

分担研究課題： 不明症例の病理検体からの新規病原体検索

研究分担者 片野晴隆 国立感染症研究所・感染病理部

研究協力者 福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、保科しほ、中島典子、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）、都築慎也、佐藤典子、望月眞、峰宗太郎、松下竹次（国立国際医療研究センター）、黒田 誠、関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）、李 天成（国立感染症研究所・ウイルス第2部）、鈴木哲朗（浜松医科大学）、梁 明秀（横浜市大医学部）

研究要旨

原因不明であった感染症症例の病理検体を対象に、網羅的ウイルス遺伝子検出法を用いて、既知の病原体遺伝子を検出すること、および、次世代シーケンサーを用いて、未知の病原体遺伝子を検出することを目的とした。2013年に国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた23例の不明疾患症例につき、163種類のウイルスを同時に網羅的に検出可能な multivirus real-time PCR を用い、原因ウイルスの同定を試みた。その結果、8例（35%）で原因ウイルスが同定され、multivirus real-time PCR が次世代シーケンサーを行う前のスクリーニングに有効であることが示唆された。また、multivirus real-time PCR でも有意なウイルスが検出されなかった3症例の病理検体につき、次世代シーケンサーでの解析を行ったが、有意なウイルスは検出されなかった。一方、2012年に心筋炎患者から次世代シーケンサーを用いて検出された trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)の解析を行った。当該患者の心筋組織から TSV の全長遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定し、世界で3番目の株として GenBank に登録した。

A. 研究目的

次世代シーケンサーは感染症検体における微生物遺伝子を検出する、極めて有力なツールであり、データベースに登録されている既知の病原体遺伝子配列の他に、未知の病原体の遺伝子配列も解読することが可能で、しかも、その感度はPCRとほぼ同等である。近年、発見された新しいウイルスの多くは次世代シーケンサーを用いて発見されている (Merkel cell polyomavirus, human polyomavirus 6 と 7)。しかし、次世代シーケンサーの解析には高額なランニングコストがかかる上、一度のランで極めて多くの遺伝子情報が得られることから、その解析には高度なバイオインフォマティクスの知識と技術を要し、長い時間がかかる。このため、現在ではすべての検体につき、次世代シーケンサーの解析を行うことは現実的でない。次世代シーケンサ

ーの解析にふさわしい症例、サンプルであるかどうかは、多くの臨床情報を集め、患者の状態、症状、緊急性、サンプルの種類、状態、量等から総合的に判断する必要がある。特に、十分な微生物学的検索がなされているかが、重要な点であるが、では、どのような検索が事前になされていればよいか、は基準がない。

国立感染症研究所感染病理部には臨床で感染症が疑われながら、医療機関や地方衛生研究所で病原体が同定できなかった不明感染症例や、これまで感染症が疑われながらも、原因が明らかでない疾患の病理検体が毎年、数十検体、コンサルテーションとして送られてきている(感染病理部リファレンス症例)。われわれはこれらの症例につき、組織形態学的検索や免疫組織化学、PCRなど、様々な手法を駆使して、病原微生物の核酸や蛋白の同定を試みてき

た。また、感染病理部では、160種類以上のウイルスを網羅的に検出できるReal time PCR法(multivirus real-time PCR)を開発し、これらの疾患の原因の解明に努めているが、依然として原因不明のままである症例が多い。本研究では感染病理部に送付された原因不明の感染症疾患の病理検体を対象に、次世代シーケンサーで全遺伝子を解読することで、未知、あるいは、既知の病原体遺伝子の検出を試みた。

また、われわれは2012年に0歳児の心筋炎サンプルから、trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)の核酸断片を、次世代シーケンサーにより検出した。TSVは2010年にヨーロッパで発見された新しいヒトポリオーマウイルスであり、8番目のヒトポリオーマウイルスということからヒトポリオーマウイルス8(human polyomavirus 8, HPyV8)とも呼ばれる。今年度は、本症例から、TSVの全長遺伝子をクローニングし、全遺伝子配列を決定した。

B. 研究方法

1) 臨床検体

全国の医療機関または地方衛生研究所から感染病理部に送付された不明感染症疾患の病理検体を使用した。これにはホルマリン固定パラフィン包埋標本が含まれる。

2) 核酸抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋標本からの核酸抽出は Qiagen DNeasy FFPE kit (DNA) および Invitrogen PureLink FFPE RNA extraction kit (RNA) を用いた。凍結サンプル、髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便等からの核酸抽出は Qiagen DNeasy kit (DNA), RNeasy Plus kit (RNA) を用いた。

3) real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法

ヒトに病原性を持つと考えられる 163 種類のウイルスを 96 穴プレート上で一度に検出できる real-time (RT-)PCR システムを本研究室で独自に開発し、これにより RNA および DNA サンプルからウイルスの検出を試みた (Katano H et al. J Med Virol 2011)。個々のウイルスを検出する定量的 PCR は MX3005P (ストラタジーン社)、または ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

4) 次世代シーケンサーによる遺伝子解析 (研究協力者 黒田らによる): RNA ~10 ng をもとに ScriptSeq V2 RNA-seq library preparation kit にて網羅配列解読用のライブラリーを作成した。調整した

ライブラリーを ベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq にて 150 mer x 150 mer のペアエンド法で解読した。検出されたリードは megablast 法にて NCBI nt データベースに配列照合し、MEGAN 5 にて各リードを生物種ごとに分類した。ヒト遺伝子を除き、既知のウイルスゲノムに相同性のある配列を抽出した。

5) TSV 遺伝子の増幅と全長遺伝子のクローニング

心筋凍結組織から抽出した DNA を鋳型に Toyobo KOD-FX を用い、long PCR を行った。増幅された TSV の全長遺伝子は pCR-Blunt にクローニングした。塩基配列の決定は Dye Terminator 法により、通常の DNA シーケンサーを用いて行った。TSV を特異的に検出する real-time PCR では、TSV の VP1 領域である nt 1,841-1,923 (GenBank GU989205) を標的とする Taqman PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認済である (H25/7/30 No.417)。試料提供者の個人情報は、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられた状態で感染研に送付される。個人を特定するための対応 表は医療機関が保管する (連結可能匿名化)。したがって、検査実施者が試料提供者個人を特定することはできない。

C. 研究結果

1) 感染病理部リファレンス症例における既知、または未知の病原体遺伝子の検索

2013 年に感染病理部に不明感染症例として送られてきた病理検体のうち、multivirus real-time PCR で解析した症例は 23 例であり、このうちの 8 例 (35%) で、本検査系により病原ウイルスを同定することができた (表 1)。検出されたウイルスの内訳は単純ヘルペスウイルス 2 型、水痘帯状疱疹ウイルス、コクサッキーウイルス A6 型、コクサッキーウイルス B3 型 (2 例)、日本脳炎ウイルスであった。multivirus real-time PCR では、TTV やヒト内因性レトロウイルスの遺伝子が検出される例が少なくないが、これらのウイルス遺伝子はヒトの健常者や健常部位からも検出されるものであり、有意ではない。上記、ウイルスの多くは病理組織 (生検、剖検) において、免疫組織学的に確認されたもので、病理学的に原因と考えられるウイルスである。

さらに、multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった症例 3 例については病理検体から抽出した RNA について、次世代シーケンサーの解析を行った（表 2）。検索の結果、有意なウイルスを検出することができなかった。表 2 に示す第 2 例では Avian leukosis virus の遺伝子断片が検出されているが、これは、逆転写酵素に含まれるものであり、非特異的なものであることが判明している。また、3 例目は EBV が関連することがすでに分かっており、EBV 以外のウイルスの関与を期待したが、有意なウイルスは検出されなかった。

2) 心筋炎から検出された TSV の検討

2012 年に感染病理部にリファレンス症例として解析依頼のあった、0 歳児の心筋炎症例から次世代シーケンサーの解析により TSV の遺伝子断片が検出された。今年度はこの心筋の凍結検体から TSV の遺伝子を増幅し、その全長遺伝子の配列決定を行った。心筋から抽出した DNA からは long PCR により 5.2 kpb におよぶ TSV の全長遺伝子の増幅が可能であった（図 1）。PCR 産物を pCR-Blunt ベクターにクローニングし、TSV 遺伝子の全長遺伝子配列を決定した。シーケンスした遺伝子配列は既報告の 2 つの TSV と 99% の相同性があり、他のヒトポリオーマウイルスとの相同性は、HPyV9 と 52%、その他は 50% 以下であり、本遺伝子配列が TSV であることが確認された。TSV-TMC 株（Tokyo MyoCarditis が由来）と命名し、GenBank に登録した（accession no. AB873001）。TSV-TMC 株は世界で 3 番目に報告された TSV の全長遺伝子配列となった。

本症例は剖検例であり、脳を除くほぼすべての臓器が採取されていることから、臓器別の TSV 量を、TSV 遺伝子の特異的に検出する real-time PCR により測定した。その結果、心臓に TSV が濃縮されていることが明らかになった（図 3）。さらに、TSV-TMC 株から、VP1 の遺伝子を増幅し、現在、VP1 に対するモノクローナル抗体を作製している（研究協力者 梁らによる）。

D. 考 察

不明感染症例の一般的な定義は存在せず、病院や医療機関の多くの医師は、不明感染症例とされる症例を日常的に経験している。その中には、軽症のため、十分な微生物検査がなされる前に軽快し、原因不明とされた症例もあれば、重症例でさまざまな微生物検査がなされたにもかかわらず、原因が不明で、

不明感染症例とされている症例もあるであろう。地方衛生研究所等から微生物検索依頼がなされた症例は、原則として疑わしい微生物に対する検索が終了しているものである。次世代シーケンサーの解析は、サンプルに含まれるすべての遺伝子情報を解読するものであり、病因微生物の遺伝子が含まれる場合には、かなり高い確率で検出可能である。しかし、不明感染症例のすべての症例を解析することは予算的にも、時間的にも不可能である。不明感染症例の、どの検体を次世代シーケンサーの解析を行うかについての一般的な選択基準は存在しないが、目安となる検査やスクリーニング法が存在すれば、効率的な検査が可能かも知れない。本研究でわれわれが用いた multivirus real-time PCR は次世代シーケンサーよりも手軽に、低予算で、多くのウイルスを網羅的にスクリーニングできるシステムであり、次世代シーケンサーに進む前の検査としては極めて有用なスクリーニング法と考えられる。

われわれが病理の検体を検索対象としている理由は 2 つある。一つは病理検体はすでに組織学的診断が付いているものがほとんどであり、明らかな感染症以外の疾患を除外することができる点である。組織学的検索により病変部が確実に含まれているかどうか分かる点は、不明感染症の検索には極めて有利である。もう一つの理由は、multivirus real-time PCR や次世代シーケンサーで検出された微生物が、果たして病因微生物であるかどうかを、病理検体に戻って、病理組織学的に検索が可能である点である。血液などの体液サンプルでは、病変部位を反映した結果が得られず、最終的な結論が出ないことが多いのに対し、病理検体は病変部を直接、組織学的に免疫組織化学や in situ hybridization などで検索することにより、検出微生物が病変部と関連があったかどうか、結論が得られる確率が高い。病原体遺伝子を検出する網羅的微生物検出法を利用した際には、PCR も次世代シーケンサーも、極めて感度の高い方法であるために、有意でない微生物遺伝子がしばしば検出される。病理検体以外のサンプルではこの判定がむずかしく、今後、多くのサンプルを検討することにより、検出された微生物が病因微生物であるかどうかを判定する方法、適切なサンプルを選択する方法が次第に明らかになっていくことが期待される。

TSV はこれまでのところ、顔面皮膚の高角化症である trichodysplasia-spinulosa 以外には疾患との関連は明らかにされていない。今回の心筋炎の症例で

は心臓に TSV が濃縮されていること、心臓から TSV の全長遺伝子が検出されていること、また、Ori を挟んだプライマーで PCR を行ったところ、増幅が可能であったこと(データは示していない)から、心臓には環状の TSV が存在していたことが示され、これは心臓で、TSV の複製が起きていた可能性を示唆している。これまで、TSV の報告例はほとんどが皮膚に限定されており、心臓から検出されたとする報告はない。心筋炎の原因ウイルスはエンテロウイルスやヘルペスウイルスなどが知られるが、感染病理部のリファレンス例でも、多くの心筋炎の症例が原因微生物不明であり、TSV は新たな心筋炎の原因ウイルスであるかも知れない。今後、作成中の抗体を用いた組織学的検索の結果が待たれるところである。

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし

E . 結 論

不明感染症例の病理組織検体を対象に、multivirus real-time PCR を用い、原因ウイルスの同定を試み、検索した症例の 35% で原因ウイルスを同定した。Multivirus real-time PCR は次世代シーケンサーを行う検体のスクリーニング法として有効な手段である。また、3 症例の病理検体につき、次世代シーケンサーでの解析を行ったが、有意なウイルスは検出されなかった。心筋炎症例から TSV の全長遺伝子のクローニングし、全塩基配列を決定した。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

- (1) 片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 ワークショップ 「感染病理学の新展開」第 102 回 日本病理学会総会. 札幌。2013.4.
- (2) 中島典子、片野晴隆 定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法と病理検体への応用 シンポジウム 3 病原体の新しい診断法 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会 宮崎 2013 年 10 月

表1 2013年にMultivirus real-time PCRで検索した病理検体の結果。HSV: herpes simplex virus, VZV: varicella zoster virus, Cox: coxsackievirus, JEV: Japanese encephalitis virus.

臨床診断	検索症例数	ウイルス検出症例数	検出ウイルス
脳炎、髄膜炎	9	4	HSV-2, VZV, CoxA6, JEV
心筋炎	7	3	CoxA2, B3
リンパ節腫脹	2	0	-
血液貧食症候群	2	0	-
その他	3	1	VZV
合計	23	8	-

表2 2013年に次世代シーケンサーの解析を行った病理検体。SFTSV: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, EBV: Epstein-Barr virus.

No.	疾患名	年齢、性別	組織	結果
1	急性心筋炎	10歳代 女性	剖検組織	有意な微生物遺伝子は検出されない。
2	亜急性壊死性リンパ節炎	50歳代 男性	ダニに咬傷後の所属リンパ節腫大。 SFTSV 陰性。	有意な微生物遺伝子は検出されない。 (Avian leukosis virus →逆転写酵素由来)
3	形質芽細胞リンパ腫	60歳代 男性	EBV 陽性。	EBV のみ。

表3 TSV-TMC株と既報告のTSVおよび他のヒトポリオーマウイルスとの相同性。TSV: trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus, HPyV: human polyomavirus.

Virus gene (GenBank Accession No.)	Homology (%)
TSV (JQ723730)	99.4
TSV (GU989205)	99.4
HPyV9 (NC_015150)	52.0
KI polyomavirus (NC_009238)	49.88
JC virus (PLYCG)	49.53
BK virus (PLYCGAS)	49.39
Merkel cell polyomavirus (NC_010277)	49.34
HPyV7 (NC_014407)	47.70
HPyV6 (NC_014406)	47.55

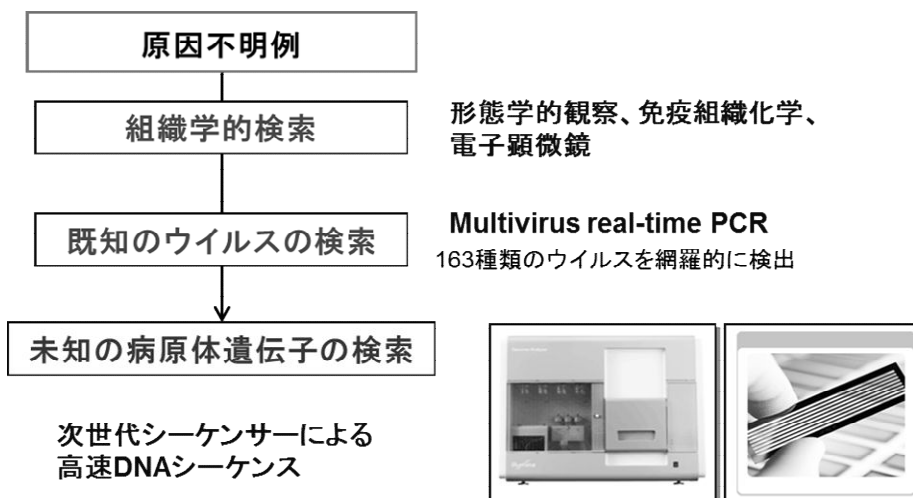


図1 本研究における原因不明症例の病原微生物の検出の概要

原因不明症例の病理検体は、まず、HE染色などの組織学的検索がなされ、明らかな感染症以外の疾患は除外される。また、検体に病変部が含まれるかどうか、組織学的に検索される。組織学的に感染症が疑われる検体では、考えられる微生物を検出する免疫染色や特殊染色を行なう。必要により、電子顕微鏡でウイルス粒子などを観察する。組織学的にウイルス感染が疑われるものの、病理組織学的な検索で原因ウイルスを同定できないサンプルは、multivirus real-time PCRによりウイルスの網羅的検索を行う。Multivirus real time PCRは、multiplex Taqman real time PCRを応用した網羅的ウイルス検出キットで、感染病理部で独自に開発したものである(Katano et al. J Med Virol 2011 83:322-330)。各ウイルスの probe-primer セットを96穴プレートに配し、FamとHexの二つの蛍光標識プローブを使用することで、ひとつのwellで2種類のウイルスを検出できるよう設計されている。また、同一プレート上で定量線を作成し、各ウイルス量が大きめに計測可能である。各 probe-primer セットは約100bpのウイルス核酸断片を検出できるよう設計されており、パラフィン切片から抽出した核酸など、断片化した核酸にも対応可能である。Multivirus real-time PCRでも、原因ウイルスの同定に至らない検体が次世代シーケンサーの解析対象となる。

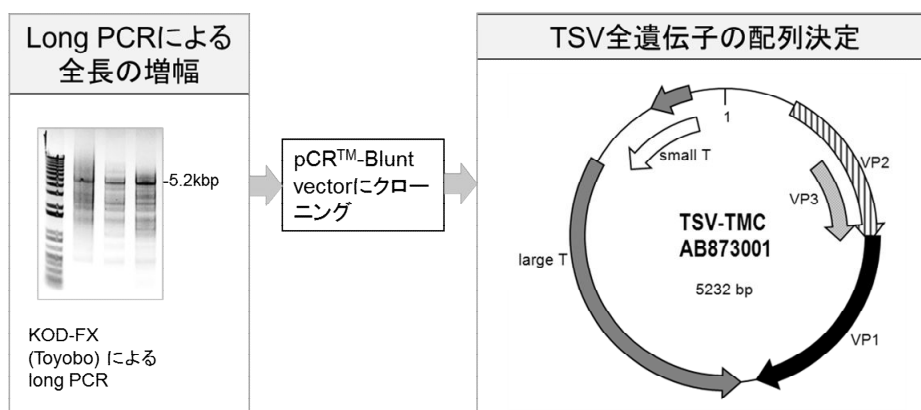


図2 TSVの全長遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

心筋組織から抽出したDNAより long PCR により、TSV 遺伝子の全長 (5.2 kbp) の増幅が可能であった (左図)。PCR 産物を pCR-Blunt vector にクローニングし、TSV 遺伝子の全長の塩基配列を決定した。塩基配列は TSV-TMC 株として、GenBank に登録した (accession no. AB873001)。右図には TSV-TMC 株の遺伝子構造を示す。既報告の TSV と遺伝子構造は変わらない。

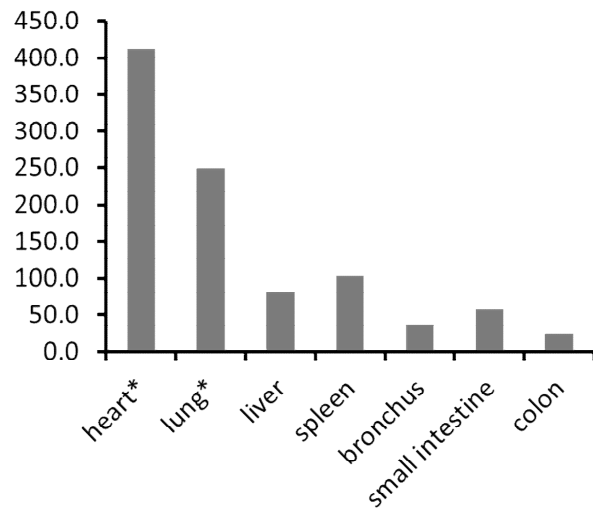


図3 TSVが検出された心筋炎患者の各臓器におけるTSV量の定量。

TSVのVP1を特異的に検出するreal-time PCRにより、各臓器から抽出したDNAを検索した。縦軸はDNA 100ngあたりのTSVコピー数を示す。心臓が最もTSV量の高い臓器であり、心筋炎との関連が示唆される。心臓*と肺*以外はパラフィン切片による検索である。