

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）
分担研究報告書

急性脳炎・脳症患者のアルボウイルス実験室診断・ウイルスサーベイランス

研究分担者 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 前木孝洋（国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官）

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスの感染によって生じる中枢神経感染症である。重症例では錯乱や意識混濁などの中枢神経症状を呈し、確立された治療法が存在しないため、予後は不良である。また、日本脳炎は特異的な症状・一般検査所見に乏しく、報告数も少ないため、診断は困難である。そのため、日本脳炎症例の中には、正確な検査・診断がなされず、原因不明の急性脳炎や脳梗塞と診断されている例があることが知られている。そこで、本分担研究では、原因不明の急性弛緩性麻痺を呈した症例および急性脳炎・脳症症例の検体を用いて、日本脳炎の検査を実施した。平成28年度は5人の患者からの14検体の解析を行い、1検体(血清)が判定保留となった以外は全検体陰性であった(判定保留となった検体の症例については、追加の検体を依頼したが、送付されなかった。しかし同日に採取された髄液検体が陰性であったことから、日本脳炎は否定的と考えられる)。しかしながら、平成28年度には11例の日本脳炎の報告例があり(過去2年間は年間2例ずつ)、今後も日本脳炎の検索は重要である。

A．研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルスの感染によって生じる中枢神経感染症である。無症候性感染が多いことが知られている一方で、一旦発症すると、致命率が高く生存例でも神経学的予後は不良である。日本における日本脳炎の報告数は、近年、10例以下で推移しており、平成26年度、平成27年度は年間2例ずつであった。しかし、平成28年度には11例の日本脳炎患者が報告された。

日本脳炎は特異的な症状・一般検査所見に乏しく、また、報告数も少ないため、診断は困難である。そのため、日本脳炎の症例の中には、原因不明の急性脳炎や脳梗塞と診断されてしまっている例があることが知られている。そこで、本分担研究では、急性弛緩性麻痺を呈した症例および原因不明の急性脳炎・脳症症例と診断されたの中に、日本脳炎の症例が存在するか否かを解析する。

B．研究方法

患者から採取された血清または髄液を用いて、日本脳炎ウイルス IgM ELISAを行った。具体的には、Focus社のDengue Virus IgM Capture DxSelect (Product Code: EL1500M)の抗原を、日本脳炎ワクチン参照品を希釈したものに変更したものをを用いた。方法は以下の通りである。まず、患者から採取された血清または髄液を希釈液にて希釈し、抗ヒトIgM抗体がコーティングされたプレートにアプライする。室温で1時間反応させ洗浄した

後、抗原(日本脳炎ワクチンをPBSで希釈したもの)と室温で2時間反応させる。洗浄後、ペルオキシダーゼが結合された抗IgM抗体と室温で30分間反応させる。洗浄後、基質を加え室温で8分間反応させた後、反応停止液を加え、プレートリーダー(Bio Rad社、iMark Microplate Reader)で吸光度(OD450)を測定する。

結果は、陰性コントロール血清の吸光度に対する検体の吸光度の比をIndexとして算出する。それぞれの検体は2 wellずつアプライし、2 wellのIndexの平均値をその検体のIndexとする。Indexは2.0未満を陰性、2.0を判定保留、2.0を越えれば陽性とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会で審査され、承認されている。

C．研究結果

結果を表に示す。

平成28年度は、5人の患者からの14検体を用いて解析を行い、1検体(血清)が判定保留、残りの13検体は陰性であった。判定保留となった1検体(血清)については、追加の血清の送付を依頼したが、送付されなかった。

D．考察

平成28年度に解析を行った5人の患者のうち4人は全ての検体が陰性であったため、日本脳炎は否定的と考えられる。そして、血清が判定保留となった1人については、別の時

期に採取された血清を用いて解析を行うため、担当医に、血清の送付を依頼したが、送付はされなかった。しかし、判定保留となった血清と同日に採取された髄液が陰性であったことから、日本脳炎は否定的と考えられる。従って、平成28年度に解析を行った5人の患者は、全て日本脳炎は否定的と考えられる。

一方、日本脳炎の患者報告数は近年10例以下で推移しており、過去2年間(平成26年度、平成27年度)はそれぞれ2例ずつであったが、平成28年度には11例が報告された。11例のうち、急性期に日本脳炎を疑い診断に至ったのは2例だけであり、他の9例は、診断に至ったのは、発症してから1ヶ月前後経過してからであった。連絡を取ることができた担当医に、診断に至るまでの経緯について聴取したところ、日本脳炎は、やはり、特異的な症状や検査結果を示さないため、診断は困難であるとのことであった。従って、平成28年度に報告された11例以外にも、まだ正確に診断されなかった日本脳炎の症例が存在する可能性は否定できないものと考えられる。

平成28年度に診断された11例の予後に関しては、2例は死亡例であり、生存した症例でも後遺症を残している例が多い。従って、日本脳炎は、報告数は減少してきているものの、依然、予後不良の疾患である。また、死亡例の2例はいずれも急性期に診断されていない例であることから、早期の診断が予後の改善につながる可能性はあるものと考えられる。従って、日本脳炎を早期に診断することは臨床的に重要であると考えられる。

日本脳炎は、毎年、流行予測事業として地域毎に、ブタの日本脳炎ウイルスに対する抗体保有率調査を行っている。これは、ブタは日本脳炎ウイルスの増幅動物であり、生後半頃に屠場に出荷されるため、ブタの抗体保有率がその地域の日本脳炎ウイルスの蔓延状況を反映していると考えられるためである。そして、平成28年度に報告された11例のうち、7例は、抗体保有率調査が行われていない地域であった。従って、正確に診断されていない日本脳炎を診断することは、流行予測事業を実施すべき地域の決定にも関わり、公衆衛生的な意味においても重要であると考えられる。

日本脳炎の診断に関しては、日本脳炎ウイルスはウイルス遺伝子の検出が困難であるため、抗体検査による血清診断が主となる。代表的な抗体検査の方法として、本研究で使用したIgM ELISA法の他にHI (hemagglutination inhibition; 赤血球凝集抑制)法、中和試験がある。このうち急性期の診断に適用可能なのはIgM ELISA法とHI法である。

IgM ELISA法とHI法のそれぞれの特徴・問題点は次の通りである。本研究で実施しているIgM ELISA法の特徴として、検査日数(試験を始めてから結果が出るまでの日数)が1~2日間と短いことがあげられる。つまり、急性期に診断を急ぐ症例では極めて有用な検査法である。しかし、問題点として、検査の依頼が煩雑であるという点が挙げられる。即ち、

依頼医は、まず、当部門へ電話にて連絡し、検体発送についての許可を得る必要がある。そして、依頼医は、国立感染症研究所に病院から検体を搬送しなければならない。この点は、検体を搬送した経験のない医師にとっては、大きな問題点となりうる。

一方、HI法は、検査会社が実施しているため、検査の依頼が容易で、検体を搬送する必要もない。即ち、依頼医にとって極めて簡便な検査方法である。しかし、問題点として、検査日数が1~2週間程度かかること、さらに、感度がIgM ELISA法に比べると低いことが挙げられる。(平成28年度に急性期に診断された例においても、同時期に提出された検体で、IgM ELISA法では強陽性で、HI法では陰性/陽性判定基準を少し越える程度の陽性という結果の検体があった)。

即ち、IgM ELISA法はHI法に比べて、依頼・検体の搬送が煩雑であるが、検査日数も少なく感度が高い検査である。

しかし、IgM ELISA法には、一般の臨床医にあまり知られていないという問題点がある。平成28年度に報告された日本脳炎の症例で、急性期を過ぎてから日本脳炎の診断に至った症例の担当医に連絡を取ったところ、日本脳炎の検査法にIgM ELISA法があることを知らなかったとのことであった。即ち、日本脳炎の検査法には検査日数のかかるHI法しかないと考えていたためにHI法を提出し、その結果、急性期には診断できなかったとのことであった。その担当医は、急性期にHI法を提出していたため、急性期に日本脳炎を鑑別疾患として挙げていたということである。つまり、その担当医が、IgM ELISA法の存在を知っていたと仮定すれば、より早期に診断に至った可能性が高い。従って、臨床医(神経内科医)に、日本脳炎のIgM ELISA法を周知することも重要であると考えられる。

E . 結論

平成28年度に本分担研究にて日本脳炎の検索を行った患者は、全て日本脳炎は否定的であった。しかし、平成28年度には11例の日本脳炎患者が報告され、その他にも正確に診断されていない日本脳炎の症例が存在する可能性は否定できない。そのため、今後も、原因不明の脳炎・脳症症例および急性弛緩性麻痺を呈する症例について、日本脳炎の検索を行うことは重要であると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G . 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

表 平成28年度 日本脳炎IgM ELISA結果

検体	種類	受領日	結果通知日	年齢	性別	発症後日数	Index
E1-1	髄液	10月14日	10月17日	2	F	5	0.42
-1	血清	"	"	"	"	6	1.16
E2-1	髄液	10月14日	10月17日	5	F	2	0.71
-1	血清	"	"	"	"	2	1.96
E3-1	髄液	10月21日	10月24日	31	M	2	0.55
-2	血清	"	"	"	"	2	0.58
-3	髄液 2	"	"	"	"	8	0.57
-4	髄液 3	"	"	"	"	17	0.92
-5	血清 2	"	"	"	"	25	0.57
E4-1	髄液	11月18日	11月21日	4	F	0	0.45
-2	血清	"	"	"	"	4	0.98
-5	全血	"	"	"	"	4	0.94
E5-1	髄液	12月7日	12月9日	4	F	6	0.89
-2	血清	"	"	"	"	6	1.07

(#) Indexは2.0を越えれば陽性、2.0未満を陰性、2.0を判定保留とした。