

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 23 例であり、9 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。内訳はパレコウイルス 3 型と HHV6B が各 3 例とエコーウイルス、ライノウイルス、及びタイプ不明のエンテロウイルスが各 1 例であった。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

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)として届出のあった脳炎症例のうち、原因不明の急性脳炎・脳症例について、日本脳炎の紛れ込みがどの程度ある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。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、国立感染症研究所(以下、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, 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。検出微生物はウイルス、細菌、真菌を含め、53 種類であり、前年度の報告書を参照されたい。定量的 PCR は MX3005P(アジレント社)、または ABI 7500(アプライド・バイオシステムズ社)を用いた。

(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、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

前年度に開発した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用い、脳炎、脳症の検体について、解析を行った。平成29年4月から平成29年11月までに23件の解析依頼があり、全例につき、解析を行った。結果、9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。内訳はパレコウイルス3型とHHV6Bが各3例とエコーウイルス、ライノウイルス、及びタイプ不明のエンテロウイルスが各1例であった。

D . 考察

前年度と合わせ、30 例の原因不明脳炎、脳症を解析した。なんらかの病態と関連すると考えられる病原微生物が 12 例で検出されたことから、病原体検出率(陽性率)は約40%となる。しかし、これにはライノウイルスなど、病態の一部と関連するが、脳炎、脳症との関連は不明である病原体も含まれている。また、同一地衛研からの頻回の依頼や、エンテロウイルスが検索されていない検体が多く含まれていることなど、本研究班で検索した症例が日本の原因不明脳炎症例の全体像を反映しているとは言えない点にも注意が必要である。

前研究班で行った解析と合わせて 130 例程度と、限られたサンプル数ではあるものの、病原体不明脳炎、脳症の原因病原体として、エンテロウイルス、HHV6 の頻度が高いことが示唆された。検索した範囲では日本脳炎の紛れ込みはまれと考えられる。本研究で用いたReal-time PCR法による病原微生物網羅的検索法は脳炎、脳症の症例に有効であることが示されたが、本法は検索あたりの単価が高く、可能な施設も限られる。今後、多くの検体をスクリーニングするにはエンテロウイ

ルス、HHV6 など、これまで本研究で検出実績のある病原微生物を主な対象とした検索法も考慮する必要がある。

E . 結論

原因不明の急性脳炎・脳症の症例 23 例を解析し、9 例から、何らかの病態と関連する病原体を検出した。

F . 研究発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

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。