

## 最近5年間(2003年～2007年)の無菌性髄膜炎・急性脳炎の 動向について

糸数清正・大野惇<sup>1)</sup>・中村正治・平良勝也・仁平稔・久高潤・古謝由紀子・玉那覇康二

### The Survey of Aseptic Meningitis and Acute Encephalitis in Okinawa Prefecture from 2003 to 2007

Kiyomasa ITOKAZU, Atsushi OONO<sup>1)</sup>, Masaji NAKAMURA, Katsuya TAIRA, Minoru NIDAIDA,  
Jun KUDAKA, Yukiko KOJA and Koji TAMANAHA

**要旨**：2005年から2007年に「沖縄県による急性脳炎・無菌性髄膜炎強化サーベイランス」で行った3年間の検査結果を元に2003年から2007年の5年間に無菌性髄膜炎や急性脳炎と診断された52症例の状況を報告する。無菌性髄膜炎(疑い含む)と臨床診断された38症例の髄液37検体中13検体から、RD, HeLa, VeroE6, Vero9013細胞でウイルスが分離された。2003年は、B群コクサッキーウイルス1型が1株。2005年は、B群コクサッキーウイルス2型が2株と型不明1株。2006年は、エコーウイルス30型が4株とエコーウイルス18型が1株及び型不明2株。2007年は、エコーウイルス30型が2株分離された。また、急性脳炎と臨床診断された14症例の髄液13検体からは、ウイルスは分離されなかった。血清は5検体のみウイルス分離に供されたがウイルスは分離されなかった。便は、9検体のうち、無菌性髄膜炎患者から2006年に提供があった5検体から、エコーウイルス30型が1株とエンテロウイルス71型が2株分離された。また、2007年には最初に無菌性髄膜炎で届けられた1例は後に、抗体検査でレプトスピラ症と診断された。なお、すべての症例から日本脳炎ウイルスは検出されなかった。

**Key words** : Survey, Aseptic meningitis, Acute encephalitis, Okinawa Prefecture

#### I はじめに

2005年6月に、厚生労働省は日本脳炎ワクチンによる重篤な副反応被害者の認定を踏まえ、現行の日本脳炎ワクチン接種の勧奨を中止した。勧奨中止による影響を科学的に推定すること、また、将来新ワクチン接種勧奨の再開に当たっては、わが国における日本脳炎の現状を正確に把握するとともに、ワクチンの必要性を科学的基盤に立って理解する必要性があるため、厚生労働科学研究費補助金により研究が行われた<sup>1)</sup>。

本県は、流行予測事業で毎年行っているブタ血清における日本脳炎抗体陽性率は50%以上であり、過去には、日本脳炎患者が発生しており、歴史的にも本県は日本脳炎ウイルスの浸淫地域である。我々は、急性脳炎と無菌性髄膜炎の掘り起こしや病原体検索の強化のため「沖縄県による急性脳炎・無菌性髄膜炎強化サーベイランス」を行った<sup>1)</sup>。今回は、最近5年間の無菌性髄膜炎と急性脳炎の状況を報告する

#### II 材料および方法

##### 1. ウイルス分離

供試材料は感染症発生動向調査に基づき2003年1月1日から

2007年12月31日までの5年間に県の定点医療機関において、無菌性髄膜炎や急性脳炎と臨床診断又は疑われた患者52症例の髄液50検体、血清(急性期)5検体、便9検体をウイルス分離に供した。ウイルス分離は、髄液、血清や便を定法に従い処理した後、単層培養したHeLa, RD, VeroE6及びVero9013細胞に接種し、1週間隔で3代盲継代培養後、細胞変性効果の有無を確認した。分離されたウイルスの型別同定は、国立感染症研究所より分与された中和用プール血清EP95、デンカ生研のE~G, L~N プール血清及びCoxA9単味血清の13種類の抗エンテロウイルス血清を用いて中和試験を行った。

##### 2. ウイルス遺伝子増幅法(PCR法)

PCR法に用いた検体は、無菌性髄膜炎や急性脳炎と診断された52症例の髄液47検体、血清4検体、便1検体であった。

##### (1) エンテロウイルスの検出

RNA抽出液5 $\mu$ lをRT-PCR Taq Mix液(Invitrogen)45 $\mu$ lに加え、48 $^{\circ}$ C30分、94 $^{\circ}$ C2分反応させた後94 $^{\circ}$ C30秒、50 $^{\circ}$ C30秒、65 $^{\circ}$ C60秒の条件を35サイクル、65 $^{\circ}$ C15分反応させるOne-Step RT-PCR法で行った。

プライマーは5'-NCRからVP2領域の約650bpを増幅するプ

1)「現」沖縄県動物愛護管理センター

\*本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金によって実施した。

ライマーペア(EVP4, OL68-1)を用いた。

(2) 日本脳炎ウイルスの検出

1stPCR は RNA 抽出液 5 μl を RT-PCR Taq Mix 液 (Invitrogen) 45 μl に加え、53°C 30 分、94°C 2 分反応させた後 94°C 60 秒、53°C 60 秒、72°C 60 秒の条件を 35 サイクル、72°C 15 分反応させる One-Step RT-PCR 法で行った。さらに、Nested PCR は 1stPCR 液 2 μl を Nested PCR Taq Mix 液 (Premix Taq ;Takara) 45 μl に加え、94°C 2 分反応させさせた後 94°C 60 秒、53°C 60 秒、72°C 60 秒の条件を 25 サイクル、72°C 15 分反応させた。

1stPCR に使用したプライマーは約 381bp を増幅するプライマーペア (JE8k, JEER) と 2006 年からは約 292bp を増幅するプライマーペア (JEen37s, JEen329 c) を追加して用いた。Nested PCR プライマーでは約 326bp を増幅するプライマーペア (JE8kinner-S, JEERinner-C) と 2006 年からは約 203bp を増幅するプライマーペア (JEen98 s, JEen301 c) を追加して用いた。

(3) フラビウイルスの検出

フラビウイルス属の共通部位の遺伝子をターゲットとした約 454bp を増幅するプライマーペア (F1a-U5004, F1a-U5457) を用いて上記の日本脳炎ウイルスの検出と同じ条件で行った。

3. 日本脳炎の抗体検査

提供された血清 21 検体(ペア 4 組)と髄液 2 検体については、流行予測事業術式により日本脳炎の HI 抗体価と 2ME 抗体価を測定した

III 結果および考察

1. 沖縄県の患者情報

(1) 無菌性髄膜炎

図 1 に沖縄県の 2001 年から 2007 年の定点あたりの患者報告数を示す<sup>2)</sup>。

図 1 から、沖縄県の無菌性髄膜炎の患者は、季節に関係なく年間を通して発生し、ピークは見られない。しかし、無菌性髄膜炎の定義は、髄膜が炎症を起こす髄膜炎のうち髄液の中に細菌が認めないものを言う。そのため、ウイルス、リケッチア、マイコプラズマ、真菌、原虫などの感染や自己免疫反応、化学物質の刺激によるものなど多種多様の起因病原体がある。このように多くの病原体が関与しているため一定の疫学パターンをとらないが、全体の 85% がエンテロウイルスによるために、全国の定点あたりの患者報告数の基本的な流行パターンはエンテロウイルス属の状況を反映して、初夏から増加し始め、夏から秋にかけて流行が見られる<sup>3)</sup>。本邦での主な病原体をあげると、エコーウイルスとコク

サッキー B 群ウイルスが多く、過去にエコー 30 型、6 型、7 型、あるいはコクサッキー B 5 型、B 3 型、B 4 型などの流行が報告されている<sup>3)</sup>。

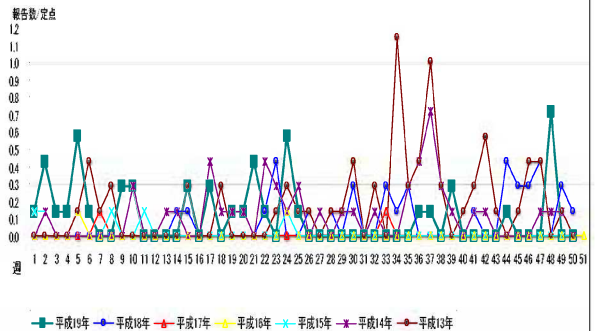


図 1. 無菌性髄膜炎の定点あたりの患者数

(2) 急性脳炎

表 1 より、患者数は年間に 10 名以下で報告されている<sup>2)</sup>。2003 年は、10 人と多いが、この年は、インフルエンザが大流行した年でもありその関連で 1 月から 2 月に 8 人の脳炎患者が報告されている<sup>7)</sup>。本邦の急性脳炎の原因ウイルスは、14 才以下では、インフルエンザが最も多く、次に HHV-6、ロタ、単純ヘルペス (HSV) である。15 才以上では、HSV が多く、次にインフルエンザである。また、報告全数の 55% は病原体不明である<sup>8)</sup>。

表 1 急性脳炎の年間の患者報告数

年	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年
報告数	10	0	1	1	0

2. 病原体検索結果

表 2 に患者情報と検査結果をまとめた。

(1) ウイルス分離状況

無菌性髄膜炎(疑い含む)と臨床診断された 38 症例の髄液 37 検体中 13 検体から、RD, VeroE6, Vero9013 細胞でウイルスが分離された。

2003 年は、B 群コクサッキーウイルス 1 型 (CB1) が 1 株。2005 年は、B 群コクサッキーウイルス 2 型 (CB2) が 2 株と型不明 1 株。2006 年は、エコーウイルス 30 型 (E30) が 4 株とエコーウイルス 18 型 (E18) が 1 株及び型不明 2 株。2007 年は、E30 が 2 株分離された。また、急性脳炎と臨床診断された 14 症例の髄液 13 検体からは、ウイルスは分離されなかった。

血清は 5 検体のみウイルス分離に供されたがウイルスは分離されなかった。便は、9 検体のうち、無菌性髄膜炎患者から 2006 年に提供があった 5 検体から、E30 が 1 株とエンテ

ロウイルス 71 型(EV71)が2株分離された。この年は、沖縄県ではEV71 による手足口病が流行していた<sup>9)</sup>。東南アジアではEV71 による手足口病流行時に中枢神経合併症の頻度が高くなり、重症者や死亡例が問題になっていることから、手足口病流行時にEV71 型が検出された場合は、中枢神経合併症の発生について注意が必要である。本邦では、EV71 は3から4年周期で流行している<sup>3)</sup>。

(2) ウイルス遺伝子検出状況

エンテロウイルス、日本脳炎ウイルス及びフラビウイルス属の遺伝子の検出を無菌性髄膜炎や急性脳炎と診断された52症例の髄液47検体、血清4検体、便1検体からPCR法で試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

(3) 日本脳炎の抗体検査

血清21検体(ペア4組)と髄液2検体、計23検体をHI抗体価と2ME抗体価を測定したが、2ME感受性陽性検体は検出されなかった。また、ペア血清が取れた4例からは、有意な抗体価の上昇は認められなかった。

(4) その他

検体番号49番は当初、無菌性髄膜炎として届けられたが、ペア血清を用いての抗体検査(顕微鏡凝集試験:MAT)にて、レプトスピラ症(推定感染血清型は *Leptospira* sp. serovar Hebdomadis)と診断された。沖縄県は、レプトスピラ症の発生が多い地域のため、髄膜炎の起因病原体としてレプトスピラも考慮しなければならないであろう。

IV まとめ

今回の調査で無菌性髄膜炎患者から、2003年にはCB1、2005年には、CB2、2006年には、E30とE18、2007年には、E30が検出されており毎年異なった型が流行していることがわかった。また、急性脳炎と臨床診断された14症例からは、ウイルスは分離されなかった。

今回、日本脳炎ウイルスの掘り起こしとして、無菌性髄膜炎と急性脳炎の強化サーベイランスをおこなったが、日本脳炎ウイルスは検出されなかった。近年の沖縄県の流行予測事業による日本脳炎ウイルスのブタの抗体価は、立ち上がりが遅く、1990年代と比較して日本脳炎ウイルスの活動は弱い傾向にあることから、今回の調査期間に日本脳炎患者の発生はなかったと思われる。しかし、沖縄県は、過去に日本脳炎の患者が発生し、ブタの抗体陽性率は、例年50%を超えている状態なので日本脳炎ウイルスのサーベイランスはまだ重要だと思われる。

また、分離された13株のうち、未同定株が3株あることとPCR法でウイルスが1件も検出されなかったことは今後の課題であり、技術の見直しや検査方法の検討が必要である

う。

IV 参考文献

- 1) 岡部信彦・中島一敏・多屋馨子・佐藤弘・上野久美・伊礼壬紀夫・田盛広三・大野惇・只野昌之(2006)「日本脳炎ウイルス感染症積極的サーベイランス」—沖縄県における急性ウイルス性脳炎・無菌性髄膜炎強化サーベイランス—。厚生労働科学研究費補助金平成17年度厚生労働科学特別研究事業 わが国における日本脳炎の現状と日本脳炎ワクチンの必要性の評価に関する緊急研究：17-31
- 2) 沖縄県福祉保健部健康増進課・沖縄県衛生環境研究所(2008)平成19年 沖縄県感染症発生動向調査事業報告書：198pp
- 3) 国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課(2009)無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向2008年12月現在。病原微生物検出情報月報,30(1)：1-3
- 4) 沖縄県福祉保健部健康増進課・沖縄県衛生環境研究所(2007)平成18年 沖縄県感染症発生動向調査事業報告書：198pp
- 5) 沖縄県福祉保健部健康増進課・沖縄県衛生環境研究所(2006)平成17年 沖縄県感染症発生動向調査事業報告書：198pp
- 6) 沖縄県福祉保健部健康増進課・沖縄県衛生環境研究所(2005)平成16年 沖縄県感染症発生動向調査事業報告書：206pp
- 7) 沖縄県福祉保健部健康増進課・沖縄県衛生環境研究所(2004)平成15年 沖縄県感染症発生動向調査事業報告書：206pp
- 8) 国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課(2007)急性脳炎 2004～2007.8.病原微生物検出情報月報,28(12)：1-2
- 9) 平良勝也・糸数清正・久高潤・仁平稔・岡野祥・大野惇・安里龍二(2007)沖縄県における病原体検出状況(平成18年度)。沖縄県衛生環境研究所報,47：143-145

表2 報告症例一覧(期間:2003年1月1日~2007年12月31日) その1

番号	年	件数	年齢	性別	地域	疾患名	検体名	採取日	ウイルス分離	PCR結果*			日本脳炎抗体検査		備考(症状など)
										F1a	JE	EV	HI	2ME	
1	2003	1	23	F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2003/10/25	分離(-)						発熱、嘔吐、腹痛、
2		2	20	F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2003/12/03	分離(LLCMK2+)						発熱、嘔気、頭痛、
CoxsackieB1															
3	2005	1	27	M	中部	急性脳炎	髄液	2005/03/10	分離(-)	-	-	-			発熱、後頭部痛、不穩
4		2	25	M	宮古	急性脳炎	髄液	2005/04/21	分離(-)	-	-	-			発熱、下肢の感覚異常
5		3	91	F	宮古	急性脳炎	髄液	2005/07/19	分離(-)	-	-	-			意識障害
6		4	4	M	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/09/20	分離(He p+)	-	-	-			発熱、頭痛、耳下腺炎
							便	2005/09/21	分離(-)						(Mumps髄膜炎)
7		5	1ヶ月	M	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/09/21	分離(-)	-	-	-			発熱、不機嫌
							便	2005/09/24	分離(-)						
8		6	40	M	八重山	無菌性髄膜炎	髄液	2005/09/22	分離(-)	-	-	-			
9		7	2	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/05	分離(-)	-	-	-			発熱
10		8	3ヶ月	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/08	分離(HeLa+)	-	-	-			発熱(菌血症)
CoxsackieB2															
11		9	2ヶ月	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/09	分離(-)	-	-	-			発熱(敗血症)
12		10	2ヶ月	F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/09	分離(-)	-	-	-			発熱
13		11	2	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/09	分離(-)	-	-	-			発熱(熱性けいれん)
14		12	2ヶ月	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/09	分離(-)	-	-	-			発熱(敗血症)
15		13	2ヶ月	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/10	分離(-)	-	-	-			発熱、上気道炎
							血清	2005/10/10	分離(-)	-	-	-			
16		14	1ヶ月	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/09	分離(HeLa+)	-	-	-			
CoxsackieB2															
17		15	5	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/13	分離(-)	-	-	-			発熱、頭痛
18		16	10	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/13	分離(-)	-	-	-			発熱
19		17	1	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/24	分離(-)	-	-	-			発熱(熱性けいれん)
20		18	3ヶ月	F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/10/30	分離(-)	-	-	-			発熱
21		19	53	F	中部	急性脳炎	髄液	2005/10/31	分離(-)	-	-	-			ふらつき、意識障害
22		20	44	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2005/11/03	分離(-)	-	-	-			発熱
23	2006	1	37	M	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/07/10	分離(-)	-	-	-			発熱、下痢、腹痛、発疹
							血清	2006/07/10				10	10		
							髄液	2006/07/31				<10			
							血清	2006/07/31				10			
24		2	20	M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/07	分離(RD+)	-	-	-			発熱、頭痛
Echo18															
							血清	2006/07/31				80	80		
25		3	11	F	宮古	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/10	分離(Vero9013+)	-	-	-			(ムンプス髄膜炎)
							血清	2006/08/10				10	<10		
							便	2006/08/10	分離(-)						
26		4	31	M	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/11	分離(-)	-	-	-			発熱、頭痛、全身倦怠感
							血清	2006/08/11				10	<10		
							髄液	2006/08/30				<10			
27		5	32	F	南部	急性脳炎	髄液	2006/08/13	分離(-)	-	-	-			発熱、意識障害
							血清	2006/08/13				10	10		
28		6	11	F	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/16	分離(-)	-	-	-			発熱、発疹、痙攣
							血清	2006/08/16				20	10		(手足口病)
							便	2006/08/16	分離(HeLa+)						
Enterovirus71															
29		7	5	F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/16	分離(-)	-	-	-			発熱、頭痛、腹痛
(ブトビ7疑)															

ゴシック・傾斜は、急性脳炎事例

\*PCRの結果 F1a:フラビウイルス JE:日本脳炎ウイルス EV:エンテロウイルス

表2 報告症例一覧(期間:2003年1月1日~2007年12月31日) その2

番号	年	件数	年齢	性別	地域	疾患名	検体名	採取日	ウイルス分離	PCR結果*			日本脳炎抗体検査		備考(症状など)
										Fla	JE	EV	HI	2ME	
30	2006	8	4 M	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/08/18	分離(-)	-	-	-			発熱、嘔吐、頸部硬直	
						血清	2006/08/18					<10	<10		
						便	2006/08/18	分離(-)							
31	9	5 M	南部	無菌性髄膜炎	血清	2006/09/07						<10		発熱、嘔吐、頭痛	
					髄液	2006/08/23	分離(RD+)	-	-	-					
					血清	2006/08/25					10	<10			
32	10	12 F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/8/30	分離(RD+)	-	-	-			発熱、頭痛、痙攣		
							分離(Vero9013+)								
33	11	1ヶ月 F	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/09/03	分離(-)	-	-	-				発熱	
					血清	2006/09/04					<10	<10			
					便	2006/09/04	分離(HeLa+)								
34	12	2 M	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/09/06	分離(RD+)	-	-	-			発熱、嘔吐、頭痛		
							分離(Echo30)								
35	13	11ヶ月 F	南部	急性脳炎	髄液	2006/09/07	分離(-)	-	-	-				発熱、下痢、麻痺、肺炎 循環不全	
					血清	2006/09/07					<10	<10			
					便	2006/09/07	分離(-)								
36	14	12 M	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/09/15	分離(-)	-	-	-			発熱、嘔吐、頭痛		
					血清	2006/09/15					40	20			
37	15	19 F	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/09/19	分離(-)	-	-	-			発熱		
38	16	7 M	中部	急性脳炎	血清	2006/10/05					<10	<10	発熱		
39	17	2ヶ月 M	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/10/05	分離(RD+)	-	-	-			発熱		
					血清	2006/10/05					<10	<10			
40	18	3 M	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2006/10/25	分離(RD+)	-	-	-			発熱		
41	2007	1	6 M	中部	急性脳炎	髄液	2007/04/11	分離(-)	-	-	-			発熱、嘔吐	
								分離(-)							
42	2	10 F	南部	急性脳炎	髄液	2007/04/20	分離(-)	-	-	-			発熱、頭痛		
43	3	6 M	中部	無菌性髄膜炎	髄液	2007/05/08	分離(-)	-	-	-			発熱、嘔吐、腹痛、上気道炎		
44	4	69 M	南部	急性脳炎	髄液	2007/06/13	分離(-)	-	-	-			発熱、意識障害、発疹		
45	5	19 F	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2007/07/14	分離(RD+)	-	-	-			発熱、嘔吐、頭痛		
							分離(Echo30)								
46	6	32 F	南部	無菌性髄膜炎	髄液	2007/07/14	分離(RD+)	-	-	-			発熱、嘔吐、頭痛		
47	7	26 F	中部	急性脳炎	髄液	2007/7/31	分離(-)	-	-	-			発熱、意識障害、痙攣		
48	8	59 M	南部	ヘルペス脳症	髄液	2007/08/31	分離(-)	-	-	-			意識障害		
49	9	12 M	北部	無菌性髄膜炎	髄液	2007/10/02	分離(-)	-	-	-			抗体検査によりレプトスピラ 症と判定		
					血清	2007/10/02	分離(-)				80	40			
50	10	76 M	宮古	無菌性髄膜炎	髄液	2007/10/12	量不足分離できず	-	-	-			発熱、意識障害		
					血清	2007/10/12	分離(-)				320	160			
51	11	80 M	宮古	急性脳炎	髄液	2007/12/11	分離(-)	-	-	-			発熱、意識障害		
					血清	2007/12/11	分離(-)				160	160			
					血清	2007/12/25					160	80			
52	12	62 F	宮古	急性脳炎	髄液	2007/12/12	分離(-)	-	-	-			発熱、意識障害		
					血清	2007/12/12	分離(-)				<10	<10			
					便	2007/12/14	分離(-)								
					血清	2008/01/10					<10	<10			

ボシク・傾斜は、急性脳炎事例

\*PCRの結果 Fla:フラビウイルス JE:日本脳炎ウイルス EV:エンテロウイルス