

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

フラビウイルスに起因する脳炎の調査

研究分担者 林 昌宏 国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
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
研究協力者 中山絵里 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 谷口 怜 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 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部 部長

研究要旨

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ともに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での特徴的な異常所見は知られていないため、JE および TBE の診断は困難である。従って、JE および TBE を診断するための検査が行われなかったために、JE あるいは 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、原因不明急性脳炎・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 あるいは TBE 症例が含まれていないかどうかについて解析を行った。22 人の原因不明急性脳炎・脳症患者から採取された 52 検体に対して JEV IgM 捕捉 ELISA 法を、51 検体に対して TBEV IgM 捕捉 ELISA 法を実施した。結果、全ての検体が陰性であった。今回検索が行われたのは、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ため、依然、正確に診断されていない JE あるいは TBE 症例が存在する可能性が考えられる。JE, TBE ともに疾病負荷の大きい疾患であるものの、有効なワクチンが開発されている。従って、本研究を継続することによって JE, TBE の正確な発生数を把握し、JE, TBE に対して適切な予防措置を講じ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、脳炎を発症した場合、患者の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 5 例である（2010 年から 2019 年の 10 年間に 50 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

属に分類される。ヒトは、主に、ダニ（マダニなど）に吸血されることで TBEV に感染する。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ものの、日本では認可されていない。

JE および TBE の診断において、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。そのために、JE および TBE が、診断のための検査が適切に実施されないため

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した。

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。

結果の判定には、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算出したIndexを用いた。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. 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

22人の原因不明急性脳炎・脳症患者から採取された52検体を用いてJEV IgM捕捉ELISAを実施した。結果は全て陰性であった(表1)。

2. TBEV IgM捕捉ELISA

22人の原因不明急性脳炎・脳症患者から採取された51検体を用いてTBEV IgM捕捉ELISAを実施した。結果は全て陰性であった(表1)。

D．考察

JEおよびTBEの診断において、患者が脳炎を発症した時期に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、「脳症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TBE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して陰性であることを証明する必要がある。本研究班においては、JEおよびTBEを正確に診断するために、原因不明急性脳炎・脳症患者から採取された血清および髄液を用いて、JEVおよびTBEVに対する抗体検査を実施した。

今回解析を行った原因不明急性脳炎・脳症患者の中にはJEと考えられる症例は含まれていなかった。しかし、次に示す理由から、本研究班で解析が行われなかった急性脳炎・脳症症例の中に、正確に診断されていないJE症例が存在する可能性が考えられる。<理由: 2019年には10例のJE症例が発生したこと(うち2例は2020年に報告)、今回解析の対象としたのは、原因不明急性脳炎・脳症として届け出られている症例のうちのごく一部であること、近年の日本におけるJE患者の大半は高齢者であるのに対して、本解析の主な対象は小児であったこと。>以上のことから、原因不明急性脳炎・脳症患者に対してJEの検索を継続することが、正確なJEの発生数を把握するために重要である。

本解析の対象とした原因不明急性脳炎・脳症患者には、TBEと考えられる症例も含まれていなかった。JE同様に、今回解析を行ったのは原因不明急性脳炎・脳症症例の一部であること、および、今回の解析の主な対象が小児であること(これまで日本で報告されているTBE患者5名は全員成人である)から、依然、正確に診断されていないTBE症例が存在する可能性が考えられる。さらに、これまで日本で報告されたTBE症例は全て北海道からであるため、北海道以外の地域ではTBE診断のための検査が行われないことが多い。そのため、本研究は、北海道以外の地域で発生しているTBE症例を発見するためにも重要である。

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。JEおよびTBEは、いずれも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。従って、本研究による原因不明急性脳炎・脳症症例に対するJEおよびTBEの検

索を継続し、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。

E . 結論

原因不明急性脳炎・脳症症例から採取された検体を用いて、JE および TBE 診断のための検査を行った。結果、いずれの検体も陰性であった。しかしながら、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は否定できない。今後も、原因不明急性脳炎・脳症症例に対してJE および TBE の検索を継続することが、JE および TBE の正確な発生数を把握し、適切な対策を行う上で重要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

・Maeki T, Tajima S, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Lim CK, Saijo M. Analysis of cross-reactivity between flaviviruses with

h sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis. Journal of Infection and Chemotherapy, 25:786-90, 2019.

2. 学会発表 該当なし

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

表 1
 令和元年度 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) | 性別 | 発症後日数(日) | JEV IgM 捕捉 ELISA | | TBEV IgM 捕捉 ELISA | |
|--------|-------|--------|----|----------|--------------------|----|--------------------|----|
| | | | | | Index ¹ | 判定 | Index ² | 判定 |
| AE1-1 | 髄液 | 10 | 男 | 0 | 0.52 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE1-2 | 血清 | | | 0 | 1.21 | 陰性 | 0.29 | 陰性 |
| AE2-1 | 髄液 | 1 | 女 | 1 | 0.70 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE2-2 | 血清 | | | 1 | 0.87 | 陰性 | 0.22 | 陰性 |
| AE2-6 | 血清 | | | 8 | 0.83 | 陰性 | 0.31 | 陰性 |
| AE3-1 | 血清 | 11 | 女 | 1 | 0.88 | 陰性 | 0.21 | 陰性 |
| AE4-1 | 髄液 | 1 | 女 | 3 | 0.63 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE4-2 | 血清 | | | 3 | 1.00 | 陰性 | 0.19 | 陰性 |
| AE5-1 | 髄液 | 1 | 男 | 1 | 0.44 | 陰性 | 0.10 [#] | 陰性 |
| N15-2 | 血清 | | | 1 | 0.63 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE6-1 | 血清 | 3 | 男 | 3 | 1.11 | 陰性 | 0.25 | 陰性 |
| AE7-1 | 髄液 1 | 66 | 男 | 0 | 0.55 | 陰性 | 0.11 | 陰性 |
| AE7-2 | 血清 1 | | | 5 | 1.60 | 陰性 | 0.12 | 陰性 |
| AE7-3 | 血清 2 | | | 32 | 0.91 | 陰性 | 0.13 | 陰性 |
| AE7-4 | 髄液 2 | | | 18 | 0.49 | 陰性 | 0.12 | 陰性 |
| AE8-1 | 血清 | 6 | 女 | 2 | 0.81 | 陰性 | 0.33 | 陰性 |
| AE9-1 | 髄液 | 74 | 男 | 7 | 0.58 | 陰性 | * | 陰性 |
| N17-2 | 血清 | | | 4 | 0.60 | 陰性 | 0.16 | 陰性 |
| N17-6 | 血清 | | | 23 | 0.54 | 陰性 | 0.14 | 陰性 |
| AE10-1 | 髄液 | 30 | 男 | 7 | 0.49 | 陰性 | 0.11 | 陰性 |
| AE10-2 | 血清 | | | 7 | 0.60 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE10-6 | 血清 | | | 45 | 0.62 | 陰性 | 0.29 | 陰性 |
| AE11-1 | 髄液 | 11 | 男 | 5 | 0.54 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE11-2 | 血清 | | | 0 | 0.84 | 陰性 | 0.37 | 陰性 |
| AE12-1 | 髄液 | 2 | 男 | 2 | 0.53 | 陰性 | 0.08 | 陰性 |
| AE12-1 | 血清 | | | 4 | 0.57 | 陰性 | 0.26 | 陰性 |
| AE13-1 | 髄液 | 0 | 男 | 1 | 0.62 | 陰性 | 0.08 | 陰性 |
| AE13-2 | 血清 | (日齢 3) | | 2 | 0.71 | 陰性 | 0.12 | 陰性 |

| | | | | | | | | |
|--------|------|----|---|----|------|----|------|----|
| AE14-1 | 髄液 | 14 | 男 | 0 | 0.58 | 陰性 | 0.08 | 陰性 |
| AE14-2 | 血清 | | | 0 | 1.53 | 陰性 | 0.14 | 陰性 |
| AE15-1 | 髄液 | 6 | 女 | 3 | 0.53 | 陰性 | 0.11 | 陰性 |
| AE14-2 | 血清 | | | 4 | 1.32 | 陰性 | 0.20 | 陰性 |
| AE16-1 | 髄液 | 21 | 女 | 22 | 0.72 | 陰性 | 0.12 | 陰性 |
| AE16-2 | 血清 1 | | | 4 | 0.71 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE16-6 | 血清 2 | | | 23 | 0.86 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE17-1 | 髄液 | 3 | 男 | 2 | 0.60 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE14-2 | 血清 | | | 2 | 0.86 | 陰性 | 0.17 | 陰性 |
| AE18-1 | 髄液 | 62 | 男 | 3 | 0.63 | 陰性 | 0.14 | 陰性 |
| AE14-2 | 血漿 | | | 1 | 0.86 | 陰性 | 0.16 | 陰性 |
| AE19-1 | 髄液 | 7 | 男 | 2 | 0.59 | 陰性 | 0.11 | 陰性 |
| AE19-2 | 血清 1 | | | 2 | 0.86 | 陰性 | 0.16 | 陰性 |
| AE19-6 | 血清 2 | | | 12 | 1.24 | 陰性 | 0.23 | 陰性 |
| AE19-7 | 血清 3 | | | 19 | 1.14 | 陰性 | 0.21 | 陰性 |
| AE20-1 | 髄液 | 4 | 女 | 3 | 0.63 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE20-2 | 血清 1 | | | 3 | 1.15 | 陰性 | 0.16 | 陰性 |
| AE20-5 | 血清 2 | | | 17 | 1.23 | 陰性 | 0.21 | 陰性 |
| AE21-1 | 髄液 | 2 | M | 0 | 0.82 | 陰性 | 0.10 | 陰性 |
| AE21-2 | 血清 1 | | | 0 | 0.84 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE21-6 | 血清 2 | | | 19 | 0.84 | 陰性 | 0.19 | 陰性 |
| AE22-1 | 髄液 | 5 | M | 9 | 0.63 | 陰性 | 0.09 | 陰性 |
| AE22-2 | 血清 1 | | | 0 | 0.88 | 陰性 | 0.15 | 陰性 |
| AE22-6 | 血清 2 | | | 16 | 0.94 | 陰性 | 0.17 | 陰性 |

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

2 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、*は検査を実施していないことを表す（検体量が不足していたため）。