

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11402

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた急性脳炎・脳症診断への新たな取り組み

研究課題名(英文)A novel approach for diagnosis of meningitis and encephalitis using metagenomic sequencing

研究代表者

吉矢 和久(Yoshiya, Kazuhisa)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40379201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性脳脊髄炎・脳症は原因が特定できない症例が多いのが現状である。特に原因となる微生物の同定は極めて重要な課題である。我々の施設には2002～2018年までに84例の急性脳脊髄炎・脳症の症例が入院。細菌性20例、ウイルス性脳炎18例、免疫介在性7例、真菌性2例、結核性1例、原因不明が36例(43%)であった。本研究ではこれら84例のうち18例の髄液をメタゲノムシーケンサーにより解析した。18例中5例(28%)の髄液中から、従来法で同定できなかった微生物を同定することができた。この結果はこれまで微生物の関与を証明できなかった急性脳脊髄炎・脳症の原因解明や発症メカニズム解明につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性脳炎・脳症は、それまで健康であった人が急速に意識障害や痙攣で発症し、重度の後遺症を残す例や死亡する例も少なくない。しかしながらその契機となる原因微生物が同定されないことが多いのが現状である。特に成人発症の急性脳炎・脳症の病原体不明の割合は6割を超えるとされている。これは現在の診断法に限界があるためである。今回我々はメタゲノムシーケンサーを用いて、従来法では同定できなかった急性脳脊髄炎・脳症の原因に関連する可能性のある微生物を同定することに成功した。これは、急性脳脊髄炎・脳症の原因究明、発症メカニズム解明、新たな治療法の開発を可能にし、急性脳脊髄炎・脳症の予後改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Causes for acute encephalitis and meningitis are difficult to be identified and about half of patients are reported to have unknown etiology. Especially, it is important to identify causative microorganisms for encephalitis and meningitis.

From 2002 to 2018, 84 patients admitted to our critical care center. A confirmed or probable etiologic agent was identified: bacterial; 20 cases, viral; 18 cases, acute immune-mediated; 7 cases, fungal; 1 case, Mycobacterium tuberculosis; 1 case. No etiology was found for 43% of cases. In this study, we analyzed cerebrospinal fluid (CSF) samples from 18 out of 84 cases by metagenomic sequencing and metagenomic sequencing identified 5 related microorganisms in 5 patients out of 18 (28%) from CSF, which could not be identified by traditional methods. This result may lead to elucidate the causative agents and the pathogenic mechanisms.

研究分野：感染症学

キーワード：メタゲノムシーケンサー 急性脳炎・脳症 細菌性髄膜炎 ウイルス性脳炎 髄液

## 1. 研究開始当初の背景

急性脳脊髄炎・脳症は、それまで健康であった人が急速に意識障害や痙攣で発症し、重度の後遺症を残す例や死亡する例も少なくない。ほとんどの例で先行感染を契機に脳脊髄炎・脳症を発症するが、その契機となる感染症の原因微生物が同定されないことが多いのが現状である。特に成人発症の急性脳脊髄炎・脳症の病原体不明の割合は 6 割を超えるとされている。これは現在の中枢神経感染症の診断法に限界があるためである。現在の中枢神経感染症の原因微生物の診断には、髄液の培養、髄液検体を用いた PCR 法、血液検体を用いた微生物の抗体価測定などの方法が用いられている。髄液培養の感度は極めて低く、また PCR 法や抗体価の測定は、既知の微生物を網羅的にスクリーニングするには限界があるため、病原体を特定することが難しいのが現状である。そこで我々は近年開発された次世代シーケンサーに着目した。次世代シーケンサーは、生体試料中のメタゲノムを網羅的に検出・解析することができ、これまで検出できなかったウイルスを含めた原因微生物を同定できる可能性がある。我々は、腸内細菌叢の分野で大阪大学微生物病研究所の中村、飯田らの研究室と最新の次世代シーケンサーによるメタゲノム解析の共同研究を行っており (Gut Pathogen. 2014; 5: 1, Plos One 2009; 4: e4219, Emerg Infect Di 2008; 14: 1784-1786) この実験系を応用すれば次世代シーケンサーを用いた髄液のメタゲノム解析による髄液中の原因微生物の同定する方法を確立できる可能性がある。そこで本研究では、重症急性脳脊髄炎・脳症患者の髄液中の原因微生物をスクリーニングする系を確立することを目指す。

## 2. 研究の目的

急性脳炎・脳症は、それまで健康であった人が急速に意識障害や痙攣で発症し、重度の後遺症を残す例や死亡する例が少なくない。ほとんどの例で先行感染を契機に脳炎が発症するが、その契機となる原因微生物(ウイルス、細菌など)が不明であることも多く、その重症化の機序も不明であり、有効な治療法が存在しないのが現状である。本研究では、急性脳炎・脳症の原因微生物同定とその発症メカニズムの解明を目的とし、メタゲノムシーケンサーを用いたメタゲノム解析による原因微生物の同定、ならびに免疫担当細胞の解析による急性脳炎・脳症の発症メカニズム、重症化メカニズムの解明を行い、急性脳炎・脳症患者に対する新たな診断法・治療法の開発、予後の改善を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)当施設に入院となった急性脳脊髄炎・脳症の患者データを後方視的・前方視的に収集し、当施設における急性脳脊髄炎・脳症症例の特徴を解析する。

### (2)術後細菌性髄膜炎症例の髄液のスクリーニング

髄液のメタゲノムシーケンサーを用いたスクリーニング方法を確立するため、まず脳出血・くも膜下出血・頭部外傷術後に術後細菌性髄膜炎が疑われる症例においてメタゲノムシーケンサーを用いたメタゲノム解析を行う。検体は術後細菌性髄膜炎が疑われた時点で可能な限り抗生剤投与前に採取。髄液所見にて髄膜炎と診断した場合にメタゲノム解析を行う。また従来起きている培養法との比較も行う。尚、メタゲノム解析は大阪大学微生物病研究所で行う。

(3)急性脳脊髄炎・脳症が疑われる症例の髄液の保存検体を使用し、メタゲノムシーケンサーを用いた網羅的なメタゲノム解析を行う。結果は従来行っている原因検索結果と比較する。

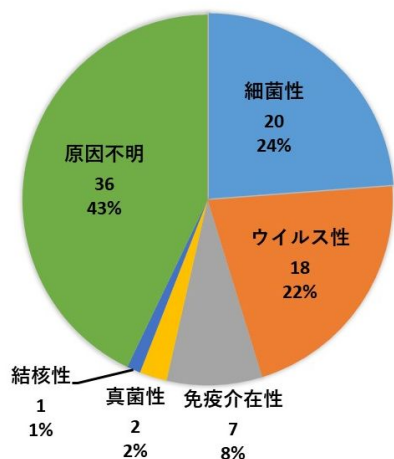
## 4. 研究成果

(1)2002~2018年の17年間に当救命救急センターに入院となった急性脳脊髄炎・脳症の患者は84例存在した。年齢は平均44歳、男性52例(62%)、女性32例(38%)であった。84例の確定診断あるいは推定される原因は、細菌性髄膜炎が20例、ウイルス性脳炎が疑われる症例が18例、免疫介在性脳炎・脳症は7例、真菌性2例、結核性1例、原因不明が36例であった。ICU滞在日数は9日(中央値)、死亡は5例(6%)であった(表1、図1)。

表 1. 患者背景と臨床経過

患者背景 (n=84)	値
年齢 (中央値)	42歳
性別	男性52例 女性32例
ICU滞在日数 (中央値)	9日
死亡率	5例 (6%)

図 1 急性脳脊髄炎・脳症の原因



(2) 髄液を用いたメタゲノムシーケンサーの測定系を確立するため、術後細菌性髄膜炎疑い症例 9 例の検体を用いてメタゲノム解析を行った。9 例はいずれも髄液検査にて細胞数上昇、髄液糖の低下により術後髄膜炎と診断している症例であるが、髄液培養検査は陰性であった。これら 9 例の髄液検体中、1 例でメタゲノムシーケンサーにより原因菌 *Staphylococcus aureus* を検出した。

この結果より、髄液を用いたメタゲノムシーケンサーによる測定系で原因微生物を同定できることが確認できた。また、術後髄膜炎では培養検査同様、メタゲノムシーケンサーを用いても原因菌の同定が難しいことが明らかとなった。

(3) 当施設で経験した 84 例の急性脳脊髄炎・脳症 84 例のうち 18 例でメタゲノムシーケンサーによる髄液の解析を行うことができた。18 例の患者背景、急性脳脊髄炎・脳症の原因は表 2 のとおりである。このうち 5 例 (28%) で原因に関連すると思われる微生物を同定することができた。同定された微生物は 3 例が細菌、2 例がウイルスであり、*streptococcus pneumoniae* が 2 例、*kocuria rhizophila* が 1 例、*human herpesvirus 6* が 2 例であった (表 3)。

表 2. 患者背景と臨床経過

患者背景 (n=18)	値
年齢 (中央値)	50歳
性別	男性12例 女性6例
原因	
細菌性	4例 (22%)
ウイルス性	3例 (17%)
免疫介在性	5例 (28%)
結核性	1例 (1%)
原因不明	5例 (28%)
ICU滞在日数 (中央値)	12日
死亡率	2例 (11%)

表 3. メタゲノム解析結果

検出された微生物	症例数 (%)
全体	5 (28%)
ウイルス	2
Human herpesvirus 6B	1
Human herpesvirus 6	1
細菌	3
Kocuria rhizophila	1
Streptococcus pneumoniae	2

メタゲノムシーケンサーを用いた解析により 18 例中 5 例 (28%) の髄液中から、従来の方法では同定することのできなかつた微生物を同定することができた。これはこれまで微生物の関与を証明できていなかった急性脳脊髄炎・脳症の原因解明や発症メカニズム解明につながる可能性を示唆するものであり、今後更なる症例の蓄積が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 弘毅  (Takahashi Hiroki)  (30609590)	関西医科大学・医学部・助教   (34417)	
研究分担者	嶋津 岳士  (Shimazu Takeshi)  (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	清水 健太郎  (Shimizu Kentaro)  (60379203)	大阪大学・医学部附属病院・助教   (14401)	
研究分担者	小倉 裕司  (Ogura Hiroshi)  (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	小島 将裕  (Ojima Masahiro)  (70721091)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員   (14401)	