



## 急性中枢神経疾患と病原ウイルス診断

福島県立医科大学医学部 小児科学講師 細矢光亮

### はじめに

ウイルス感染が直接の原因となる中枢神経疾患には髄膜炎と脳炎がある。また、ウイルス感染が関連して発症する中枢神経疾患には脳症がある。これらの病態にかかわるウイルスとしては、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型、アデノウイルス、エンテロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ムンプスウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルスなどがある。ウイルスにより起こしやすい病態が異なり、また、ウイルスの流行に季節性があるため、病態と発症時期から原因ウイルスの推定がある程度可能である。本稿では、ウイルス感染症の一般的な診断方法と分子生物学的な手法を用いた診断方法を述べ、それぞれの病態の病原診断に応用した成績を紹介した。

### I. ウイルス感染症の診断方法

#### 1. ウイルス分離

ウイルスの分離方法には、組織培養法、鶏卵培養法、小動物（マウス）を用いた分離法などがある。組織培養には、HeLa細胞、Hep2細胞、Vero細胞、RD細胞、MDCK細胞などの継代細胞を用いる。これらの細胞により、コクサッキーウイルスA群以外のエンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、RSウイルスなどの分離が可能である。麻疹ウイルスの野生株を分離するには、B95a細胞やVero/hSLAM細胞

等の特殊な細胞が必要である。水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、ライノウイルスは、ヒト胎児由来の細胞により分離されるが、このような細胞は現在ほとんど使用されていない。発育鶏卵は、インフルエンザウイルスや単純ヘルペスウイルスの分離に用いられる。しかし、これらのウイルスは培養細胞で分離できるため、使われる頻度は減少している。乳のみマウスはコクサッキーウイルスA群や日本脳炎ウイルスの分離に用いられる。動物保護の観点から、ウイルス分離にマウスを用いることも少なくなってきた。

分離されるウイルスは、分離方法や用いる細胞の種類により決定されるので、目的とするウイルスを明らかにしておくことが大切である。

#### 2. 血清学的診断

特異的IgM抗体の検出か、ペア血清における特異抗体の有意な上昇によって感染が証明される。抗体検出法にはELISA法、NT法、HI法、CF法などがあり、目的とする感染症の種類に合わせて選択する。臨床症状や周囲における流行状況から病原体が推定できる場合にはその確認に適している。しかし、原因が推定できない場合やエンテロウイルスのように多数の血清型が存在する場合には有用とは言えない。

#### 3. 抗原検出法

インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ロタウイルスなどに対する抗原検出キットが数多く販売されている。現在市販されているものの多くは免疫クロマトグラフィー法を反応原理としており、検出感度・特異度ともに優れている。したがって、一般臨床において病原診断に使用するには問題ない。しかし、中枢神経感染症の病原診断に

おいては、咽頭拭い液などにウイルス抗原が証明された場合でも、ウイルス分離法や血清診断などで当該ウイルスの感染を確認することが望ましい。

#### 4. PCR 法

PCR法は目的とする遺伝子を増幅して検出する方法で、検出感度も優れており、ウイルス感染症の診断に広く応用されている。ヘルペス脳炎の場合、組織培養によるウイルス分離法では髄液中にウイルスを検出するのは困難である。このため、確定診断は脳生検材料に単純ヘルペスウイルスを証明することによって行われていた。PCR法の検出感度は高く、ウイルスが分離されない髄液においてもヘルペスウイルス遺伝子の検出が可能になった。現在、PCR法がヘルペス脳炎診断のスタンダードである。

エンテロウイルスには60種類以上の血清型が存在するため、それぞれの血清型に対するプライマーを作ることは困難であった。しかし、エンテロウイルス属に共通する遺伝子配列にプライマーを設定することにより、エンテロウイルスを広く検出できるようになった<sup>1)</sup>。PCR法は、組織培養法では分離の困難なコクサッキーウイルスA群の検出には特に有効である<sup>2)</sup>。エンテロウイルスによる髄膜炎は、新生児期の感染を除き比較的軽症であり、後遺症を残すこともまれである。したがって、エンテロウイルス髄膜炎を積極的に診断することは、過剰な医療行為を削減するうえからも重要である。近年、PCR法により増幅したウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子系統解析によりエンテロウイルスの遺伝子型(血清型)の同定ができるようになった<sup>3)</sup>。さらにこの方法は、分子疫学的解析への応用が可能である。このように、PCR法はウイルスの検出・同定法として優れているが、あくまでも遺伝子の一部を増幅するものであり、遺伝子情報のすべてを得ることができるものではないので、ウイルス分離を併用してウイルスを保存することが望ましい。

## II. 中枢神経疾患における病原ウイルス診断

### 1. ウイルス性髄膜炎

無菌性髄膜炎は、髄膜刺激徴候があり、髄液中に単核球優位の細胞増多を認め、病原細菌が検出され

ない病態である。その多くはウイルス感染症と考えられているが、通常のウイルス分離法による病原ウイルスの検出は満足いくものではない。1991～1994年にかけては、全国的にも髄膜炎の大きな流行はなかった期間である。この期間に福島県内において無菌性髄膜炎45例より髄液検体を採取し、組織培養法でウイルス分離を行ったところ、分離されたのはエンテロウイルスが3株のみであった。中枢神経系に親和性があると考えられるエンテロウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型に対するPCR法を確立し、無菌性髄膜炎の病原診断を行った<sup>4)</sup>。その結果、エンテロウイルスを25検体に、ムンプスウイルスを14検体に、水痘帯状疱疹ウイルスとサイトメガロウイルスをそれぞれ1検体に検出した(図1)。すなわち、45検体中41検体、91.1%にウイルス遺伝子を検出した。検出時期をみると、ムンプスウイルスは年間を通して検出されるのに対し、エンテロウイルスは6～12月に集中した。1997年6～12月にかけて、福島県南部においてエコーウイルス30型による髄膜炎の流行があった。126名より髄液検体を採取し、組織培養法により66検体、52.4%よりエコーウイルス30型を分離した。先ほどと同様にPCR法を行うと、エンテロウイルスを118検体に、ムンプスウイルスを2検体に検出した(図2)。すなわち、126検体中120検体、95.2%にウイルス遺伝子を検出した<sup>5)</sup>。

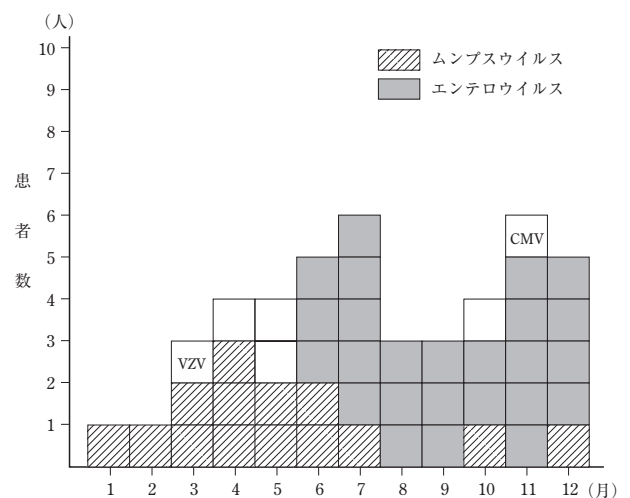


図1 無菌性髄膜炎患者髄液からのウイルス遺伝子の検出(1991～1994年、非流行期)

この非流行期と流行期の調査から、無菌性髄膜炎の多くはウイルスが原因であること、初夏から秋にみられる髄膜炎の多くがエンテロウイルスによること、ムンプスウイルス髄膜炎は年間を通してみられることが明らかになった。国立感染症研究所感染症情報センターの出す感染症発生動向調査をみると、無菌性髄膜炎の発生は1年を通してみられるが、初夏から秋にかけて一峰性のピークがあるのがわかる。ムンプスワクチン接種率が低いわが国においては、エンテロウイルスだけでなくムンプスウイルスも無菌性髄膜炎の原因になっているため、このような発生動向を示すことになる。したがって、ウイルス性髄膜炎の病原診断においては、夏季の発生であればまずエンテロウイルスを疑いウイルス分離やPCR法による検出を試み、エンテロウイルスが検出されない場合やエンテロウイルスの流行シーズン以外の場合にはムンプスウイルスを疑い検出を試みる。両ウイルスが検出されない場合には、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルスなどを調べる必要があるだろう。

## 2. 急性脳炎

急性脳炎の原因としては、単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、アルボウイルスなどがある。現在ウイルス性脳炎の中で原因療法が可能なの

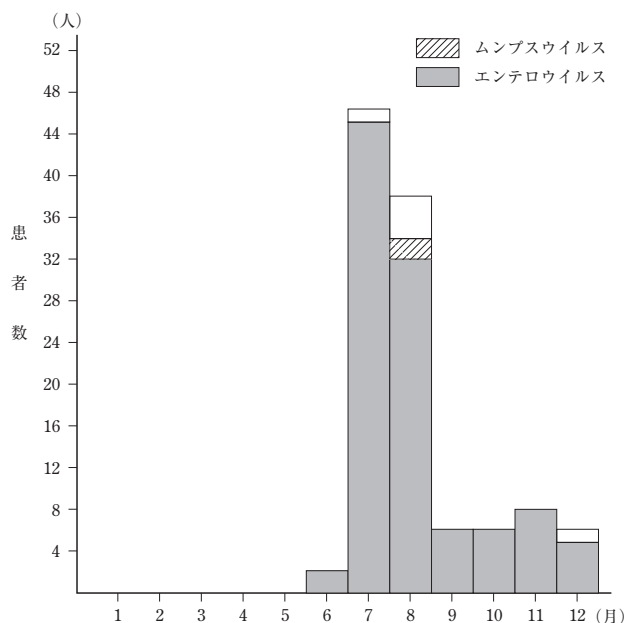


図2 無菌性髄膜炎患者髄液からのウイルス遺伝子の検出 (1997年, 流行期)

は、ヘルペス脳炎のみであるので、急性脳炎と診断した場合には、まずヘルペス感染症の有無を検索する必要がある。しかし、髄液よりヘルペスウイルスが分離される頻度は低い。PCR法はヘルペスウイルス遺伝子検出に有効であるが、PCR法の制度管理と迅速に結果を得られるシステムの構築が望まれる。米国における脳炎の発症は年間約2,500例あり、そのうち原因がエンテロウイルスと特定されるのは約2%である。しかし、患者発生の季節性や、米国で多いアルボウイルスの流行状況を勘案すると、年間500~1,000例がエンテロウイルスに起因すると推定されている。Huangら<sup>6)</sup>がPCR法を用いて41例の脳炎患者において病原診断を行った報告では、単純ヘルペスウイルスが5例、12%であるのに対して、エンテロウイルスが3例、7%であったとしている。われわれが急性脳炎/脳症16例でPCR法を用いてウイルス遺伝子検索を行ったところ、2検体(12.5%)よりエンテロウイルス遺伝子を検出した。これらの結果は、急性脳炎においてもエンテロウイルス感染症の占める頻度がかかなり高いことを示唆している。急性脳炎ではまずヘルペスウイルス感染症の有無を調べ、それが否定された場合、特に夏季に発症した場合には、エンテロウイルスや日本脳炎ウイルスを念頭に検査を進める必要がある。

## 3. 急性脳症

急性脳症は、多くは発熱で発症し、遷延する痙攣や意識障害などの中枢神経症状を呈する。画像上はびまん性の脳浮腫を主体とする病変を示し、病理学的には細胞浸潤などの炎症反応が乏しい病態である。すなわち、発症にウイルス感染症が関与するが、中枢神経組織への直接の感染はないと考えられている。急性脳症を引き起こす感染症としては、インフルエンザとヒトヘルペスウイルス6型の頻度が高い。福島県において発症した急性脳炎/脳症105例の原因を後方視的に調査したところ、やはりインフルエンザと突発性発疹の頻度が高かった<sup>7)</sup>。これらのウイルス感染が、急性脳症の病態にどのようにかかわっているのか、まだ完全には解明されていない。インフルエンザ脳症では、病理学的に中枢神経系を含む全身の臓器において血管の破綻があり、血漿成分の漏出と血管内血栓が認められている。ま

た、高サイトカイン血症の存在が示されており、これが血管の破綻に関与すると推測されている。急性脳症の発症にかかわるウイルスとしては、インフルエンザウイルスやヒトヘルペスウイルス6型以外にも、麻疹ウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスなどがあげられる。急性期には髄液、咽頭拭い液、直腸拭い液、血清などを採取・保存しておき、ウイルス分離法、PCR法、血清学的診断法などにより、病原を確定する努力が必要である。

### おわりに

PCR法の導入により、髄膜炎や脳炎の病原診断がかなり高率になされるようになった。われわれの成績では、髄膜炎の90%以上で病原診断が可能であった。しかし、いかに高い感度の検出方法であっても、検体の採取時期や保存方法を誤れば検出は困難となる。病原診断の確率を向上させるためには、病初期の検体を確実に採取し、保存しておくことが重要であり、それが病原診断の生命線である。

### 文 献

- 1) Zoll G.J., Melcher W.J.G., and Kopecka H., et al.: General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enterovirus: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* **30**: 160-165, 1992.
- 2) Hosoya M., Ishiko H., and Shimada Y., et al.: Diagnosis of group A coxsackieviral infection using polymerase chain reaction. *Arch Dis Child* **87**: 316-319, 2002.
- 3) Ishiko H., Shimada Y., and Yanaha M., et al.: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* **185**: 744-754, 2002.
- 4) Hosoya M., Honzumi K., and Sato M., et al.: Application of PCR for various neurotropic viruses on the diagnosis of viral meningitis. *J Clin Virol* **11**: 117-124, 1998.
- 5) Hosoya M., Sato M., and Honzumi K., et al.: Application of polymerase reaction and subsequent phylogenetic analysis to the diagnosis of enteroviral infection in the central nervous system. *J Clin Virol* **25**: S27-38, 2002.
- 6) Huang C., Chatterjee N.K., Grady L.J.: Diagnosis of viral infections of the central nervous system. *N Engle J Med* **340**: 483-484, 1999.
- 7) 川崎幸彦, 細矢光亮, 永井真紀, 他: 福島県下における小児期発症急性脳炎・脳症 105 例の疫学的臨床的検討. *日本小児科学会雑誌*, **105** (6): 695-702, 2001.