

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

エンテロウイルス等感染症を含む急性弛緩性麻痺・急性脳炎・脳症の原因究明に資する臨床疫学研究

「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 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

日本脳炎（Japanese encephalitis, 以下 JE）およびダニ媒介脳炎（Tick-borne encephalitis, 以下 TBE）は、それぞれ、日本脳炎ウイルスおよびダニ媒介脳炎ウイルス感染による中枢神経感染症である。JE、TBE は、近年の日本における報告数は少ないものの、生命予後および神経学的予後不良の疾患である。JE および TBE に特異的な症状や一般検査における特異的な異常所見が知られていないため、JE、TBE とともに、その診断は困難である。そのため、JE および TBE を診断するための検査が正確に実施されずに、JE および TBE が誤って「原因不明急性脳炎・脳症」と診断されている可能性が考えられる。そこで、本研究では、平成 28 年度・平成 29 年度に引き続いて、原因不明急性脳炎・脳症に対して、JE を診断するための検査を実施した。さらに、平成 28 年度から 30 年度に本研究班で解析を行った検体を用いて、TBE を診断するための検査も行った。結果、いずれの症例も、JE および TBE は否定的であると考えられた。しかし、今回検索を行ったのは、急性脳炎・脳症として届出されている症例の一部であるため、依然、正確に診断されていない JE、TBE 症例が存在する可能性が考えられる。JE、TBE とともに疾病負荷の大きい疾患であるが、有効なワクチンが開発されている。従って、JE、TBE の正確な発生数を把握し、適切な予防措置を講じるために、本研究班を継続することが重要である。

A. 研究目的

日本脳炎（Japanese encephalitis, 以下 JE）は、JEV（Japanese encephalitis virus, 以下 JEV）の感染による中枢神経感染症である。JEV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、主に、蚊（コガタアカイエカなど）による吸血により、ヒトに感染する。JEV は不顕性感染が多いことが知られている一方で、脳炎を発症した例では生命予後および生存例での神経学的予後は不良である。日本では、JEV に対するワクチン接種が行われており、近年の日本における JE の報告数は年間平均 4.5 例である（2009 年から 2018 年の 10 年間に 45 例の JE 患者が報告された）。

ダニ媒介脳炎（Tick-borne encephalitis, 以下 TBE）は、TBEV（Tick-borne encephalitis virus, 以下 TBEV）が感染することで生じる中枢神経感染症である。TBEV も JEV と同様に、フラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、ヒトは、主に、ダニ（マダニなど）に吸血されることで感染する。JEV 同様に、不顕性感染が多い一方で、脳炎発症例の生命予後および神経学的予後は不良である。

日本ではこれまで 5 例の TBE 患者が報告されている

。TBE に対するワクチンは海外では使用されているが、日本では認可されていない。

JE および TBE の診断に関して、JE や TBE に特異的な症状や一般検査（血液検査、髄液検査、頭部 MRI 検査など）における特異的な異常所見は報告されていない。さらに、JE、TBE とともに近年の日本における報告数が少ないために、脳炎の鑑別疾患として挙がりにくい。そのため、JE および TBE を診断するための検査が正確に実施されずに、原因不明急性脳炎・脳症と診断されてしまっている可能性が考えられる。

そこで、本研究は、急性脳炎・脳症と診断された症例の中に、正確に診断されていない JE および TBE の症例が含まれていないかどうかを検索することを目的とする。

B. 研究方法

1. JEV IgM 捕捉 ELISA

ELISA には、Dengue Virus IgM Capture DxSelect（Focus 社、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および髄液を56で30分間、非働化処理した後に、希釈液を用いて希釈し、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時間反応させ洗淨した後、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。洗淨後、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。洗淨後、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。

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として算出した。それぞれの検体を2wellずつアプライし、2wellのIndexの平均値をその検体のIndexとした。Indexが2.00を超えれば陽性、2.00を判定保留、2.00未満を陰性と判定した。

2. JEVに対する中和試験

試験前日にVero細胞を12well plateの各wellに、 3×10^5 cells/ml, 1ml/wellで播種した。

試験当日に、非働化処理した患者血清を希釈液(MEMに2%FBSを添加したもので)10倍に希釈し、その後2倍段階希釈した。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1wellあたり60 μ lずつ接種した。接種後、37、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、1wellあたり1.5ml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2mMで加えたもの)を加え、37、5%CO₂下で5日間培養した。培養終了後、各wellに1.0ml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。水道水にて洗淨後、メチレンブルー染色液を各wellに1.0mlずつ加え1時間室温で静置した。水道水にて洗淨後、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の逆数を中和抗体価とした。

3. TBEV IgM 捕捉 ELISA

EIA TBE virus IgMキット(TestLine社、Product Code: TBM096)を用いて、添付の指示書通りに行った。

患者検体は、検体量が十分である場合は2wellずつアプライし、2wellのIndexの平均を当該検体のIndexとした。検体量が十分でなかった場合には、1wellにアプライし、そのwellのIndexを当該検体のIndex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

1. JEV IgM 捕捉 ELISA

平成30年度に本研究班で解析を行った21人の患者から採取された48検体のうち、47検体はJEV IgM捕捉ELISAで陰性を示し、1検体(N17-2、急性期血清)が陽性を呈した(表1)。

2. JEVに対する中和試験

JEV IgM捕捉ELISAで陽性を示した検体(急性期血清、N17-2)およびその回復期血清(N17-6)を用いてJEVに対する中和試験を実施した。結果、急性期血清(N17-2)、回復期血清(N17-6)のJEVに対する中和抗体価は、それぞれ、640倍、320倍であった(表1)。

3. TBEV IgM 捕捉 ELISA

平成30年度に本研究班で解析を行った21人の患者から採取された48検体を用いてTBEV IgM捕捉ELISAを実施した結果、全ての検体が陰性の結果を示した(表1)。

また、平成28年度、平成29年度に本研究班で、JEV IgM捕捉ELISAを実施した血清(平成28年度は4人の患者から採取された5血清、平成29年度は21人の患者から採取された34血清)を用いてTBEV IgM捕捉ELISAを実施した結果、いずれの検体も結果は陰性であった(表2、表3)。

D. 考察

JEおよびTBEの診断において、脳炎を発症した際に患者から採取された血清や髄液からJEVあるいはTBEV遺伝子が検出されることは極めて稀である。従って、「脳炎患者から採取された血清や髄液からJEVおよびTBEV遺

伝子が検出されなかった」という結果から、「当該患者の診断がJEあるいはTBEVである可能性は否定的である」という結論を導くことはできない。JEおよびTBEVを否定するためには、抗JEV抗体および抗TBEV抗体検出検査を実施する必要がある。本研究班においては、JE、TBEを正確に診断するために、JEVおよびTBEVに対する抗体検査を実施した。

平成28年度、平成29年度に引き続いて、JE V IgM捕捉ELISAを実施したところ、1検体(N17-2, 急性期血清)のみ陽性を呈した。当該患者の回復期血清(N17-6)とペアでJEVに対する中和試験を実施したところ、急性期から回復期にかけての有意な抗体価の上昇は確認できなかった(急性期血清であるN17-2、回復期血清であるN17-6の中和抗体価の中和抗体価はそれぞれ640倍と320倍であった)。N17は、2回のJEワクチン接種歴があり、JEVに対する中和抗体価はワクチン接種によって獲得したものと考えられる。

TBEは1993年に初めて、日本での発生例が北海道から報告された¹。その後、20年間以上、TBE患者の発生は報告されていなかったが、2016年に2例目のTBE患者が北海道から報告され、その後、2017年に2例、2018年に1例報告された。これまでの日本におけるTBE症例は全て北海道で発生しているが、本州でもTBEVが活動していることを示唆する報告が発表されている^{2,3}。具体的には、1948年に、東京で、脳炎患者から、TBEVに近縁のウイルスが分離されたこと²や、島根県で採取されたネズミ(TBEVの自然宿主)がTBEVに対する抗体を保有していたこと³が報告されている。従って、本州でもTBE患者が発生している可能性が考えられるため、本研究班において、TBEの診断のための検査を行ったところ、結果は全て陰性であった。

今年度、検索を行った急性脳炎脳症患者の中には、JEおよびTBE症例は含まれていないと考えられる。しかし、回復期血清が入手できず、急性期の髄液あるいは血清のみでしか検査を実施できなかった症例では、より厳密にJEおよびTBEを否定するためには、回復期血清を用いた検査を実施することが必要である。また、今回JEおよびTBEの検索を行ったのは、急性脳炎脳症として届出されている症例のごく一部である。さらに、近年の日本におけるJEおよびこれまで日本で報告されたTBE患者は成人および高齢者(大半が高齢者)である。一方、本研究班で検査を実施した対象は小児が中心である。従って、依然、正確に診断されていないJEおよびTBE症例が存在する可能性は否定できない。

JEおよびTBEともに、ワクチン接種により予防可能な疾患である。そのため、JEおよびTBEの発生数を正確に把握することで、患者が発生した地域でのワクチン接種を促進するなどの予防措置を取ることが可能である。JE、TBEともに日本における報告数は多くないものの、その疾病負荷は極めて大きい。そのため、JEおよびTBEを正確に診断し適切な予防措置を講じることが重要である。

<引用文献>

1. Takashima I, Morita K, Chiba M, et al: A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus, *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1943-7, 1997
2. Ando K, Kuratuska K, Arima S, Hinonaka N, Honda Y, Ishii K. Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* 24: 429-41, 1952
3. Yoshii K1, Mottate K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M, Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I. Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 73: 409-12, 2011

E. 結論

平成28年度、平成29年度に引き続いて、原因不明急性脳炎・脳症症例に対してJEの診断のための検査を実施したところ、いずれの症例もJEは否定的であった。さらに平成28年度から30年度に本研究班で解析した検体を用いてTBEに対するIgM捕捉ELISAを実施した結果、全て陰性であった。しかし、依然、正確に診断されていないJE、TBE症例が存在する可能性が考えられる。JEおよびTBEともに疾病負荷が大きく、ワクチン接種で予防可能な疾患であることを考慮すると、本研究班においてJEおよびTBEの検索を継続することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

(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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1
平成30年度 日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, JEV) IgM 捕捉 ELISA および中和試験、ダニ媒介脳炎ウイルス (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) IgM 捕捉 ELISA の結果

検体番号	検体の種類	年齢 (歳) ¹	性別	発症後日数 (日)	JEV		TBEV		判定
					IgM 捕捉 ELISA Index ²	判定	中和試験 中和抗体価 ³	IgM 捕捉 ELISA Index ⁴	
N1-1	髄液	6	女	77	0.48	陰性	*	0.10 [#]	陰性
-2	血清			79	0.81	陰性	*	0.20	陰性
-6	血清			100	1.23	陰性	*	0.24	陰性
N10-1	髄液	7	女	2	0.47	陰性	*	0.12	陰性
-2	血清			4	0.73	陰性	*	0.34	陰性
-3	血清			22	0.71	陰性	*	0.42	陰性
N11-1	髄液	2	女	2	0.47	陰性	*	0.07	陰性
-2	血清			3	0.86	陰性	*	0.17	陰性
N12-1	髄液	1	男	6	0.51	陰性	*	0.10	陰性
N13-1	髄液	10	男	24	0.55	陰性	*	0.08 [#]	陰性
-2	血清			24	0.78	陰性	*	0.15	陰性
-6	血清			35	0.97	陰性	*	0.24	陰性
N14-1	血清	4	女	1	0.60	陰性	*	0.27	陰性
N15-1	髄液	5	男	1	0.45	陰性	*	0.06 [#]	陰性
-2	血清			1	0.83	陰性	*	0.22	陰性
-7	血清			35	1.16	陰性	*	0.22	陰性
N16-1	血清	1	男	3	1.18	陰性	*	0.13	陰性
-6	血清			54	0.91	陰性	*	0.18	陰性
N17-1	髄液	3	男	0	0.96	陰性	*	0.09	陰性
-2	血清			0	2.03	陽性	640	0.11	陰性
-6	血清			18	1.06	陰性	320	0.17	陰性
N18-1	髄液	7	男	1	1.03	陰性	*	0.21 [#]	陰性

-2	血清			1	1.34	陰性	*	0.13	陰性
-6	血清			8	1.09	陰性	*	0.20	陰性
N19-1	髄液	日齡 13	男	1	0.52	陰性	*	0.07 [#]	陰性
-2	血清			3	0.61	陰性	*	0.19	陰性
N20-1	髄液	1ヶ月	男	0	0.61	陰性	*	0.09 [#]	陰性
N21-1	髄液	7	男	0	0.49	陰性	*	0.07	陰性
-2	血清			0	1.03	陰性	*	0.16	陰性
-6	血清			15	0.93	陰性	*	0.32	陰性
N22-1	髄液	3	女	0	0.56	陰性	*	0.09	陰性
-2	血清			0	0.73	陰性	*	0.16	陰性
-6	血清			26	0.64	陰性	*	0.10	陰性
N23-1	髄液	2	女	56	0.49	陰性	*	0.08	陰性
-2	血清			49	1.11	陰性	*	0.14	陰性
-6	血清			66	1.48	陰性	*	0.31	陰性
N24-1	髄液	5	男	1	0.5	陰性	*	0.08	陰性
N25-1	髄液	2	男	8	0.47	陰性	*	0.08	陰性
-2	血清			8	0.62	陰性	*	0.28	陰性
N26-1	血清	11ヶ月	女	2	0.85	陰性	*	0.25	陰性
N27-1	髄液	1	男	2	0.43	陰性	*	0.09	陰性
-2	血清			2	1.73	陰性	*	0.32	陰性
-6	髄液			11	0.48	陰性	*	0.09	陰性
-8	血漿			5	1.44	陰性	*	0.28	陰性
N28-1	髄液	2	男	4	0.34	陰性	*	0.20	陰性
-2	血清			13	0.84	陰性	*	0.85	陰性
N29-1	髄液	1	女	5	0.51	陰性	*	0.11	陰性
-2	血清 1			7	0.70	陰性	*	0.43	陰性
-6	血清 2			32	0.46	陰性	*	0.26	陰性
N30-1	髄液	6	女	3	0.42	陰性	*	0.14 [#]	陰性
-2	血清			3	0.79	陰性	*	0.28	陰性

N31-1	髄液	2	女	0	0.43	陰性	*	0.05 [#]	陰性
-2	血清 1			0	1.04	陰性	*	0.12	陰性
-6	血清 2			6	0.74	陰性	*	0.12	陰性
N32-1	血清	10 ヶ月	女	7	0.65	陰性	*	0.09	陰性
N33-1	髄液	2	男	8	0.42	陰性	*	0.05	陰性
-2	血清			8	0.83	陰性	*	0.12	陰性
-10	血清 2			36	0.94	陰性	*	0.12	陰性
N34-1	髄液	15	女	2	0.81	陰性	*	0.49	陰性
-2	血清 1			2	1.00	陰性	*	0.58	陰性
-6	血清 2			45	1.13	陰性	*	0.42	陰性
N35-1	髄液	40	女	2	1.02	陰性	*	0.07	陰性
-2	血清			2	0.84	陰性	*	0.11	陰性
N36-1	髄液	10	女	0	0.36	陰性	*	*	
-2	血清 1			0	0.78	陰性	*	0.40	陰性
-6	血清 2			4 ヶ月	0.94	陰性	*	0.36	陰性
-7	髄液 2			4	0.36	陰性	*	*	
-8	血清 3			4	0.86	陰性	*	0.41	陰性
N37-1	髄液	2	女	9	0.57	陰性	*	*	
-2	血清 1			11	0.79	陰性	*	0.48	陰性
-5	血清 2			32	0.51	陰性	*	0.30	陰性
N38-1	髄液	72	女	15	0.38	陰性	*	*	
-2	血清			5	0.54	陰性	*	0.15	陰性
N39-1	髄液	5	女	2	0.40	陰性	*	0.10	陰性
-2	血清			2	0.84	陰性	*	0.17	陰性

1 患者の年齢が1歳未満の場合は、月齢または日齢を示す。

2 JEV IgM 捕捉 ELISA の Index が 2.00 を超えれば陽性と判定する。

3 JEV (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。*は未実施を表す。

4 TBEV IgM ELISA の Index が 1.10 を超えれば陽性と判定する。#は、1 well での解析結果を、*は未実施を表す。

表2 平成28年度に本研究班で解析を行った検体を用いた、ダニ媒介脳炎ウイルス (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) IgM 捕捉 ELISA の結果

検体番号	検体の種類	年齢	性別	発症後日数 (日)	TBEV IgM 捕捉 ELISA*	
					Index	判定
E1-3	血清	2	女	6	0.43	陰性
E3-2	血清	31	男	2	0.25	陰性
-5	血清			25	0.16	陰性
E4-2	血清	4	女	4	0.20	陰性
E5-2	血清	4	女	6	0.14	陰性

* TBEV IgM ELISA の Index が 1.10 を超えれば陽性と判定する。

表3 平成29年度に本研究班で解析を行った検体を用いた、ダニ媒介脳炎ウイルス (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) IgM 捕捉 ELISA の結果

検体番号	検体の種類	年齢 (歳) ¹	性別	発症後日数 (日)	TBEV IgM 捕捉 ELISA	
					Index ²	判定
E10-2	血清	1	男	2	0.33	陰性
-7	血清			14	0.24	陰性
E11-2	血清	1	男	0	0.15	陰性
-6	血清			10	0.17	陰性
E12-2	血清	10	男	1	0.10	陰性
E13-2	血清	1ヶ月	男	0	0.09	陰性
-6	血清			11	0.12	陰性
E14-2	血清	1	男	2	0.14	陰性
-6	血清			7	0.36	陰性

E15-2	血清	6	男	5	0.21	陰性
-7	血清			18	0.17	陰性
E16-2	血清	日齡 1	男	8	0.08	陰性
E17-2	血清	3	男	0	0.23	陰性
E18-1	血清	1 ヶ月	男	3	0.08	陰性
E19-2	血清	1 ヶ月	男	0	0.09	陰性
E20-2	血清	1 ヶ月	男	3	0.10	陰性
E21-2	血清	25	男	1	0.14	陰性
-6	血清			14	0.17	陰性
E22-2	血清	30	男	13	0.12	陰性
-3	血清			33	0.17	陰性
E23-2	血清	15	女	3	0.31	陰性
-3	血清			49	0.17	陰性
E24-2	血清	7	男	3	0.16	陰性
E25-2	血清	50	男	16	0.14	陰性
E26-2	血清	1 ヶ月	男	0	0.10	陰性
-6	血清			7	0.13	陰性
E27-2	血清	1 ヶ月	女	0	0.10	陰性
-6	血清			7	0.11	陰性
E28-1	血清	2 ヶ月	男	1	0.12	陰性
-5	血清			7	0.10	陰性
E29-2	血清	4	女	1	0.29	陰性
-6	血清			7	0.22	陰性
E30-2	血清	3	男	0	0.19	陰性

1 患児の年齢が1歳未満の場合は、月齢または日齢を示す。

2 TBEV IgM ELISA の Index が 1.10 を超えれば陽性と判定する。