

厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
分担研究報告書

原因不明小児急性肝炎の実態把握の研究
分担研究課題名 原因不明小児急性肝炎の病原体検索

所 属 国立感染症研究所
感染病理部
研究分担者 鈴木 忠樹

研究要旨: 日本で発症している原因不明の小児急性肝炎症例について、特定のウイルス感染と関連が見られるか否かを明らかにするため、患者検体について、多くの病原体遺伝子を網羅的に検索した。研究期間内に原因不明の小児急性肝炎3例患者の全血、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿、肝組織について検索を行った。核酸抽出後、まず、マルチプレックス定量的 PCR 法を応用したウイルスの網羅的検索 (multivirus real-time PCR 法) により、約 170 種類のウイルスの検索を試みたが、3例ともすべてのウイルスが陰性であった。次に、抽出核酸を用い、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析 (DNA, RNA) を行った。Torque teno virus が検出された例もあったが、もともと健康人に内在するウイルスであり、結果、有意なウイルス遺伝子の検出には至らなかった。欧米の小児急性肝炎例から高頻度に検出されているアデノウイルス随伴ウイルス 2 (adeno-associated virus 2, AAV-2) についても定量的 PCR 法を用い、検出を試みたが、全検体が陰性であった。わずか3例の検索ではあるが、欧米で急激な増加が見られる原因不明小児急性肝炎とは異なる病態である可能性も示唆される。今年度は、上記検索法に加え、アデノウイルスや肝指向性のある他の AAV に対する高感度検出法の開発とともに、ウイルス分離用細胞として、複数種の培養細胞の準備を行った。日本の小児急性肝炎例について、欧米でみられる症例と異なる病態によるものかを明らかにするためには、今後、さらに多くの症例を収集し、解析する必要がある。

研究協力者

片野 晴隆 国立感染症研究所
黒田 誠 国立感染症研究所
齋藤 智也 国立感染症研究所
花岡 希 国立感染症研究所
高橋健一郎 国立感染症研究所

A. 研究目的

2022年に英国、および、米国で急激な増加がみられた原因不明の小児急性肝炎について、欧米の研究結果からはアデノウイルス随伴ウイルス (adeno-associated virus 2, AAV-2) 感染との関連が示唆されている。欧米でみられたような小児急性肝炎の急激な増加は日本においては明らかでないが、原因不明の小児急性肝炎は一定数存在している。本研究では、日本で発症している原因不明の小児急性肝炎症例について、特定のウイルス感染と関連が見られるか否かを明らかにするため、患者検体について、多くの病原体を網羅的に検索し、その病理、病態を解明することを目的とする。

B. 研究方法

日本国内で発生した原因不明の小児急性肝炎患者の3名の検査に用いた検体 (全血、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿、肝組織など) を使用した。提供された臨床検体から DNA/RNA を精製し、原因病原

体 (ウイルス) の探索にはマルチプレックス定量的 PCR 法を応用したウイルスの網羅的検索 (multivirus real-time PCR 法) を用いた。本法ではヒト疾患と関連する約 170 種類のウイルス核酸の増幅可能であり、2010年に公表されてから当部で様々な原因不明疾患においてウイルスを検出した実績がある。

メタゲノム解析は、検体の DNA, RNA から metagenome DNA-Seq (mDNA-Seq, QIAseq FX DNA Library Kit) および metagenome RNA-Seq (mRNA-Seq, Zymo-Seq Ribofree Total RNA Library Kit) にて次世代シーケンサー用のライブラリーを作成し、Illumina 社 NextSeq 1000 の P1 reagent (1.3 億クラスター、150-mer paired-end) で解読リードを得た。解読リードからヒト配列を削除の後、NCBI nt データベースに対して megablast 法による配列相同性検索を実施し、病態に関連する病原体の存在を検討した (MePIC 2 によるパイプライン解析)。3名の臨床検体から、病原体探索を実施した。

原因不明小児急性肝炎との関連が想定されるアデノウイルス種の検出方法に関して、文献的検討を実施した。同様にウイルス分離に適した細胞も検討した。さらに欧米で不明肝炎症例に検出されている AAV-2 についても検出系の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、国立国際医療研究センター、国立感染症研究所および日本小児科学会の各倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

研究期間内に原因不明の小児急性肝炎 3 例(Case 1-3)、7 検体の検索を行った。患者の発症年齢は 6 か月から 3 歳まで、すべて男児で、検体は全血、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿、肝組織であった。

核酸抽出後、症例ごとに **multivirus real-time PCR** 法によるウイルスの網羅的検索を行ったところ、アデノウイルス、AAV-2 を含む検索したすべてのウイルスが陰性であり、有意なウイルス遺伝子の検出には至らなかった(表 1)。一方で、内因性コントロールとして検出したヒト **beta-actin** や **GAPDH-mRNA** は陽性であり、検体中の核酸、核酸抽出法に問題はないことが示された。

次に抽出核酸を用い、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行ない、次のような結果であった。

● Case 1

血清の mRNA-Seq により **Human bocavirus** を数本検出したが、**Viremia** ウイルス血症を呈する病原体である可能性が低く、本症状の病因に直接起因するものではないと判断された。肝臓 FFPE 検体からは特筆すべき病原体を検出できなかった。

● Case 2

血清の mDNA-Seq/mRNA-Seq とともに特筆すべき病原体を検出できなかった。

● Case 3

咽頭スワブ検体から **Hepatitis delta virus** が 4 本検出された。極少量の検出であり、本症例との関連性を肯定できるものではなかった。全血検体から **Torque teno virus** が数本検出され、急性症状による内因性の **circo DNA virus** の活性化と判断された。血清および尿検体の mDNA-Seq/mRNA-Seq とともに特筆すべき病原体を検出できなかった。

アデノウイルス型別に関して、原因不明小児急性肝炎に欧米ではアデノウイルス F 種の関与が指摘されたことから、アデノウイルス F 種の検出感度が最も高い「病原体検出・検査マニュアル 腸管アデノウイルス(感染性胃腸炎)」。 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AdenoVirusDiarrhea20220518.pdf> および、アデノウイルス種を広汎に型別可能な「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎 検査・診断マニュアル(第 4 版)」。 https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AdenoVirus_PCF_EKC20230106.pdf 記載の方法を実施可能にした。複数のウイルスの存在も考慮し、ウイルス分離用細胞として、複数種の培養細胞(A549、293、Vero、Hela、RD-A、RD-18S、GL37LL、

LLC-MK2、WI-38、HEL 299、Molt-3、COS-7) を用意した。

欧米の小児急性肝炎例で検出されている AAV-2 について、定量的 PCR の検出系を立ち上げるとともに、肝臓に指向性のある AAV について、同時に定量的 PCR を確立した。提供された 3 例につき、すべての検体で AAV を検索したが、陽性検体はなかった。

D. 考察

今年度は研究期間が短く、3 例の検索に留まった。欧米の症例で 8 割以上の検出率である AAV-2 は今回検索した 3 例からは検出されなかった。メタゲノム解析で検出されたいくつかのウイルスはコピー数が低いことと、**Torque teno virus** は病原性のない内因性のウイルスを検出しているのみであることが推察され、結局、有意なウイルスは検出されなかった。わずかに 3 例の検索であり、結論は出せないが、欧米で急激な増加が見られる原因不明小児急性肝炎とは異なる病態である可能性も示唆される。日本の小児急性肝炎の原因を明らかにするには、さらに多くの症例を、さまざまな検体で検索することが必要である。

また、本研究では、いくつかの報告で、ヘルペスウイルス等の DNA ウイルスと小児急性肝炎との関連が示唆されたことから、アデノウイルス以外の DNA ウイルスも分離が可能なように、複数の培養細胞を用意し、非固定・非不活化臨床検体が利用可能な場合は常時ウイルス分離が可能な状態を維持した。

E. 結論

3 例の小児急性肝炎の解析を行い、病原体遺伝子の網羅的検索を行ったが、有意な病原体遺伝子の検出には至らなかった。欧米でみられる小児急性肝炎に高頻度に検出される AAV-2 についても検索したが 3 例とも陰性であった。3 例中、1 例しか肝臓検体の提供がなく、主に血清による病原体検査であったため、総合的な網羅的病原体検査の遂行が困難であった。今後、当該病態の究明にあたっては、一定の検査材料の種類・量の確保とともに、包括的な病原体検査をもとにした調査研究が望ましいと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図表

表 1 multivirus real-time PCR 検索病原体一覧

DNA viruses
Polyomavirus: JC virus, BK virus, KI virus, WU virus, Merkel cell polyomavirus, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus, Human polyomavirus6, 7, 9, 10, 11, 12, New Jersey polyomavirus
Papillomaviruses: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,56,58,59, 66, 68, 73
Parvoviruses: parvovirus B19; human bocavirus; adenovirus A–F
Herpes viruses: HHV 1–5, 6A, 6B, 7 and 8; B virus
Poxviruses: variola virus, monkey pox virus, molluscum contagiosum virus
Hepadnavirus: Hepatitis B virus
Other: Adeno-associated virus 2
RNA viruses
Filoviruses: Sudan Ebola virus, Zaire Ebola virus, Marburg virus
Bunyaviruses: Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, hemorrhagic fever with renal syndrome virus (Hantaan, Dobra, Puumala, and Seoul), Rift valley fever virus, sin nombre virus, Severe fever with thrombocytopenia syndrome 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: pan-enterovirus, enterovirus 68 and 71; poliovirus 1–3; coxsackievirus A2–A6, A8–A10, A16, A21, A24, B1–B6; echovirus 5, 6, 7, 9, 11, 13–16, 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 1-4; Japanese encephalitis virus; Murray Valley encephalitis virus; St. Louis encephalitis virus; West Nile virus; Tick-borne encephalitis virus; yellow fever virus, Zika virus, Alongshan virus
Orthomyxoviruses: influenza virus A–C, H3, H5N1, H7N9 and H1N1pdm
Paramyxoviruses: parainfluenza virus 1–3; Hendra virus; mumps virus; measles 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-coronavirus, SARS-CoV-2, MERS coronavirus
Caliciviruses: astrovirus, sapovirus, Norwalk-like virus 1 and 2
Hepatitis viruses: hepatitis A virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, hepatitis E virus, GB virus
Lentivirus: HIV-1, HTLV-1 and 2
Others: squirrel Bornavirus, Simian endogenous retrovirus

図 1 : 次世代シーケンサーで病原体検索を検討した臨床検体一覧



メタゲノム解析用ツール MePIC2 による

- NGSリードのクオリティトリミング
- ヒトゲノム配列の削除
- Megablast - nt (NCBIの統合塩基配列データベース) による配列検索

mDNA-Seq / mRNA-Seq	Case #	Specimens	MePIC/nuc Quality Trimming (品質の高いNGSリード数)	MePIC/nuc After Genome Subtract (ヒトゲノム配列削除後の残りNGSリード数)	ヒトゲノム配列 %	MePIC/nuc Blast Hits (既知データベースにヒットしたNGSリード数)	Bacteria reads	Bacteria %
mDNA-Seq	Case 1	Liver-FFPE	3,015,277	15,121	99.5%	6,194	2365	0.0784%
mDNA-Seq	Case 1	Serum	20,442,463	66,803	99.7%	17,644	1706	0.0083%
mDNA-Seq	Case 2	Serum	15,259,260	63,223	99.6%	26,502	1823	0.0119%
mDNA-Seq	Case 3	Blood	24,244,393	89,833	99.6%	35,389	881	0.0036%
mDNA-Seq	Case 3	Serum	7,671,597	27,043	99.6%	9,838	1240	0.0162%
mDNA-Seq	Case 3	Swab	31,011,289	3,598,860	88.4%	2,311,734	2117160	6.8271%
mDNA-Seq	Case 3	Urine	804,869	6,108	99.2%	2,700	2120	0.2634%
mRNA-Seq	Case 1	Liver-FFPE	14,525,628	77,565	99.5%	24,704	3881	0.0267%
mRNA-Seq	Case 1	Serum	5,567,165	39,570	99.3%	13,509	2740	0.0492%
mRNA-Seq	Case 2	Serum	7,195,169	49,299	99.3%	16,468	3738	0.0520%
mRNA-Seq	Case 3	Blood	32,687,460	133,478	99.6%	15,934	1253	0.0038%
mRNA-Seq	Case 3	Serum	718,104	7,352	99.0%	2,802	1325	0.1845%
mRNA-Seq	Case 3	Swab	9,401,083	2,903,883	69.1%	2,569,390	2424888	25.7937%
mRNA-Seq	Case 3	Urine	91,396	5,392	94.1%	3,439	3022	3.3065%

ヒト試料のまるごとNGS解析（メタゲノム解析）であるため、基本、99%近くはヒトゲノム配列に該当する。ヒトゲノム削除後に残った少数リードから、病原体候補を探索した。