

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究分担者 氏名 舘田 一博（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座
研究協力者 氏名 青木弘太郎（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座
嵯峨 知生（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座
石井 良和（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座

研究要旨

抗菌薬の先行投与が原因で培養が陰性となり、原因菌が特定出来ず抗菌薬の選択に苦慮するケースがある。我々は、化膿性椎体炎の椎体穿刺吸引物、感染性心内膜炎の疣贅および脳膿瘍ドレナージの膿汁について、それぞれ次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索（DNA-seq）に供試し、原因微生物を特定し得た。脳膿瘍では混合感染を示唆する結果が得られ、病原体網羅的検索の優位性が示された。これらの結果の結果を踏まえて、臨床では抗菌薬が適切に選択された。さらに、通常の検査法では病原体の特定ができないことが多い、ウイルス性髄膜炎および脳炎が疑われた患者血清を用いて核酸の網羅的検索（RNA-seq）を実施した結果、臨床像から疑われていたウイルスに由来する遺伝子を検出するに至った。

A. 研究目的

感染症診療において適切な検査による原因微生物の特定は、治療薬を選択する上でも必要不可欠である。重症度が高いあるいは治療薬に反応しない、または長期間の治療を要する感染症において、原因微生物の同定は特に重要である。しかし感染症診療において、従来検査法では感染症の原因微生物を特定することができない症例に遭遇することがある。このような場合、病原体に由来する遺伝子を検出することで起因微生物を推定することが可能な場合がある。従来法で診断できない起因微生物を推定することは、感染症患者にもたらす治療上の有益性はきわめて大きいと考えられる。

我々は、通常の微生物検査で原因病原体が不明となってしまった症例について、感染症の起因病原体を特定することを目的に次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索（DNA-seq および RNA-seq）を行なった。

B. 研究方法

各種臨床検体から全核酸（DNA および RNA）を抽出し、臨床像から細菌をターゲットとした場合には DNA-seq を、RNA ウイルスをターゲットとした場合には RNA-seq を実施した。DNA ライブラリの調整には Nextera XT DNA Sample Prep kit（illumina）を、RNA（cDNA）ライブラリの調整には ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation Kit（epicentre）を用いた。各ライブラリの解読には次世代 DNA シーケンサー MiSeq（illumina）を用い 250bp×2 でシーケンスを行なった。取得したリードの解析には、メタゲノム病原体検索ツールである MePIC（国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター）を用いた。検索結果を MEGAN にて閲覧し、結果の解釈および討論を実施した。

倫理面への配慮

「微生物の網羅的検出法を用いた原因病原体の検索」は、東邦大学医学部倫理委員会から平成 25 年 12 月 19 日付で承認を受けている（課題番号：2510924060）。

本検査でも申請書に記載した通り、次世

代シーケンサーで得られた配列からヒトゲノム情報を解析開始前の時点で削除した。具体的には、ヒトゲノム配列 (hs_ref_GRCh37) を対象にして Bwa mapping によりヒト配列に該当する解読リードを削除した。残る解読リードを病原体候補として megablast - nt および blastx- nr 相同性検索を行い、臨床所見に該当する病原体候補を抽出した。以上の結果、解析対象とした限定された配列情報のみから個人を特定することや、生活習慣病などの個人特有のリスク因子を特定することはできない。

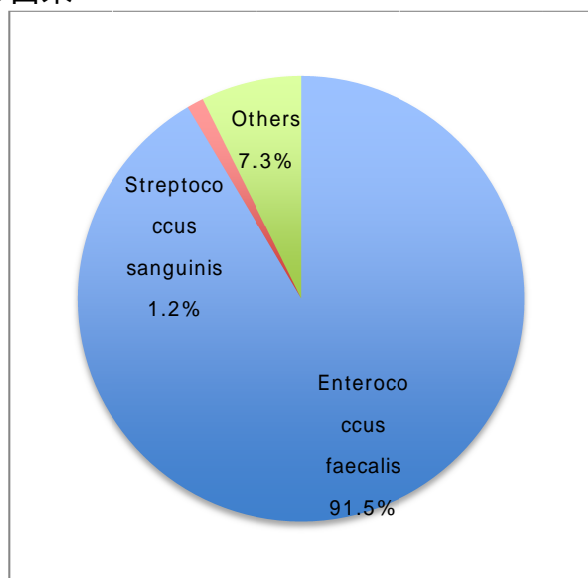
C. 研究結果

症例 1

70 歳男性、他院にて左下蜂窩織炎の診断で入院し、セファロスポリン系薬にて 1 ヶ月加療された症例。その後、原因不明の発熱、炎症反応上昇および腰痛が出現し、臨床経過および画像所見より、化膿性椎体炎と診断され、原因菌検索目的で穿刺術が施行された。穿刺吸引物および血液培養からも *Enterococcus faecalis* が検出された。

穿刺吸引物について DNA-seq を実施したところ、合計 3,701,992 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 8,553 本 (0.23%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、7,814 本 (91.4%) が *E. faecalis* 由来のリードであった (図 1)。

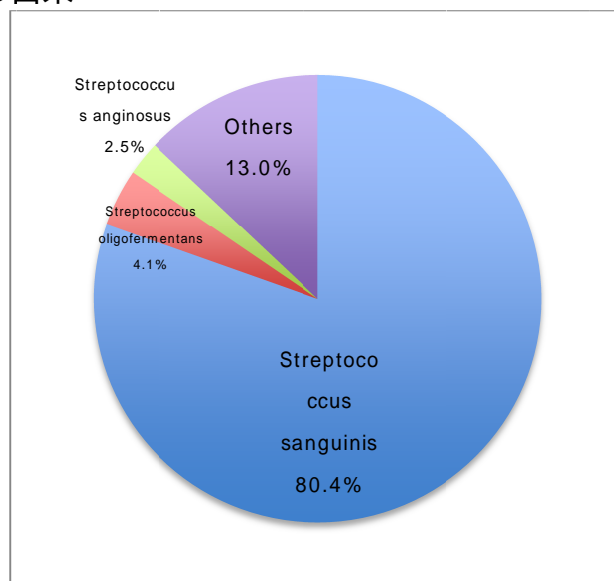
図 1. 症例 1 の Bacteria に占めるリードの由来



症例 2

患者背景は不明。感染性心内膜炎に対し、人工弁置換術が施行された。適切された疣贅の培養検査は陰性であった。その疣贅について DNA-seq を実施したところ、合計 4,616,658 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 56,471 本 (1.31%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、45,425 本 (80.4%) が *Streptococcus sanguinis* 由来のリードであった (図 2)。

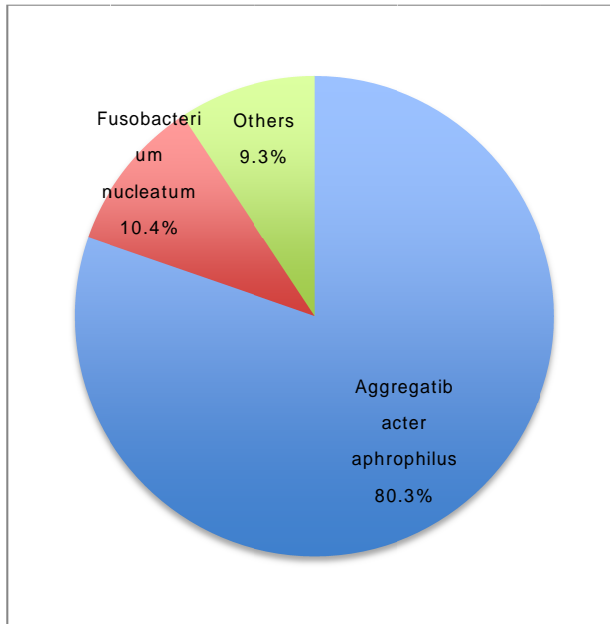
図 2. 症例 2 の Bacteria に占めるリードの由来



症例 3

39 歳男性、免疫不全等重症感染症のリスク因子がないにもかかわらず、右基底核部脳膿瘍を発症した。抗菌薬投与前に採取した血液培養は陰性であった。アンピシリンおよびセフトリアキソンの投与にも関わらず膿瘍が拡大したためドレナージが施行された。膿汁の培養検査は陰性であった。その膿汁について DNA-seq を実施したところ、合計 7,522,354 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 4,146 本 (0.06%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、3,278 本 (79.1%) が *Aggregatibacter aphrophilus*、423 本 (10.2%) が *Fusobacterium nucleatum* 由来のリードであった (図 3)。

図3. 症例3のBacteriaに占めるリードの由来



症例4

生後1ヶ月男児、38 台の稽留熱を認め、全身状態および末梢循環不全が強く、敗血症症状を認めた。ウイルス性髄膜炎および脳炎が疑われ、各種臨床検査データを考慮して *Parechovirus* 感染症と臨床症状から診断した。

髄液と血清について、RNA-seq ライブラリ (cDNA ライブラリ) を作成したが、髄液についてはライブラリが不良であったため血清由来ライブラリのみ解読を行なった。Total 20,285,474 本のリードが取得され、そのうち Viruses 由来のリードは 883 本 (0.004%) であった。そのうち、Human parechovirus 3 (HPeV-3) 由来のリードが 55 本 (6.23%) 検出された。その他、臨床的に有意である Viruses 由来のリードは検出されなかった。

D. 考察

本検討のうち、症例4以外は長期に適切な抗菌薬の投与が必要な症例であった。一般に、検体採取前に抗菌薬が先行投与されている場合には培養検査が陰性となるケースが多く、起因微生物が不明となるために広域抗菌薬を長期投与せざるを得ない。

症例1では、椎体穿刺吸引物の培養検査によって、化膿性椎体炎の起因菌として *E. faecalis* が分離されており、同一検体について DNA-seq を行なったところ、同菌種が検出されたことから、本手法は臨床材料から起因菌として想定される細菌を確実に検出可能であることが示された。

症例2および3において、各検体についての培養検査が陰性であったが、細菌をターゲットに DNA-seq を実施したことで起因菌の検出が可能であった。また、症例3においては *A. aphrophilus* および *F. nucleatum* の混合感染の可能性が示唆され、網羅的解読の有用性が示された。

これらの症例は、本解析により起因菌が判明したことで、その後の抗菌薬選択の一助となった。

症例4は臨床的に *Parechovirus* 感染症が疑われており、患者血清についての RNA-seq により HPeV-3 の存在が証明された。当時、本邦では *Human parechovirus* のなかでも3型が流行しており、RNA-seq による検査結果においても HPeV-3 と相同性の高いリードが検出され、疫学情報とも一致した。取得リード数が十分であれば、臨床材料の RNA-seq は起因ウイルスの型別も可能であることが示唆された。

E. 結論

抗菌薬先行投与等のため培養検査が陰性であった原因菌不明症例について、次世代シーケンサーを用いた病原体網羅的検索は、抗菌薬選択等の観点で臨床への貢献が可能であった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

