

平成 28 年 9 月 21 日

次世代シーケンサーによる小児急性脳炎・脳症の原因ウイルスの新規診断法の臨床応用

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）小児科学の伊藤嘉規（いとう よしのり）准教授（責任著者）、川田潤一（かわだ じゅんいち）助教（筆頭著者）、奥野友介（おくのゆうすけ）同大学医学部附属病院（病院長・石黒直樹）先端医療・臨床研究支援センター特任講師らの研究グループは、次世代シーケンサーを用いて、原因不明の小児急性脳炎・脳症の臨床検体からウイルスの遺伝子配列を検出することで、原因ウイルスを特定できることを見出しました。

小児期の急性脳炎・脳症は、基礎疾患のない健常な小児が発症し、意識障害やけいれんを伴う予後不良な疾患です。インフルエンザ脳症は、迅速診断法により診断されますが、急性脳炎・脳症の半数は原因が特定されません。多くはウイルスに関連すると想定されています。新規の診断法により、原因ウイルスの特定が可能となれば、急性脳炎・脳症の発症機序の解明、それに伴う治療方法の向上が期待できます。

次世代シーケンサーは、ヒト由来、ウイルス由来に関わらず、存在しているすべての遺伝子の塩基配列を解読するため、既知のウイルス全てを網羅的に検出することが可能となります。研究グループは、急性脳炎・脳症患者から得られた脳脊髄液と血清を次世代シーケンサーで解析することで、原因ウイルスの特定を試みました。

小児急性脳炎・脳症患者の脳脊髄液からは、2例でコクサッキーウイルス A9 型、1例でムンプスウイルスの遺伝子配列が検出され、原因ウイルスと考えられました。一方で、血清からは1例で植物のウイルスであるトウガラシ微斑ウイルスの配列が検出されました。これまでヒトに病気を起こすと考えられていないウイルスで、急性脳炎・脳症との関連については、今後検討する必要があります。

現在、病原ウイルスの同定には、PCR 法や抗原検出などが一般的に用いられていますが、いずれの手法もあらかじめ想定したウイルスしか検出できません。そのため、より多くの急性脳炎・脳症の病原ウイルスを診断できる方法の臨床応用は重要です。今後は、次世代シーケンサーを用いることで、原因ウイルスが特定され、病気の解明や治療法の開発につながることを期待されます。

本研究成果は科学誌『Scientific Reports』（英国時間 9 月 14 日 8 時速報版）に掲載されました。

次世代シーケンサーによる小児急性脳炎・脳症の原因ウイルスの 新規診断法の臨床応用

ポイント

- 次世代シーケンサーを用いて、原因不明の小児の急性脳炎・脳症の臨床検体からウイルスの網羅的な検出を行った。
- 原因不明の急性脳炎・脳症 18 例中 4 例からウイルスの遺伝子配列が検出され、疾患との関連が示唆された。
- 次世代シーケンサーが病原ウイルスの特定に有用な手法であることを明らかにした。

1. 背景

急性脳炎・脳症は、主に小児期に好発する予後不良な疾患で、死亡例や重度の後遺症を残す例もまれではありません。急性脳炎・脳症は、その急激な臨床経過からウイルス感染が誘因となっていると考えられていますが、検査の方法が確立しているインフルエンザなどの一部を除いて、原因ウイルスを特定することは困難です。現在、病原ウイルスの特定には、PCR 法、抗原検出などの手法が用いられますが、いずれも限られたウイルスのみを検出することが可能です。さらに、RNA ウイルスは変異が多く、高感度の PCR 法を用いても偽陰性となることが少なくありません。そのため、現状においては、様々な手法を組み合わせても、急性脳炎・脳症の半数程度は原因が特定できておりません。したがって、急性脳炎・脳症の発症機序には不明な点も多く、治療法も十分には確立していません。

次世代シーケンサーは、ヒト由来、ウイルス由来に関わらず、存在しているすべての塩基配列を解読するため、理論的には既知のウイルス全てを網羅的に検出することが可能となります。研究チームは、急性脳炎・脳症患者から得られた脳脊髄液と血清を次世代シーケンサーで解析することで、原因ウイルスの特定を試みました。

2. 研究成果

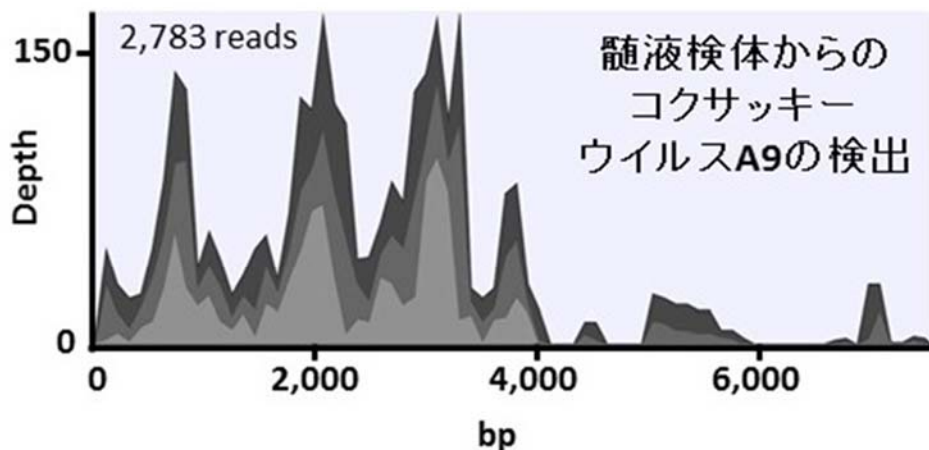
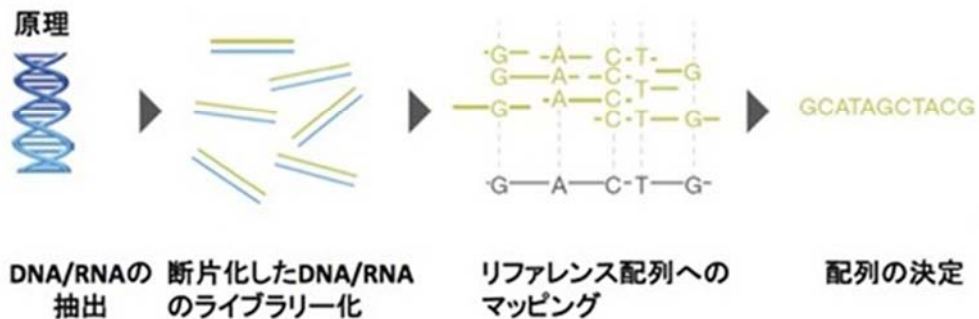
研究グループは、まず既存のウイルス感染症の臨床検体を用いて、次世代シーケンサーによるウイルスの検出法の検証を行いました。血清や脳脊髄液から核酸を抽出し、DNA および RNA ライブラリーを作成し、それらを次世代シーケンサーである MiSeq または HiSeq を用いて約 500 万リード判読しました。その結果、DNA ウイルス、RNA ウイルスとも検出が可能であり、従来の PCR 法と同等の検出感を有していることが確認されました。

次に、原因不明の小児急性脳炎・脳症患者 18 例から得られた脳脊髄液および血清を用いて、次世代シーケンサーによる解析を行いました。脳脊髄液からは、2 例でコクサッキーウイルス A9 型、1 例でムンプスウイルスの遺伝子配列が検出され、原因ウイルスと考えられました。一方で、血清からは 1 例で植物のウイルスであるトウガラシ微斑ウイルスの配列が検出されました。トウガラシ微斑ウイルスとヒトの疾患との関連については、今後も検討する必要があると考えられます。細菌由来の配列も一定量検出されましたが、皮膚の常在菌等と推測されました。

3. 今後の展開

急性脳炎・脳症は、時に難治な経過をたどる重篤の疾患ですが、その発症機序は十分に解明されていません。また、臨床経過から感染が契機となっている症例が多いと考えられています。原因が特定されない例も多くみられます。本研究では、次世代シーケンサーが、急性脳炎・脳症の診断に応用できることが示されました。次世代シーケンサーは、理論的には既知のウイルス全てを検出することが可能であり、さらには未知のウイルスの配列を構築することも可能であることが報告されています。次世代シーケンサーを用いることで、疾患の原因ウイルスが特定され、病態の解明や治療法の開発に応用されることが期待されます。

次世代シーケンサーによる網羅的なシーケンス



4. 用語説明

(1) 小児急性脳炎・脳症

様々な病原体の感染症に合併する中枢神経系障害。発熱、けいれん、意識障害が典型的な臨床症状。日本では、1990年代から起因病原体の頻度が大きく変化し、インフルエンザ・ヒトヘルペス6型(HHV-6)の発症頻度が増加した。

(2) 次世代シーケンサー

一度のアッセイで、1000万以上のリード（DNA断片のシーケンス数）を得ることがで

きるシーケンスを行える機器。ヒトの疾患関連遺伝子解析への臨床応用が先行している。この手法は、微生物の解析にも極めて有効であり、理論的には、少量の臨床検体から細菌・ウイルス・真菌等のすべての微生物の存在を定量的に解析できる。

5. 発表雑誌

Jun-ichi Kawada, Yusuke Okuno, Yuka Torii, Ryo Okada, Satoshi Hayano, Shotaro Ando, Yasuko Kamiya, Seiji Kojima, Yoshinori Ito. Identification of Viruses in Cases of Pediatric Acute Encephalitis and Encephalopathy Using Next-Generation Sequencing. *Scientific Reports*, 2016; 6: 33452

English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical_en/res/ResearchTopics/2016/next_20160921en.pdf