

1. 北海道におけるダニ媒介脳炎患者の後方視的調査研究

○山口 宏樹 （北海道立衛生研究所）

【研究目的】

ダニ媒介脳炎（Tick-borne encephalitis: TBE）は TBE ウイルス（TBEV）の感染によって起こるダニ媒介感染症であり、海外では年間 1 万名前後の TBE 患者が報告されている。日本国内ではこれまで 5 名の患者が報告され（うち 2 名死亡）、いずれも北海道内での感染と推定されている。本研究では、TBE 以外のダニ媒介感染症を疑われた症例に関して、TBEV 感染の有無を後方視的に調査し、道内における感染実態を明らかにすることを目的とした。

【研究の必要性】

ダニ媒介感染症には、TBE の他に、ライム病、回帰熱、日本紅斑熱、ツツガムシ病及び重症熱性血小板減少症候群が挙げられる。その中で、道内では TBE、ライム病及び回帰熱の患者報告が確認されており、当所ではそれらの検査業務を実施している。これらの病原体は自然界においてマダニとげっ歯類やシカ等の野生動物の間で感染環を形成しており、ヒトへの主な感染経路は病原体保有マダニの刺咬である。一般に家畜動物では TBEV に感染しても無症状であるが、海外では飼育犬における発症事例や、生乳を介したヒトへの感染も報告されている。TBE に対する特異的な治療法はなく、回復した場合も神経学的後遺症が残ることが多い。日本国内では TBEV ワクチンが未認可なため、最善の予防策はマダニの刺咬を防ぐことである。

国内初の TBE 確定診断症例は、1993 年に道内から報告された。その後 20 年以上を経て、2016 年以降に 4 名（うち 2 名死亡）の患者報告があり^{1, 2)}、これら 5 症例は全て道内での感染が疑われている（表 1）。

表 1 これまでの TBE 発生事例

	届出受理年月	届出受理保健所	年齢	性別	その他
1 例目	1993 年	渡島保健所	30 歳代	女性	—
2 例目	2016 年 8 月	札幌市保健所	40 歳代	男性	死亡
3 例目	2017 年 7 月	市立函館保健所	70 歳代	男性	死亡
4 例目	2017 年 8 月	札幌市保健所	70 歳代	男性	—
5 例目	2018 年 5 月	旭川市保健所	40 歳代	女性	—

一方、野生動物やマダニの疫学調査から、TBEV やその近縁ウイルスは国内の広い範囲に分布していることが示されている¹⁾。1993 年以降で感染者が 5 名のみの報告とは考え難く、無症候感染者や、軽症及び脳炎患者の中に TBE と診断されなかった感染者が存在していたことが推定される。その理由として、国内における本疾患に対する認知度の低さや、診断系が確立されていないことが挙げられる。

道は、2016 年の患者報告後、今後も患者が発生する可能性を考慮して各機関と連携し、2017 年 6 月より TBE の行政検査を開始し、2018 年度末までに 3 名の患者を探知した²⁾。しかしながら、2017 年 6 月以前のダニ媒介感染症（ライム病、回帰熱及び重症熱性血小板減少症候群）が疑われた症例に関しては TBE の検査を実施していない。道内における本疾患の感染実態を後方視的に明らかにすることは、TBEV の浸淫状況を把握することに繋がり、その情報に基づき、本疾病への注意喚起、早期探知及び蔓延防止に活用できる。

また、海外では年間 1 万名前後の TBE 患者が報告され、TBEV の診断キットが市販されており、広く用いられている。市販されている TBEV 診断キットを用いて抗体価の測定を行い、当所で実施する検査法による結果と比較し、検査法の評価を行うことも必要と考えられる。

【研究計画】

(1) 当所の検査法による抗体検出

2014 年 4 月から 2019 年 3 月までに当所に搬入され、ダニ媒介感染症が疑われた 112 症例 126 検体を用いて、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法による特異的 IgG 及び IgM 抗体検査を実施した^{3, 4)}。研究に用いる検体は血清及び髄液とし、検体は 100 倍希釈して用いた。

(2) 海外市販キットとの比較検討

(1) の検体において、海外市販キット (TBE virus (FSME) IgM ELISA (Cat:30114078, IBL International GmbH)) を用いて IgM 抗体価を計測した。(1)の検査結果と比較検討を行った。

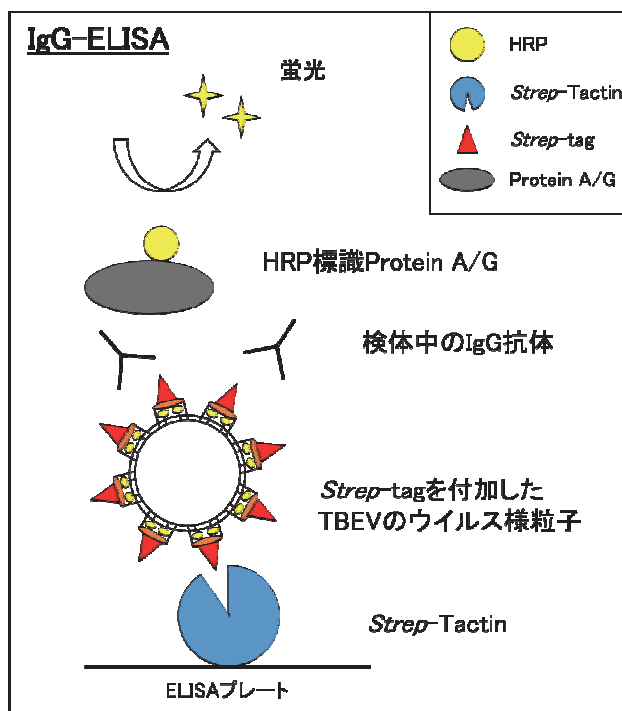
なお、本研究は、北海道立衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号 31-2）。

【実施内容・結果】

(1) 当所の検査法による抗体検出

次ページに、当所にて実施している検査方法を図式化した^{3, 4)}。

①IgG-ELISA



ELISA プレートに *Strep*-Tactin を吸着させる

↓

抗原である「*Strep*-tag を付加した TBEV のウイルス様粒子」を加える

↓

検体を加え、検体中の IgG 抗体と抗原抗体反応させる

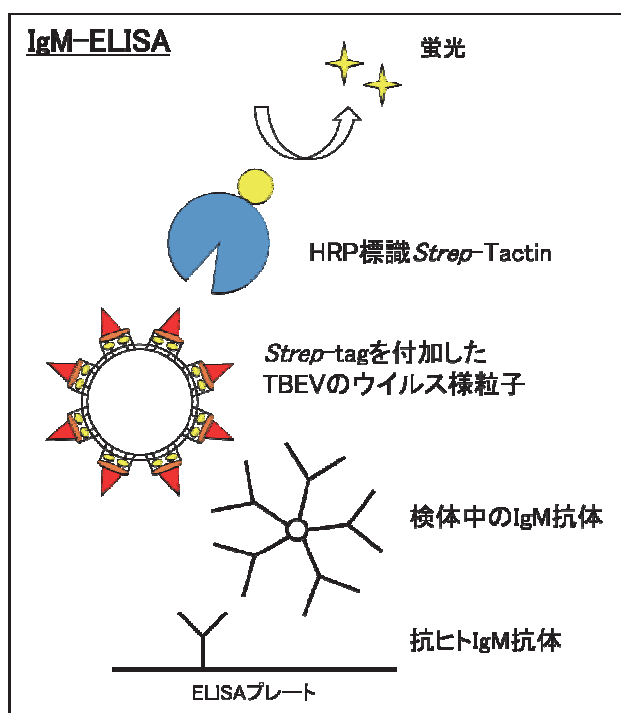
↓

HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素）標識した Protein A/G と反応させる

↓

基質を加え、吸光度を測定

②IgM-ELISA



ELISA プレートに抗ヒト IgM 抗体を吸着させる

↓

検体を加え、検体中の IgM 抗体と反応させる

↓

抗原を加え抗原抗体反応させる

↓

HRP 標識した *Strep*-Tactin を反応させる

↓

基質を加え、吸光度を測定

112 症例 126 検体を実施した結果、IgG-ELISA では 2 症例 2 検体の、IgM-ELISA は 3 症例 3 検体の陽性結果を得た（表 2）。そのうち、2 症例は IgG・IgM とともに陽性であった。それ以外の検体は全て陰性の結果を示した。また、これら 3 症例ともにライム病及び回帰熱の検査結果は陰性だった。

(2) 海外市販キットとの比較検討

キットに付属されている取扱説明書に沿って 112 症例 126 検体において実施した結果、2 症例 2 検体の陽性と、1 症例 1 検体の判定保留の結果を得た（表 2）。それ以外の検体は全て陰性の結果を示した。このうち、陽性の 2 症例は（1）の症例 1 と 2 であった。

表 2 ELISA で陽性結果を示した症例

	年度	年齢	性別	IgG- ELISA	IgM- ELISA	海外市販 キット (IgM)	ダニ 刺咬歴 ※1	脳炎/ 髄膜炎 ※2
1	2014	60 歳代	男性	+	+	+	○	○
2	2014	80 歳代	男性	+	+	+	不明	○
3	2015	70 歳代	女性	—	+	—	不明	×
4	2015	小学生	男性	—	—	±	×	×

※1, 2: 医師から届出があった情報の中から抜粋して記載

【考察と今後の課題】

感染症法における TBE の届出基準は、

- ① 分離・同定による病原体の検出
- ② PCR 法による病原体の遺伝子の検出
- ③ IgM 抗体の検出
- ④ 中和試験による抗体の検出（ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇）

と、規定されている。しかし、TBEV の使用にはバイオセーフティレベル 3（BSL-3）の実験施設が必要であり、④を実施できる施設は極めて少数である。また、本症は発病初期に検体中の抗体価がすでに上昇している場合が多く、ウイルス遺伝子の検出が困難なため、①や②の実施も困難である。そのため、TBE の診断は③の実施が重要となる。

一般的に、IgM 抗体は発病初期に出現し、IgG 抗体は IgM 抗体より遅れて出現し長期間持続する抗体である。また、IgM 抗体は病原体に対し、より特異的に反応する。これらのことから、ヨーロッパでは不活化 TBEV を抗原とした IgM-ELISA キットが販売され、医療機関等で用いられている。しかし、道内に分布していると考えられる TBEV は極東型（致死率約 30%）であり、ヨーロッパで流行するヨーロッパ型 TBE（同約 2%）とは抗原性や病態が異なるため、日本国内で TBE の診断に海外市販キットのみを用い、検査結果を判断するのは危険である。一方、当所で実施している「*Strep-tag* を付加した TBEV のウイルス様粒子」を抗原とする ELISA 法は、北海道由来の極東型の抗原を用いているため特異性に優れた、安全かつ簡便な検査法であることが確認できた。

今回の結果から、2014 年以降の当所に保管されているダニ媒介感染症が疑われた検体の中には、3 症例の IgM-ELISA 陽性の検体が存在していたことが明らかになった（症例 1、2、3）。これら 3 症例のペア血清は存在しないため、抗体価の上昇等を確認することを行うことはできなかった。症例 1 と 2 については、IgG-ELISA も陽性であったと同時に、海外市販キットにおいても陽性結果を得ることができた。また、医師からの届出から、症例 1 と 2

は発熱を有し、脳炎もしくは髄膜炎の症状を呈していたことが明らかになっている。症例 3 は IgM-ELISA のみ陽性を示したため、発病初期の検体であった可能性もあるが、海外市販キットでは陰性であった。また、症例 4 は海外市販キットで判定保留の結果を示すのみであった。症例 3、4 のような検体においては、感度・特異性でより優れている中和試験法を行うことが重要であると考えられた。

海外市販キットで陽性を示した検体は、当所で実施する検査法においても陽性を示したことから、当所で実施する検査法は同等以上の感度・特異度を示すものと考えられた。今後は陽性検体の遺伝子検索や中和抗体価の測定などを実施する必要があると考える。また、これらの結果をふまえ、広く情報発信をすることで感染症・予防対策の啓発に利用したいと考える。

【参考文献】

- 1) 好井健太郎 他. 「2016 年に北海道で発生したダニ媒介性脳炎症例」. 病原微生物検出情報. 2017;38:126.
- 2) 山口宏樹 他. 「2017 年の北海道におけるダニ媒介脳炎」. 病原微生物検出情報. 2018;39:46-7.
- 3) Inagaki E, et al. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. Ticks Tick Borne Dis. 2016 Jul;7(5):723-729.
- 4) Nakayasu M, et al. Development of a serodiagnostic IgM-ELISA for tick-borne encephalitis virus using subviral particles with strep-tag. Ticks Tick Borne Dis. 2018 Sep;9(6):1391-1394.

【経費使途明細】

使 途	金 額
海外市販 ELISA キット（輸入品）	244,890 円
マイクロプレートウォッシャー周辺機器	67,510 円
マイクロプレートリーダー周辺機器	23,026 円
ELISA 用試薬（洗浄液、基質等）	133,660 円
消耗品（プレート、グローブ等）	28,646 円
振込手数料	2,268 円
合 計	500,000 円
大同生命厚生事業団助成金	500,000 円