

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

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 室長

研究要旨

臨床で感染症が疑われながら、病原体が同定できず、原因が明らかでない疾患の病理検体から定量的 PCR、および、次世代シーケンサーを用いて、既知、及び、未知の病原体遺伝子を検出することを目的とした。2014年に国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた113例の不明疾患症例につき、170種類のウイルスを同時に網羅的に検出可能な定量的 PCR (multivirus real-time PCR) を用い、原因ウイルスの同定を試みた。その結果、4例(3.5%)で原因ウイルスが同定された。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による解析を行ったが、有意なウイルスは検出されなかった。一方、われわれが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した trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV) について、血清抗体を検出する ELISA を確立し、日本人における血清疫学を明らかにした。健常者の6割以上が血清中に抗 TSV 抗体陽性であり、TSV が日本国内に広く感染しているウイルスであることが明らかになった。

研究協力者:

福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）

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、脇田隆字（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）

A. 研究目的

感染症が疑われ、かつ、原因微生物の同定ができない検体の解析法として、次世代シーケンサーによる全核酸遺伝子の解読は、不明病原体の解明に極めて有力なツールである。次世代シーケンサーは2000年代前半に開発されてから急速に広まりつつあり、その有用性に疑いの余地はないが、現在でも、1サンプルあたりに高額なランニングコストがかかる上、遺伝子情報の解読、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が必要であり、一つのサンプルから微生物の同定までに至る過程は

決して容易なものではない。簡易な装置の開発も進められているが、その普及にはまだ時間を要し、現在ではすべての検体で次世代シーケンサーの解析を行うことは現実的でない。しかし、どのような症例を次世代シーケンサーで解析すべきかについて、その適応に関する基準や、標準的な考え方がないのが現状である。

われわれは多くの感染症疑いの不明疾患の病理検体を扱ってきた経験から、臨床検体において、次世代シーケンサーの解析に適するかどうかの基準を、(1)十分な微生物学的検索がなされているが、それでもなおかつ、原因不明であること、(2)患者の状態、症状、検査値などの十分な臨床情報が得られていること、(3)サンプルの種類、状態、量が次世代シーケンサーの適応となること、(4)病変部の病理組織サンプルなど、検索結果の確認が取れる材料が存在すること、または、検索結果がすぐに治療方針に反映できるような臨床体制があり、臨床側と綿密な情報交換が可能な状況にあること、などの要件から、総合的に判断している。

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病理検体がコンサルテーションとして送られてきている。われわれはこれらの症例につき、組織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いる。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定量的 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、残念ながら 8 割から 9 割は原因不明のままである。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のうち、上記の方法で原因病原体の同定に至らなかった症例から、次世代シーケンサーで全遺伝子を解読する症例を選定し、さらに実際に次世代シーケンサーの解析を行うことで、次世代シーケンサー解析の適応を検討した。

さらに、われわれが 2012 年に 0 歳児の心筋炎サンプルから検出された trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV) について、血清中の抗体を検出する ELISA の系を立ち上げ、日本人における血清疫学を調査した。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 番目に発見されたヒトポリオーマウイルスである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。trichodysplasia-spinulosa 以外の疾患との関連は知られておらず、心筋炎検体から検出されたとする報告もこれが初めてである。今年度は、TSV 感染と他の疾患との関連を調査するツールとして ELISA を開発し、日本人健常者における抗 TSV 抗体陽性率を調査した。

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。血清疫学に用いた血清は国立感染症研究所血清銀行に保存してある血清サンプル 1,000 人分を用いた。

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

本研究室で独自に開発した、ヒトに病原性を持つと考えられる 170 種類以上のウイルスを 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 (研究代表者 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-ELISA の開発と血清疫学:

TSV の VP1 を、組換え Baculovirus 発現システムによるタンパク合成し、virus like particle (VLP) を作成した (研究協力者 季らによる)。ELISA は TSV の VLP を抗原に、ヒト血清を 1 次抗体として、2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用い、p-ニトロフェニルホスファートで発色し、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

(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、および、H26/8/4 No.511)。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。血清疫学に用いた血清銀行の血清も、すべて匿名化されている。

C . 研究結果

1) 感染病理部レ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

2014 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 113 例であり、このうちの 4 例 (3.5%) 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、研究協力者、福本、佐藤、高橋、長谷川ら)。検索対象は脳炎、心筋炎、肺炎などの検体であり、検出されたウイルスの内訳はインフルエンザウイルス 1 例、ヒトパピローマウイルス 2 例、単純ヘルペスウイルス 1 型 1 例であった。ヒトパピローマウイルス例では単一の病変部から複数のタイプのヒトパピローマウイルスが検出された。また、インフルエンザウイルス感染後の肺炎とされる剖検例から単純ヘルペスウイルス 1 型が検出される例もあり、単純ヘルペスウイルス 1 型感染は病理組織における免疫組織学的検討でも確認された。

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 例と HHV-6 が関連した薬剤過敏症の症例について、病理検体から抽出した RNA を次世代シーケンサーで解析した (表 2)。原因不明例では、有意なウイルスを検出することができなかったが、HHV-6 が関連した薬剤過敏症の症例では HHV-6 の mRNA の発現プロファイルの解析が可能であり、現在も解析中である。

2) TSV の血清疫学

われわれは 0 歳児の心筋炎剖検症例から次世代シーケンサーの解析により TSV の遺伝子断片を検出し、昨年度には、この心筋の凍結検体から TSV の全長遺伝子を増幅することに成功し、その配列決定を行った (研究協力者、福本)。5.2 kbp におよぶ TSV の全長遺伝子配列は、既報告の 2 つの TSV と 99 % の相同性があり、TSV-TMC 株 (Tokyo Myocarditis が由来) として 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。

TSV はヒトから見つかった 8 番目のポリオーマウイルスとして human polyomavirus 8 (HPyV8) ともいわれる。元々発見された trichodysplasia-spinulosa という皮膚のまれな疾患以外では疾患との関連は報告されておらず、欧州における血清疫学では健常者の 7 割が抗体陽性とされる。しかし、日本では trichodysplasia-spinulosa の報告例はなく、日本人における血清疫学も知られていないことから、TSV に対する ELISA を立ち上げ、日本人における血清疫学を調査した (研究協力者、福本、李、脇田、鈴木)。日本人の血清 1,000 人分を調査したところ、

抗体陽性者は 629 人であり、抗体陽性率は 62.9% であった。抗体陽性率の性別、世代、地域による差は認められなかった。年齢別には 5 歳までに約 5 割、10 歳までに約 7 割が感染しており、その後も徐々に抗体陽性率は上昇し、60 歳代では約 9 割が抗体陽性であった。抗体価は感染直後の 10 歳代で最も高く、その後、高齢になるまで、徐々に減衰するが、70 歳代以上の群で再び上昇する。このことは 70 歳代以上で TSV が再活性化する可能性を示唆する。一般にポリオーマウイルスの VP1 は異なるポリオーマウイルス間で遺伝子の相同性が高く、BKV と JCV では血清が交差反応することが知られているが、本研究で立ち上げた TSV-ELISA では近似の Merkel cell polyomavirus, BKV とは交差反応性が無いことが確認された。

D. 考察

次世代シーケンサーは不明感染症例における原因微生物の同定に極めて有効なツールであることは間違いないが、1 検体にかかるコストが高額な上、高額な機器とバイオインフォマティクスに長けた技術者が必要であるなど、臨床検体を日常的に検索するにはまだ多くの問題がある。不明症例とされている症例の中には、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、原因が不明とされている症例もあるであろう。一般的に不明感染症例の定義は存在しないばかりか、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。multivirus real-time PCR は次世代シーケンサーよりも手軽に、低コストで、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有効なスクリーニング法と考えられる。われわれの使用している multivirus real-time PCR では 170 種類を超えるウイルスの網羅的検索が可能であるが、症状や部位別、サンプルごとに検出されるウイルスはある程度絞られることから、目的ごとに、標的ウイルス数を削減したものが、今後、地方衛研などで次世代シーケンサーを検討する前のスクリーニング法としては現実的であろう。

TSV の血清疫学では日本人成人の約 7 割が TSV に対する血清抗体を保持していることが判明し、本ウイルスが日本人の間で広く感染していることが分かった。この数値は既に報告されている欧州や豪

州の検討結果とほぼ同じであり、10歳までに7割が抗体陽性であることは、多くの人で10歳までに初感染が成立していることを示している。他のウイルス感染症と同様に血清抗体価は初感染後、10歳代をピークとして徐々に減衰し、70歳以上でもう一度、抗体価の上昇が見られる。これは、老齢期にTSVが再活性化している可能性を示唆するものである。本検索は健常者血清を対象とした研究であるために、疾患との新たな関連が明らかになるものではない。健常者における感染率は欧州と同様であるにもかかわらず、trichodysplasia-spinulosaが日本人ではまったく報告がない点も疑問である。また、初感染に出現するIgMについては今回の検索では捉えることはできなかった。TSVの初感染がどのような病態と関連するか、興味深い点であり、小児を中心に多くの血清を検索する必要がある。さらにTSVに対するモノクローナル抗体(研究協力者 梁ら)を用い、保存病理検体を検討し、TSVと新たな疾患との関連を明らかにできるよう、検索を続けていく。

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た。本年度は、検索した症例の3.5%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。4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、新たに有意なウイルスは検出されなかった。心筋炎症例から次世代シーケンサーで検出したTSVについて、血清抗体を検出するELISAを立ち上げ、日本人健常者における血清疫学を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

(1) Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita

T, Katano H: Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl. Int J Clin Exp Pathol 2014. 7:5308-5312.

(2) Mine S, Suzuki K, Sato Y, Fukumoto H, Kataoka M, Inoue N, Ohbayashi C, Hasegawa H, Sata T, Fukayama M, Katano H: Evidence for human herpesvirus-6B infection of regulatory T-cells in acute systemic lymphadenitis in an immunocompetent adult with the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: A case report. J Clin Virol 2014. 448-452.

2) 学会発表

(1) 福本 瞳、都築慎也、佐藤典子、峰 宗太郎、望月 眞、川名誠司、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆。日本人からの Trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus のクローニング。第 113 回 日本皮膚科学会総会。京都。2014.5.

(2) Katano H, Hishima T, Sakamoto K, Uehara T, Sekizuka T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M. Profiling microRNA in Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disorders with deep sequencing and real-time RT-PCR. International Herpesvirus Workshop, Kobe, 2014.7.

(3) 高橋健太、福本 瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、長谷川秀樹、片野晴隆。不明脳炎症例の病理検体における原因ウイルスの網羅的検索。第 62 回日本ウイルス学会学術総会。横浜。2014.11.

(4) 福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰宗太郎、保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆。網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用。第 62 回日本ウイルス学会学術総会。横浜。2014.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

表1 2014年にMultivirus real-time PCRで検索した病理検体の結果。HPV: human papillomavirus, HSV: herpes simplex 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	0	-
心筋炎	39	0	-
肺炎	31	2	HSV, influenza virus
扁桃炎	22	0	-
その他	12	2	HPV
合計	113	4	-

表2 2014年に次世代シーケンサーの解析を行った病理検体。HHV6: human herpesvirus 6.

No.	疾患名	年齢、性別	組織	結果
1	HHV-6関連薬剤過敏症	50歳代 男性	剖検リンパ節	多量のHHV-6 mRNAを解読 HHV-6 mRNAの発現profileを解析中
2	原因不明亜急性壊死性 リンパ節炎	30歳代 男性	リンパ節生検	有意な微生物遺伝子は検出されない。
3	心筋炎	60歳代 男性	剖検心臓	有意な微生物遺伝子は検出されない。
4	心筋炎	0歳 男性	剖検心臓	有意な微生物遺伝子は検出されない。

表3 日本人健常者におけるTSVの血清疫学。

検体	陽性数/サンプル数 (%)	オッズ比 (95% CI) *	P**
合計	629/1,000 (62.2%)		
性別			
男	327/500 (65.4%)	1	-
女	302/500 (60.4%)	0.807 (0.624-1.043)	0.102
世代			
1980年に採集された血清	315/500 (63.0%)	1	-
2012年に採集された血清	314/500 (62.8%)	0.991 (0.767-1.282)	0.948
地域			
東北	106/163 (65.0%)	1	-
関東	108/161 (67.1%)	1.096 (0.692-1.736)	0.697
中部	122/183 (66.7%)	1.075 (0.689-1.678)	0.749
近畿	57/96 (59.3%)	0.786 (0.468-1.321)	0.363
中国	103/160 (64.4%)	0.972 (0.616-1.534)	0.902
四国	38/60 (63.3%)	0.929 (0.502-1.720)	0.814
九州	95/177 (53.7%)	0.623 (0.402-0.964)	0.033

*オッズ比は性別では男性、世代では1980年、地域では東北に対する調整オッズ比を示す。

** P値はカイ2乗検定