

無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス3型の検出

内山友里恵¹・嶋崎真実²・藤井ますみ²・粕尾しず子²
中沢春幸²・藤田 暁³

キーワード：無菌性髄膜炎，エコーウイルス3型，地域流行

1. はじめに

無菌性髄膜炎は、細菌性髄膜炎以外の髄膜炎の総称である。主にウイルスが髄膜に感染することで発症し、一般に発熱、頭痛、嘔吐などの症状を示すのち、比較的良好に経緯する¹⁾といわれている。日本では夏季を中心に患者発生報告があり、主な起因ウイルスは、エコーウイルス、コクサッキーB群ウイルス等のエンテロウイルスである。原因となるエンテロウイルスは毎年流行が認められるが、流行する血清型および流行規模は年ごとに相違している。

2014年、一部地域において短期間に無菌性髄膜炎の患者が複数相次いで発生し、全ての患者からエコーウイルス3型（以下E3と略す）が検出されたことから、E3による無菌性髄膜炎の集団発生事例と疑われた。例年全国でのE3による無菌性髄膜炎の発生報告は数例²⁾に過ぎないが、2014年（12月3日現在）は13事例と比較的報告数が多くなっている。しかしいずれも散発事例で、現在までE3による無菌性髄膜炎の集団発生の報告はない。

そこで今回、無菌性髄膜炎患者発生事例の概要と検出されたE3の分子疫学的解析を行ったので報告する。

2. 材料および方法

2.1 検査材料

検査材料は、感染症法に基づく積極的疫学調査として2014年7月3日～12日に長野県東部で無菌性髄膜炎と診断された患者6名の臨床検体（咽頭ぬぐい液：6検体、髄液：7検体）とした（表1）。

2.2 検査方法

2.2.1 ウイルス分離方法

ウイルスの分離は、病原体検出マニュアル³⁾に準じ、次のとおり実施した。咽頭ぬぐい液および髄液を、3000rpmで15分間遠心分離した。その上清液100μLを、事前に24穴培養プレートに細胞が単層になるように培養した、Vero, HEp-2, Vero9013, RD-A および RD-18S 細胞の各細胞に接種し、35℃, 5%CO₂ 条件下で一週間培養後判定した。判定は各細胞が感染したことを示す細胞変性効果（cytopathic effect：以下CPE）の出現の有無で行い、CPEが認められなかった場合は継続して3代目まで継代培養を行った後、最終判定を行った。

2.2.2 遺伝子学的検査方法

咽頭ぬぐい液、髄液および各検体について細胞培養を行いCPEが認められた細胞培養上清液から、QIAampViral RNA Mini Kit（QIAGEN社）を用いてRNAの抽出を行った。抽出したRNAは、エンテロウイルスのVP1, VP4-VP2の各領域をターゲットにしたRT-PCR法を実施した。

VP1領域は、抽出したRNAをSuperScript II 逆転写酵素（ライフテクノロジーズ）でcDNAを作成後、Oberste MS⁴⁾らの方法に準じて、プライマーは187および011を使用し構造蛋白質VP1領域の増幅を目的としたPCRを行った。反応にはVeriti200（Applied Biosystems）を用いた。PCR条件は、94℃2分の反応後、94℃30秒、51℃1分、72℃1分の反応サイクルを30回繰り返し、最後に72℃5分伸長反応とした。その後、電気泳動を行い特異的な

1 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978
（現：長野県北信保健福祉事務所 〒389-2255 飯山市静間 1340-1）
2 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978
3 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978
（現：長野県長野食肉衛生検査所 〒380-0948 長野市差出南 3-2-29）

表1 無菌性髄膜炎患者情報及び検査成績

case	性別	年齢	発病日	検査材料	検査成績
1	F	5	2014/7/3	咽頭ぬぐい液	エコーウイルス3型
				髄液	エコーウイルス3型
2	F	0	2014/7/5	咽頭ぬぐい液	エンテロウイルス 型別不能
				髄液	不検出
3	M	2	2014/7/6	咽頭ぬぐい液	エコーウイルス3型
				髄液	不検出
4	M	8	2014/7/10	咽頭ぬぐい液	エコーウイルス3型
				髄液	エコーウイルス3型
5	M	7	2014/7/10	咽頭ぬぐい液	エコーウイルス3型
				髄液A	不検出
				髄液B	エコーウイルス3型
6	M	5	2014/7/12	咽頭ぬぐい液	エコーウイルス3型
				髄液	エコーウイルス3型

発生時期：2014年7月3日～12日

臨床検体：総数13検体（咽頭ぬぐい液 6検体，髄液 7検体）

発生地域：長野県東部

PCR産物（758base）の増幅を確認した。

VP4-VP2領域は、抽出したRNAを、Access RT-PCR System（Promega）を用いて、One-Step RT-PCRを行った。逆転写後プライマーはEVP2⁵⁾およびOL68-1⁶⁾を用いて構造蛋白質VP4-VP2領域の増幅を目的としたPCRを行った（同上機器使用）。条件は、48℃ 45分、94℃ 2分の逆転写反応後、94℃ 10秒、50℃ 10秒、65℃ 1分の反応サイクルを35回繰り返し、最後に65℃ 5分の伸長反応とした。その後、電気泳動を行い特異的なPCR産物（750base）の増幅を確認した。

さらにPCR産物の増幅が認められなかった検体については、semi-nested PCR法を実施した。プライマーは、EVP4⁷⁾およびOL68-1を使用し、条件は、94℃ 2分の反応後、94℃ 10秒、50℃ 10秒、65℃ 1分の反応サイクルを35回繰り返し、最後に65℃ 5分の伸長反応とした。その後、電気泳動を行い特異的なPCR産物（650base）の増幅を確認した。

得られたPCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。塩基配列が決定されたVP1領域（613nt）については、オランダNational Institute for Public Health and the Environment（RIVM）が提供する遺伝子配列による型別分類ウェブサービス（Enterovirus Genotyping tool Version 0.1）を用い、VP4-VP2領域

（422nt）については、DNA Data bank of Japanの提供するデータベース検索（BLAST）より相同性検索し、ウイルスを同定した。さらにClustal Wを用いてアライメントを行い、近隣結合法（NJ法）により系統樹解析を行った。

3. 結果

3.1 患者の概要とウイルス検出状況

2014年7月、長野県東部の同一医療機関において無菌性髄膜炎と診断された患者が複数相次いで発生した。管轄保健所では短期間のうちに一部地域で患者が発生していることから同一病原体による集団感染を疑い、起因ウイルス検索のため当所に検体を搬入した。当所でRT-PCR法により検査を実施したところ、患者の咽頭ぬぐい液6検体中5検体、および髄液7検体中4検体からE3が検出された（表1）。患者は男性4名女性2名の計6名で、年齢は0歳から8歳（0歳、2歳、7歳、8歳が各1名、5歳が2名）の若年層であった。主な症状は、いずれも発熱（39.4～38.4℃）、頭痛、下痢など症状を呈し髄膜炎が認められた。なお全員予後良好で重症化することなく回復した。保健所の疫学調査では患者間の関連性は不明であった。

3.2 患者の遺伝子解析

無菌性髄膜炎患者から検出したE3のVP1、VP4-

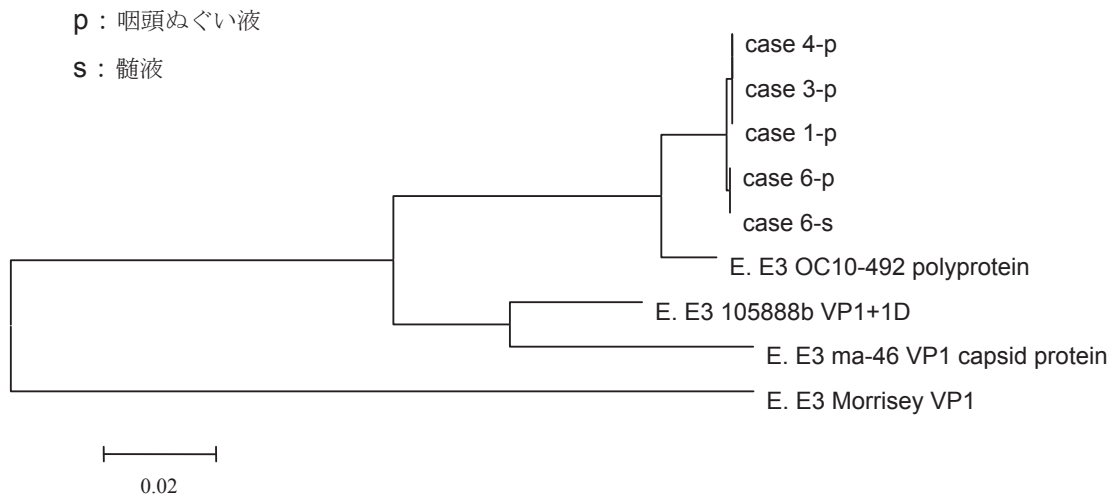


図1 VP1 領域 (613nt) 系統樹解析

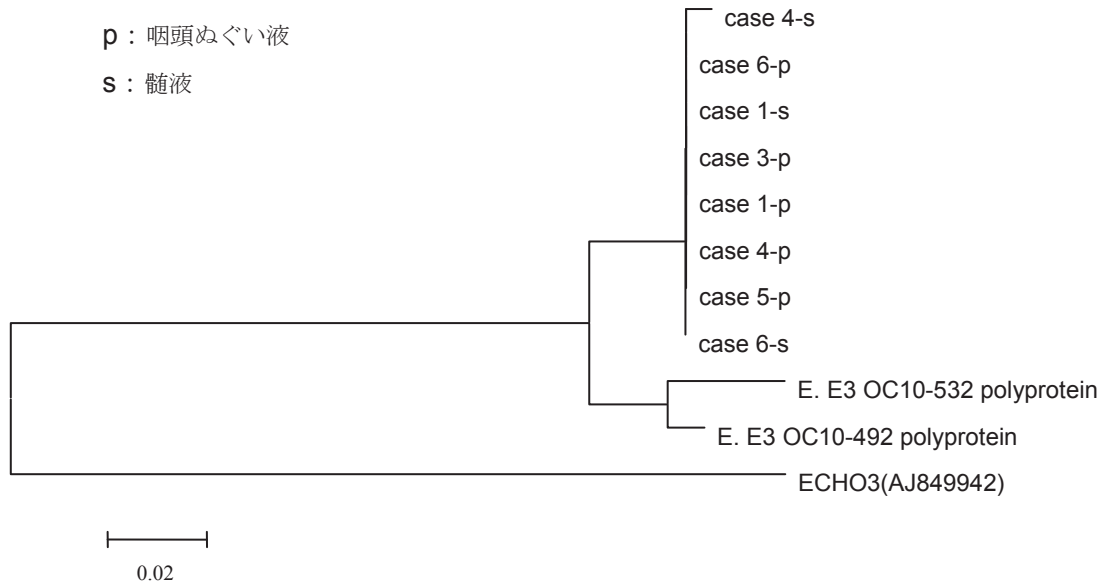


図2 VP4-VP2 領域 (422nt) 系統樹解析

VP2 の各領域について系統樹解析を試みた。無菌性髄膜炎患者から検出した E3 のうち、VP1 領域の塩基配列が決定した 7 株について、系統樹解析を行ったところ、解析可能であった case1, 3, 4, は相同性が 100% で、case6 についても 99.8% と非常に近縁であった (図 1)。また、VP4-VP2 領域については、塩基配列が決定した 12 株の解析を行った結果、case1, 3, 4, 5, 6 の相同性は 100% ~ 99.8% であり非常に近縁であった (図 2)。

4. 考察

長野県東部の一部地域で、短期間に患者が相次い

で発生した無菌性髄膜炎は、E3 が起因ウイルスであることが判明した。また、ウイルス粒子表面に存在する構造蛋白質で、抗原性に関わる領域を含んでいる VP1 領域⁴⁾ および、ウイルス粒子の内部に存在しているウイルス構造蛋白質に関係する領域である VP4-VP2 領域^{5)~7)} の各領域において系統樹解析を実施したところ、患者から検出された E3 は、両領域とも、遺伝子学的に極めて近いことが示唆された。このことから今回の複数の感染事例は、患者の疫学的関連性が不明であるが、同一 E3 による地域流行であったと考えられた。

長野県において E3 は、無菌性髄膜炎症例の患者から、ここ 10 年以上検出されていない⁸⁾。全国的

にも、近年 E3 による無菌性髄膜炎の報告は年間 5 例以下と発生数は少なかったが、2014 年（12 月 3 日現在）は、香川県 3 例、岡山県 2 例、香川県 1 例、奈良県 1 例、埼玉県 1 例と無菌性髄膜炎患者からの E3 検出が相次いで報告されている。しかし、国立感染症研究所の感染症サーベランスシステムおよび病原微生物検出情報によると、これらの報告はいずれも散発事例であり⁹⁾、今回当県で認められた E3 による無菌性髄膜炎患者の一部地域での流行は、全国的にも極めて稀である。

今後も E3 の発生動向に注意が必要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所，無菌性髄膜炎とは：<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/520-viral-meningitis.html>（平成 26 年 12 月確認）
- 2) 国立感染症研究所，病原微生物検出情報 IASR 年別無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルス、2010～2014 年：
<https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data70j.pdf>（平成 26 年 12 月確認）
- 3) 国立感染症研究所，手足口病病原体検査マニュアル
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/HFMdis.pdf>（平成 26 年 12 月確認）
- 4) Oberste MS, et al. (2000), Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. J Clinical Microbiology 38 (3) : 1170-1174
- 5) Rotbart HA, et al. (1990), Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. J Clinical Microbiology 28:438-442
- 6) Olive DM, et al. (1990), Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. J Gen Virol 71:2141-2147
- 7) Ishiko H, et al. (2002), Molecular Diagnosis of Human Enteroviruses by Phylogeny-Based Classification by Use of the VP4 Sequence. J infect Dis 185:744-754
- 8) 長野県環境保全研究所（2004 年～2013 年）業務年報，第 1 号～第 10 号，感染症発生動向調査病原体検出状況
- 9) 国立感染症研究所，病原微生物検出情報 IASR エンテロウイルス 無菌性髄膜炎由来ウイルス 都道府県別 2014 年：
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/1532-iasrgv.html>（平成 26 年 12 月確認）

Detected of echovirus type 3 from aseptic meningitis patients

Yurie UCHIYAMA¹, Mami SHIMAZAKI², Masumi FUJII², Shizuko KASUO²,
Haruyuki NAKAZAWA² and Satoru FUJITA³

- 1 *Infectious Disease Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan*
(Present: Hokushin Health and welfare Office, 1340-1 Shizuma, Iiyama 389-2255, Japan)
- 2 *Infectious disease division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan*
- 3 *Infectious disease division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan*
(Present: Nagano Meat Inspection Laboratory, 3-2-29 Sashideminami, Nagano 380-0948, Japan)