

原 著

(東女医大誌 第63巻 臨時増刊号)
頁 243~250 平成5年10月)

軽症下痢に伴う痙攣を呈した患児髄液からの RT-PCR 法によるロタウイルスの検出について

東京女子医科大学 小児科 (主任: 福山幸夫教授)

¹⁾国立公衆衛生院衛生微生物学部 (主任: 牛島廣治部長)²⁾帝京大学医学部小児科 (主任: 阿部敏明教授)

ニシムラ	ツトム	クヤマ	ノボル	コンドウ	エリ	イシイ	ノゾミ
西村	敏	久山	登	近藤	恵里	石井	のぞみ
サイ	シンメイ	タナカ	テルユキ	セキ	チナツ	オグニ	ヒロカズ
崔	信明	田中	輝幸	関	千夏	小国	弘量
オオサワ	マキコ	フクヤマ	ユキオ	ウシジマ	ヒロシ	ニシムラ	シュウイチ
大澤	真木子	福山	幸夫	牛島	廣治 ¹⁾	西村	修 ¹⁾²⁾

(受付 平成5年6月23日)

Detection of Rotavirus in Cerebrospinal Fluid in Patients with Convulsions and Gastroenterocolitis by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Tsutomu NISHIMURA, Noboru KUYAMA, Eri KONDO, Nozomi ISHII, Shinmei SAI, Teruyuki TANAKA, Chinatsu SEKI, Hirokazu OGUNI, Makiko OSAWA, Yukio FUKUYAMA, Hiroshi USHIJIMA¹⁾ and Shuichi NISHIMURA¹⁾²⁾

Department of Pediatrics (Director: Prof. Yukio FUKUYAMA),
Tokyo Women's Medical College

¹⁾Department of Microbiology (Director: Dr. Hiroshi USHIJIMA), Institute of Public Health²⁾Department of Pediatrics (Director: Prof. Toshiaki ABE) Teikyo University School of Medicine

Rotaviruses are the major causative viruses of gastroenteritis in infancy, but few reports have described these viruses in relation to the central nervous system. Infants are also liable to develop a variety of convulsive disorders. Although it is generally known that mild diarrhea, mainly caused by rotaviruses, is sometimes accompanied by convulsions, there has been no established hypothesis to explain this phenomenon. We used the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method to detect rotaviruses in the cerebrospinal fluid of 6 children (rotavirus-positive in fecal tests) with convulsions accompanied by mild diarrhea who were admitted to the Pediatric Department of Tokyo Women's Medical College between January and March, 1992. The specimens of cerebrospinal fluid were collected from 2 patients in the acute and convalescent phases and 4 patients in the acute phase. Five of the 6 patients in the acute phase had positive reactions, while 2 patients in the convalescent phase were negative.

This study is the first to indicate that rotaviruses may infiltrate into the central nervous system in the acute stage of disease in infants who have convulsions with so-called "mild diarrhea" unassociated with meningitis or encephalitis.

はじめに

乳幼児期は、各種の痙攣性疾患に罹患しやすい。
乳幼児期に起こりやすい痙攣には、熱性痙攣や、

福山の提唱した良性乳児痙攣¹⁾等、予後良好で本
来てんかんと区別されるものも多く、諸岡が提唱
した軽症下痢に伴う痙攣²⁾もいわゆる良性乳児痙

表 症例概要および結果

症例	年齢	性別	家族歴	既往歴	最高体温(℃)	痙攣型	痙攣回数	処置	便スクリーニング*	RT-PCR		髄液所見			
										便	血清	髄液	細胞数	(L:N)	蛋白(g/dl)
1	1y1m	M	(-)	(-)	39.4	GTS	2	(-)	(-)	+	+	3/3	3:0	18	66
2	1y9m	F	(-)	(-)	無熱	GTCS	2	(-)	(+)	-	+	8/3	6:2	21	61
3	1y11m	M	(-)	(-)	38.7	GTCS	3	DZP(0.5mg/kg 坐) ⇒リドカイン**	(-)	-	+	6/3	6:0	25	87
4	1y11m	F	(-)	7mよりGTS群発入院まで7回	39.6	GTS	14	DZP (0.4mg/kg iv)	(+)	ND	+	10/3	5:5	20	79
5	3y2m	M	父方いここにFCの既往あり	(-)	39.8	GTCS	11	DZP 0.5mg/kg po ⇒0.4mg/kg 坐 ⇒0.3mg/kg iv ⇒リドカイン**	(+)	+	+	2/3	2:0	28	71
6	1y9m	F	(-)	(-)	無熱	GTS ⇒ rt. hemi.	1	(-)	(+)	ND	-	2/3	1:1	21	39

FC: 熱性けいれん, GTS: 全身強直発作, GTCS: 全身強直間代発作, rt. hemi: 右半身けいれん, DZP: ジアゼパム, 坐: 坐薬, iv: 静注, po: 経口, ND: 施行せず, *: セロダイレク
ト米研ロタ®, [] 回復期の結果, **: 持続点滴

痙攣の基本概念と相通じるものがある。最近、熱性痙攣患児の髄液中より突発性発疹の起因ウイルスであるヒトヘルペスウイルス6が polymerase chain reaction (PCR) 法にて陽性を示したとの報告³⁾⁴⁾が相次ぎ話題になっている。今回我々は昨冬当科に入院したいわゆる軽症下痢に伴う痙攣を認めた患児の髄液を reverse transcription PCR (RT-PCR) 法で検索し、ロタウイルスの存在を証明し得たので、若干の文献的考察とともに報告する。

対象および方法

1. 対象症例

東京女子医科大学病院小児科に1992年1月から1992年3月までに入院した痙攣を伴った軽症下痢症の患児6例である(表)。

年齢は1歳1カ月から3歳2カ月の乳幼児で男、女各3例で男女比は1:1であった。

家族歴では症例5のいところに熱性痙攣を認めたが、その他にはてんかん、熱性痙攣等神経疾患の家族歴は認めなかった。

既往歴では症例4が7カ月より全身強直発作(GTS)の群発を本入院までに7回起こしており、他院にて経過観察中である以外全て初発の痙攣発作であった。また、精神運動発達遅滞はなかった。

痙攣発作時に体温が常に38℃以上であったのは症例3のみで、他は37℃台や全くの無熱時に痙攣を認めたものもあった。

痙攣の型および回数は、症例1~5はGTS、全身強直間代発作(GTCS)が2~14回群発した。症例6のみ3分半のGTSに続き、1分半の右半身性間代痙攣を認めた。

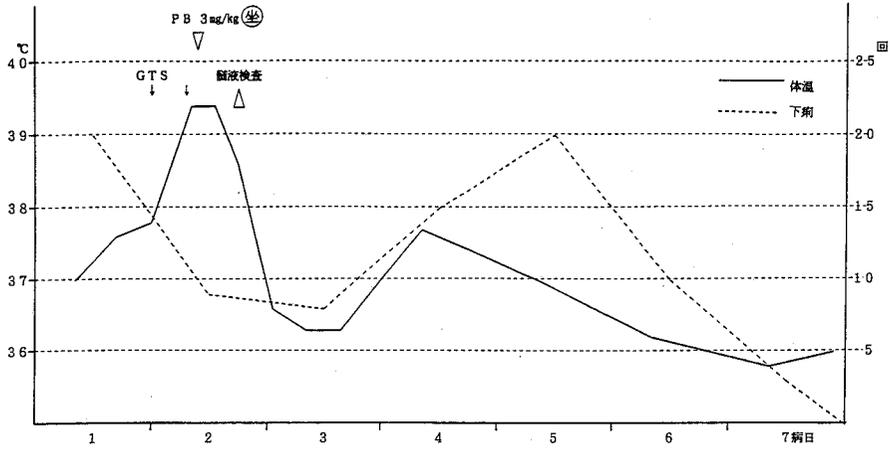
処置は、個々の発作を停止させる救急処置としてではなく、反復する発作の群発を頓挫させる目的で行われたが、無処置で止まったもの3例、ジアゼパム(DZP)投与で止まったもの1例、リドカインの点滴静注を必要としたもの2例であった。

以下、症例について簡単な経過を示す(図1)。

1) 症例1: 1歳1カ月男児

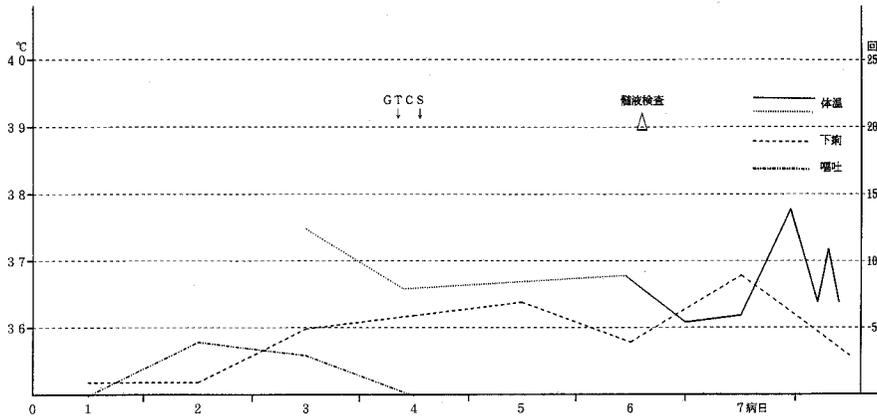
2歳の姉が気管支喘息である以外、家族歴・既往歴に特記すべきことなし。数日の感冒様症状後、

症例 1



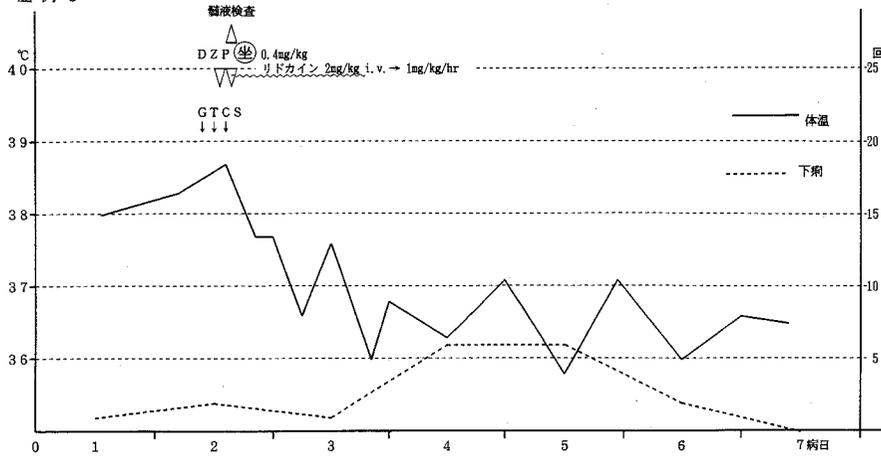
a

症例 2



b

症例 3



c

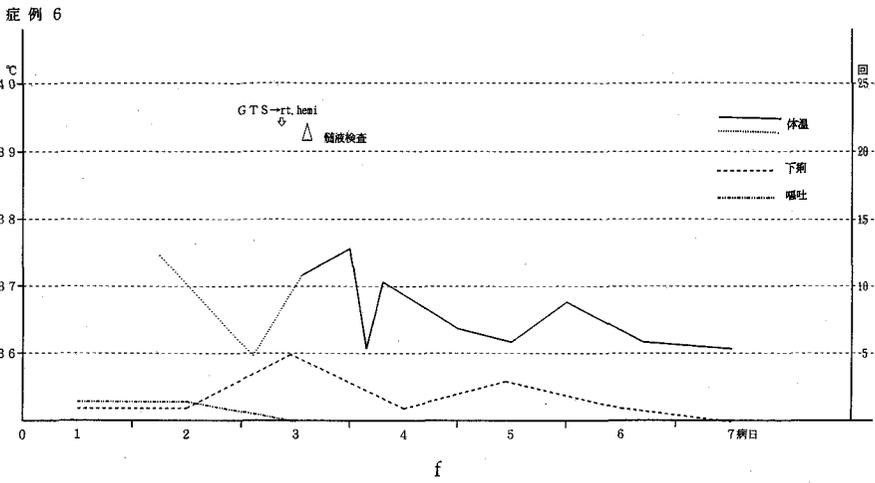
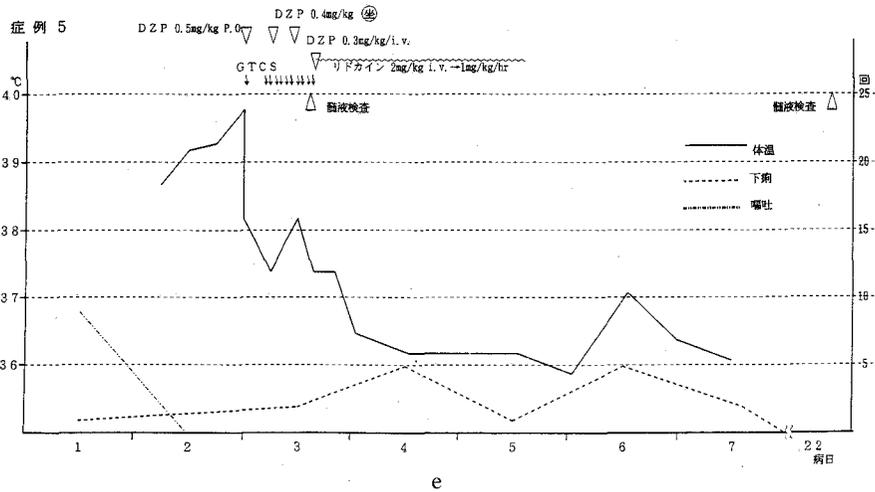
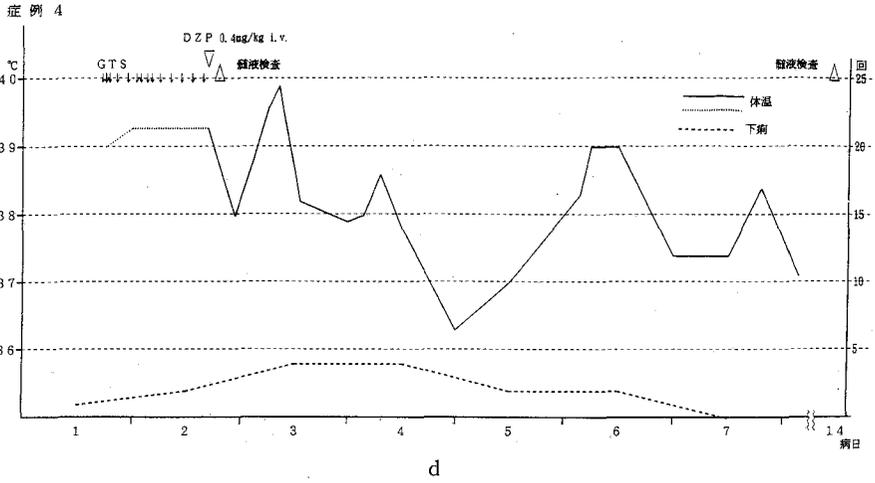


図1 各症例の経過表

37℃台の発熱とともに黄白色の水様性下痢が頻回（約9時間の間に20回前後）に認められ、下痢開始後約17時間後に37.8℃で約1分のGTSを認め近医受診、経過観察とされる。その約3時間後39.4℃にて再び約2分のGTSを起し紹介入院となった。入院時、神経学的に異常は認められなかったが、軽度脱水を認めたため点滴補液等施行した。臨床症状の改善を待って退院としたが、入院後痙攣は一度も見られなかった。従って、抗痙攣剤は2回目の痙攣直後に近医でフェノバルビタール坐剤3mg/kgが1回投与されたのみである。入院時の脳波所見では軽度の徐波の混入は認めたが突発性異常波等は認めなかった。なお、本例では第2および第5病日に施行した糞便ロタ・スクリーニングがいずれも陰性であった。しかし、同一検体におけるRT-PCRは陽性を示した。

2) 症例2：1歳9カ月女児

家族歴・既往歴に特記すべきことなし。黄色水様性下痢を認めた翌日、数回の嘔吐および下痢とともに37℃台の発熱を認めた。第4病日、無熱時に約2時間の間隔をおいて、各々約1分のGTCSを2回認めたため、第6病日に精査目的で当科紹介入院となった。入院時、軽度脱水症状は認めたものの神経学的に異常は認めず、抗痙攣剤も投与せず点滴補液等にて脱水及び胃腸炎の症状も軽快したため、第10病日退院となった。なお、第6病日に施行した脳波所見では基礎波の軽度徐波化を認めたが、突発性異常波等は認めなかった。

3) 症例3：1歳11カ月女児

家族歴・既往歴に特記すべきことなし。38℃の発熱とともに黄色の下痢を認めた約24時間後、約2～3分のGTCSを認め来院、診察時にも約2分30秒のGTCSを来したため入院となった。この間も38℃台の発熱、黄色水様便は持続した。DZP坐剤0.42mg/kg使用後約1時間30分経て、再びGTCSを認めたため、リドカイン2mg/kg静注後1.0mg/kg/hで持続点滴施行した。その後は痙攣の再発をみず、第3病日には解熱し、入院時認めていた軽度の脱水や第4病日には1日6回とピークを向かえていた下痢も点滴補液等で軽快したので第7病日には退院となった。神経学的異常も認

めなかった。脳波上、軽度の徐波の混入は認めしたが、突発性異常波等は認めなかった。糞便ロタ・スクリーニングは第2および第6病日に施行したが、いずれも陰性であった。しかし、同一検体におけるRT-PCRは陽性を示した。

4) 症例4：1歳11カ月女児

家族歴に特記すべきことなし。既往歴：満期正常分娩。定顎3カ月、座位保持可能7カ月、独歩可能1歳、笑顔2カ月、入院時単語3語。7カ月時、GTSの群発を起し、他院で脳波上左前頭葉限局性棘波を指摘され、持続的抗痙攣剤投与を受けていた。本入院までに計7回群発を起こした。下痢や発熱を伴うものもあった。いずれも1～2日の経過で発作消失したとのことであった。1歳10カ月時の最後の群発以降は38℃以上でも発作は起こさなかったが、それ以前はすべて群発に繋がったとのことである。今回は、39℃の発熱とともに1分間のGTSを認め近医受診、下痢も始まり、その後も発作が24時間に13回起きたため当科紹介入院となった。入院後も発作を認め、DZP 0.43mg/kg静注以後発作の再発を認めなかった。解熱し、下痢も治まり、全身状態改善したため、第15病日に退院した。入院時のCTでは異常は認められなかった。第14病日の脳波所見では突発性異常波や徐波化は認めなかった。津守・稲毛式発達検査ではDQ=95であった。回復期の第14病日にも髄液検査施行した。

5) 症例5：3歳2カ月男児

父方のいところに熱性痙攣の既往のある者が1名いる以外、家族歴、既往歴に特記すべきことなし。食欲低下、腹痛とともに頻回の嘔吐、続いて水様性下痢を認め、翌日38℃台に発熱、近医にて加療を受けたが、夕方には39℃台となった。午前3時39.8℃で3分間のGTCSを認め、当院救急外来受診し、DZPシロップ0.5mg/kgを処方された。午前7時以降再び10秒から1分のGTCSが群発し外来受診、DZP 0.4mg/kg坐剤使用後入院となった。入院後もGTCS認めたためDZP 0.3mg/kg静注した。しかし、再びGTCSくり返したためリドカイン2mg/kg静注後1mg/kg/h持続点滴施行した。その後発作を認めず、髄膜炎、脳炎・脳症

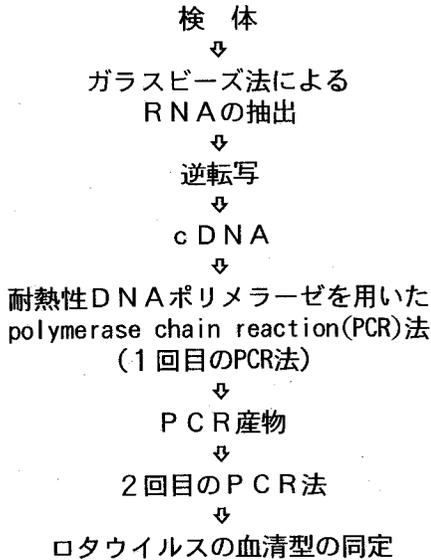


図2a RT-PCR法の概略

使用したオリゴヌクレオチドプライマー(文献5~7)

1. sense

- 1) Beg9(5'-GGCTTTAAAGAGAGAATTCCGTCCTGG-3')
- 2) aAT8(5'-GTCACACCATTGTAAATTCG-3')
- 3) aBT1(5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3')
- 4) aCT2(5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTC-3')
- 5) aDT4(5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3')
- 6) aET3(5'-CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG-3')
- 7) aFT9(5'-CTAGATGTAACACTACAACACTAC-3')

2. anti-sense

End9(5'-GGTCACATCATACAATTCTAACTAAG-3')

図2b RT-PCR法に使用したプライマー

等否定され、全身状態改善したため12日後に退院した。第5病日の脳波検査所見では、突発性異常波も徐波化も認めなかった。回復期である第22病日にも髄液検査施行した。

6) 症例6：1歳9カ月女児

家族歴・既往歴に特記すべきことなし。感冒様症状とともに黄白色水様性下痢と嘔吐出現。第3病日に保育園で昼食後無熱性に約3分30秒のGTSおよび約1分30秒の右半身性間代性痙攣を認め当科入院。入院時、意識清明、神経学的所見に異常なく、脳波所見等でも異常を認めなかった。抗痙攣剤を使用しなかったが痙攣の再発をみず、

また、胃腸炎も軽快したので第8病日に退院となった。

2. RT-PCR法によるウイルス検査法

検体からのロタウイルス検出は、Gouveaら⁵⁾の方法に準じ⁶⁾、まず検体よりロタウイルスのRNAを抽出し、逆転写して相補的DNAを作った。1回目のPCRはロタウイルス共通のBeg9とEnd9のプライマーを用い、2回目のPCRは血清型特異的プライマー混合(aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9)とEnd9を用いた。血清型は増幅されるPCR産物の分子量の違いによるアガロースゲル電気泳動型で同定される(図2a, b)。

対照にはサイトメガロウイルス感染症の患者(5例)の髄液を使用し陰性を示した。

また、糞便中ロタウイルスのスクリーニングには、逆受身ラテックス凝集反応であるセロダイレクト栄研ロタ[®]を使用した。

結 果

髄液中のRT-PCRの結果は急性期では症例6以外すべて陽性を示し、回復期は検索し得た2例(症例4：第14病日、症例5：第22病日)は共に陰性化していた。

血清中のRT-PCRは症例6以外に施行し、発作回数が多かった症例4、5で急性期に陽性を示した。

糞便スクリーニングでは症例1、3は陰性であったが、同一検体で検索したRT-PCRでは陽性であった。

なお、得られたロタウイルスの血清型は髄液、血清、便中ともに昨冬都内で流行していた1型⁷⁾であった。

考 察

軽症下痢に伴う痙攣は1年を通して見られるが特に冬季に多く⁸⁾⁹⁾、中でもロタウイルスによるものは冬に多い⁹⁾。今回我々は、1992年1月から3月までに当院小児科に入院した軽症下痢に伴う痙攣を起こした児6例全員にロタウイルスに関する検索を無選択的に施行した。その結果、糞便スクリーニングであるセロダイレクト栄研ロタ[®]陽性4例、陰性2例であったが、陰性者も同一検体でRT-PCR法を施行したところいずれも陽性を示

した。これは感度の違いによると考えられる（セロダイレクト栄研ロタ®は抗原量として6.25 μ g/ml以上ないと陽性にならない）。従って、全例ロタウイルスによる軽症下痢症に痙攣を合併した症例と考えられた。

重症下痢（消化不良性中毒症）に伴う乳幼児の痙攣の原因として、以前は、下痢が重症で脱水が高度なための水分、電解質不均衡、内因性毒素の発生、髄液と血液の浸透圧の差などが考えられていた。しかし、近年は医療の進歩に伴い重症の下痢をみることは少なくなり、諸岡の報告以来散見される軽症下痢に伴う痙攣^{8)~11)}は、脱水は軽度であり、しかもほとんどが等張性である。従って、従来言われてきた電解質や浸透圧からは説明できなくなり、ウイルスによる軽い脳炎、痙攣の素因等が推論されてきた¹⁰⁾。今回我々は、急性期髄液よりRT-PCR法にてロタウイルスを証明し、ロタウイルスが中枢神経系へ一過性に浸潤した可能性を示唆した。

ロタウイルスと中枢神経系の親和性についての主な報告には以下のようなものがある。Vartdalら¹²⁾は多発性硬化症患者の、また、牛島ら¹³⁾は臨床的にロタウイルス感染とは考えられない種々の神経疾患患者の髄液でロタウイルス抗体陽性の例があると報告しているが、これらは脳血液関門の透過性の亢進によると考えられている。一方、牛島ら¹⁴⁾はヒトロタウイルスおよびマウスロタウイルスをマウスの脳内に接種したが、中枢神経症状を発現させ得なかったと報告した。しかし、同時にアストロサイトーマ・セル・ラインの1株に対し5代継代培養してロタウイルスが存在するものがあったという。ロタウイルスによると考えられる急性脳症、脳炎や髄膜炎の報告は散見される^{15)~19)}が、中枢神経組織または髄液からロタウイルスを分離した報告は、Wongら¹⁷⁾の無菌性髄膜炎の1例のみである。

以上のようにロタウイルスと中枢神経系の親和性に関しては、*in vivo*、*in vitro*ともに報告が少なく、今後の研究の成果が待たれるところである。

熱性痙攣の患者の髄液からヒトヘルペスウイルス6がPCR法で高率に陽性を示したのと同様

に、同じ機会性痙攣である軽症下痢に伴う痙攣の患児の髄液から一過性にロタウイルスが陽性であったことは、その機序を考える上で貴重なものと考えここに報告した。

まとめ

1) 昨冬当院小児科に入院した軽症下痢に痙攣を合併した乳幼児6例は全例、ロタウイルスによる下痢症であった。

2) 2例では急性期と回復期、4例では急性期の髄液についてロタウイルスRT-PCR法を施行した。急性期には6例中5例が陽性を示し、回復期を調べ得た2症例では2例とも陰性化していた。

3) 以上より痙攣発作時にはロタウイルスが中枢神経系へ浸潤している可能性が初めて示唆されたので報告した。

本論文の要旨は第8回東京女子医大神経懇話会（平成4年6月26日）で発表した。

文 献

- 1) 福山幸夫：小児のてんかん境界領域一とくに熱性けいれんおよびいわゆる乳児けいれんについて一。精神医学 5：211-223, 1963
- 2) 諸岡啓一：軽症下痢とけいれん。小児科 23：131-137, 1982
- 3) 山西弘一：日常みられるウイルス感染と小児神経疾患〔5〕ヒトヘルペスウイルス6。（第34回日本小児神経学会総会教育講演）脳と発達24：S94-95, 1992
- 4) 長藤 洋, 近藤一博, 服部春生ほか：けいれん発作のために髄液よりHHV-6(human herpes virus 6) DNAを検出した熱性けいれんの2例。小児臨 46：247-252, 1993
- 5) Gouvea V, Glass RI, Woods P et al: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol 28：276-282, 1990
- 6) Ushijima H, Koike H, Mukoyama A et al: Detection and serotyping of rotaviruses in stool specimens by using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. J Med Virol 38：292-297, 1992
- 7) 西村修一, 金保洙, 忻克勤ほか：逆転写-DNA増幅法による過去2冬期を中心とした東京北部でのヒトロタウイルス血清型の疫学。感染症誌 67：53-58, 1993
- 8) 梶山 通, 福山幸夫：乳児下痢症とけいれん。日小児会誌 88：883-889, 1984

- 9) 小野 厚, 杉本健郎, 谷内昇一郎ほか: ロタウイルス性胃腸炎における乳幼児無熱性けいれん, 脳と発達 14: 520-521, 1982
- 10) 中井孝子, 曾田真理子: 軽症下痢に伴う良性けいれん, 小児臨 35: 219-223, 1982
- 11) 己斐幹生, 熊埜御堂義昭, 梶谷 喬: 下痢に伴う乳幼児の無熱性痙攣について—下痢に伴わないものとの比較検討—, 小児診療 47: 804-808, 1984
- 12) Vartdal F, Vandvik B: Multiple sclerosis Electrofocused "bands" of oligoclonal CSF IgG do not carry antibody activity against measles, varicella-zoster or rotaviruses. J Neurol Sci 54: 99-107, 1982
- 13) 牛島廣治, 荒木和子, 阿部敏明ほか: 髄液中の抗ロタウイルス抗体について, 小児臨 40: 2544-2546, 1987
- 14) 牛島廣治, 荒木和子, 平岩幹男ほか: ロタウイルスと中枢神経性疾患との関連についての考察, 小児臨 36: 2764-2768, 1983
- 15) Salmi T, Arstila P, Koivikko A et al: Central nervous system involvement in patients with rotavirus gastroenterocolitis. Scand J Infect Dis 10: 29-31, 1978
- 16) 勝島矩子: 非細菌性下痢症, 感染症 11: 121-130, 1981
- 17) Wong CJ, Price Z, Brunckner DA: Aseptic meningitis in an infant with rotavirus gastroenteritis. Pediatr Infect Dis 3: 244-246, 1984
- 18) Ushijima H, Bosu K, Abe T et al: Suspected rotavirus encephalitis. Arch Dis Child 61: 692-694, 1986
- 19) 竹谷俊樹, 土田昌宏, 梅里美博ほか: ロタウイルス抗体価の上昇を認め, 可逆性弛緩性麻痺を呈した急性脳症の幼児例, 日小児会誌 94: 129-133, 1990