

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

研究要旨

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。日本では近年においても、毎年、日本脳炎症例が報告されている。日本脳炎は特異的な症状・一般検査所見に乏しく、また報告数が少ないため、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可能性が指摘されている。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・脳症症例から採取された検体を用いて、日本脳炎の検査を実施した。平成 29 年度は 21 人の患者からの 53 検体を用いて日本脳炎ウイルスに対する IgM 捕捉 ELISA を、また、IgM 捕捉 ELISA で陽性となった検体を用いて日本脳炎ウイルスに対する中和試験を実施した。日本脳炎ウイルス IgM 捕捉 ELISA では、1 検体が陽性を示し、残りの 52 検体は陰性であった。陽性を呈した検体が採取された患者は、中和試験の結果および他の検体の IgM 捕捉 ELISA の結果から、日本脳炎である可能性は否定的と考えられた。従って、平成 29 年度に検索を行った 21 人の患者には、日本脳炎症例は含まれていないと考えられた。しかしながら、平成 29 年度に急性脳炎として届け出が提出されたものの、本研究班で日本脳炎の検索を行っていない例も多い。従って、診断されていない日本脳炎症例が存在する可能性は否定できないため、本研究班で日本脳炎の検索を続行することは重要である。

A．研究目的

日本脳炎は、日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, 以下 JEV) 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、発症例では致命率が高く、生存例の神経学的予後も不良である。日本では 1960 年代までは年間 1000 例を超える日本脳炎症例が報告されていたが、ワクチン接種の開始および他の環境要因の変化に伴って、患者数は減少した。近年、日本では年間 2～11 例の日本脳炎症例が毎年報告されている。日本脳炎患者の大半は 60 歳以上の高齢者である。

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、日本脳炎症例の中には、原因不明の急性脳炎や脳梗塞と誤って診

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、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中に、日本脳炎の症例が含まれているか否かを解析する。

B．研究方法

1. 患者検体

平成 29 年度は、21 人の患者から採取された 53 検体 (髄液 20 検体、血清 33 検体) を非働化処理 (56℃、30 分間による熱処理) した後に、JEV IgM 捕捉 ELISA を実施した。JEV IgM 捕捉 ELISA で陽性を呈した検体は、当該患者の、他の時期に採取された血清とともに、JEV に対する中和試験に供した。

2. JEV IgM 捕捉 ELISA

Focus社のDengue Virus IgM Capture DxS elect (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變更してJEV IgM捕捉ELISAを行った。方法は次の通りである。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した。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時間反応させた。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分間反応させた。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)を測定した。

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として算出した。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とした。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。

3. JEVに対する中和試験

試験前日にVero細胞を12 well plateの各wellに、 3×10^5 cells/mL、1 mL/wellで播種した。試験当日に、希釈液(MEMに2 %FBSを添加したもの)で10倍に希釈し、その後2倍階段希釈した。JEV北京株を、希釈液を用いて2.00 PFU/ μ Lに希釈し、これを攻撃ウイルスとした。希釈した血清75 μ Lと攻撃ウイルス 75 μ Lを混合し、37 °Cで90分間中和反応させた。中和反応終了後、血清希釈液と攻撃ウイルス液の混合液を氷浴中に移した。Vero細胞の培養上清を除いた後、血清希釈液と攻撃ウイルス液の混合液を1 wellあたり60 μ Lずつ接種した。接種後、37 °C、5 %CO₂ インキュベーターで90分間吸着させた。吸着の間、15分毎にティルティングを行った。吸着反応終了後、1 wellあたり1.5 mLの重層培地 (Eagle's MEMで調製した1 %メチルセルロース溶液に2% FBSおよびL-glutamineを最終濃度2 mMで加えたもの)を加え、37 °C、5 %CO₂下で5日間培養した。培養終了後、各wellあたり1.0 mLの10 %中性緩衝ホルマリン液(ホルマリン原液を、PBSを用いて10倍に希釈した液)を

加え、手で軽く振盪した後に1時間静置した。水道水にて洗浄後、メチレンブルー染色液を各wellあたり1.0 mL加え1時間室温で静置した。水道水にて洗浄後、プラーク数を算定した。

攻撃ウイルス液に希釈液のみを加えた細胞のプラーク数に比べ、50 %以上プラーク数が減少していた血清の希釈倍率の最大値を中和抗体価とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所のヒトを対象とする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

1. JEV IgM捕捉ELISA

平成29年度に解析を行った21人の患者からの53検体のうち、52検体はJEV IgM捕捉ELISAで陰性を示し、1検体 (E23-2, 急性期血清)が陽性を呈した。

2. JEVに対する中和試験

陽性となった検体(E23-2, 急性期血清)の中和抗体価は160倍、当該患者の回復期血清(E23-3)の中和抗体価は80倍であった。

D. 考察

平成29年度に解析を行った21人の患者のうち20人は、全ての検体がJEV IgM捕捉ELISAで陰性を示した。従って、この20人の患者は、日本脳炎ではないと考えられる。さらに、残りの1人(E23)は急性期血清(E23-2)がJEV IgM捕捉ELISAで陽性を示したものの、以下の2つの理由から日本脳炎ではないと考えられる。当該患者の他の検体(急性期髄液,[E23-1]および回復期血清[E23-3])がJEV IgM捕捉ELISAで陰性を示したこと、急性期血清(E23-2)および回復期血清(E23-3)を用いたJEVに対する中和試験で、急性期から回復期にかけての有意な抗体価の上昇を認めなかったこと。以上より、平成29年度に検索を行った21人の患者の中に、日本脳炎症例は含まれていないと考えられた。

日本脳炎は特異的な臨床症状を示さず、また、脳炎・脳症の診断のための一般的な検査

(血液検査、髄液検査、頭部MRI検査など)においても、日本脳炎に特異的な所見は報告されていない。近年、日本脳炎の報告数が少なくなったため、日本脳炎を経験したことのあつる臨床医が減少していることもあり、急性脳炎・脳症症例において日本脳炎を疑い、検査を実施し診断することは困難である。一方、急性脳炎の届け出数は近年増加傾向にあり、平成29年には688例の急性脳炎が報告された。平成29年度に届け出られた急性脳炎症例のうち、本研究班で日本脳炎の検索を行ったのは一部であるため、検索が行われなかった急性脳炎症例の中に日本脳炎が含まれる可能性は否定できない。

正確に診断されていない日本脳炎症例を診断し、日本脳炎報告数を正確に把握することは、ワクチン接種による日本脳炎の予防戦略において重要である。

日本における近年の日本脳炎患者の大半は60歳以上の高齢者である。日本脳炎は、日本では年間の報告数は多くないものの、致死率が高く、生存例でも神経学的予後は不良である。従つて、日本脳炎は疾病負担の大きい疾患であるため、高齢者を対象としたワクチン接種による予防を検討すべき疾患である。平成30年3月29日現在、高齢者を対象として肺炎球菌ワクチンの定期接種が開始されており、水痘帯状疱疹ワクチンも定期接種へ向けての検討が行われている。高齢者への日本脳炎ワクチン接種開始を検討するにあたり、正確な日本脳炎患者数を把握することが必要である。

一方、日本脳炎の正確な報告数を把握することは、小児への日本脳炎ワクチン接種計画においても重要である。平成27年に千葉県で10ヶ月の乳児の日本脳炎症例が報告された。この報告を受けて、日本小児科学会は、日本脳炎ワクチン(標準的接種開始年齢は3歳)を、日本脳炎罹患リスクの高い者に対しては生後6ヶ月から接種を開始することを推奨する旨の声明を発表した。その声明において、日本脳炎罹患リスクの1つとして「最近日本脳炎患者が発生した地域」が挙げられている。従つて、日本脳炎の発生状況を正確に把握することは、各地域で小児におけるワクチン接種時期を検討する上でも重要である。

日本脳炎を診断するための代表的な検査として、JEV遺伝子検出検査と抗体検査(抗JEV抗体の上昇を確認する検査)があげられる。日本脳炎患者から採取された血清や髄液からはJEV遺伝子はほとんど検出されないため、日本脳炎は主に抗体検査によって診断される。

抗体検査の方法として、今回実施したJEV IgM捕捉ELISA法およびJEVに対する中和試験法の他に、HI (Hemagglutination Inhibition:赤血球凝集抑制)法、CF (complement fixation:補体結合法)法が挙げられる。各検査法の長所・短所は以下の通りである。

HI法、CF法の長所は、検体の提出が簡便であることである。即ち、検査会社がHI法、CF法を実施しているため、病院から外注検査として提出することができる。一方、HI法、CF法の短所として、急性期血清と回復期血清の両方が必要であること、検査を実施してから判定までに1週間近く日数を要する点である。

JEV IgM捕捉ELISA法の長所として、急性期の血清・髄液のみで判定可能であることおよび検査を実施してから判定までに要する日数が短い(1, 2日間)ことが挙げられる。JEV IgM捕捉ELISA法の短所として、検査会社が実施していないため、検体の提出が煩雑であること、中和試験に比べると特異性が低いことが挙げられる。

中和試験の長所は、他の試験法よりも特異性が高い点である。短所として、検体の提出が煩雑であること、検査を実施してから判定までに1週間近く日数がかかること、さらに急性期血清・回復期血清の両方が必要であることが挙げられる。

平成29年度には、外注のHI法、CF法の結果に基づいて3例の日本脳炎症例が報告された。そのうち2例の検体を用いて、当部門において、診断を確定するためのJEV IgM捕捉

ELISAおよび中和試験を実施した。2例とも、JEV検体がJEV IgM捕捉ELISAで陽性を示し、かつ中和抗体価の上昇も確認できたことから、日本脳炎の診断に合致する結果であった。

その2例について、患者の発症日から届け出が提出される日まで1ヶ月近くの間隔があ

ったため、検体を提出した担当医に連絡を取り、詳細を問い合わせた。結果、担当医は急性期の血清をHI法、CF法に提出し陽性の結果を得ていたが、急性期から回復期にかけての有意な抗体価の上昇を確認するために、回復期血清を提出し、その結果を確認してから日本脳炎の届け出を提出したために、発症から届け出までに時間がかかったとのことであった。この担当医が、急性期血清をHI法、CF法に提出し、陽性の結果が返ってきた時点で、急性期血清・髄液をJEV IgM捕捉ELISA法に提出していれば、より早期に日本脳炎を診断できたと考えられる。そのため、日本脳炎を診断する機会のある神経内科医・小児科医に対して、JEV IgM捕捉ELISA法についての情報発信を行うことが、日本脳炎をより早期に診断するために肝要である。

E . 結論

本分担研究で平成29年度に検索を行った21人の患者の中には、日本脳炎症例は含まれていないと考えられる。しかし、日本においては近年でも毎年日本脳炎症例が報告されており、また、急性脳炎の届け出が提出されたものの、本研究班で日本脳炎の検索を行っていない症例も多い。そのため、診断されていない日本脳炎症例が存在する可能性は

否定できない。日本脳炎の報告数を正確に把握することはワクチン接種による予防を検討する上で重要であり、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対して、日本脳炎の検索を行うことは重要である。

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29年度 日本脳炎ウイルスIgM捕捉ELISAおよび中和試験結果

検体	検体の種類	年齢	性別	発症後 日数	ELISA index(*)	解釈	中和抗体価(**)
E10-1	髄液	1	男	2	0.51	陰性	not done
-2	血清			2	0.51	陰性	not done
-7	血清			14	0.98	陰性	not done
E11-1	髄液	1	男	0	0.49	陰性	not done
-2	血清			0	0.69	陰性	not done
-6	血清			10	0.75	陰性	not done
E12-1	髄液	10	男	1	0.76	陰性	not done
-2	血清			1	0.84	陰性	not done
E13-1	髄液	1ヶ月	男	0	0.64	陰性	not done
-2	血清			0	0.93	陰性	not done
-6	血清			11	1.29	陰性	not done
E14-1	髄液	1	男	5	0.48	陰性	not done
-2	血清			2	0.74	陰性	not done
-6	血清			7	1.04	陰性	not done
E15-1	髄液	6	男	0	0.68	陰性	not done
-2	血清			5	0.99	陰性	not done
-6	髄液			7	0.88	陰性	not done
-7	血清			18	0.97	陰性	not done
E16-1	髄液	日齢1	男	8	0.73	陰性	not done
-2	血清			8	0.73	陰性	not done
E17-1	髄液	3	男	0	0.54	陰性	not done
-2	血清			0	0.94	陰性	not done
E18-1	血清	1ヶ月	男	3	1.11	陰性	not done
E19-1	髄液	1ヶ月	男	0	0.73	陰性	not done
-2	血清			0	0.74	陰性	not done
E20-1	髄液	1ヶ月	男	3	0.73	陰性	not done
-2	血清			3	1.10	陰性	not done
E21-1	髄液	25	男	0	0.52	陰性	not done
-2	血清			1	0.82	陰性	not done
-6	血清			14	1.02	陰性	not done
E22-1	髄液	30	男	7	0.50	陰性	not done
-2	血清			13	0.87	陰性	not done
-3	血清			33	0.79	陰性	not done
E23-1	髄液	15	女	1	0.48	陰性	not done
-2	血清			3	2.30	陽性	160
-3	血清			49	1.67	陰性	80
E24-1	髄液	7	男	5	0.43	陰性	not done
-2	血清			5	0.66	陰性	not done
E25-1	髄液	50	男	16	0.46	陰性	not done
-2	血清			16	0.88	陰性	not done
E26-1	髄液	1ヶ月	男	0	0.44	陰性	not done
-2	血清			0	0.50	陽性	not done
-6	血清			7	0.56	陰性	not done

(次頁へ続く)

(前頁より)

検体	検体の種類	年齢	性別	発症後 日数	ELISA index ^(*)	解釈	中和抗体価 ^(**)
E27-1	髄液	1ヶ月	女	0	0.44	陰性	not done
-2	血清			0	0.48	陰性	not done
-6	血清			7	0.56	陰性	not done
E28-1	髄液	2ヶ月	男	5	1.25	陰性	not done
-2	血清			5	0.97	陰性	not done
E29-1	髄液	4	女	1	0.54	陰性	not done
-2	血清			1	1.15	陰性	not done
-6	血清			7	1.15	陰性	not done
E30-1	髄液	3	男	0	0.51	陰性	not done
-2	血清			0	0.98	陰性	not done

(*) ELISA Index;

日本脳炎ウイルスIgM捕捉ELISAのindexを示す。Indexは2.00を超えれば陽性と判定する。

(**) 中和抗体価;

日本脳炎ウイルス北京株に対する中和抗体価を示す。中和抗体価は、血清を加えていないコントロールのwellにおけるプラーク数の50 %以上の減少を認めた血清の最大の希釈倍率の逆数で表す。