

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。平成 28 年度から 29 年度に検討を行った症例は 30 例であり、エンテロウイルス、パレコウイルス、HHV6 など、12 例から原因ウイルスの候補を検出した。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

5 類感染症としての急性脳炎（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）症例のうち、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った。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、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された。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、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(表1)。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30年3月までに30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、12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(3例)、HHV-6B(3例)、タイプ不明のエンテロウイルス(2例)、コクサッキーウイルスA6、エコーウイルスE7、アデノウイルス5、ライノウイルスAが各1例であった。

## 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。本研究班からはウイルスに、細菌、真菌を加えることで、より原因病原体を網羅的に検出することを目指した。ウイルス、細菌、真菌の選定はこれまでの疫学データや、報告を参考にし、最終的に53種類の微生物を選択した。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。

30件の症例から12例(40%)の症例で病原微生物の検出に至った。前研究班における検出率(16.0%)よりも著しく向上している。これは、適切なサンプル採取やサンプルの質の向上があった反面、依頼施設の偏りがある点に関連している可能性も考えられた。とくに、エンテロウイルス未検索の施設からの検体で、エンテロ系のウイルスが検出された症例が目立った。

検出されたウイルスでは、エンテロウイルスとHHV-6Bの検出率が高く、乳児ではパレコウイルスが高頻度に検出されている。したがって、脳炎患者では汎エンテロウイルスRT-PCR、および、HHV-6のPCR、さらに、生後3か月ぐらい乳児ではパレコウイルス3型の検索を行うことが重要であることが示された。これらの検索ができるような機関が増加させることが脳炎の原因検索には望ましい。前研究班の結果と合わせると131例の症例を検索し32例で病原体が検出されたことになる(表2)。日本脳炎ウイルスが検出された例は1例のみであり、紛れ込みは極めて少ないことが推定された。

## 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。30症例を検討し、12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. 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。

表 1 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 influenza, Escherichia coli, Salmonella enterica, Mycoplasma pneumoniae, Treponema pallidum
真菌	Aspergillus fumigatus, Cryptococcus, Mucor
原虫	Toxoplasma

表 2 第1期および第2期の本研究班検体における検出病原体。総数131例を検索し、32例で病原体が判明した(判明率24.4%)。病原体が判明したものの5割はエンテロ系である。NGS は次世代シーケンサーにより検出された病原体。

CMV: cytomegalovirus, Cox: coxsackievirus, EBV: Epstein-Barr virus, Echo: echovirus, EV: enterovirus, HHV: human herpesvirus, JEV: Japanese encephalitis virus, NGS: next generation sequencer

検出病原体	数	%	Subtype, 内訳	備考
Enterovirus	10	31	EV71 (1), Cox A6 (2), Cox A10 (1), CoxB3 (1), CoxB4 (2), Echo 7 (1), panEntero (2)	0-42歳。便での検出率が高い。
Parechovirus	6	19	Type 3	ほとんどが乳児。血清や髄液。
HHV6	6	19	Type B	1-4歳。血清。
Rhinovirus	2	6	Type A	
Parvovirus B19	2	6		
Norovirus	2	6	Type 2	
JEV	1	3		NGS
CMV	1	3		
EBV	1	3		リンパ腫?
Astrovirus	1	3	Strain MLB	NGS
adenovirus	1	3	Type 5	