

エコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の流行 について

原田 誠三郎* 佐藤 宏康* 安部 真理子*
後藤 良一* 森田 盛大* 長沼 雄峰**

I 緒 言

1983年に全国各地¹⁾でEcho30型ウイルス(E-30)による無菌性髄膜炎の流行がみられた。

秋田県でも4月中旬から9月中旬にかけて無菌性髄膜炎の流行が発生し、ウイルス学的検索によって、本流行の病原ウイルスがE-30であることが明らかとなった。

本報では、本流行時における無菌性髄膜炎患者のウイルス学的検索および血清学的検査成績について報告する。

II 材料及方法

A. 被検材料

1. ウイルス分離材料

当所で実施している病原微生物定点観測病院で無菌性髄膜炎(49名)、急性咽頭炎(4名)および嘔吐症(1名)と臨床診断された患者から採取した分離材料(髄液34件、咽頭ぬぐい液28件、糞便11件)を用いた。

2. 被検血清

血清学的検査には、無菌性髄膜炎患者から得られたベア血清9例を用いた。また、血清疫学調査には、定点観測時に採取したE-30流行前(1982年, 150名)と流行後(1983年, 71名)の血清を用いた。

3. 免疫血清の作製

免疫血清の作製にはモルモットを用いた。すなわち、JINET細胞で培養したE-30標準株と同分離株の19132株の各ウイルス液を3000rpm10分間遠心し、その上清を2回フロロカーボン処理後、incomplete adjuvantと等量混合し、モルモットの両手足筋肉と背皮下に1mlずつ注射した。さらに、2週間後にウイルス液のみ同部位に注射した。採血は初めの免疫から約1カ月後に行ないそれを免疫血清とした。

なお、被検血清はいずれも使用時まで-20℃に保存した。

B. 実験方法

1. ウイルス分離

1%胎児コウシ血清(FCS)加維持MEM液1mlで液交換したJINET細胞培養チューブに分離材料(髄液、咽頭ぬぐい液)を0.2mlずつ接種した。また、糞便はウイルス保存液(SLEK)で約10倍懸濁液とした後、10,000rpm30分間遠心し、その上清を上記細胞に0.2ml接種するとともに1時間後に糞便中の毒性を除去するため新しい維持液と交換し、上記チューブと同様37℃の回転培養でウイルス分離を行なった。

2. 分離ウイルスの同定

分離ウイルスの同定は、Schmidtpool血清を用いてチューブ法²⁾に準じて行なった。さらに、E-30標準株と分離株19132の両抗血清を用いて確認した。細胞はいずれもJINETを使用した。

3. 中和試験

E-30標準株と分離株(19132株)に対する患者ベア血清と免疫血清の中和抗体価測定は、JINET細胞を用いてチューブ法²⁾に準じて行なった。

4. 血清疫学的調査

両ウイルスに対する8倍スクリーニング中和抗体価をマイクロタイター法²⁾に準じて行なった。

5. ブラック法

E-30標準株と分離株19132ウイルスのクローニングをブラック法により行なった。

すなわち、10%BS加MEMで調整されたJINET細胞液(1×10⁴/ml)6mlをシャーレ(60mm)に分注し、37℃の5%CO₂フラン器で4日間培養した。使用時にシャーレの培養液をピペットで吸引し、それに37℃に加温した0.2%FCSMEM5mlを加え1回洗浄後、MEMで希釈(10⁻¹~10⁻⁸)した両ウイルス液0.2mlを2枚のシャーレに接種し、37℃のCO₂フラン器で15分間ごとにテールテングを行ないながら60分間吸着させた。また、未吸着ウイルスを除くため同MEM液で1回洗浄後、一次重層液(Eagle'sMEM(×2)50ml, Glutamin(30mg/ml)1ml, 7%NaHCO₃1.2mlと1.6%Agar Noble

* 秋田県衛生科学研究所 ** 秋田組合総合病院小児科

(Difco)50ml, FCS2ml混合) 4ml重層し, 37°CのCO₂ フラン器で4日間培養した。二次重層は, 一次重層液へ neutral red(1:200)0.5mlを加えた液4mlを用いて行なった。ウイルスのクローニングは, 二次重層後2日目に行なった。

6. ブラック減少法 (50%)

無菌性髄膜炎患者のペア血清と免疫血清を用いて行なった。まず, 各希釈血清と1回クローニング後40~50PFU /0.2mlに調整された両ウイルス液をそれぞれ等量混合し, 37°Cで1時間反応後2枚のシャーレにそれぞれ0.2mlずつ接種し, 先のブラック法と同様に一次重層と二次重層を行ない, 培養後生じたブラック数を算定した。抗体価は, 対照に用いた8枚のシャーレ (使用ウイルスとMEM等量混合し, 0.2ml接種) のブラック数と比較し, 50%ブラック減少にあたる血清希釈倍数を作図により求め中和抗体価 (50%ブラック減少抗体価) とした。

III 成績

A. 秋田県における無菌性髄膜炎患者の月別, 地域別発生状況

秋田県微生物感染症発生状況速報にもとづき, 4月中旬から9月中旬までの期間に発生した無菌性髄膜炎患者を図1に示した。期間中の総患者発生数は76名であったが, ピークは31名発生した7月であった。また, 6月から8月までの3カ月間には全患者の約80%にあたる63

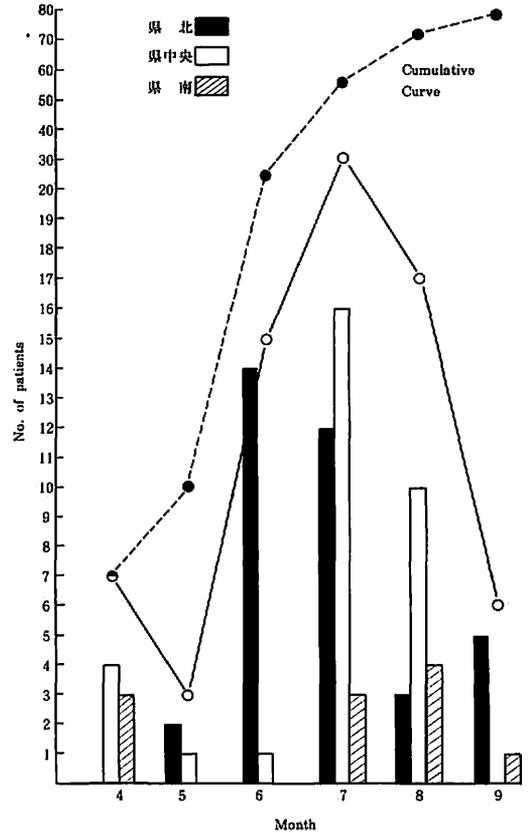


図1. 秋田県における無菌性髄膜炎患者の月別, 地域別発生状況

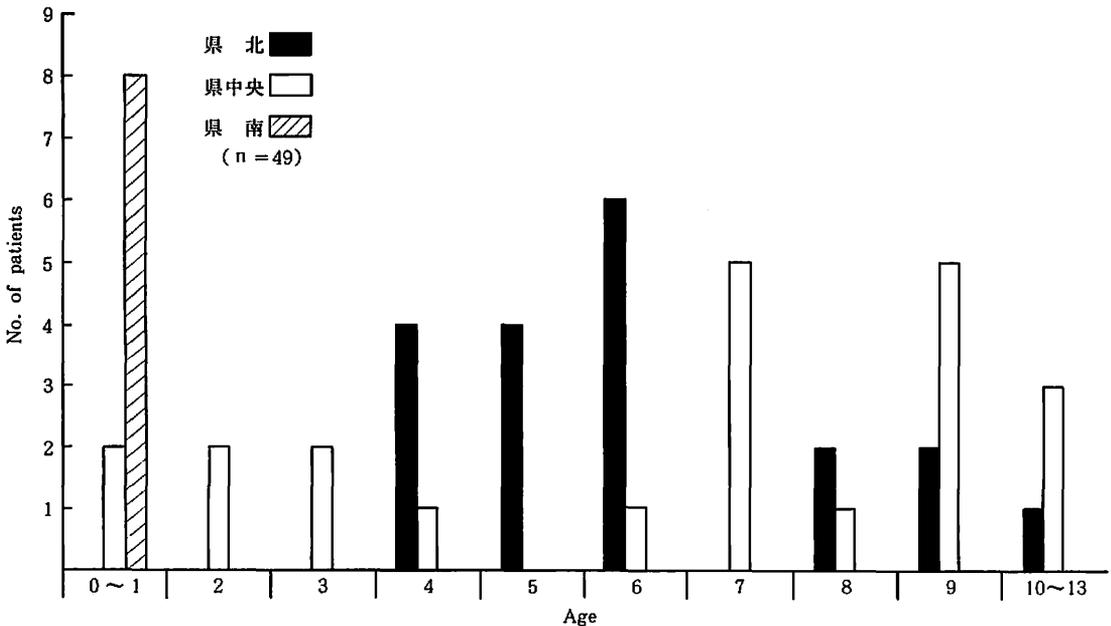


図2. ウイルス学的検索を行なった無菌性髄膜炎患者の地域別年齢別分布状況

名の患者が発生した。地域別にみると、県北地域が36 (45.5%)と最も多く、特に、6月には14名の発生があり、全県のピーク(7月)より1カ月早いピークを示した。また、中央地域では、10から16名の患者が発生した7月と8月を除くと、各月共0~4名の患者発生であったが、患者総数は32名(40.5%)であった。県南地域は11名(13.9%)と最も少なく、特に、5月と6月には患者発生はみられなかった。

B. ウイルス学的検索を行なった無菌性髄膜炎患者の地域別年齢別分布状況

ウイルス学的検索を行なった49名の患者の地域別年齢別分布を図2に示した。まず、患者数の最も多かった年齢は0~1才の10名(20.4%)であり、ついで6才と9才の各7名(14.3%)であった。大別すると、4~6才の幼稚園該当年令群が16名(32.7%)と最も多く、次いで、小学校低学年児の7~9才が15名(30.6%)であった。地域別にみると、中央の22名(44.9%)が最も多く、次いで、県北の19名(38.8%)、県南の8名(16.3%)であったが、県南の8名はいずれも0~1才児であった。

C. 無菌性髄膜炎患者の主症状

図3に患者の主症状を示したが、50%以上の患者が頭痛(94%)、嘔吐(63%)および咽頭発赤(65%)などの症状を示した。また、約80%の患者が38℃以上の発熱を示した。

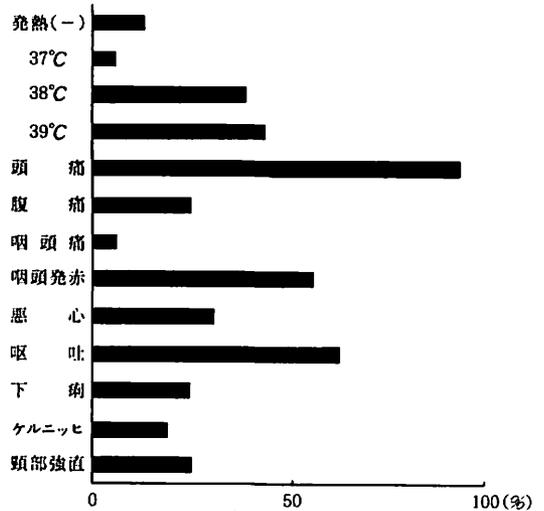


図3. 無菌性髄膜炎患者の主症状

D. 無菌性髄膜炎患者のウイルス学的および血清学的検査成績

無菌性髄膜炎と診断された患者についてウイルス分離を行なった結果、表1の如く、49名中11名(22.44%)からE-30が分離された。地域別にわけると、中央22名中9名(40.9%)、県北19名中1名(5.26%)および県南8名中1名(12.5%)であった。また、材料別にみる

表1. 無菌性髄膜炎患者のウイルス分離成績

月	ウイルス分離陽性患者数 / 被検患者数				ウイルス分離陽性材料数 / 被検材料数				分離株の同定成績
	県北	県中央	県南	合計	Th・Sw ※	St ※※	C・S・F ※※※	計	
6	0 / 2	2 / 2	0	2 / 4 (50%)	0 / 2	2 / 2	0 / 2	2 / 6 (33.33%)	すべてE-30
7	0 / 8	4 / 9	1 / 2	5 / 19 (26.3%)	4 / 10	4 / 7	0 / 14	8 / 31 (25.8%)	"
8	1 / 6	3 / 9	0 / 3	4 / 18 (22.2%)	5 / 14	0 / 1	0 / 10	5 / 25 (20%)	"
9	0 / 3	0 / 2	0 / 3	0 / 8 (0%)	0 / 2	0 / 1	0 / 8	0 / 11 (0%)	(-)
計	1 / 19 (5.26%)	9 / 22 (40.9%)	1 / 8 (12.5%)	11 / 49 (22.44%)	9 / 28 (32.14%)	6 / 11 (54.54%)	0 / 34 (0%)	15 / 73 (20.54%)	すべてE-30

※ Throat Swab ※※ Stool ※※※ Cerebrospinal fluid

と、リコールからは全く検出されなかったが、糞便からは54.5%、また、咽頭ぬぐい液からは32.14%の陽性率でウイルスが分離され、すべてE-30と同定された。E-30以外のウイルスは全く検出されなかった。なお、この期間中急性咽頭炎患者4名および嘔吐症患者1名の咽頭ぬぐい液5検体中5検体(100%)からE-30が分離された。これらの患者の内10名について血清学的検査を行なった結果、表2の如く、E-30の標準株に対して中和抗体価の有意上昇を示したのはペア血清の得られた9名

中5名(55.6%)であったが、分離株の19132株に対しては9名中7名(77.8%)が有意上昇を示した。また、E-30の分離されなかった表2以外の患者で、ペア血清の入手できた患者37名について血清学的検査を行なった結果、6名にE-30に対する中和抗体価の有意上昇が認められた。³⁾ これらの結果からウイルス学および血清学的検査を行なった無菌性髄膜炎患者86名中21名(24.4%)の病原がE-30と診断(2名は推定)された。

表2. 無菌性髄膜炎患者のウイルス学的及び血清学的検査成績

No	Name	Diagnosis	Age (Years)	Results of virus isolation test		Titers of neutralizing antibodies against prototype strain and isolate.		
				Materials	Results	Serum No (Days after onset)	Echo-30 Prototype str.	Isolate (19132)
1	G · O	Aseptic meningitis	7	St* + (Echovirus type30) Th** -		42715 (1) 43723 (45)	32 32	64 256
2	Y · S	"	7	St + (Echovirus type30) Th -		42748 (4) 43743 (25)	8 16	8 64
3	M · K	"	7	St + (Echovirus type30) Th + (Echovirus type30)		42751 (4) 43715 (11)	4 16	8 128
4	I · E	"	8	St + (Echovirus type30) Th + (Echovirus type30) CSF***-		42755 (2)	8	16
5	Y · M	"	7	St - Th -		42760 (2) 43728 (10)	4 16	4 32
6	Y · T	"	6	CSF -		42802 (6) 43748 (13)	16 16	64 64
7	T · Y	"	11, 2	Th -		42777 (2) 43739 (9)	4 4	4 8
8	A · S	"	6	ND		42763 (1) 43727 (20)	4 16	4 64
9	N · W	"	4	ND		42780 (1) 43732 (12)	4 32	4 64
10	G · S	"	4	ND		42779 (3) 43731 (9)	8 32	8 32

* Stool ** Throat swab *** Cerebrospinal fluid ND: not done

表3. 標準株と分離株の交叉中和試験

Virus	Antisera	Neutralization test		50% plaque reduction test	
		Echo-30	19132	Echo-30	19132
Echo-30 (Proto type)		256	24	94100	108090
19132 (Isolate)		48	96	10240	40960

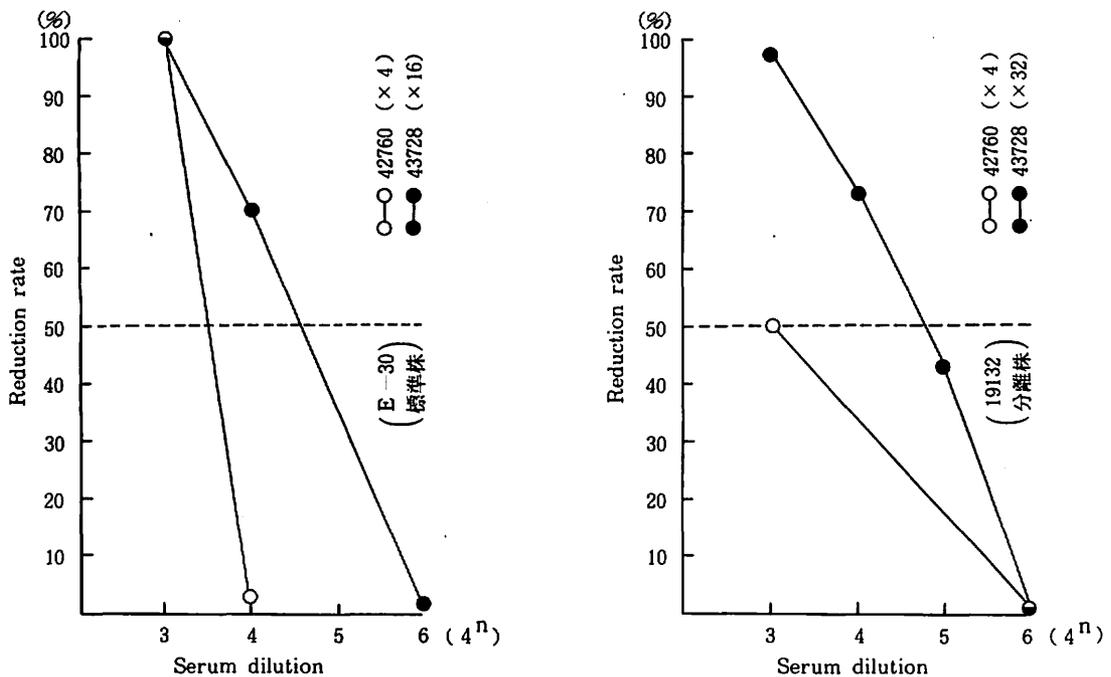


図4. ブラック減少法による患者ペア血清の中和抗体価測定成績

E. 標準株と分離株の交叉中和試験

まず、チューブ法による成績をみると、標準株と分離株との間における変異が観察された。すなわち、ホモウイルスに対して256倍の中和抗体価を示した抗標準株血清は分離株に対して約1/5の48倍の抗体価しか示さなかったし、また逆に、ホモウイルスに対して96倍であった抗分離株血清は標準株に対して1/4の24倍の抗体価しか示さなかった。

一方、50%ブラック減少法でみると、抗標準株血清は、チューブ法とほぼ同様に、分離株に対してホモウイルスの場合より約1/9低値の10240倍の抗体価を示した。しかし、抗分離株血清は、チューブ法の結果と異なり、ホモウイルスに対する抗体価の方が標準株を用いた時よりも約1/2.6倍低値の抗体価を示したことから、現在、再実験をすすめている。

F. 50%ブラック減少法による患者ペア血清の中和抗体価測定成績

上述の如く、標準株と分離株との間に抗原変異が観察されたことから、チューブ法で患者ペア血清の中和抗体価を測定すると共に、50%ブラック減少法による抗体価を測定して比較してみた。その結果が図4である。No.42

760 (2病日血清) とNo.43728 (10病日血清) のペア血清の場合、チューブ法では標準株に対し、 $\times 4$ と $\times 16$ また、分離株に対して $\times 4$ と $\times 32$ であり、その上昇比 (No.43728の抗体価/No.42760の抗体価) は分離株に対しての方が2倍高かった。これに対して、50%ブラック減少法では標準株に対して $\times 4^{3.5}$ ($\times 128$) と $\times 4^{4.57}$ ($\times 564$)、また、分離株に対して $\times 4^{3.0}$ ($\times 64$) と $\times 4^{4.77}$ ($\times 744$) であり、チューブ法と同様に、分離株に対する上昇比の方が1.3倍高かった。

G. 流行前後におけるE-30中和抗体保有状況の変動

流行前の1982年におけるE-30標準株と分離株に対する中和抗体保有状況をみたのが図5である。標準株に対する抗体保有率は、きわめて低率で、2才〜3才群と7才以上に約3%の抗体保有がみられたにすぎなかった。また、分離株に対しても9才まで全く抗体が検出されず、10才以上の年齢でわずか6%に抗体が検出された程度であった。

一方、流行後の1983年では、図6の如く、流行前(1982年)に比較して、各年齢群共標準株に対して20~60%の高い中和抗体保有率を示し、特に、2~3才群が60%と最も高かった。

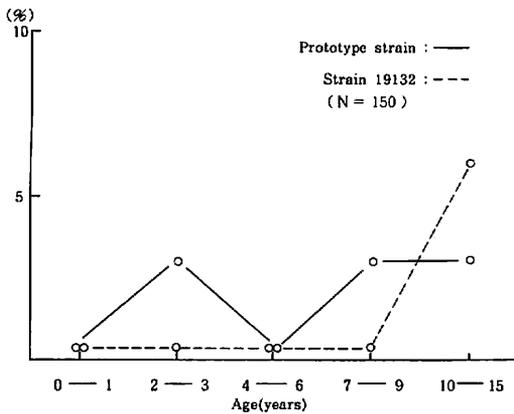


図5. 標準株と分離株(19132)に対する中和抗体保有状況(8倍スクリーニング)

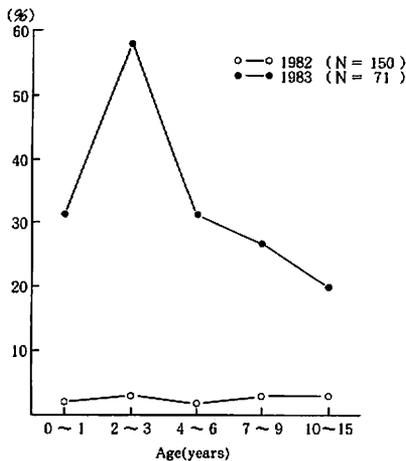


図6. E-30ウイルス流行後の中和抗体保有状況(8倍スクリーニング)

IV 考 察

4月中旬から9月中旬までに発生した無菌性髄膜炎患者は県内で総計79名に達した。そして分離陽性数の多少はあったものの県内各地域でE-30が分離された。この背景には、流行前後の中和抗体保有変動からも明らかのように、2~3才を中心とした広範囲の年齢域におけるE-30の活発な侵襲があったものと考えられる。しかし、4~9月の秋田県感染症サーベイランス情報による無菌性髄膜炎の罹患年齢分布をみると、年齢域は1才以下から14才と広範囲であったが、最も高率な分布率を示したのは5~9才の56.2%であり、これに対して抗体保有率

の最も上昇した2~3才を含む1~4才の罹患年齢分布は31.5%であったことから、抗体保有率の最も上昇した年齢群と一致しなかった。その成因については、現段階では説明するに至っていない。

次に、患者ペア血清についてチューブ法で中和抗体価を測定してみると、標準株よりも分離株を用いた場合に、有意上昇例が多くみられたこと、および、標準株よりも分離株に対して高い中和抗体価を示したことから、抗原変異の可能性が示唆されたので、免疫血清を用いて交叉中和試験を行ってみた。その結果、今回の流行株は標準株と比較して、抗原構造が若干異なっている可能性の強いことがわかった。このことから、我々はこの抗原変異の程度を更に明らかにするため現在実験をすすめているが、これらについては次号で報告する考えである。

V 総 括

1983年4月中旬から9月中旬にかけて、秋田県内に無菌性髄膜炎の流行がみられ、それらについてウイルス学および血清学的検査を行なった結果、以下の成績を得た。

- 1) 期間中の無菌性髄膜炎患者数は79名であった。
- 2) 同疾患の主病原ウイルスは、E-30であった。また、咽頭ぬぐい液9株と糞便6株の計15株が分離されたが、すべてE-30であった。
- 3) 今回の分離株は、E-30標準株と比較して抗原構造が若干異なっていることがわかった。

なお、本文の要旨は昭和58年9月第37回日本細菌学会東北支部総会(福島市)で発表した。

文 献

- 1) 厚生省公衆衛生局保健情報課, 国立予防衛生研究所: 病原微生物検出情報(月報), 第44号, 15-16, (1983)
- 2) 甲野礼作たち: 臨床ウイルス学手技篇, 講談社, 東京, 45-49, (1978)
- 3) 安部真理子たち, 投稿中