血清：最低必要量は0.2mL

回復期にペア血清も採取されていれば抗体検査も可能

呼吸器由来検体：後鼻腔ぬぐい液

咽頭ぬぐい液

後鼻腔吸引液

下気道由来検体

} 可能であれば複数採取

綿棒の場合は乾燥予防に、最小限度(1mL弱)の生食に浸すのが望ましい

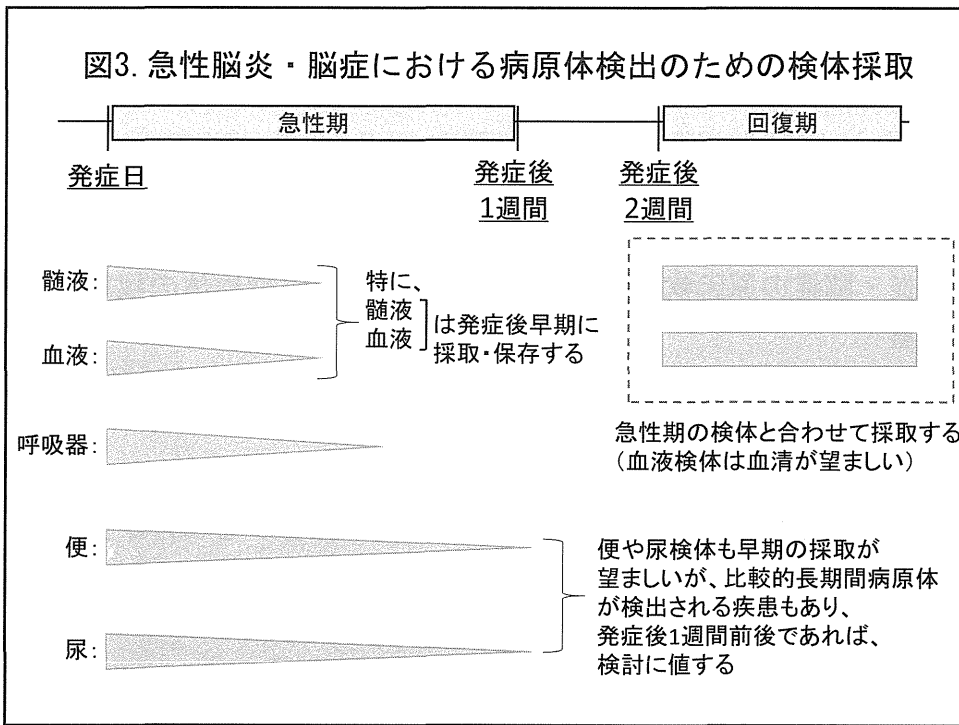
便：最低必要量は0.5g程度
乳剤でも可

尿：最低必要量は0.2mL

➤ 採取後、なるべく早くに-70℃(少なくとも-20℃以下)に保存

➤ 複数のチューブに小分けに保存されているのが望ましい

図3. 急性脳炎・脳症における病原体検出のための検体採取



急性脳炎・脳症～検体採取・保管に関するガイドライン～

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」

- ・急性脳炎・脳症の原因病原体を検索するには、急性期検体の採取・保管が不可欠である
- ・検体は、原則として、5点セット（髄液、血液、呼吸器由来検体、便、尿）を採取する
- ・検体は、 -70°C 以下（少なくとも -20°C 以下）に凍結保管する
- ・検体は、凍結融解を避けるため、小分けにして保管することが望ましい

はじめに

急性脳炎・脳症は様々な病原体によって引きこされる。インフルエンザは小児を中心に「インフルエンザ脳症」を合併することがよく知られているが、インフルエンザウイルス以外に、突発性発疹の原因ウイルスである HHV-6B,7 (Human herpesvirus 6B,7)、ロタウイルス、RS ウイルス、ムンプスウイルス、アデノウイルス、HSV1,2 (Herpes simplex virus 1,2)、ノロウイルス、EB ウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ヒトパレコウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルスなどのウイルスが原因病原体として報告されている[1, 2]。また、その他、日本国内では日本脳炎ウイルスも忘れてはならない重要な病原体である。ウイルス以外にも、細菌やリケッチアによる発症例の報告もあるが、感染症発生動向調査に届け出られた急性脳炎（脳症を含む）の原因病原体では各年代ともにウイルスが原因となることが多い[3]。鑑別すべき病原体に関しては、「インフルエンザ脳症ガイドライン 改訂版（厚生労働省 インフルエンザ脳症研究班）」にまとめられており、急性脳炎・脳症の病原体診断の際に参考になる（参照：http://www.okayama-u.ac.jp/user/pedhome/download/IAE_guideline_2009.pdf）。

急性脳炎・脳症は、ともに、急速に進行する意識障害を特徴とするため、髄液検査は病態の解明に重要であるが、特に急性脳症に関しては、髄液検体中に原因病原体が特定できないことが多い。また、前述の通り、急性脳炎・脳症を引き起こす病原体は多岐にわたっており、それぞれの病原体を検索するのに適した臨床検体は異なる。そのため、複数の臨床検体を確保した上で病原体検索を行うことが重要である。

臨床検体に関しては、発症後、なるべく早期（早ければ早いほどよく、少なくとも発症後 1 週間以内）に採取し -70°C 以下に凍結保管しておくことがきわめて重要である。

また、抗体価の動きを確認するためには、急性期血清と回復期血清のペアを同時に測定してその動きを確認することが重要である（抗体陽転あるいは有意上昇）。急性期検体は採取のタイミングを逃すと遡って採取することはできないため、急性期の治療と並行し検体採取を遅滞なく行えることが望ましい。治療のために免疫グロブリン製剤を投与する場合は、投与前の検体の確保が重要である。また、採取後、検体からの RNA 抽出のためには、-70℃以下（少なくとも-20℃以下）で保存しておくことも重要である（ただし、全血検体の場合、凍結を行うと溶血するため、遠心後血漿成分と血球成分に分けて保管することが望ましい）。

一般的に、凍結融解を繰り返すことで、検体中からのゲノム（特に RNA）抽出効率が低下することが知られている。急性期の臨床検体を採取後、あらかじめ複数のサンプルチューブに小分けにして凍結保管しておくと、一つの検体を対象として複数の病原体検索を行う際に有用である。

入院施設を持った国内医療機関の場合、多くが臨床検査部門を持っており、その施設内で細菌培養検査が実施されていることが多い。しかし、急性脳炎・脳症の主要な原因病原体はウイルスであることから、ウイルス分離や多岐にわたるウイルスを網羅した PCR 検査等のウイルス遺伝子検索は一部の医療機関で実施されているのみである。感染症法に基づく感染症発生動向調査対象疾患では、保健所を通して全国の地方衛生研究所でウイルス分離や、PCR 法等によるウイルス遺伝子検出が実施されている場合もあるが、急性脳炎・脳症の検体がすべて検査対象になっていないことも多い。

本ガイドラインでは、詳細なウイルス学的検討を行う際に重要となる検体採取・保管方法を中心に記載した。

採取が推奨される検体

臨床検体は、5点セット（髄液、血液(全血および血清)、呼吸器由来検体、便、尿）+回復期血清検体を基本として考える。下記に各種検体を採取する上での注意点を述べるが、検体の採取量などはあくまで参考である。また、臨床検体中からの RNA の抽出効率を高めるために、できる限りベッドサイドで採取後すぐに氷上に置いて保冷し、常温に保管される時間をなくすることが重要である。

採取した検体を保管する容器には、患者を特定できる情報（名前、患者 ID など）、検体の種類、採取年月日などを採取後すぐに記載する。

➤ 髄液（脳生検検体を含む）

- ✓ 成人の場合、1～3mL 程度、小児の場合、1mL 程度を滅菌スピッツにて採取する。最低必要量は 0.2mL。
- ✓ 採取時に複数の容器に小分けにしておくことが望ましい。
- ✓ 細菌培養検査のためには、抗菌薬投与前に検体を採取する。しかし、ウイルス分

離や PCR 検査のためには抗菌薬投与後の検体であっても特に支障はない。

- ✓ 脳生検検体の場合、採取量は米粒大で十分だが、確実に病変部を含んでいる必要がある。

➤ 血液検体（血清、血漿、全血）

- ✓ 必要量は血清、血漿の場合、0.5～1mL（最低必要量 0.2mL）。全血であれば 2mL あればウイルス分離、ウイルス遺伝子検出、抗体価測定などが可能である。
- ✓ 急性期と回復期のペア血清を採取しておく、抗体検査の際に有用である。
- ✓ 全血の場合、凍結により溶血するため、結果の解釈が困難になる場合があるが、最近では全血から DNA あるいは RNA の抽出が可能なキットが市販されているため、これらを活用する。ヘパリンは PCR 反応を阻害するため、抗凝固剤としては適していない。EDTA 加血で採取して、遠心後血漿成分と血球成分にわけて保管しておくことができれば、より有用である。また、血球成分から単核球成分を分離しておくことで更に詳細な解析が可能となる。

➤ 呼吸器由来検体（後鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、後鼻腔吸引液、下気道由来検体（気管支吸引液、喀痰など））

- ✓ 病原体あるいは疾患によっては、後鼻腔ぬぐい液と咽頭ぬぐい液で検出率が異なる場合がある。また、上気道由来検体と下気道由来検体で検出率が異なる場合がある。呼吸器由来検体に関しては、可能であれば複数の部位から採取することが望ましい。
- ✓ ぬぐい液を採取する場合、綿棒を用いる際には、必ず滅菌済みの医療用綿棒を用いる。フロックドスワブも市販されているが、乾燥には十分に注意が必要である（乾燥すると、綿棒より検出効率が下がる場合がある）。
- ✓ 綿棒により検体を採取した場合は乾燥予防に、最大 1mL 程度の VTM（ウイルス搬送用培地）に浸しよく攪拌する。VTM（ウイルス搬送用培地）を医療機関に保管しておくことが望ましい。もし VTM（ウイルス搬送用培地）が医療機関になかった場合は、生理食塩水を用いる場合があるが、保管により pH が変化することから、速やかに検査(研究)機関に搬送する必要がある。綿棒を細菌培養用の寒天培地に入れると、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出に困難を来すことから注意する。
- ✓ 気管吸引液の場合も、検体採取後にチューブ内に残った検体を吸引する生理食塩水に関しては 1mL 程度にとどめるのが望ましい。
- ✓ 抗菌薬や BSA（ウシ血清）などのキャリア蛋白が入った VTM（ウイルス搬送用培地）に保存しておく方がウイルス分離や PCR 法等によるウイルス遺伝子の検出には適している。しかし、その場合、細菌培養検査や次世代シーケンサーに

よる遺伝子解析には不適當となる。

- ✓ 各年齢群で、インフルエンザウイルスは最も頻度の高い病原体の一つである。呼吸器由来検体を採取しておく意義は大きい。

➤ 便

- ✓ 最低必要量は 0.5g 程度。10%乳剤でも検体として有用である。便採取時には、尿が混入しないように注意する。
- ✓ 便が採取できない時などは、直腸ぬぐい液も検体として有用である。綿棒を肛門より 2.5～4.0cm 挿入し優しく回転させる。その際、綿棒は 2 本分採取するのがよい。採取後、乾燥防止目的で生理的食塩水を 1mL 程度入れる場合もある[4]。
- ✓ エンテロウイルス属（エンテロウイルス D68 を除く：便からの検出率は極めて低い）やノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどは、便検体からの検出率が高い。便検体は病原体検索に非常に重要である。

➤ 尿

- ✓ 必要量は 1mL 程度（最低必要量 0.2mL）。便が混入しないように採取する。尿道カテーテルなどを用いて、無菌的に採取する場合もある。
- ✓ 採取、保管の重要性が認識されにくいだが、他の部位の検体と比較して、尿検体で比較的長期に排泄される病原体（麻疹ウイルス、ジカウイルスなど）もあるため、尿検体の保管も重要である。

おわりに

急性脳炎・急性脳症は、急激な意識障害の進行を特徴とし、症状も重篤であることから、実際の臨床現場では検体の確保以外に求められる医療的処置や治療なども多い。

忙しい臨床現場でも、円滑に、適切な時期での検体採取、適切な検体保管が実現できるよう、医療機関内での検体確保・保存のマニュアルを作成しておくなど、平常時より保管用容器や VTM（ウイルス搬送用培地）などの準備を整えておくことが重要である。

参考文献

1. Hoshino, A., et al., *Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes*. Brain Dev, 2012. 34(5): p. 337-43.
2. Morishima, T., et al., *Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan*. Clin Infect Dis, 2002. 35(5): p. 512-7.
3. 奥野英雄, 他. わが国の急性脳炎(脳症を含む)の発生動向と今後の課題. 小児科 2015; 56(6): 831-7.