

として日本脳炎ウイルスの検索(研究分担者:高崎智彦)→real-time PCRによるウイルスの網羅的検出法(研究分担者:片野晴隆)→次世代シークエンサーによる網羅的病原体検査(研究分担者:黒田誠)の順に実施するが、ウイルスの網羅的検索で原因が判明したものや、検体内の核酸が分解していることが判明した症例については次世代シークエンサーによる検索は行っていない。また、蚊の活動性がない冬期に発症した症例については日本脳炎の検索は行わない。

## 2) 核酸抽出

髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便のそれぞれの検体から QIAamp MinElute Virus Spin Kit (キアゲン社) を用い DNA と RNA を混和した形で抽出した。後の次世代シークエンサーの検索に適するよう、carrier RNA は使用していない。

## 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約 170 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 (multivirus real-time PCR) 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)(表 1、図 1)。定量的 PCR は MX3005P、MX-3000P (アジレント社)、または ABI 7500、7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

### (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 (H25/9/25 No. 445)。試料提供者の個人情報、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

平成 25 年 11 月から平成 28 年 2 月までに 95 例の解析依頼があり、当部ではこのうちの 94 例で multivirus real-time PCR

を施行し、16 例から原因ウイルス、あるいは、脳炎、脳症の病態と関連が疑われるウイルスを同定した(表 2)。検出されたウイルスの内訳はエンテロウイルス 4 例(エンテロウイルス 71, コクサッキーウイルス A6, A10, B3), ヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) とパレコウイルス 3 型が 3 例ずつ、ノロウイルスとパルボウイルス B19 が 2 例ずつ、さらに EBV と CMV が 1 例である。これとは別に multivirus real-time PCR を施行しなかった 1 例から次世代シークエンサーによる解析で日本脳炎ウイルスが、multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった 1 例から、次世代シークエンサーによりヒトアストロウイルスの新しい株である MLB 株が検出されている。ほかにも、次世代シークエンサーではウイルス、細菌の断片が数多く検出されているが、病態との関連が明らかでないものも含まれている。解析した 94 症例中、少なくとも 10 例(10.6%)では RNA のヒト内因性コントロールも検出されない症例であった。すなわち、これらの症例では、検体中の RNA が、採取、保存、輸送の過程で分解してしまっていることが予想されることから、次世代シークエンサーによる解析は原則行っていない。

また、平成 27 年 9 月頃から、急性弛緩性麻痺を伴う脳炎、脳症患者が複数例、本研究班に報告されたことから、これらの患者検体も検索を行っている。本研究班の症例として検討した検体は少なく、急性弛緩性麻痺の微生物学的原因について、最終的な結論を得ていない。脳炎を伴わない症例を含めた急性弛緩性麻痺の患者検体の収集が行われ、現在、検体の整理が行われ、今後、症例を選んで検索する予定である。

## D. 考察

94 例中 16 例で multivirus real-time PCR が原因ウイルスの同定に貢献したことから、本検査系の検出率は約 17% である。次世代シークエンサーによる解析結果も合わせれば約 2 割程度の患者で原因微生物の同定に至ったものと考えられる。原因不明脳炎を検索対象として、網羅的微生物検索を行った研究は他に類を見ないのであり、貴重な結果といえる。本研究班で対象とする症例は、原則、不明脳炎の届出をされている症例のうち、原因不明のものとされる。検査体制の不備等から、感染症

の検査が十分ではない症例が不明脳炎として、送付されてしまうこともあり、こうした症例の取り扱いについては、今後の課題である。不明脳炎症例の原因解明という目標において、不明脳炎症例の定義、サンプルの収集法については引き続き、検討が必要で、本検索で対象とする原因不明脳炎・脳症の検体としては、(1)臨床症状から推察して必要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、量が適切であること、(4)緊急性のある検体については、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、などの要件が必要であろう。

脳炎の原因となる病原微生物は多種多様であり、各医療施設や地方衛生研究所でその検査を対応するには限界がある。脳炎、脳症の発症メカニズムは不明な点が多く、病原体が関与しない症例も多く含まれる。将来的には、全国どこからでも、脳炎に関与するウイルス、細菌などの病原体を迅速に検索できる検査体制の構築が切に望まれる。本研究班で得られたデータはそうした新たな検査体制の構築に向けて、微生物学的なエビデンスを提供するばかりでなく、脳炎検体の取り扱い、輸送法や必要な検査項目について、参考となる情報を提供するものと期待される。

## E. 結論

原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、その原因を究明すべく、ウイルスの網羅的検索を行った。当研究班で収集した94例の不明脳炎の検体のうち、16例から原因ウイルスを同定した。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

- (1) Yamamoto S, Takahashi S, Tanaka R, Okayama A, Araki A, Katano H, Tanaka-Taya K, Azuma H: Human herpesvirus-6 infection-associated acute encephalopathy without skin rash. *Brain Dev* 2015. 37:829-832.
- (2) Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Saeki H, Katano H: Development of a new real-time PCR system for

simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *Int J Clin Exp Pathol* 2015. 8:15479-15488.

- (3) 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) 高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹. 不明脳炎症例の病理組織検体における原因ウイルスの網羅的検索. 第104回日本病理学会総会 2015年4月30日-5月2日 名古屋国際会議場
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

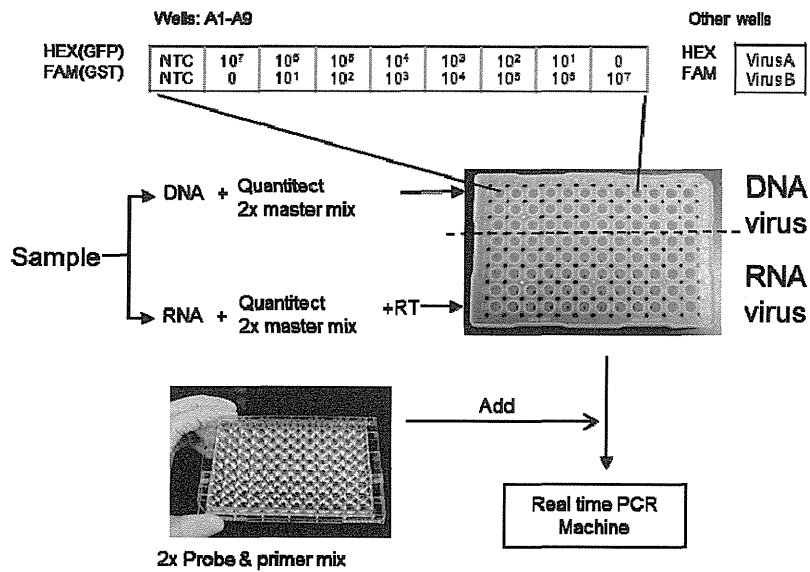


図1 Multivirus real-time PCR の概要

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、各ウイルス量がだまかに計測可能である。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。各 well の probe-primer セットに上記核酸 (RNA, DNA) を加え、キアゲン社 Quantitect multiplex One step RT-PCR kit を用いて反応を行ない、ABI PRISM 7900HT でデータの採取を行う。

表1 Multivirus real-time PCR で検出可能なウイルスの一覧

<b>DNA viruses</b>
Polyomavirus: JC virus, BK virus, KI virus, WU virus, Merkel cell polyomavirus, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus, Human polyomavirus6, 7, 9, 10, 11, 12
Papillomaviruses: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73
Parvoviruses: adeno-associated virus 1, 2, 3 and 5; parvovirus B19; human bocavirus; adenovirus A- F
Herpes viruses: HHV 1- 8, B virus
Poxviruses: variola virus, monkey pox virus, molluscum contagiosum virus
Anellovirus: TTV
Hepadnavirus: Hepatitis B virus
<b>RNA viruses</b>

Filoviruses: Ebola virus, Marburg virus

Bunyaviruses: Crimean- Congo hemorrhagic fever virus, hemorrhagic fever with renal syndrome virus (Hantaan, Dohrva, Puumala, and Seoul), Rift valley fever virus, sin nombre virus

Arenaviruses: Lassa virus, Junin, Guanarito, Machupo and Sabia viruses

Togaviruses: equine encephalitis virus (Venezuelan, Eastern, and Western), Sindbis virus, Mayaro virus, Getah virus, Chikungunya virus, rubella virus

Enteroviruses: enterovirus 68 and 71; poliovirus 1- 3; coxsackievirus A2- A6, A8- A10, A16, A21, A24, B1- B6; echovirus 5, 6, 7, 9, 11, 13- 18, 25, 30; parechovirus 1 and 3; rhinovirus A and B; rotavirus; reovirus 1- 4; Melaka virus; Colorado tick borne fever virus

Flaviviruses: dengue virus 1 and 2; Japanese encephalitis virus; Murray Valley encephalitis virus; St. Louis encephalitis virus; West Nile virus; Tick-borne encephalitis virus; yellow fever virus

Orthomyxoviruses: influenza virus A- C, H5N1, H7N9 and H1N1

Paramyxoviruses: parainfluenza virus 1- 3; Hendra virus; mumps virus; measles virus; Sendai virus; RS virus A and B; metapneumovirus; Nipah virus

Rabdoiruses: rabies virus, lyssavirus 5 and 6, Chandipura virus, Duvenhage virus

Coronaviruses: coronavirus OC43, 229E and NL63; SARS virus, MERS coronavirus

Caliciviruses: sapovirus, Norwalk-like virus 1 and 2

Hepatitis viruses: hepatitis A virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, hepatitis E virus, GB virus

Retroviruses: human immunodeficiency virus 1, human T cell leukemia virus 1 and 2

Others: astrovirus, Simian endogenous retrovirus

表2 本研究班で収集された脳炎サンプルの解析結果(有意なウイルスが検出されたもののみ)

患者No	検体の種類	臨床的事項			結果		
		性別	診断時年齢	感染研受付日	日本脳炎	Multivirus PCR	次世代シーケンサー
P1	髄液、血清	男	42歳	2013/10/24	陰性	有意なウイルスは無し。	coxsackievirus B4 解読リード 2本陽性
P2	髄液、血清	男	0.1歳	2013/10/25	陰性	有意なウイルスは無し。	coxsackievirus B4 解読リード 146本陽性
P5	血清、臓器(脳、髄液は無し。)	男	10日	2013/10/31	陰性	CoxB3	未検
P12	髄液、血清	女	4歳11か月	2014/2/26	陰性	HHV-6 (633 copy per ul)	未検
P24	髄液、全血	女	4歳10か月	2014/7/25	IgM抗体陽性	未検	JEVの検出(1read)
P29	5点	女	4歳10か月	2014/7/30	陰性	Parechovirus 3 (312 copy per uL)	未検
P35	髄液、血清	女	65歳	2014/9/9	陰性	EBV (1.6x10E1 copy per ul)	未検
P42	5点	男	4歳	2014/11/26	陰性	norovirus 2 (3.62x10E6)	未検
P45	5点	男	22日	2015/1/14	未検	Enterovirus 71 (1.96x10E6 (便))	未検
P48	5点	男	2歳	2015/3/31	未検	norovirus 2 (7.79x10E6 便) BKV (2.64x10E4 尿), Adv-B (1.9x10E2 尿)	未検
P54	5点	男	4歳	2015/6/5		human bocavirus 20copy/ $\mu$ l	Human astrovirus MLB-1 69本
P64	5点	女	0歳	2015/8/28	陰性	Parechovirus 3 (209 copy per uL)	未検
P66	5点	女	0歳	2015/9/8	陰性	Parvovirus B19 (220 copy per uL)	未検
P69	5点	男	7歳	2015/10/21	陰性	Cox A10 (6.15.E+06)	未検
P74	髄液、血清、尿	男	8歳	2015/9/29	陰性	Parvovirus B19 (48198 copy per uL)	未検

P76	血清, 便	男	1歳	2015/10/2	陰性	Cox A6 (7.77x10E4)	未検
P81	5点	男	0歳	2015/10/9	陰性	Parechovirus 3 (177copy)	未検
P84	4点	女	1歳	2015/12/15		HHV6B 812.5copy/ $\mu$ L	未検
P93	5点	男	1歳	2016/2/9		HHV-6B 8.24copy/ $\mu$ L	未検
P96	5点	男	0歳	2016/2/19		CMV, Rhinovirus	未検

他に NGS で微生物が検出された症例あり。ただし、病因との関連が不明であるため本表には未記載。

不明脳炎症例における網羅配列解読・病原体データベースの作成

研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター センター長
研究協力者	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第三室
	高崎智彦	国立感染症研究所・ウイルス第一部 室長
	片野晴隆	国立感染症研究所・感染病理部 室長

**研究要旨** 全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEMの実態・病因解明に資することを目的とする。分担研究者は、急性脳炎・脳症の原因究明を目的とした次世代シーケンサー(next-generation sequencing: NGS)による網羅的病原体検索を担当した。

H25-27年度の3カ年で62名の不明脳炎・脳症患者についてNGS検査未実施網羅的病原体検索が必要と判断された検体の検査を行った(P1-P89)。NGS検査前に当該病原体が確定もしくはRNA分解等で不適当な臨床検体以外については実施していない。患者髄液からHuman coxsackievirus B4、Human astrovirus MLB-1、日本脳炎ウイルス、Human herpes virus (-3, -4, -8)、Human parainfluenza virus 4b、Human bocavirus、Norovirus、各種細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液からHuman adenovirus C、Human herpes virus (-5, -6B, -7)、Enterovirus B、Human parainfluenza virus 3、Human parainfluenzavirus 4、Human parechovirus 6、Saffold virus 2を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。血液関連検体(血清、血漿、全血)から、主にTorque teno virus(亜種含む)を検出する症例が多く、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症にともなって再活性化している可能性が示唆された。Enterovirus等を起因病原体として疑う場合、便検体の検査は有効である。脳炎・脳症の前駆症状と思われる腸管症状の起因菌(ESBL産生大腸菌)の特定と菌分離に成功した症例もあった。尿検体からは優位な病原体を検出できず、今後の検査には対象外としてもよいかもしれない。

患者検体から調整したDNA/RNAの質が悪い検体も散見され、保管・送付法による問題であろうか、検査対象外とせざるを得なかった。網羅的病原体検索法は革新的な微生物検査法ではあるが、少しでも不明症例を効率良く解明するためには病院からの検体送付法・臨床情報の収集等の基本的な作業手順を正確に遵守することも必要である。また、どの微生物検査法を駆使しても不明として判定される症例について、検体採取部位の再検討や、そもそも感染症が起因するのかどうかを議論することも必要であろう。

個別PCR(対象配列が短く限定的)で検出できない症例においても、NGSは病原体ゲノムDNAの欠片でも検出でき、感度もおよそ10倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑いが濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の高度な核酸検査法であって確定検査診断ではないため、抗体検査法によるIgM陽性を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。

## A. 研究目的

本研究班では、原因不明の急性脳炎・脳症、予防接種後急性脳炎・脳症、ADEM 症例から症状・所見とともに臨床検体を収集し、日本脳炎の鑑別を実施すると共に、急性脳炎・脳症の原因究明を目的として網羅的な病原体検索を行い、脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。

全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。

## B. 研究方法

1) 臨床検体の収集と微生物検査の流れ役割分担  
研究代表者の多屋と研究分担者の倉根は感染研の研究分担者高崎、片野、黒田との連携を密にして、原因究明に適切な臨床検体が感染研に届けられるよう調整し、医療機関と感染研、感染研各部を結ぶ情報交換システムを確立し、医療機関と感染研間で迅速な情報共有が可能となるようシステムを構築する。

保健所に報告された急性脳炎、厚生労働省に報告された脳炎・脳症、ADEM の患者の症状・所見に基づき統一的な方法で収集し解析すると共に、適切な臨床検体（血液（急性期と回復期のペア）、髄液、鼻咽頭ぬぐい液、便、尿）が感染研に届けられるよう調整し、また、日本脳炎として報告された患者の予後（転帰）については、厚生労働省と連携して調査を実施する。

収集した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）から微生物検査を行う。検査の流れは、日本脳炎ウイルス（研究分担者：高崎智彦）→ 包括的ウイルス PCR 検査（研究分担者：片野晴隆）→ 次世代シーケンサーNGS による網羅的病原体検査（研究分担者：黒田誠）の順に遂行し、不明症例を積極的に解明していく。具体的には、高

崎は、日本脳炎特異的 IgM 抗体補足 ELISA 法を用いて、髄液及び血清中の抗日本脳炎 IgM 抗体を測定することで日本脳炎の鑑別を行う。日本脳炎が否定的であるならば、感染研の片野は real-time PCR 法を用いて、網羅的なウイルス検索を実施する。それでも病原体が判明しなかった場合、黒田は次世代シーケンサーにより大量の核酸配列を網羅的に解読し、従来法で特定できない易変異性 RNA ウイルスや未知のウイルスの検索を行う（図 1）。感染研・病原体ゲノム解析研究センターにベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq（本研究課題でリース賃借）と情報解析サーバーが整備されている。

3年間で症例を蓄積し、結果をまとめ、長期的な視野に立ってこれらの疾患の原因究明に資する病原体検索を全国的な規模で実施継続していく体制の構築、継続について検討する。

## 2) 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検索

研究分担者：片野博士から臨床検体由来の精製 DNA/RNA を引き継ぎ、Multivirus-PCR 法でも検出できなかった病原体の検出を遂行する（図 2）。

- DNA-seq (DNA の網羅的解読)  
片野博士から提供された DNA 1 ng をもとに、Illumina NEXTERA XT DNA sample Prep kit にて網羅配列解読用の DNA ライブラリーを作成した。
- RNA-seq (RNA の網羅的解読)  
片野博士から提供された 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。
- 配列解読  
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 シングルエンド法で解読した。検体あたり、およそ~300 万本の解読リードを得られるよう調整した。
- 配列解析  
解読リードには患者由来のヒト配列が含まれており、倫理規定上、削除して以降の解析から除外する必要がある。Bwasw リードマッピング法にてヒトゲノム配列 (hs\_ref\_GRCh37.p2) にマッピングし、マッピングされなかったリードを病原体候補とした。



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。病因論が明確なウイルス種を優先的に検索し、ウイルスが検出されなかった場合には細菌性の症例であったかどうか検討した。CLC Genome workbench を用いて De novo assembly を行った。

- 分子系統解析

MEGA6.0 を用いて 1,000 回ブートストラップ処理した最尤法による分子系統解析を行った。

(倫理面への配慮)

試料提供者の個人情報、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 がつけられる。医療機関で急性脳炎・脳症、ADEM 等、本研究班で対象となる患者から検体を採取する場合は、各医療機関の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。緊急の対応が必要であったり、各医療機関の倫理委員会で検討できない場合は、感染研の倫理委員会で包括的に審査されるものとする。

連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々の ID とし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこの ID を運用して行う。

申請者には ID が付けられた検体と添付の情報が送付される。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、申請者において個人を特定することはできないようにする。本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を受けた (H25/9/25 No. 445)。

## C. 研究結果

### 1) 本研究課題で収集した急性脳炎・脳症検体の病原体検索

研究分担者：片野による Multivirus-real-time PCR 法はウイルスを対象とした包括的な PCR 検査法であり、急性脳炎の病原体検出にも威力を発揮し期待できるシステム

である。しかしながら、一般的に PCR 法ではプライマーが合致しない病原体は検出できず、いずれの方法でも不明症例になるケースが見受けられる。研究分担者：高崎による抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体も陰性であることを確かめ、研究分担者：黒田はメタゲノム解析法による網羅的病原体検索により、取りこぼした病原体をも検出する役割を担当した。

網羅的病原体検索法の DNA-seq と RNA-seq の両方を試みた結果、特異性・感度ともに RNA-seq のほうが良好であり、以後の検査には RNA-seq を基本にして検査することとした。

以下、特徴的な病原体を検出した症例のみ考察する。

- 症例 1 (P1)

42 歳、急性脳炎症例、髄液から Human coxsackievirus B4 の配列 2 本を検出した (図 3)。

- 症例 2 (P2)

生後 1 ヶ月、無菌性髄膜炎、髄液から Human coxsackievirus B4 の配列 146 本を検出した (図 4)。症例 1 と 2 は同一の医療機関からの依頼検体であったことと発症時期が数日しか違わないため、同一の Human coxsackievirus B4 による発症かどうか検討すべく、得られた解読リードを用いて塩基レベルで Human coxsackievirus B4 の評価を行った。Human coxsackievirus B4 の検出リード数が 2 本と少ないけれど、結果、P2 の Human coxsackievirus B4 と同一の塩基アレルであることが示唆され、同等の類縁株にて急性脳炎を発症した可能性が示唆された (図 5)。

- 症例 2 4 (P24)

患者 P24 の髄液から日本脳炎ウイルスが検出され (図 6)、分担研究者・高崎博士による IgM 抗体陽転の検査結果から、本症例は日本脳炎ウイルスによる脳炎である可能性が示唆された。特に細菌性の疑いが強い

・ 症例 3 2 (P32)

便検体の NGS 検査の解読リードの 84.9% がヒト配列であり、明らかに下痢等による腸管上皮細胞の剥離があったと推察された。脳症発症前に前医にて既に重い下痢症状ありと診断されていたことが分かった。便検体の NGS 検査から、正常腸内フローラとは逸脱したバランスで大腸菌優位なフローラになっていた (図 7)。便検体から大腸菌 8 コロニーを分離し、それぞれ個別にゲノム解読してゲノム分子系統解析をした結果、8 コロニーとも同一のコアゲノムを有することが判明した (図 8)。

・ 症例 4 2 (P42)

便検体からノロウイルス配列 (解読リード 2127 本) を検出した (図 9)。得られた 2127 本 (150-mer) の *de novo assembly* により、全長 7.5 kb のノロウイルスゲノム配列を確定した。ホモロジー検索から台湾のヒト下痢症で分離された Hu/GII-4/Taoyuan/CGMH59/2012/TW 株のゲノム情報と酷似していることが判明した (図 9)。本症例の分離株の genotype は GII.4 に分類された。便検体の NGS 検査から、ノロウイルスだけでなく大量の大腸菌配列を検出し、正常な腸管フローラと比べて明らかな逸脱した組成であることが示唆された (図 10)。抗菌薬治療の影響など、複合的な要因が重なっている可能性が示唆された。分離した大腸菌コロニー 4 株の全ゲノム情報から、同一のコアゲノムを有するクローンであることが判明した (図 11)。

・ 症例 5 4 (P54)

髄液から Human astrovirus (HAstV) MLB-1 が検出され、全ての臨床検体で HAstV が陽性であったことから本症例は HAstV MLB-1 による脳炎である可能性が示唆された (表 2)。便検体から得られた RNA-seq リードを用いて *de novo assembly* を行い、6,181 nt の HAstV 全長ゲノム配列を得て「HAstV

MLB-1 NAGANO1545」と命名した (GenBank ID: LC064152 として登録)。NAGANO1545 配列は全ゲノム配列長に渡って中国のヒト糞便から分離された SY071 (GenBank ID: JQ086552) と 99%以上の相同性を有し、近隣国との類似性が見られた。公開されている HAstV のゲノム情報が乏しいため、分子系統解析で分類に使用される RNA-dependent RNA polymerase 遺伝子の部分配列を抽出し (LC064152.1|Human\_astrovirus\_MLB1\_NAGANO1545, 3173-3495: 323 nt)、1,000 回ブートストラップ処理した最尤法にて分子系統樹を作成し評価した (図 12)。部分配列での分子系統解析から、2013 年 5 月に日本で分離された HAstV MLB-1 JP11710 と近縁であることが判明した。繰り返す下痢症状の激しい患者でもあったことから、腸管症状が起因する脳炎へ進展したものと推察された。

他の患者髄液から、Human herpes virus-8, Human parainfluenza virus 4b, Human bocavirus, 各種細菌等、様々な病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液から Human adenovirus C, Human herpes virus (-5, -6B, -7), Enterovirus B, Human parainfluenza virus 3, Human parechovirus 6, Saffold virus 2 を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。

D/E. 考 察・結 論

Multivirus real-time -PCR 法 (研究分担者: 片野晴隆) と網羅的病原体検索法 (研究分担者: 黒田誠) の感度・特異性を比較したところ、双方の検査を遂行することで、より確からしい結果を示すことができた。髄膜炎の多くが DNA ウイルスである HHV-6 等が想定されるが、DNA-seq よりも RNA-seq のほうが感度もよく、RNA ウィル

スも守備範囲に入れるためには RNA-seq が一番効率のよい検査法であることが示唆された。

個別 PCR (対象配列が短く限定的) で検出できない症例においても、NGS は病原体ゲノム DNA の欠片でも検出でき、感度もおよそ 10 倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑いが濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の単なる高度な核酸検査法であって確定検査ではないため、抗体検査法による IgM 陽転を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。

不明脳炎・脳症の解明には、臨床情報・検査法を含む総合的な基盤データベースの構築が不可欠であり、少しでも不明症例を効率良く検査・解析することが先決である。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

なし

##### 2) 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

## 網羅検査法としてのメタゲノム解析

～新興・再興感染症対策～  
従来の検査法で特定できない病原体を想定

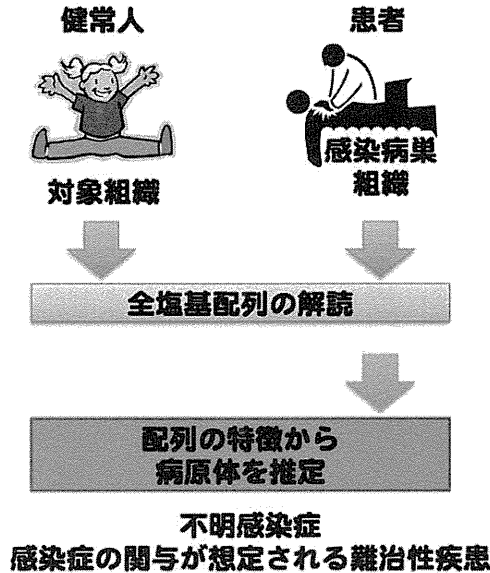


図1 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査法の基本的概念図  
患者由来検体から検出される特徴的な配列を用い、総合的に病原体候補を特定していく。

## Detection of potential pathogens by deep sequencing

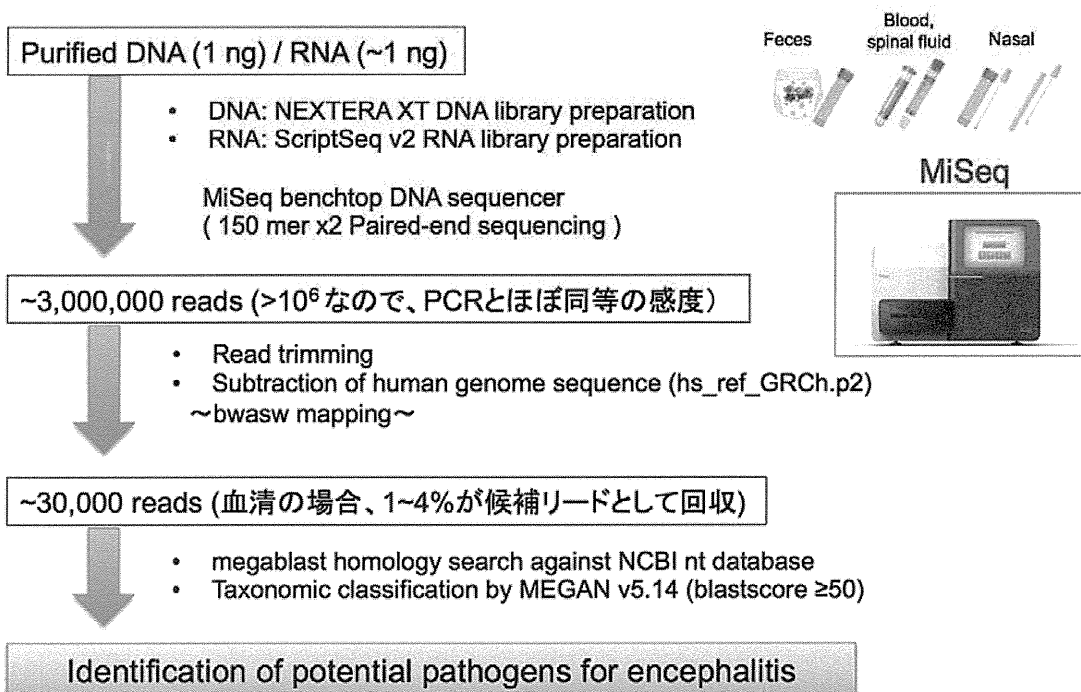


図2 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査法の流れ図

表1 NGS 検査にて脳炎・脳症の髄液から検出された候補病原体の一覧。

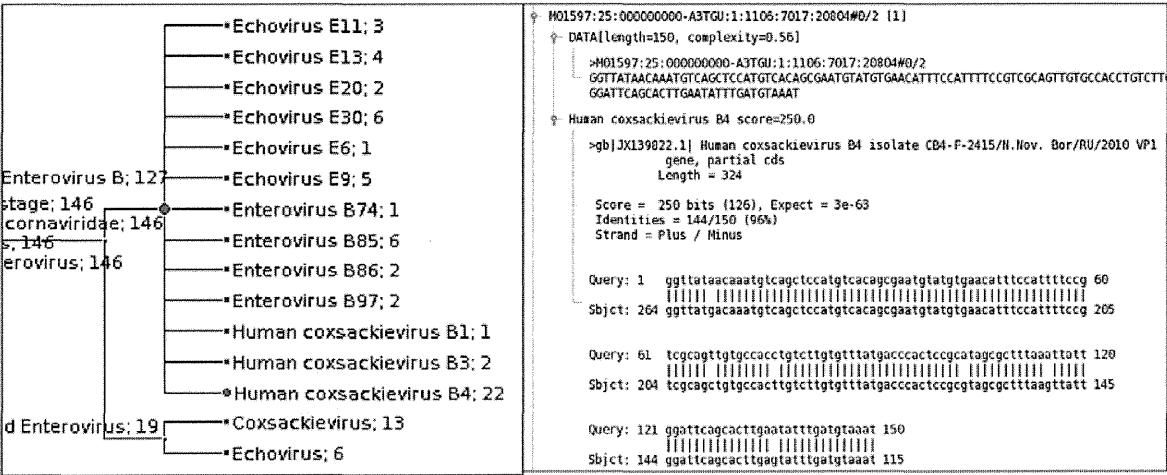
検体No	検体の種類	性別	診断時年齢	診断名	発病日(脳炎脳)	検体採取日	次世代シーケンサー	NGS (DNA-seq, RNA-seq)
P1-1	髄液	男	42歳	急性脳炎	2013/9/18	2013/9/21		coxsackievirus B4 解読リード 2本陽性
P2-1	髄液	男	0.1歳	無菌性髄膜炎				coxsackievirus B4 解読リード 146本陽性
P11-1	髄液	女	3歳	急性脳炎	2014/1/29	2014/2/1		TTV, 2 reads
P13-1	髄液	男	38歳	急性脳炎	2014/4/8	2014/4/17		HHV-8, 5 reads
P13-2	血清	男	38歳	急性脳炎	2014/4/8			Human parainfluenza virus 4b, 2 reads
P13-3	咽頭ぬぐい液	男	38歳	急性脳炎	2014/4/8			HHV-7, 2 reads、Avastrovirus (pigeon avian nephritis virus) 2 reads、VirusChimp162 2 reads、ヨーグルト食べた? Lactobacillus casei が21,268 reads (沢山)
P24-1	髄液	女	4歳10か月	急性脳症	2014/4/14	2014/4/14		日本脳炎ウイルスの配列が1本検出
P27-2	髄液②	女	8歳	急性脳炎(ADEM、小脳炎)	2014/6/1	2014/6/11		Human bocavirus を検出 2本
P27-3	血液(EDTA血)	女	8歳	急性脳炎(ADEM、小脳炎)	2014/6/1	2014/6/17		Human bocavirus を検出 2本
P28-2	血液	男	10か月		2014/6/13	2014/6/18		Human herpesvirus 6Bを1本検出。TTV like も数本検出。
P30-3	咽頭ぬぐい液	女	2歳3か月	急性脳症(MERS?)	2014/6/30	2014/7/4		Human parainfluenza virus 3, 18本
P31-2	血清	女	60歳5ヶ月	急性辺縁系脳炎	2014/8/8	2014/8/12		Torque teno virus 2本
P31-3	咽頭ぬぐい液	女	60歳5ヶ月	急性辺縁系脳炎	2014/8/8	2014/8/19		Veilonella, Prevotellaの偏性嫌気性菌が多数
P32-1	髄液	女	9歳	急性脳症	2014/8/24	2014/8/25		大腸菌を検出
P32-2	血清	女	9歳	急性脳症	2014/8/24	2014/8/25		大腸菌を検出
P32-4	便	女	9歳	急性脳症	2014/8/24	2014/8/26		K1大腸菌が半数。
P32-5	尿	女	9歳	急性脳症	2014/8/24	2014/8/26		K1大腸菌が半数。
P34-4	咽頭ぬぐい液	女	1歳2か月	急性脳症	2014/7/4	2014/7/9		HHV-6B, 1本
P36-4	咽頭ぬぐい液(咽)	女	3歳7か月	急性脳炎・脳症あるいは急性	2014/9/5	2014/9/18		HHV-5 5本, Hamophilus influenzae, Moraxella属が大多数。
P37-2	血清	男	5歳9か月	急性脳炎	2014/9/19	2014/9/19		Torque teno mini virus , 1本
P37-3	全血	男	5歳9か月	急性脳炎	2014/9/19	2014/9/19		Torque teno mini virus , 10本
P38-2	血清	女	14歳	急性脳炎・脳症、辺縁系脳	2014/9/13	2014/9/13		Torque teno virus 1本
P38-3	全血	女	14歳	急性脳炎・脳症、辺縁系脳	2014/9/13	2014/9/17		Torque teno virus 9本
P42-1	髄液	男	4歳	急性脳症	2014/11/18	2014/11/21		ノロウイルス 11本 (0.01%)(他サンプルからの紛れ込が懸念)、大腸菌 1,190本
P42-2	血清①	男	4歳	急性脳症	2014/11/18	2014/11/21		ノロウイルス 7本 (0.00004%)(他サンプルからの紛れ込が懸念)、大腸菌 670本
P42-3	咽頭ぬぐい液	男	4歳	急性脳症	2014/11/18	2014/11/21		ノロウイルス 5本 (0.0001%)(他サンプルからの紛れ込が懸念)、大腸菌 595本、Staphylococcus aureus 黄色ブドウ球菌 20,159本 (17.8%)
P42-4	便	男	4歳	急性脳症	2014/11/18	2014/11/23		ノロウイルス 2127本 (0.2%)、大腸菌 7,620,252本(便の19.8%)
P42-5	尿	男	4歳	急性脳症	2014/11/18	2014/11/21		ノロウイルス 3本 (0.0001%)(他サンプルからの紛れ込が懸念)、大腸菌 497本
P43-3	血清①	男	8歳	急性脳症	2014/11/28	2014/11/28		Torque teno virus
P49-1	髄液	女	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/18		Klbsiella 等腸内細菌科が少し
P49-2	血清	女	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/19		Human adenovirus 4 が1本
P54-1	髄液	男	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/30		Human astrovirus MLB-1 81本
P54-2	血清	男	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/30		Human astrovirus MLB-1 69本
P54-3	咽頭ぬぐい液	男	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31		Human astrovirus MLB-1 177本, Human bocavirus 1本
P54-4	便	男	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31		Human astrovirus MLB-1 147,610本(2.3%),
P54-5	尿	男	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31		Human astrovirus MLB-1 321本
P57-3	咽頭ぬぐい液	男	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/8		偏性嫌気性菌のPrevotella, Veilonella が多数
P59-3	咽頭ぬぐい液	女	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9		偏性嫌気性菌のFusobacterium が多数
P59-5	鼻腔ぬぐい液	女	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9		Moraxella catarrhalis が多数、かつ Torque teno virus 13本検出(原発巣でしょうか?)
P63-5	尿	女	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17		大腸菌多め 4150本
P63-6	血清②	女	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17		Torque teno virus 3本
P78-3	咽頭ぬぐい液	女	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8		HPIV4, 72本: Human parechovirus 6, 229本
P83-1	髄液	男	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15		HHV-3, 1本
P83-4	鼻腔ぬぐい液	男	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15		HHV-4, 1本
P89-3	咽頭ぬぐい液	男	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25		Saffold virus 2. 1本、他、Prevotella, Veillonella 等の偏性嫌気性菌

```

En1_HumanNHITS_megablast-nt_082813-02_1E-5_s50_rna
  Cxsackievirus [2]
    M01597:25:00000000-A3TGU:1:2104:20641:2229#0/1 [1]
      DATA[length=118, complexity=0.511]
      >M01597:25:00000000-A3TGU:1:2104:20641:2229#0/1
      AAGCAAC(CCAAAGACAGACAGACGCACGAACACCGCTTGTAGTGTAGTGACACTCTATCATCCACTACATAATAATTATTACAAGATGTCGCATCAATTGACGGACGGCA
    Cxsackievirus score=151.0
      >gb|AF160103.1|AF160103 Cxsackievirus B4 isolate 6095 polyprotein gene, partial cds
      Length = 561
      Score = 151 bits (76), Expect = 2e-33
      Identities = 97/104 (93%)
      Strand = Plus / Plus
      Query: 9   caaaagacaggagcgcacgaaaccagcttgagtgctagtgcaactctatccaccac 68
      Sbjct: 163 caaaagacaggagcgcacgaaaccagcttgagtgctagtgcaactctatccaccac 222
      Query: 69   actaatataantattacaagatgctgcataaatttcggcga 112
      Sbjct: 223 actaatataactactacaagatgctgcataaactcggcga 266
    M01597:25:00000000-A3TGU:1:2104:20641:2229#0/2 [1]
      DATA[length=118, complexity=0.511]
      >M01597:25:00000000-A3TGU:1:2104:20641:2229#0/2
      TGCCCGTTCGCTGAATTTGATGACAGCATCTTTGTAATAATTTATATTAGTGTAGTGGATGATAGAGTGCACCTAGCAC
    Cxsackievirus score=151.0
      >gb|AF160103.1|AF160103 Cxsackievirus B4 isolate 6095 polyprotein gene, partial cds
      Length = 561
      Score = 151 bits (76), Expect = 2e-33
      Identities = 97/104 (93%)
      Strand = Plus / Minus
      Query: 7   ttgcctgactttagtcgacatctttgtaataatttattatgtagtggatgagag 66
      Sbjct: 266 ttgcctgactttagtcgacatctttgtagttagtaattatgtagtggatgagag 207
      Query: 67   ttgcactagcactcaagctggtttcgtgcgctcctcttttg 110
      Sbjct: 206 ttgcactagcactcaaacctggctcgtgcgctcctcttttg 163
  
```

✧ Coxsackievirus B4 と 93% 相同性を示す解読リード2本を髄液から検出できた。  
 ✧ ヒト由来の配列が少なく、髄膜炎等で見られる細胞増多は無かったと思われる。

図3 症例1 (P1) の網羅的病原体検索の結果。Multivirus real-time -PCR では不明であったが、網羅的病原体検索法にて髄液 RNA から Human coxsackievirus B4 を検出した。



✧ 髄液から Coxsackievirus を Total 146本検出し、特に B4 が一番多かった。  
 ✧ P1 と同様に、ヒト由来の配列が少なく、髄膜炎等で見られる細胞増多は無かったと思われる。

図4 症例2 (P2) の網羅的病原体検索の結果。Multivirus real-time -PCR では不明であったが、網羅的病原体検索法にて髄液 RNA から Human coxsackievirus B4 を大量に検出した。

P1 / P2 Coxsackievirus B4 の比較 ~リードマッピングによる評価~

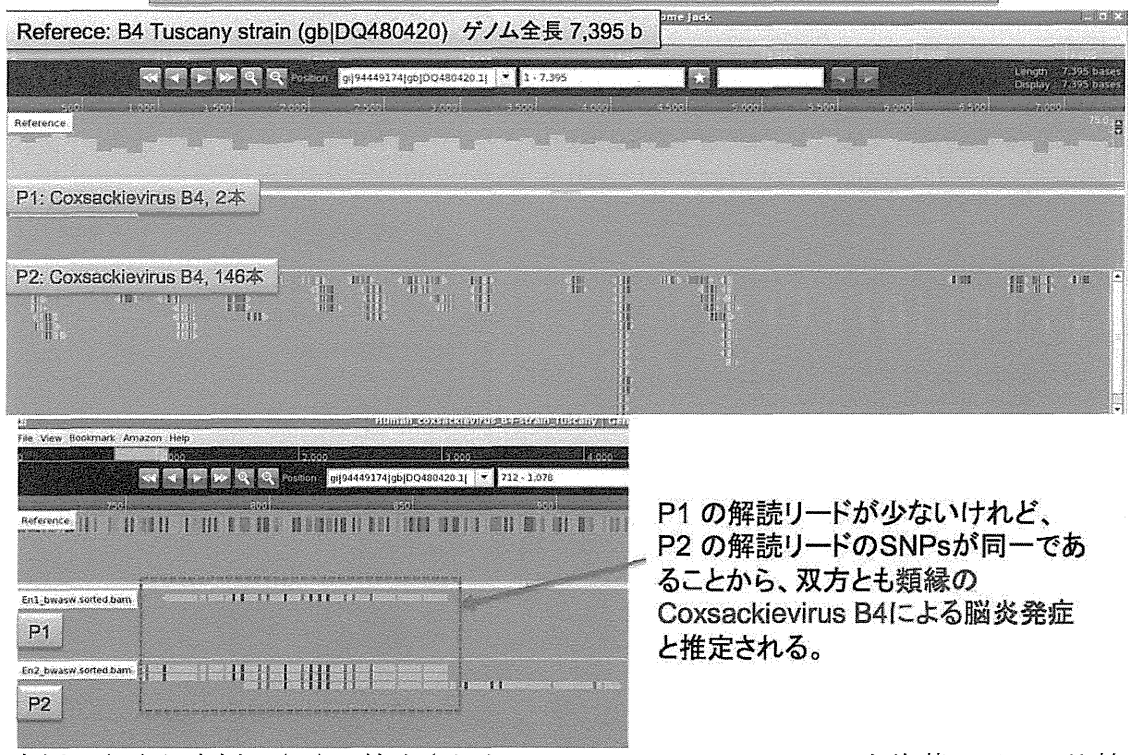
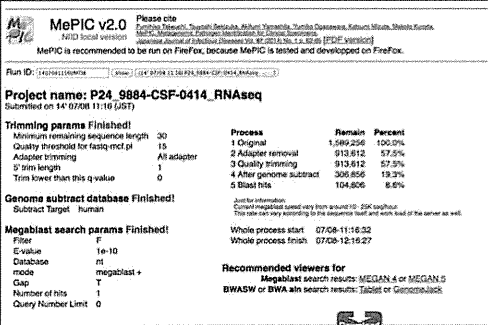
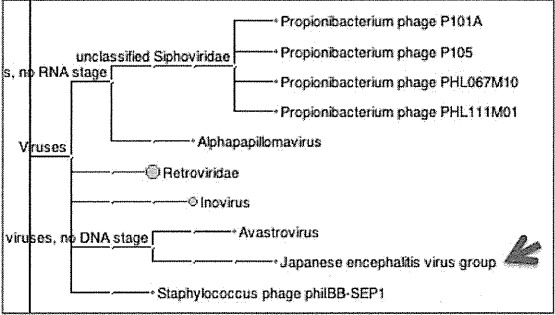


図5 症例1 (P1) と症例2 (P2) で検出された Human coxsackievirus B4 を塩基レベルで比較した。Tuscany 株ゲノムを参照配列としたリードマッピングの結果、P1, P2 ともに類縁の Human coxsackievirus B4 であることが示唆された。

P24の髄液(9884-CSF, 4/14)のNGS検査

- P24髄液(4/14)は透明で、細胞沈渣無し。50 µl 使用。
- RNA-seqライブラリーの作成が困難であったが、わずかに見える泳動像から回収。
- 日本脳炎ウイルスの配列が1本検出された。





**Japanese encephalitis virus genomic RNA, complete genome, strain: JEV/Bo/Aichi/1/2010**  
 Sequence ID: [dbj|AB853904.1](#) Length: 10958 Number of Matches: 2

Range 1: 10466 to 10527 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
113 bits(124)	2e-22	62/62(100%)	0/62(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      TACTGAGTAGACGGTGCTGCCTGCGTCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGA 60
              |||
Sbjct 10466  TACTGAGTAGACGGTGCTGCCTGCGTCTCAGTCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAATCTGA 10525

Query 61     CA 62
              ||
Sbjct 10526  CA 10527
    
```

図6 症例24 (P24) の網羅的病原体検索の結果。日本脳炎ウイルスを髄液から検出した。



## P32-4 便・直腸スワブ(8/26)のNGS検査

□ 便(直腸スワブ)からは大腸菌が大多数(14.5%)

**MePIC v2.0**  
Please cite  
 Fumagalli, Tabet, Nguyen, Sasazuki, Nakano, Yamaguchi, Nishida, Ohtawara, Kitamura, Maeno, Mascho, Kuroda.  
 MePIC: Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Sequences.  
 Japanese Journal of Infectious Diseases, Vol. 87, 2014, No. 1, 52-66 [PDF version]  
 MePIC is recommended to be run on FireFox, because MePIC is tested and developed on FireFox.

**Project name: P32-4-Feces0826\_megablast**  
 Submitted on 14/08/28 10:50 (JST)

**Trimming params Finished!**

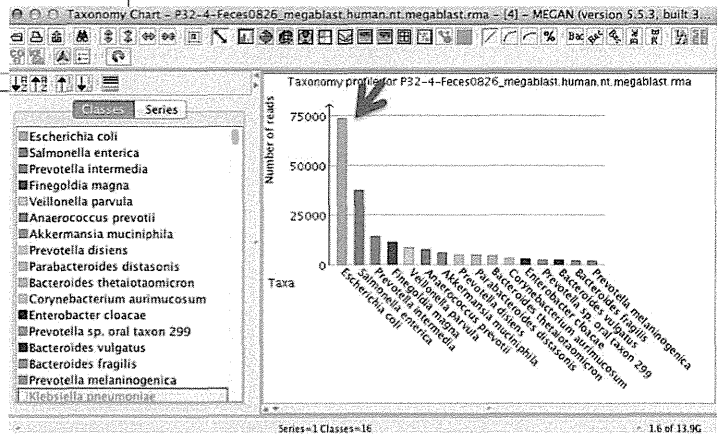
Minimum remaining sequence length	30	Process	1 Original	3,350,331	100.0%
Quality threshold for fastq-mcut.pl	15		2 Adapter removal	3,269,059	97.6%
Adapter trimming	A5 adapter		3 Quality trimming	3,269,059	97.6%
5' trim length	1		4 After genome subtract	504,820	15.1%
Trim lower than this q-value	0		5 Blast hits	374,257	11.2%

**Genome subtract database Finished!**  
 Subtract Target human

**Megablast search params Finished!**

Filter	F	Whole process start	08/28-10:50:35
E-value	1e-10	Whole process finish	08/28-20:20:43
Database	nt		
mode	megablast+		
Gap	T		
Number of hits	1		
Query Number Limit	0		

84.9% がヒト腸管上皮細胞  
 直腸スワブの擦過により増加したのか、  
 下痢症状により増えたのか不明....  
 健常便であれば2%程度



大腸菌 73,668 本 / ヒト以外  
 504,820 本 = 14.5% の存在比

図7 症例32 (P32) の網羅的病原体検索の結果。正常腸管フローラから逸脱したような大量の大腸菌を便検体から検出した。便のNGS検査から、解読リードの84.9%がヒト配列であることから、明らかな腸管粘膜の炎症を伴った下痢症状が疑われた。

## 直腸スワブ(8/26)・大腸菌分離株の遺伝的特徴

### コアゲノムSNPs解析による分子系統解析



Extraintestinal pathogenic  
*Escherichia coli* O1:K1  
 の可能性あり。  
 新生児髄膜炎に係る K1 莢膜抗原を有す  
 (次スライド)

### MLST-1.7 Server - Typing Results

Sequence Type: ST95

Locus	% Identity	HSP Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100.00	536	536	0	adk-37
fumc	100.00	469	469	0	fumc-38
gyrB	100.00	460	460	0	gyrB-19
icd	100.00	518	518	0	icd-37
mdh	100.00	452	452	0	mdh-17
pura	100.00	478	478	0	pura-11
recA	100.00	510	510	0	recA-26

MLST法にても ST95 の遺伝型に該当する。

図8 症例32 (P32) の便検体から分離した大腸菌8コロニーの個別ゲノム解読とゲノム分子系統解析。分離株は O1K1 に分類され、8コロニーとも全て同一のコアゲノムSNPsを有するクローンである

ことが示唆された。MLST 法での ST95 に分類される腸管外病原性大腸菌株であった。

## P42-4 便のNGS検査

Norwalk virus  
Sum=2,127

2127ヒット / 9,980,800 リード  
(0.02%)

```

Norovirus Hu/GII-4/Sagai/2006/JP score=276.0
>dbj|AB447456.2| Norovirus Hu/GII-4/Sagai/2006/JP genomic RNA, complete genome
Length=7559

Score = 276 bits (149), Expect = 7e-71
Identities = 149/149 (100%), Gaps = 0/149 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   CCATTATGGCCTGTATGTTGAGCGAGGCTTTGTGCTGGGTGTCACAAACCACCAGCTGC   60
          |||
Sbjct 418  CCATTATGGCCTGTATGTTGAGCGAGGCTTTGTGCTGGGTGTCACAAACCACCAGCTGC   477

Query 61   CATTAGCCTCGCCAAGGTCGAACCTAACACCACCTCTCCTTGTTCCTGGAGACCTGTGTACAC   120
          |||
Sbjct 478  CATTAGCCTCGCCAAGGTCGAACCTAACACCACCTCTCCTTGTTCCTGGAGACCTGTGTACAC   537

Query 121  TCCTCAGTACCTCATCTCTCCAGACACTC   149
          |||
Sbjct 538  TCCTCAGTACCTCATCTCTCCAGACACTC   566

Norovirus Hu/GII-4/Sagai/2006/JP score=246.0
>dbj|AB447456.2| Norovirus Hu/GII-4/Sagai/2006/JP genomic RNA, complete genome
Length=7559

Score = 246 bits (133), Expect = 5e-62
Identities = 135/136 (99%), Gaps = 0/136 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   CCCACCATCTAGCAGATCCTCTAGCCAAGGCACAGTCTCAACCGTGCCCTAAAGAAGTTT   60
          |||
Sbjct 7371  CCCACCATCTAGCAGATCCTCTAGCCAAGGCACAGTCTCAACCGTGCCCTAAAGAAGTTT   7430

Query 61   TGGACTCCTGGACTGGCGCTTTTAAACACGCGCAGGCAGCCTCTCTCGCTCACATTTCGCA   120
          |||
Sbjct 7431  TGGACTCCTGGACTGGCGCTTTTAAACACGCGCAGGCAGCCTCTCTCGCTCACATTTCGCA   7490

Query 121  GGCGAGGGGAGTCACG   136
          |||
Sbjct 7491  GGCGAGGGGAGTCACG   7506
    
```

配列アセンブルして全長ゲノム 7.5 kb を取得  
ホモロジーから、以下のノロウイルスとほぼ同等

"Norovirus Hu/GII-4/Taoyuan/CGMH59/2012/  
TW"  
"Hu/GII-4/Taoyuan/CGMH59/2012/TW"  
"feces"  
"Homo sapiens"  
"Taiwan"  
"23-Apr-2012"  
"genotype: GII.4"

図9 症例 42 (P42) の便検体から得られたノロウイルス配列 (解読リード 2127 本) の一部アライメントを示す。得られた 2127 本(150 mer)の de novo assembly により、全長 7.5 kb のノロウイルスゲノム配列を取得した。ホモロジー検索から台湾のヒト下痢症で分離された Hu/GII-4/Taoyuan/CGMH59/2012/TW 株のゲノム情報と酷似していた。本症例の分離株の genotype は GII.4 に分類された。

## P42-4 便のNGS検査

大量の大腸菌を検出  
正常な腸管フローラとは言いがたい組成

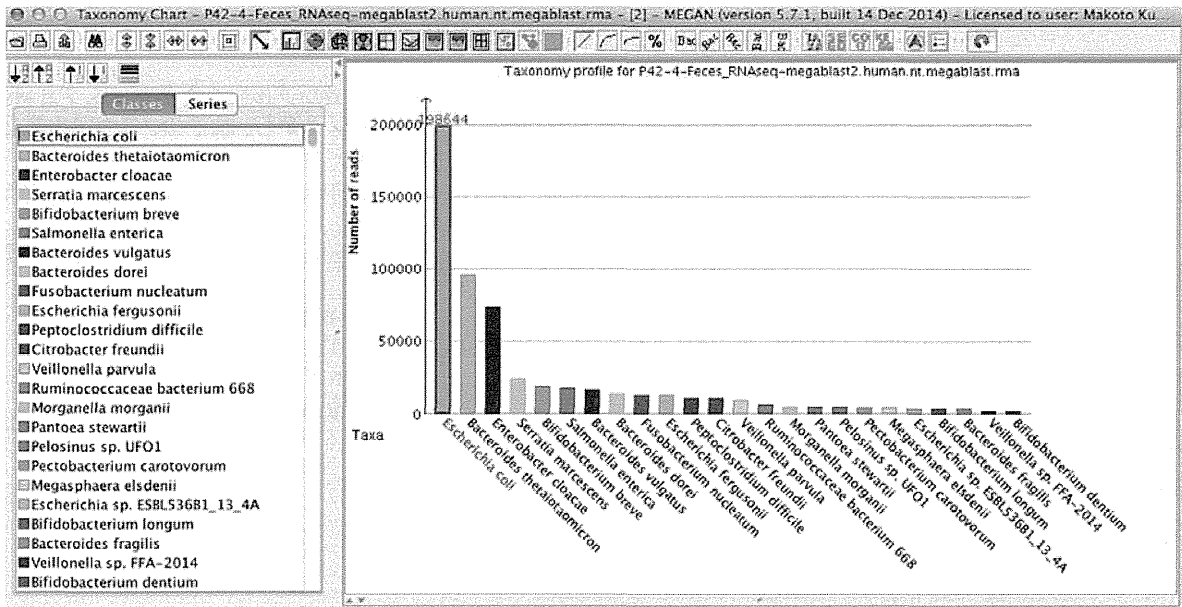


図 10 症例 42 (P42) の便検体の NGS 検査から、大量の大腸菌配列を検出し、正常な腸管フローラと比べて明らかな逸脱した組成であることが示唆された。抗菌薬治療の影響など、複合的な要因が重なっている可能性が示唆された。

## P42-4 便のNGS検査

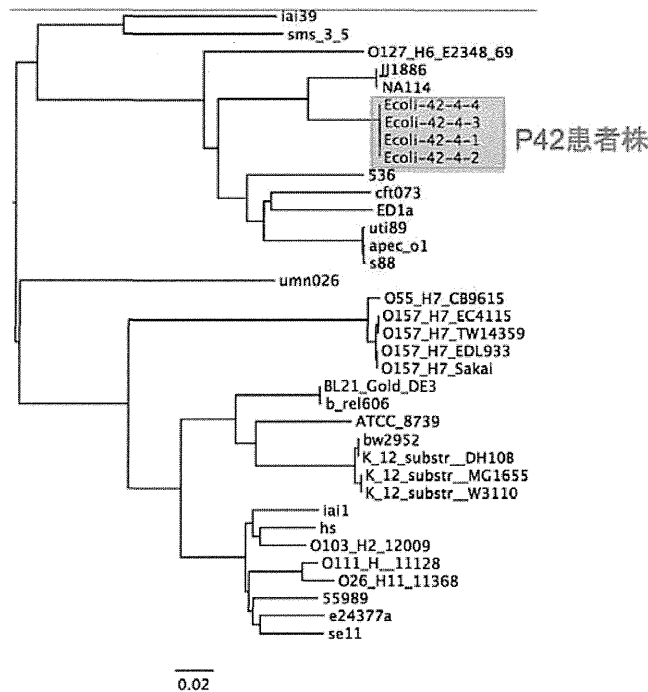


図 11 症例 42 (P42) の便検体のから分離した大腸菌コロニー 4 株の全ゲノム情報から、同一のコアゲノムを有するクローンであることが判明した。