

不明脳炎症例におけるウイルス等の網羅的検索

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

原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、定量的 PCR を応用したウイルス、細菌、真菌の網羅的検索系を開発した。これを用いて、今年度に検討を行った症例は 7 例であり、3 例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルス A6、アデノウイルス 5、及びタイプ不明のエンテロウイルスであった。これらの結果は本網羅的検索の有用性を示すとともに、日本の脳炎症例における微生物学的なエビデンスを提供するものと期待される。

A . 研究目的

日本において、急性脳炎（ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く）の少なくとも 3 割程度は原因不明とされている。本研究班では、原因不明の急性脳炎・脳症例から検体を収集し、日本脳炎の紛れ込みがどの程度あるのかを鑑別すると共に、網羅的な病原体検索を行い、脳炎・脳症の実態・病因解明に資するデータを採取することを目的とする。また、2015 年に発生した急性弛緩性麻痺の症例について、その臨床病態と微生物学的原因の究明も行う。本分担研究では原因不明の脳炎症例のサンプル（髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿）から、原因微生物の同定を行う目的で、定量的 PCR を応用したウイルス、細菌、真菌の網羅的検出法を開発し、実際の症例について解析を行った。

B . 研究方法

1) 臨床検体

検体収集の方法と、感染研における検査の役割分担は研究代表者の報告書を参照されたい。感染研に到着した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）は、原則として日本脳炎ウイルス→定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法の順に実施する。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。

3) Real-time PCR によるウイルス、細菌、真菌の網羅的検出法

本研究室で独自に開発した、ウイルスの網羅的検出法 (multivirus real-time PCR, Katano H et al. J Med Virol 2011) を応用し、脳炎、脳症の発症に関連のある微生物（ウイルス、細菌、真菌を含む）を選択し、脳炎、脳症のための病原微生物網羅的検索法を開発した。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。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) 脳炎、脳症のための病原微生物網羅的検索法の開発

Real-time PCR法を用いて、脳炎、脳症の原因となる病原微生物に特化した網羅的検索法を開発した。標的微生物は表1のとおりであり、ウイルス、細菌、真菌を含め、53種類の病原微生物を選択した。同一プレート内でヒト内因性コントロールを同時に検出できるよう、設計した。ウイルスにはDNAウイルスの他にRNAウイルスを含むため、全体の系をreal-time RT-PCRの系とし、PCR前にRT反応を行った。いくつかの細菌、真菌、ウイルスの核酸を陽性コントロールに用い、感度と特異性を検討し、目的以外の微生物が感度良く検出されること、検出限界が10 copy/reactionであることを確認した。さらに、これまで、特定の微生物が検出された実績のある臨床検体の余剰サンプルを試し、感度と特異性を確認した。

(2) 臨床検体の検索

平成 28 年 10 月から平成 29 年 3 月までに 7 件の解析依頼があり、全例につき、上記の病原微生物の網羅的検索を行った。結果、3 例について、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルス A6、アデノウイルス 5、及びタイプ不明のエンテロウイルスであった。

D . 考察

前研究班では約 100 例の原因不明脳炎、脳症を解析し、約 2 割程度でその原因病原体（ウイルス）の同定が可能であった。今年からはウイルスに加え、細菌、真菌、原虫を加えることで、より原因病原体を網羅的に検出することを目指したが、一方で、これまでの研究から、脳炎、脳症とは全く関係のないウイルスを検索対象から除外したことで、最終的に 53 種類の微生物を選択した。細菌、真菌などの選定はこれまでの疫学データや、報告を参考にした。数種類の検体で予備実験を行ったところ、咽頭拭い液や便では、健常者でも特定の細菌が大量に検出されてしまう

ことから、これらのサンプルは他の種類のサンプルとは分けて検討する必要が生じた。このため、これらのサンプルと他サンプルのwellを分け、一人の患者検体が96ウエル1プレートで検索できるよう、設計を行った。これにより検体間のコンタミネーションを極力減らしつつ、結果を得ることができた。

症例の解析については、本年度は初年度であり、倫理委員会の承認が得られたのが平成 29 年 10 月であったことから、7 件の症例解析にとどまった。エンテロウイルス系は、臨床症状から疑われるものの、検出がむずかしく、適切な時期、サンプルを選んで検索することが重要であることが示唆された。今回、アデノウイルスが 1 例から検出されているが、脳炎、脳症との関連は不明であり、さらなる詳細な検討が必要である。

E . 結論

原因不明の急性脳炎・脳症の症例の解析のため、定量的 PCR を応用したウイルス、細菌、真菌の網羅的検索系を開発した。7 症例を検討し、3 例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出した。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Sato M, Kuroda M, Kasai M, Matsui H, Fukuyama T, Katano H, Tanaka-Taya K: *Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. J Clin Virol* 2016. 78:66-70.
2. Itoh K, Iwamoto K, Satoh Y, Fujita T, Takahashi K, Katano H, Hasegawa H, Takasaki T, Tando S, Fushiki S: *Knowledge Obtained from an Elderly Case of Japanese Encephalitis. Intern Med* 2016. 55:2487-2490.

2. 学会発表 該当なし。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

表 脳炎、脳症のための病原体検索法における検索対象微生物一覧

DNAウイルス	JC virus, Parvovirus B19, Herpes simplex virus 1,-2, Varicella zoster virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Human herpesvirus 6A, -6B,-7
RNAウイルス	Chikungunya virus, pan-Enterovirus, Enterovirus 68, Poliovirus 1, -3, Parechovirus 1, -3, Dengue virus 1-4, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, Tick-borne encephalitis virus, Zika virus, Influenza virus A, -B, A (H1N1 pdm), Nipah virus, astrovirus MLB1, -1, -VA1, sapovirus, Norwalk like virus 1, -2
細菌	Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Rickettsia prowazekii, Rickettsia japonica, Orientia tsutsugamushi, Bordetella pertussis, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Salmonella enterica, Mycoplasma pneumoniae, Treponema pallidum
真菌	Aspergillus fumigatus, Cryptococcus, Mucor
原虫	Toxoplasma