

201517007B

**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25年度～27年度 総合研究報告書**

**研究代表者 多屋 馨子**

**平成 28(2016)年 3 月**

## 目 次

### I. 総合研究報告

- 日本脳炎ならびに予防接種後を含む急性脳炎・脳症・急性弛緩性麻痺の実態・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…… 16  
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～…………… 25  
(資料 2)急性脳炎・脳症～検体搬送に関するガイドライン～…………… 30
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…………… 36  
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)…………… 45  
(資料 2)急性弛緩性麻痺症例(二次調査用紙)…………… 52
3. 「日本脳炎IgM補足ELISA法の評価」、「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」、「急性弛緩性麻痺とエンテロウイルスD68に関する最近の知見の検討(海外文献より)」…………… 59  
倉根一郎、森野紗衣子、多屋馨子
4. 急性脳炎・脳症の病因診断の問題点および3次医療機関における傾向について…………… 66  
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・脳症の実態・病因解明に関する研究…………… 72  
亀井 聡
6. 「日本脳炎の実験室診断 IgM 捕捉 ELISA 法の改良および日本脳炎患者・ウイルスサーベイランス」…………… 75  
高崎智彦、田島 茂、中山絵里、モイ メンリン、小滝 徹
7. 不明脳炎症例におけるウイルスの網羅的検索…………… 78  
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	85
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	102
---------------------	-----

# I . 総合研究報告書

日本脳炎ならびに予防接種後を含む  
急性脳炎・脳症・急性弛緩性麻痺の実態・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** 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例の報告があった。2015年度はインフルエンザ脳症に関して詳細な検討を加えた結果、2009/2010～2014/2015シーズンでは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確かに少ないものの、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。成人のインフルエンザ脳症に関する研究に繋がっている。また、2013年から3年連続で急性脳炎（脳症を含む）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。2013年9月25日に本研究班の研究が国立感染症研究所のヒトを対象とする医学倫理委員会で承認されてから、病原体不明として届けられていた急性脳炎（脳症）症例については1例ずつ問い合わせを行い、研究班での検討について紹介した結果、2016年3月20日までに100症例について病原体の検索依頼があった。研究班2年目の2014年には日本脳炎ウイルス（JEV）ゲノムが次世代シーケンサーを用いた解析（以下、NGS検査）で検出され、日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体の上昇も認められたことから、春先に感染したと考えられる日本脳炎症例を見出した。研究班の目的の一つである原因不明急性脳炎の中に紛れ込んでいる日本脳炎を見つけるという目的が達成されたことは意義が大きく、医療機関・行政機関・研究機関の連携強化の重要性が明らかとなった。原因不明の急性脳炎では必ず日本脳炎を鑑別診断に上げて、ウイルス学的な検査を実施する必要性を啓発した結果、2015年の関東地方での0歳児の日本脳炎の診断にも繋がったことが推察される。さらに、multiplex PCR法を用いて網羅的にウイルス遺伝子の検出を行ったところ、16例から病態と何らかの関連があると考えられる病原体遺伝子が検出された。コクサッキーウイルスB3、A10、A6、好発年齢以外でのヒトヘルペスウイルス6B（HHV6B）、パレコウイルス3型、EBV、ノロウイルス、エンテロウイルスA71、パルボウイルスB19遺伝子が検出され、原因不明症例の病原体検索に繋げることができたことは意義が大きい。この方法で病原体が検出できなかった場合は、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実施しているが、前述したJEV以外に、髄液からコクサッキーウイルスB4、アストロウイルスMLB-1、ヒトヘルペスウイルス(-3, -4, -8)、ヒトパラインフルエンザウイルス4b、ボカウイルス、ノロウイルス、各種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。咽頭拭い液からヒトアデノウイルスC、ヒトヘルペスウイルス(-5, -6B, -7)、エンテロウイルスB、ヒトパラインフルエンザウイルス(-3, -4)、パレコウイルス6型、Saffoldウイルス2型を検出し、呼吸器感染症との関連についても検討する必要がある。血液関連検体（血清、血漿、全血）からは、主にTorque teno virus（亜種含む）を検出する症例が多かった。また、エンテロウイルス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。脳炎・脳症の前駆症状と思われる腸管症状の起因菌（ESBL産生大腸菌）の特定と菌分離に成功した症例もあった。

本研究班では病因解明のために5点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）を求めているが、原因究明のためには、適切な時期での検体の採取・保管・搬送が重要である。3種類以上搬送されたのは73症例（73.0%）、5種類すべて（5点セット）搬送されたのは52症例（52.0%）であり、年々5点セットで搬送される割合が多くなった。一方でRNAの内因性コントロールが検出されない症例が23症例（23.0%）あり、そのうち5症例についてはDNAの内因性コントロールも検出されなかったことから、検体採取の方法、保管、搬送について、ガイドラインを作成した。

一方、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ことも重要なポイントである。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非常に重要であることが明らかとなり、そういう観点からも、臨床・基礎・疫学で構成するこの研究班の特性を活かすことができると考えられた。

予防接種後副反応（有害事象を含む）として届けられた脳炎・脳症は接種から平均 9.4 日、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）は接種から平均 18.6 日で発症していたが、今後は分母情報とともに検討することが重要であり、そのためには年齢別の被接種者数の情報が必要であることが明らかとなった。また、他の要因による紛れ込みを鑑別するための検討（病原体診断）が必要と考えられたが、予防接種後の脳炎・脳症については感染症発生動向調査の様に一例ずつの問い合わせが実施できていないことから、研究班への紹介は少なく、多くの検討には至らなかった。

急性脳炎・脳症と鑑別を要する疾患として重要な疾患の一つに細菌性髄膜炎が挙げられるが、本研究班では細菌性髄膜炎治療薬であるメロペネム（MEPM）の髄液移行性と結核性髄膜炎の転帰影響要因についても検討した。成人細菌性髄膜炎例で MEPM を静脈内投与（2g/8 時間）した際の髄液 MEPM 濃度を検討し、髄液 MEPM 濃度が起炎菌に対する最小発育阻止濃度を上回ることを確認した。成人結核性髄膜炎患者を対象とした検討結果から、来院時の重症度と水頭症、投薬までの日数、髄液 ADA を転帰影響要因として同定した。

また 3 年目の研究班では新たに 2015 年秋に多発した急性弛緩性麻痺（AFP）症例についても検討した。感染症法に基づく積極的疫学調査の枠組みで全国 31 都府県から 100 例の AFP 症例が報告された。中国四国地方での詳細な検討により全国で約 110 例の AFP 症例が発生していたことが推察されていたが、100 例を把握できたということは、大部分の症例について把握できたのではないかと考えられる。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）、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。2015 年 12 月 24 日に詳細な臨床・疫学情報を求めた二次調査が国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得たことから、積極的疫学調査で情報提供があった症例について、二次調査を行った。その結果、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が多く、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。AFP 症例の病原体検索は、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、病原体情報と臨床情報の突合が必要である。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。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るが、EVD68 については便、髄液、血液からの検出率は低く、呼吸器由来検体の凍結保管が鍵となったが、保管されていない症例も多く、今後の検討課題である。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。

## 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

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、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、すべての医師に保健所への届出が義務づけられている。2013年の日本脳炎の報告数は9名であったが、2014年に報告された日本脳炎2名のうち1名は、本研究班の結果で診断された症例であり、研究班の目的の一つである原因不明急性脳炎の中に紛れ込んでいる日本脳炎を見つけるという目的が達成された。

原因不明の急性脳炎・脳症の患者検体を収集し、抗JEV抗体の測定法としてより高感度なIgM捕捉ELISA法を用いるとともに、JEVを含めた網羅的病原体検索をmultivirus PCR法およびNGS検査を使って解析することにより、日本脳炎の紛れ込みがないかを確認し、原因不明のままになっている急性脳炎

(脳症)の原因究明を実施することで、一人でも多くの急性脳炎患者の原因病原体を究明し、医療機関にその結果を還元するとともに、国内の急性脳炎(脳症)のdisease burdenについて明らかにすることを目的とする。

平成26年度については、1名について予防接種後の急性脳炎の原因病原体の検討を行ったが、原因究明には繋がれなかった。引き続き時間的に予防接種から短い期間で発症した急性脳炎・脳症・急性散在性脳脊髄炎(ADEM)等について同様の検討を

行うことで、原因究明に繋げることを目的とする。

研究班に搬送された検体の内、ゲノム抽出が困難な検体が含まれていたこと、細菌感染症の疑いがある場合、検体の保管期間が長期に渡ると、該当病原体が死滅して分離にまで至らないケースが想定されることから、急性期の検体の凍結保管の重要性が明らかになった。原因究明に必要な臨床検体の種類(5点セット)、採取時期、採取方法、検体の保管方法・搬送方法について最適な方法を医療機関に提案することを目的とする。

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が、研究結果から2013年12月に細菌性髄膜炎成人例におけるMEPM6g/日の適応拡大が承認され、2014年末に細菌性髄膜炎の診療ガイドライン2014が発表された。今後はガイドラインに基づいた臨床応用を行い、予後改善に繋げることを目的とする。

平成27年度は、これまでに行った研究結果をもとに、適切な臨床検体の採取、保管、搬送に関するガイドラインを作成し、一人でも多くの急性脳炎(脳症)の原因究明に繋げられるように引き続き検討を進める。

また本研究班の3年目に原因不明の急性脳脊髄炎症例が短期間の間に4例研究班に紹介され、原因病原体の検索依頼があった。症状は弛緩性麻痺を認めている者が3例あり、この紹介が、2015年秋に多発した急性弛緩性麻痺(AFP)症例の探知に繋がった。厚生労働省が実施する積極的疫学調査の検討依頼があり、研究班の班員に加えて、小児神経学を専門とする研究協力者、画像診断を専門とする放射線科の専門医の協力を得て、2015年のAFP症例の臨床疫学的な研究を行うことを目的とした。

### 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、急性脳炎・脳症が感染症発生动向調査に基づく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。2015年秋のAFP症例の多発時には、中国四国地方の患者数の全数把握に努め、情報を共

有した。

研究代表者の多屋と研究分担者の倉根は、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、予防接種後副反応として届けられた脳炎・脳症・ADEM について解析するとともに、研究協力者の森野とともに国内外の情報を収集して、原因不明のままになっている急性脳炎・脳症の原因検索に資する方法について検討する。2015 年については、AFP に関する海外論文の文献レビューを行った。

国立感染症研究所（以下、感染研）では、感染症発生動向調査に基づき報告された急性脳炎・脳症の症例と、予防接種後副反応報告として届けられた脳炎・脳症・ADEM の症例について厚生労働省（以下、厚労省）と協力して解析する任務を担っている。

研究協力者の奥野と、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、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。

研究協力者の佐藤、研究協力者の奥野、研究代表者の多屋は予防接種後副反応として届けられた脳炎・脳症・ADEM 症例について医薬品医療機器総合機構（以下、PMDA）、厚労省健康局結核感染症課、同 医薬食品局安全対策課との連携を密にして、報告された症例について集計し、解析を行う。

研究代表者の多屋は、保健所・地衛研・医療機関の担当者から病原体検索依頼があった場合には、症状・所見について詳しく情報収集し、研究班での検討が可能と考えられた症例については、検討に必要な臨床検体の種類、保管方法を説明し、医師・患者への説明文書、検査に係る同意書、症例登録フォームなどを送付して、一人でも多くの急性脳炎・脳症、予防接種後の脳炎・脳症・ADEM 症例の原因究明に資するための調整を行う。

研究協力者の新井は、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・脳症の患者、予防接種後副反応として届けられた脳炎・脳症・ADEM 患者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。

研究代表者の多屋と研究協力者の吉良、チョン、奥村、森、安元、鳥巢、清水は、2015 年に多発した AFP 症例の臨床・疫学情報について調査し、詳細な二次調査を実施することで、病態の把握を行う。

研究分担者の高崎と研究協力者の田島、中山、メンリン、小滝は、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、研究代表者の多屋、研究協力者の奥野、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。

（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、受付番号 655：平成 27 年 12 月 24 日：急性弛緩性麻痺）。

### C. 研究結果

研究協力者の奥野、新井、佐藤、森野、砂川と研究代表者の多屋は、2007～2015 年に感染症発生动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。9 年間に 3,156 例が報告され、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。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検討を加えると、2009/2010～2014/2015 シーズンでは 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。

2016 年 3 月 20 日までに本研究班で病原体検索をおこなったのは 100 症例で、5 点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）のうち 3 種類以上搬送されたのは 73 症例（73.0%）、5 種類すべて（5 点セット）搬送されたのは 52 症例（52.0%）であった。RNA の内因性コントロールが検出されない症例が 23 症例（23.0%）あり、その内 5 症例については DNA の内因性コントロールも検出されなかった。原因究明のためには、適切な検体の採取・保管・搬送が重要であり、検体採取から検査に至るまでの体制整備とともに、検体採取・保管・搬送のガイドラインの作成を行った。

2013 年 4 月～2014 年 9 月までに、予防接種法に基づく予防接種後副反応報告（有害事象を含む）として脳炎・脳症 14 例、ADEM 20 例が報告（2015 年 1 月現在）された。接種から発症までの期間は、脳炎・脳症（13 例）は平均 9.4 日、ADEM（19 例）は平均 18.6 日であった。

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 年に多発した AFP 症例の臨床・疫学情報について調査した。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が多く、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。

研究分担者の倉根と研究協力者の森野、多屋は、急性脳炎・脳症の実態の把握、病因解明には、その病因や臨床像の多様性を検討しうる評価およびデータ収集・解析方法の構築が重要であることから、その手法の検討に応用しうる最新の知見を収集検討することを目的として、海外文献の調査研究を行った。

急性脳炎・脳症の病因検索において、感染症が疑われるものについてはアルゴリズム

化した段階的な検索が有用であった。具体的にアルゴリズムの第一段階では、脳炎症例で検出頻度の高い病原体と病歴に合致した検査項目を実施し、そこで同定されなかった症例について次の段階の病原体検索と神経画像検査、脳炎関連自己抗体検査、髄液検査など、特殊検査を順次加える事で、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った。データ収集・解析方法として、米国のワクチン有害事象報告システム (VEARS) その他の大規模データベースを用いた、特定の有害事象の検出状況の検討事例や単独ワクチン接種後の市販後調査結果と事前の安全性プロファイルとの一致が示された文献などから大規模データベースの利用の有用性が示された。またその活用の手法として、複数の報告事象の重み付けスキーム、アイランド・アルゴリズムを用いた視覚化レイアウトなどの機能を備えた解析システムが有用と報告された。

急性弛緩性麻痺 (AFP) の発症とエンテロウイルス D68 の関与が示唆検討されており、それぞれの側面から疫学、診断、臨床像についての情報収集、検討を行った。各国の EVD68 のサーベイランスや報告において、各々の症例数は多くないものの、AFP 症例が含まれていた。一方で AFP 症例の一部で EV-D68 が主に呼吸器検体から検出された。また便から検出された報告例も少数あった。現在、EV-D68 感染と AFP の関連性はまだ明らかでないが、AFP 症例において臨床像の把握と積極的な病原体検索の実施によるさらなる情報の集積が重要と考えられた。

研究分担者の森島と研究協力者の八代は、岡山大学関連病院を中心に中国四国地区の基幹病院を中心に、主に小児科医を対象として急性脳炎・脳症の病原体解析の重要性を啓発し、急性期の検体採取法・保存法・感染研への搬送法の指導を行った。上記に加えて、3 次病院における急性脳症の傾向評価、病因診断の有用性と注意点に関する検討、2015 年の急性弛緩性麻痺の中国四国地区における実態調査を行った。

研究分担者の亀井は、急性脳炎の鑑別診断として重要な疾患の一つである細菌性髄膜炎を取り上げ、成人の細菌性髄膜炎患者を対象

として細菌性髄膜炎治療薬であるメロペネム (MEPM) の髄液移行性と結核性髄膜炎の転帰影響要因について検討した。成人細菌性髄膜炎例で MEPM を静脈内投与 (2g/8 時間) した際の髄液 MEPM 濃度を検討し、髄液 MEPM 濃度が起炎菌に対する最小発育阻止濃度を上回ることを確認した。成人結核性髄膜炎患者を対象とした検討結果から、来院時の重症度と水頭症、投薬までの日数、髄液 ADA を転帰影響要因として同定した。

研究分担者の高崎と、研究協力者の田島、中山、メンリン、小滝は、本研究班を通じて依頼された原因不明急性脳炎・脳症症例の日本脳炎特異的 IgM 抗体の測定を実施しているが、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なりの日数が必要とされるのが現状である。発症早期の検体が得られないことが多いため、髄液中の抗日本脳炎 IgM 抗体検出が非常に重要であり WHO のパネル血清評価などを用いて感度・特異性を高めた。2014 年度には本研究班を通じての検査依頼のうち、1 症例が日本脳炎であることを確定した。また、ここ数年、韓国で日本脳炎ウイルス遺伝子 V 型ウイルスの蚊からの検出が相次いでおり、1990 年代前半に III 型から I 型にシフトしたように V 型ウイルスへのシフトの可能性があることが明らかになった。

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・脳症の症例の髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿からウイルスの網羅的検索を行った。multivirus real-time PCR では 94 例の解析を行い、16 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、ヒトヘルペスウイルス 6B、パレコウイルス 3 などであった。

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。本研究班で収集された不明脳炎症例は合計 45 症例であり、そのほぼ全例につき、multivirus real-time PCR を施行した結果、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、HHV-6、パレコウイルス 3、EB ウィルス、ノロウイルスであった。HHV-6 陽性例では医療機関で実施された血清抗体検査から 5 歳近くでの初感染であったことが証明され、症例報告として英文誌に掲載された。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。

研究班に病原体検索依頼があった症例の臨床検体について検討した結果、様々な病原体遺伝子が検出された一方で、RNA の内因性コントロールが検出されない症例が約 30%あり、そのうち一部は DNA の内因性コントロールも検出されなかった。

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。H25-27 年度の 3 カ年で 62 名の不明脳炎・脳症患者について NGS 検査未実施網羅的病原体検索が必要と判断された検体の検査を行った (P1-P89)。NGS 検査前に当該病原体が確定もしくは RNA 分解等で不適当な臨床検体以外については実施していない。患者髄液から Human coxsackievirus B4、Human astrovirus MLB-1、日本脳炎ウイルス、Human herpes virus (-3, -4, -8)、Human parainfluenza virus 4b、Human bocavirus、Norovirus、各種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 adenovirus C、Human herpes virus (-5, -6B, -7, Enterovirus B、Human parainfluenza virus 3、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とまって再活性化している可能性が示唆された。Enterovirus 等を起病病原体として疑う場合、便検体の検査は有効であった。脳炎・脳症の前駆症状と思われる腸管症状の起病菌 (ESBL 産生大腸菌) の特定と菌分離に成功した症例もあった。尿検体からは優位な病原体を検出できなかった。

#### 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) の届出数には、都道府県毎の差が大きく、全数届出疾患であることが周知されていない可能性が考えられた。しかし、本研究班が始まって以降、報告数は年々増加しており、2015 年は 2009 年 (A(H1N1)pdm09 によるパンデミック発生年) に次いで多い報告数となった。全数把握疾患であることが周知され始めていることが推察される。

また、原因不明脳炎の中から日本脳炎が見つかったことから、少なくとも関東以西の夏期の急性脳炎症例では、日本脳炎を鑑別に挙げて検査を実施する必要があることの啓発活動を行った結果、2015 年の関東地方での 0 歳児の日本脳炎症例の診断に繋がったことが考えられる。

研究班で得られた結果はわが国の急性脳炎・脳症症例における微生物学的なエビデンスを提供するばかりでなく、臨床検体の取り扱い、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。適切な検体の採取・保管・搬送が重要であり、検体採取から検査に至るまでの体制整備とともに、検体採取・保管・搬送のガイドラインの作成が必要と考えられたことから、3 年目の本研究班でガイドラインを作成した。このガイドラインが急性期検体を用いた適切な病原体検索に資することが期待される。

日本脳炎については、Ⅲ型株が製造株である現行日本脳炎ワクチンが、Ⅴ型に対して有効性が低いという報告もあることから、我が国でも今後より積極的なⅤ型に対するウイルスサーベイランスが必要である。

原因不明とされていた急性脳炎・脳症の患者検体について本研究班で検討した結果、5 人に一人は原因と考えられる病原体ゲノムが見つかった。これらの結果は日本の不明脳炎症例における微生物学的なエビデンスを提供することに繋がり、極めて重要な結果と考えられた。

2015 年秋の AFP 症例の多発については、本研究班に急性脳脊髄炎の検討依頼があったことから探知に繋がったと考えているが、全国の小児神経科医の協力のもと、異常事態であることがエビデンスをもって証明され、日本小児科学会の協力もあって、厚生労働省が行う感染症法に基づく積極的疫学調査に至

ったことは極めて有用な成果であった。このことは、病態の解明に大きな功を奏した。病原体検索については、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。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。

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。

予防接種後 28 日以内に発症した脳炎・脳症・ADEM はワクチンによっては予防接種法に基づく報告義務がある疾患であることを周知するとともに、一例でも多くの原因究明に繋げるための体制整備が必要であると考えられた。

急性脳炎（脳症）が全数報告疾患であること、予防接種後 28 日以内に発症した脳炎・脳症・ADEM はワクチンによっては予防接種法に基づく報告義務がある疾患であることを周知するとともに、一例でも多くの原因究明に繋げるための体制整備が必要である。そのためには、感染症サーベイランスと予防接種後副反応サーベイランスの制度の充実と活用が望まれる。一方で、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、臨床症状や検査結果等の所見を参考にすることが重要である。

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 陽転

を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。また NGS 検査で TTV 検出例が多かったことは、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症にと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、便検体の検索が重要である。急性脳炎・脳症の原因究明には便検体の冷凍保管も必要であることを医療機関や保健所等に情報提供していく必要がある。

以上のことから、原因不明急性脳炎・脳症の原因究明には、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となった。患者検体から調整した DNA/RNA の質が悪い検体も散見され、保管・送付法による問題であろうか、検査対象外とせざるを得なかった。網羅的病原体検索法は革新的な微生物検査法ではあるが、少しでも不明症例を効率良く解明するためには病院からの検体送付法・臨床情報の収集等の基本的な作業手順を正確に遵守することも必要である。また、どの微生物検査法を駆使しても不明として判定される症例について、検体採取部位の再検討や、そもそも感染症が起因するのかどうかを議論することも必要であろう。

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だと思われる。

## 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 例の報告があった。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。2013 年 9 月 25 日に本研究班の研究が国立感染症研究所のヒトを対象とする医学倫理委員会で承認されてから、病原体不明として届けられていた急性脳炎（脳症）症例については 1 例ずつ問い合わせを行い、研究班での検討について紹介した結果、2013 年から 3 年連続で急性脳炎（脳症を含む）報告数の増加が見られた。

また、2016年3月20日までに100症例について本研究班に病原体の検索依頼があった。インフルエンザ脳症に関して詳細な検討を加えた結果、0-4歳が最も多く、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確かに少ないものの、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。

研究班2年目の2014年には日本脳炎ウイルス（JEV）ゲノムが次世代シーケンサーを用いた解析（以下、NGS検査）で検出され、日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体の上昇も認められたことから、春先に感染したと考えられる日本脳炎症例を見出した。研究班の目的の一つである原因不明急性脳炎の中に紛れ込んでいる日本脳炎を見つけるという目的が達成されたことは意義が大きく、医療機関・行政機関・研究機関の連携強化の重要性が明らかとなった。原因不明の急性脳炎では必ず日本脳炎を鑑別診断に上げて、ウイルス学的な検査を実施する必要性を啓発した結果、2015年の関東地方での0歳児の日本脳炎の診断にも繋がったことが推察される。

multiplex PCR法を用いて網羅的にウイルス遺伝子の検出を行ったところ、16例から病態と何らかの関連があると考えられる病原体遺伝子が検出された。コクサッキーウイルスB3、A10、A6、好発年齢以外でのヒトヘルペスウイルス6B（HHV6B）、パレコウイルス3型、EBV、ノロウイルス、エンテロウイルスA71、パルボウイルスB19遺伝子が検出され、原因不明症例の病原体検索に繋げることができたことは意義が大きい。この方法で病原体が検出できなかった場合は、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実施しているが、前述したJEV以外に、髄液からコクサッキーウイルスB4、アストロウイルスMLB-1、ヒトヘルペスウイルス(-3, -4, -8)、ヒトパラインフルエンザウイルス4b、ボカウイルス、ノロウイルス、各種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。エンテロウイルス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。脳炎・脳症の前駆症状と思われる腸管症状の起因菌（ESBL産生大腸菌）の特定と菌分離に成功した症例もあった。

本研究班では病因解明のために5点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）を求めているが、原因究明のためには、適切な時期での検体の採取・保管・搬送が重要である。年々5点セットで搬送される割合が多くなった。一方でRNAの内因性コントロールが検出されない症例が23症例（23.0%）あり、そのうち5症例についてはDNAの内因性コントロールも検出されなかったことから、検体採取の方法、保管、搬送について、ガイドラインを作成した。

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ことも重要なポイントである。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非常に重要であることが明らかとなり、そういう観点からも、臨床・基礎・疫学で構成するこの研究班の特性を活かすことができると考えられた。

予防接種後副反応（有害事象を含む）として届けられた脳炎・脳症の中から、他の要因による紛れ込みを鑑別するための検討（病原体診断）が必要と考えられたが、予防接種後の脳炎・脳症については感染症発生動向調査の様に一例ずつの問い合わせが実施できていないことから、研究班への紹介は少なく、多くの検討には至らなかった。

急性脳炎・脳症と鑑別を要する疾患として重要な疾患の一つに細菌性髄膜炎が挙げられるが、本研究班では細菌性髄膜炎治療薬であるメロペネム（MEPM）の髄液移行性と結核性髄膜炎の転帰影響要因についても検討した。成人細菌性髄膜炎例でMEPMを静脈内投与（2g/8時間）した際の髄液MEPM濃度を検討し、髄液MEPM濃度が起炎菌に対する最小発育阻止濃度を上回ることを確認した。成人結核性髄膜炎患者を対象とした検討結果から、来院時の重症度と水頭症、投薬までの日数、髄液ADAを転帰影響要因として同定した。

また3年目の研究班では新たに2015年秋に多発した急性弛緩性麻痺（AFP）症例についても検討した。感染症法に基づく積極的疫学調査の枠組みで全国31都府県から100例のAFP症例が報告された。中国四国地方での詳細な検討により全国で約110例のAFP症例が発生していたことが推察されていたが、100例を把握できたということは、大部分の症例について把握できたのではないかと考えられる。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）、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。2015年12月24日に詳細な臨床・疫学情報を求めた二次調査が国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得たことから、積極的疫学調査で情報提供があった症例について、二次調査を行った。その結果、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が多く、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。AFP症例の病原体検索は、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、病原体情報と臨床情報の突合が必要である。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。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るが、EVD68については便、髄液、血液からの検出率は低く、呼吸器由来検体の凍結保管が鍵となったが、保管されていない症例も多く、今後の検討課題である。

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。

#### F. 健康危険情報

原因不明と考えられていた急性脳炎患者から日本脳炎ウイルス（JEV）ゲノムがNGS検査で検出され、日本脳炎ウイルス特異的IgM抗体の上昇も認められたことから、春先に感染したと考えられる日本脳炎症例を見出した。研究班の目的の一つである原因不明急性脳炎の中に紛れ込んでいる日本脳炎を見つけるという目的が達成されたことは意義が大きい。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

研究分担者の研究発表は（総合）分担研究報告書に記載

##### 1. 論文発表（著書を含む）

- 1) Yamamoto S, Takahashi S, Tanaka R, Okayama A, Araki A, Katano H, Tanaka-Taya K, Azuma H: Human herpesvirus-6 infection-associated acute encephalopathy without skin rash. *Brain Dev.* 37:829-832, 2015.
- 2) 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
- 3) 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

- 4) 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. 学会発表
- 1) 多屋馨子：緊急フォーラム「エンテロウイルスD68感染症：多発する急性弛緩性麻痺と重症呼吸障害の原因か？」原因不明の重症疾患多発時の急性期検体確保の重要性～急性弛緩性麻痺例の経験から～。第47回日本小児感染症学会総会・学術集会。2015年10月。福島県福島市。
  - 2) 多屋馨子：ワクチン関連トピックス2015～ワクチンの有効性と安全性～。第19回日本ワクチン学会学術集会。2015年11月。愛知県犬山市
  - 3) 多屋馨子：新型ウイルス感染症(エンテロウイルスD68, ノロウイルス, ジカウイルスなど。第101回東京小児科医会学術講演会。2016年3月。東京都新宿区
  - 4) 多屋馨子：ワクチン関連トピックス2015～ワクチンの有効性と安全性～。第19回日本ワクチン学会学術集会。2015年11月。愛知県犬山市
  - 5) 奥野英雄、佐藤弘、新井智、木下一美、砂川富正、大石和徳、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検討課題 第55回日本臨床ウイルス学会(札幌、2014年6月)
  - 6) 奥野英雄、佐藤弘、新井智、砂川富正、大石和徳、多屋馨子：国内で使用可能なワクチンが存在する疾患に合併した急性脳炎（脳症を含む）の発生動向 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会（東京、2014年10月）
  - 7) 山本志保、田中亮介、岡山亜貴恵、荒木章子、高橋悟、片野晴隆、多屋馨子、東寛：突発性発疹を呈さなかったヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) 脳症の1例 第25回日本小児神経学会北海道地方会（札幌、2015年3月）
  - 8) 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.
  - 9) 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）
  - 10) 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）
  - 11) 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）
- 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
  3. その他  
なし

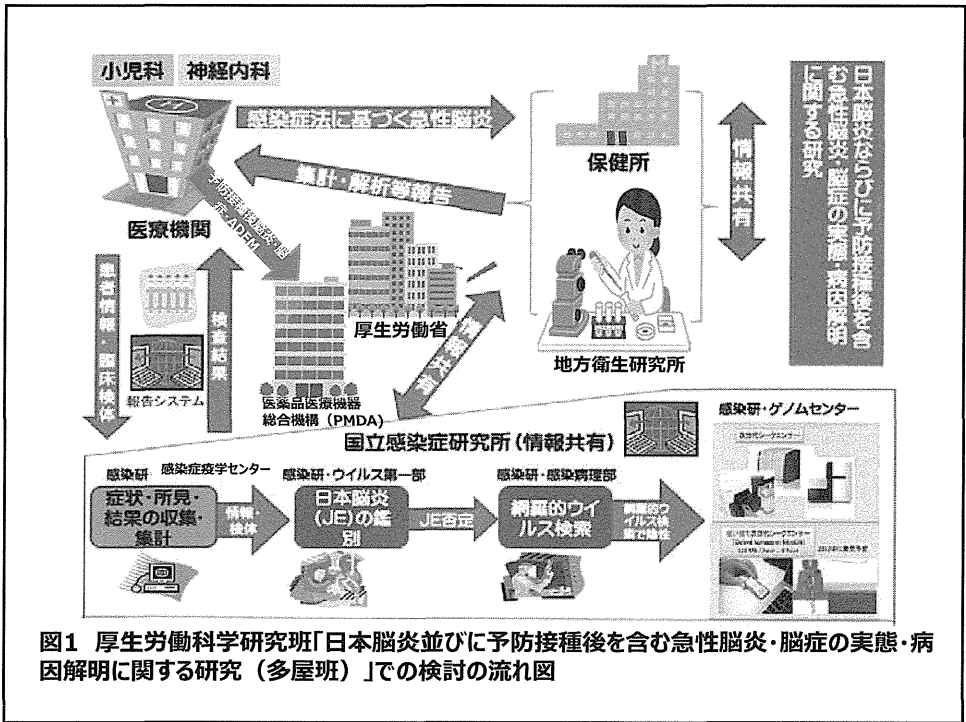


図1 厚生労働科学研究班「日本脳炎並びに予防接種後を含む急性脳炎・脳症の実態・病因解明に関する研究（多屋班）」での検討の流れ図



## Ⅱ. (総合)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。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検討を加えると、2009/2010～2014/2015シーズンでは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、小児例と比較し臨床症状に異なる部分もあり、また、その重症度についても決して低くないことが示唆された。

2016年3月20日までに本研究班で病原体検索をおこなったのは100症例で、5点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）のうち3種類以上搬送されたのは73症例（73.0%）、5種類すべて（5点セット）搬送されたのは52症例（52.0%）であった。RNAの内因性コントロールが検出されない症例が23症例（23.0%）あり、そのうち5症例についてはDNAの内因性コントロールも検出されなかった。

2013年4月～2014年9月までに、予防接種法に基づく予防接種後副反応報告（有害事象を含む）として脳炎・脳症14例、ADEM20例が報告（2015年1月現在）された。接種から発症までの期間は、脳炎・脳症（13例）は平均9.4日、ADEM（19例）は平均18.6日であった。先行感染症等の他の要因による紛れ込みを鑑別するための検討（病原体診断）が必要と考えられた。急性脳炎（脳症を含む）が感染症発生動向調査に基づく全数報告疾患であること、予防接種後28日以内に発症した脳炎・脳症・ADEMはワクチンによっては予防接種法に基づく報告義務がある疾患であることを周知するとともに、一例でも多くの原因究明に繋げるための体制整備が必要であると考えられた。

原因究明のためには、適切な検体の採取・保管・搬送が重要であり、検体採取から検査に至るまでの体制整備とともに、検体採取・保管・搬送のガイドラインの作成を行った。このガイドラインが急性期検体を用いた適切な病原体検索に資することが期待される。

#### 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、精度の高い病原体検索のためには、検体の質の担保が欠かせない。当研究班では、血液（血清や血漿、全血など）、

咽頭ぬぐい液、便、尿の5種類（5点セット）の検体採取を臨床医に依頼している。

一方、2013年4月の予防接種法改正にともない、予防接種後の一定期間に法令で定められた症状・疾患を診断した医師には予防接種法に基づく報告が義務付けられたが、これらの報告症例のうち、脳炎・脳症および急性散在性脳脊髄炎（ADEM）の症例について検討を行った。

#### B. 研究方法

感染症発生動向調査に基づいて2007～2015年の8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。また、報告された病原体の中で最も多いインフルエンザウイルスに関しては、インフルエンザ関連脳症（以下、インフルエンザ脳症）として別に検討を加えた。

また、2013年10月14日から2015年1月15日までに研究班で病原体検索をおこなった症例のうち、採取された検体数と検体の質について検討をおこなった。

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、次世代シーケンスにより網羅的検出（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仮定した。

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スによる判定に加え、血清学的診断も実施した（研究分担者：高崎、片野、黒田）。

予防接種後副反応については、2013年4月から2014年9月までに報告された症例のうち、脳炎・脳症およびADEMの症状を含む症例について検討を行った。

（倫理面への配慮）

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審査委員会」の承認を得た（平成25年9月25日承認）。

### 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（20.3%）、頭痛は579例（18.4%）、項部硬直は366例（11.6%）で認められた。

2015年の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例と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、アデノウイルスが各11例であり、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歳では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）。

**採取検体の評価**：2016年3月20日までに本研究班で病原体検索をおこなったのは100症例であった。そのうち、研究班で求めている5点セット（血液、髄液、咽頭ぬぐい液、便、尿）のうち、3種類以上搬送され

たのは73症例(73.0%)、5種類すべて(5点セット)搬送されたのは52症例(52.0%)であった(表3)。

不明病原体検索のためのマルチプレックスReal-time PCRの実施にあたって、RNAの内因性コントロールが検出されない症例が23症例(23.0%)あり、そのうち5症例についてはDNAの内因性コントロールも検出されなかった。

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。研究班として、急性脳炎・急性脳症診察時に使用可能な病原体採取・検体保管・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、安全な搬送法にまで言及した。

予防接種後副反応報告(有害事象報告)：2013年4月～2014年9月までの1年半の間に、予防接種法に基づく予防接種後副反応報告(有害事象を含む)として医療機関から脳炎・脳症14例、ADEM 20例が報告された(2015年1月現在)。

年齢別の報告状況をみると、1歳(8例：脳炎・脳症5例、ADEM 3例)と3歳(9例：脳炎・脳症3例、ADEM 6例)が多く(図4)、接種ワクチン(同時接種例も含む)は1歳ではMRワクチン(75%：6/8)、3歳では日本脳炎ワクチン(89%：8/9)の割合が多かった。また、20代以降の6例はすべてインフルエンザワクチン接種後の報告であった。

次に発生月別にみると、概ね月に1～2例の頻度であったが、2013年11月(6例：脳炎・脳症2例、ADEM 4例)と12月(5例：脳炎・脳症2例、ADEM 3例)に多く報告された。

接種ワクチンは11月(67%：4/6)、12月(60%：3/5)ともにインフルエンザワクチンの報告が多かった。

また、接種から発症までの期間は(複数の接種日が記載されていた2例を除く32例について検討)、脳炎・脳症(13例)は平均9.4日、ADEM(19例)は平均18.6日であった。

#### 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)pdm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。2015年は、2013年より3年連続で増加し、2009年の報告数とほぼ同じであった。

2015年1月15日までに本研究班で病原体検索をおこなった44症例のうち、5点セットが搬送されたのは18症例(40.9%)にとどまった。また、44症例のうち、抽出核酸量が非常に少ない症例や、内因性コントロールが検出できない症例も見られ、採取後の保管状況の影響が考えられた。特に、13症例(29.5%)についてはRNAの内因性コントロールが検出されず、RNAを用いた検索には適していなかった。特に急性脳炎(脳症を含む)の様に重篤な症例については、急性期の医療現場は混乱していることも多く、また必要な検査も多いことから、適切な検体を適切に保管しておくことが困難なことが予想される。今回作成した検体採取・保存・搬送のためのガイドラインが急性期検体を用いた適切な病原体検索の浸透に資することが期待される。

予防接種後副反応として報告された急性脳炎・ADEM症例では、1歳のMRワクチン、3歳の日本脳炎ワクチン、20代以降のインフルエンザワクチン接種後の報告が多い傾向がみられたが、これはそれぞれのワクチンの(標準的な)接種年齢との関連が考えられ、今後は分母情報を含めた検討が必要と考えられた。また、2013年11～12月にインフルエンザワクチン接種後の報告が多い傾向がみられたが、接種者数、季節的な接種状況との関連が考えられ、これについても分母情報を含めた検討が必要と考えられた。しかし、いずれの症例においても予防接種後に生じた脳炎・脳症、ADEMが先行感染症等の他の要因によるものか、予防接種によるものかの十分な検討(病原体あるいは遺伝子検出等)が必要と考えられた。

#### E. 結論

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)pdm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