

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461632

研究課題名(和文)次世代シーケンサーのメタゲノミック解析を用いた新生児感染症の病原微生物の同定

研究課題名(英文) Pathogenic microorganism identification in neonatal infectious diseases by a meta-genomic analysis using the next generation sequencer

研究代表者

森岡 一郎 (MORIOKA, Ichiro)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：80437467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、新生児感染症において次世代シーケンサーを用いたメタゲノミック診断法を確立し、今まで同定が困難だった病原微生物の同定を行うことであった。結果、次世代シーケンサーを用いたメタゲノミック解析系を確立し、新生児および小児感染症領域に応用した。乾燥臍帯で子宮内エコーウイルス7型感染を証明しえた新生児遷延性肺高血圧症の新生児、間質性肺炎を発症したエンテロウイルスD68感染症の小児、網膜血管吻合を伴う網膜炎を合併した先天性サイトメガロウイルス感染症の新生児などの新知見を得、英文ジャーナルに発表した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a meta-genomic analysis using the next generation sequencer for perinatal and neonatal infectious diseases, and to identify pathogenic microorganisms that had been difficult to identify to date. As results, a meta-genomic analysis system using the next generation sequencer was established during the study period and we applied to the neonatal and pediatric patients with infection. We obtained new findings from patient specimens using these techniques, and for the first time, reported the cases to the international journals, such as a newborn with persistent pulmonary hypertension who was detected echovirus 7 from not only the serum, nasal swab and bronchoalveolar lavage, but also the preserved umbilical cord, a pediatric patient due to enterovirus D68 infection that developed interstitial pneumonia, and a newborn with congenital cytomegalovirus infection with retinal arterio-venous anastomosis.

研究分野：新生児医学、小児感染症学

キーワード：次世代シーケンサー メタゲノミック診断法 新生児感染症 小児感染症

### 1. 研究開始当初の背景

周産期・新生児感染症は、依然、児の生命予後を左右する重篤な疾患である。日常診療で児が感染症の症状や検査所見を有しているものの、標準的診断検査法で起因微生物が同定できない症例をしばしば経験する。それを解決するために、我々は次世代シーケンサーを用いたメタゲノミック解析に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期・新生児感染症において次世代シーケンサーを用いたメタゲノミック診断法を確立し、今まで同定が困難だった病原微生物の同定を行うことであった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 倫理審査委員会の承認

本研究課題内容を神戸大学大学院医学研究科遺伝子解析研究倫理審査委員会に申請した。

#### (2) 研究のセットアップ

次世代シーケンサーによる解析を行うための研究環境を整えた。

#### (3) 後ろ向き解析

すでに病原微生物を同定できている感染症を発症した既存サンプルを用いて、次世代シーケンサーによるメタゲノミック解析(後ろ向き解析)を行った。

(4) 次世代シーケンサーによるメタゲノミック解析を含む種々の遺伝学的解析を駆使して、周産期・新生児感染症の生体検体の解析を行い、病原微生物の同定を試みた。解析系の確立により、小児期の感染症にまで対象範囲を拡大した。

### 4. 研究成果

(1) No.104「次世代シーケンサーを用いたメタゲノミック診断法の確立と周産期・新生児期・小児期における感染症の新規病原微生物遺伝子の同定」として本学倫理委員会の承認を得た(平成26年9月29日付)。

(2) MiSeq(イリミナ社)プラットフォーム、シーケンサーに必要なライブラリ作成技術・シーケンスランや解析を行う研究環境を整えた。

(3) エンテロウイルスが同定されている既存サンプル(咽頭ぬぐい液、糞便)で、ライブラリ作成、シーケンスランを行い、ヒトゲノム参照配列を除外し、サンガー法でエンテロウイルスの配列を確認した。

(4) 周産期・新生児期・小児期における感染症の病原微生物遺伝子の同定を行った。代

表的な結果を以下に示す。

### **乾燥臍帯で子宮内エコーウイルス7型感染を証明しえた新生児遷延性肺高血圧症の1例**

【症例】日齢0男児。在胎38週3日、体重2932gで出生。新生児遷延性肺高血圧症を発症し、集中治療を行なった。原因として、感染症を疑ったが、気管洗浄液の培養検査で細菌は検出しなかったため、ウイルスの遺伝学的検査を行った。候補病原微生物としてエンテロウイルスを同定した。入院時の血清・鼻腔拭い液・気管洗浄液のRT-PCR法とサンガー法にてエコーウイルス7型と確定した。さらに、後日、乾燥臍帯からもエコーウイルス7型を検出し子宮内感染と診断した(図1)。

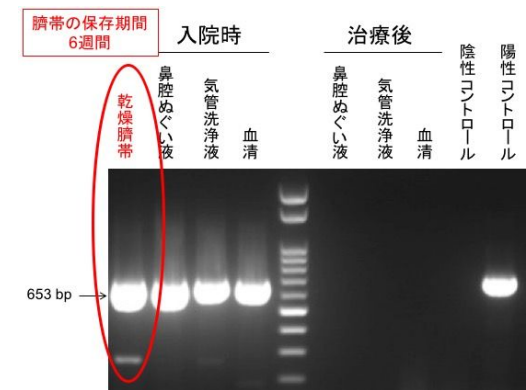


図1. エンテロウイルス VP4 領域の RT-PCR 結果 入院時の各種生体検体と乾燥臍帯からエンテロウイルスのバンドを検出した。治療後は消失した。

乾燥臍帯を用いてエコーウイルスの子宮内感染を証明した初めての症例であった。サイトメガロウイルス以外のウイルス感染症でも、乾燥臍帯を用いて先天感染の後方視的診断を行える可能性を提唱した(J Matern Fetal Neonatal Med. 27, 1820-2, 2014)。

### **間質性肺炎を発症したエンテロウイルス D68 感染症の1例**

【症例】4歳女児。鼻汁、発熱、努力呼吸を認めため急病センターを受診後、当院に搬送され入院となった。肺炎と診断し、発症後17時間で気管挿管した。人工呼吸管理を含む集中治療を行うも、改善乏しく、血液検査でSP-A、SP-D、KL-6の間質性肺炎のマーカーの上昇、胸部CT検査で気管支に沿って分布する両側肺野の斑状影とびまん性のすりガラス影、気管支肺胞洗浄液中の好中球、リンパ球の上昇があり、間質性肺炎と診断した。病原微生物の同定には、種々の遺伝学的解析を駆使して、気管支肺胞洗浄液からエンテロウイルス D68 を検出し、エンテロウイルス D68 感染症による間質性肺炎と診断した。

エンテロウイルス D68 感染症の新たな合併症として間質性肺炎があることを見出した(J Infect Chemother. 22, 712-5, 2016)。

## 網膜血管吻合を伴う網膜炎を合併した先天性サイトメガロウイルス感染症の新生児の1例

【症例】在胎 36 週 3 日、出生体重 1860g の男児。小頭症、肝脾腫、点状出血があった。眼科的診察で網膜炎に加えて網膜血管の動脈-静脈吻合を認めた。先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症を疑い、出生時の血液・尿中から CMV-DNA を検出し、症候性先天性 CMV 感染症と診断した。

先天性 CMV 感染症では通常観察されない網膜血管の動脈-静脈吻合があったため、微量な眼房水から各種遺伝学的検査を駆使して、CMV-DNA を確認した。この眼所見はバルガンシクロピルの内服治療により改善した。

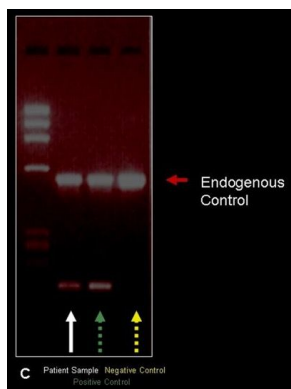


図 2 眼房水の CMV-DNA 解析結果

患者の眼房水から CMV-DNA のバンドを確認した。

先天性サイトメガロウイルス感染症の眼合併症は、脈絡網膜炎以外に報告はなかった。新たな眼所見として網膜血管吻合を同定した (BMC Ophthalmol. 16, 81, 2016)。

以上のような症例を代表に、次世代シーケンサーによるメタゲノミック解析を含む種々の遺伝学的解析を駆使して、周産期・新生児感染症、小児感染症の生体検体の病原微生物解析を行い、知見を得た。研究期間に多くの学会や論文発表を行った。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 126 件)

Morioka I, Kamiyoshi N, Nishiyama M, Yamamura T, Minamikawa S, Iwatani S, Nagase H, Nozu K, Nishimura N, Taniguchi-Ikeda M, Ishibashi K, Ishida A, Iijima K: Changes in the numbers of patients with acute gastroenteritis after voluntary introduction of the rotavirus vaccine in a Japanese children's primary emergency medical center. *Environ Health Prev Med.* 22, 15 (2017) doi: 10.1186/s12199-017-0638-3. 査読有  
Tanimura K, Tairaku S, Ebina Y, Morioka I, Nagamata S, Deguchi K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Yamada H: Prediction of congenital

cytomegalovirus infection in high-risk pregnant women. *Clin Infect Dis.* 64, 159-165 (2017) 査読有  
Nagasaka M, Morioka I, Kawabata A, Yamagishi Y, Iwatani S, Taniguchi-Ikeda M, Ishida A, Iijima K, Mori Y: Comprehensive analysis of serum cytokines/chemokines in febrile children with primary human herpes virus-6B infection. *J Infect Chemother.* 22, 593-598 (2016) 査読有  
Tagami M, Honda S, Morioka I, Iijima K, Yamada H, Nakamura M. An unusual case of congenital cytomegalovirus infection related retinopathy. *BMC Ophthalmol.* 16, 81 (2016) doi: 10.1186/s12886-016-0246-9. 査読有  
Matsumoto M, Awano H, Ogi M, Tomioka K, Unzaki A, Nishiyama M, Toyoshima D, Taniguchi-Ikeda M, Ishida A, Nagase H, Morioka I, Iijima K: A pediatric patient with interstitial pneumonia due to enterovirus D68. *J Infect Chemother.* 22, 712-715 (2016) 査読有  
Nishida K, Morioka I, Nakamachi Y, Kobayashi Y, Imanishi T, Kawano S, Iwatani S, Koda T, Deguchi M, Tanimura K, Yamashita D, Nibu K, Funakoshi T, Ohashi M, Inoue N, Iijima K, Yamada H: Neurological outcomes in symptomatic congenital cytomegalovirus-infected infants after introduction of newborn urine screening and antiviral treatment. *Brain Dev.* 38, 209-216 (2016) 査読有  
Fukuzumi N, Osawa K, Sato I, Iwatani S, Ishino R, Hayashi N, Iijima K, Saegusa J, Morioka I: Age-specific percentile-based reference curve of serum procalcitonin concentrations in Japanese preterm infants. *Sci Rep.* 6, 23871 (2016) doi: 10.1038/srep23871 査読有  
Kobayashi Y, Morioka I, Koda T, Nakamachi Y, Okazaki Y, Noguchi Y, Ogi M, Chikahira M, Tanimura K, Ebina Y, Funakoshi T, Ohashi M, Iijima K, Inoue N, Kawano S, Yamada H: Low total IgM values and high cytomegalovirus loads in the blood of newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Perinat Med.* 43, 239-43 (2015) 査読有  
Morioka I, Iwatani S, Koda T, Nagasaka M., Yamana K., Kurokawa D., Fujita K., Nishida K., Iijima K: Recent epidemiology of neonatal sepsis in Japan: Did the strategies to control and prevent MRSA transmission lead to a reduction in the incidence of

late-onset sepsis? *Research and Reports in Neonatology*. 2014, 177-181 (2014) 査読有

Morioka I, Matsumoto M, Miwa A, Yokota T, Matsuo K, Koda T, Nagasaka M, Shibata A, Fujita K, Yamane M, Yamada H, Enomoto M, Chikahira M, Iijima K: Dried umbilical cord is a potential material for retrospective diagnosis of intrauterine enterovirus infection. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 27, 1820-1822 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 219 件)

Morioka I, Nagasaka M, Kawabata A, Yamagishi Y, Iwatani S, Taniguchi-Ikeda M, Ishida A, Iijima K, Mori Y: Comprehensive analysis of serum cytokines/chemokines in febrile children with primary human herpes virus-6B infection. Presented as a poster at the 12nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Bangkok, Thailand, November 10 to 11, 2016.

Kamiyoshi N, Iwatani S, Nishiyama M, Yamamura T, Minamikawa S, Taniguchi-Ikeda M, Ishibashi K, Iijima K, Ishida A, Morioka I: Changes in patients with acute gastroenteritis after voluntary introduction of rotavirus vaccine in a Japanese children's primary emergency medical center. Presented as a poster at the 12nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Bangkok, Thailand, November 10 to 11, 2016.

Matsumoto M, Awano H, Ogi M, Tomioka K, Unzaki A, Nishiyama M, Toyoshima D, Taniguchi-Ikeda M, Ishida A, Nagase H, Morioka I, Iijima K: A pediatric patient with interstitial pneumonia due to enterovirus D68. Presented as a poster at the 12nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Bangkok, Thailand, November 10 to 11, 2016.

森岡一朗、岩谷壮太、福嶋祥代、徳田央士、西田浩輔、前山花織、山名啓司、黒川大輔、長坂美和子、香田 翼、飯島一誠: 早産児における血清プロカルシトニン値の出生後の経時的変化の特徴と基準曲線の作成、口演発表、第 52 回日本周産期・新生児医学会、富山、7/16-18/2016

森岡一朗、前山花織、岩谷壮太、出口可奈、谷村憲司、出口雅士、飯島一誠、山田秀人: *Mycoplasma hominis* による子宮内感染から新生児遷延性肺高血圧症

を呈した早産児の 1 例、口演発表、第 32 回日本産婦人科感染症学会、東京、7/10/2016

森岡一朗: 新生児・乳児ウイルス感染症の臨床に関する最近の展開、ランチョンセミナー、日本周産期新生児医学会第 34 回周産期学シンポジウム、神戸、2/5-6/2016

森岡一朗、西田浩輔、香田 翼、岩谷壮太、出口雅士、谷村憲司、平久進也、蝦名康彦、船越 徹、大橋正伸、飯島一誠、山田秀人: 新生児尿スクリーニングと抗ウイルス薬治療導入後の症候性先天性サイトメガロウイルス感染児の後遺症発生率、口演発表、第 32 回日本産婦人科感染症学会、宇都宮、5/23/2015

Morioka I, Horikoshi Y, Kitajima H: Immunogenicity of Delayed Hepatitis B Vaccination in Preterm Infants in Japan. Presented as a poster at the Pediatric Academic Society Annual Meeting, San Diego, USA, April 25 to 28, 2015.

Morioka I, Nishida K, Yamashita D, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Imanishi T, Deguchi M, Tanimura K, Kawano S, Nibu KI, Iijima K, Yamada H: Efficacy of Antiviral Treatment on Abnormal Auditory Brainstem Responses in Congenital Cytomegalovirus-Infected Infants. Presented as a poster at the Pediatric Academic Society Annual Meeting, San Diego, USA, April 25 to 28, 2015.

森岡一朗: シンポジウム「周産期の炎症と感染～長期予後改善を目指して～」先天性サイトメガロウイルス感染の効果的な周産期管理法の確立を目指して、第 33 回周産期学シンポジウム、浜松、1/23-24/2015

Morioka I, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Okazaki Y, Noguchi Y, Ogi M, Chikahira M, Inoue N, Yamada H, Kawano S, Iijima K. Characterizations of blood markers for cytomegalovirus (CMV) detection in newborns with congenital CMV infection. Presented as a poster at the Pediatric Academic Society and Society for Asian Pediatric Research Joint Meeting, Vancouver, Canada, May 3 to 6, 2014.

森岡一朗、平久進也、出口雅士、蝦名康彦、山田秀人: ミニワークショップ「周産期の感染症」、先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染の診断における新生児血中 CMV-IgM、アンチゲネミア、CMV-DNA の意義、第 66 回日本産科婦人科学会学術集会、東京、4/18-20/2014

〔図書〕(計 7 件)

森岡一朗:改訂第2版 症例から学ぶ周産期診療ワークブック、1. 胎児編、4. 母子感染症、6) HBV, HCV:日本周産期・新生児医学会教育・研修委員会編集、メジカルビュー社、217-223、2016

森岡一朗:第11章 感染症、寄生虫:先天性トキソプラズマ症、森内浩幸編集、水口 雅、市橋 光、崎山 弘総編集、今日の小児治療指針第16版、医学書院、385-386、2015

森岡一朗:第4章 新生児疾患:新生児のウイルス感染、板橋家頭夫編集、水口 雅、市橋 光、崎山 弘総編集、今日の小児治療指針第16版、医学書院、168-169、2015

森岡一朗:第22章 新生児疾患:新生児敗血症・髄膜炎、山口 徹、北原光夫監修、福井次矢、高木 誠、小室一成総編集、今日の治療指針 2015年版-私はこう治療している、医学書院、1267-1268、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/pediat/>

報道

早産児の感染症、早期発見へ 神戸大グループが新診断基準、神戸新聞 24面、2016年4月16日朝刊

早産児の感染症、早期診断へ 神戸大院が新診断基準、産経新聞 19面、2016年5月3日朝刊

6. 研究組織

(1)研究代表者

森岡 一朗 (MORIOKA, Ichiro)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号: 80437467

(2)研究分担者

池田(谷口) 真理子 (TANIGUCHI- IKEDA, Mariko)

神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授

研究者番号: 00410738

竹島 泰弘 (TAKESHIMA, Yasuhiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40281141

(3)連携研究者

森 康子 (MORI, Yasuko)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 50343257

出口 雅士 (DEGUCHI, Masashi)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号: 50403291