

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16534

研究課題名（和文）Droplet Digital PCR法を用いた中枢神経感染症の高感度検出法開発

研究課題名（英文）Development of a highly sensitive detection method for Central Nervous System infections using Droplet Digital PCR

研究代表者

東本 祐紀 (Yuki, Higashimoto)

藤田医科大学・医療科学部・講師

研究者番号：20569701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：急性脳炎・脳症はあらゆる年齢層に生じる予後不良な中枢神経感染症であるが、病因、病態解明を含めいまだ多くの課題が残されている。その鑑別診断においては、現在の標準法である real-time PCR (qPCR) 法を用いても、いまだ約半数が原因不明とされ、より高感度な検査法が望まれている。本研究では ddPCR 法を用いた3種のヘルペスウイルス検出法を確立するため、既存 qPCR 法との比較検討を行った。ddPCR 法では現状の qPCR 法を上回る結果を得る事は出来なかった。感度向上のためには、ddPCR 法のサンプル添加量の増量、あるいは各ウイルス検出系毎の適切なアニーリング温度の検討など、改善の余地がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HSV-1とVZVはqPCR法がddPCR法より感度が良く、HSV-2ではddPCR法とqPCR法は同程度の感度であった。既報ではddPCR法がqPCR法よりも高感度との報告も多数あるため、さらなる改善の余地がある。既存より高感度分子生物学的診断法を構築することで、原因不明脳炎・脳症の中から新たに起因ウイルス同定が可能になり、それらがどのような臨床像を呈しているか明らかになる。また未診断例の中から新たにHSV、VZV陽性検体が見つければ、早期診断、適切な抗ウイルス剤投与により患者予後の改善に直結する。

研究成果の概要（英文）：Acute encephalitis/encephalopathy is a central nervous system infection with a poor prognosis that occurs in all age groups, but many issues remain, including the elucidation of the aetiology and pathogenesis. In the differential diagnosis, the cause is still unknown in about half of cases using the real-time PCR (qPCR) method, which is the current golden standard method, and a more sensitive method is desired. In this study, a comparison with existing qPCR methods was conducted to establish a method for detecting three types of -herpesviruses using ddPCR methods. Three ddPCR methods did not provide better results than the current qPCR methods. There is room for improvement, such as increasing the amount of sample added to the ddPCR method or examining the appropriate annealing temperature for each virus detection system, in order to increase sensitivity.

研究分野：感染症

キーワード：ヘルペスウイルス ddPCR

1. 研究開始当初の背景

急性脳炎・脳症はあらゆる年齢層に生じる予後不良な中枢神経感染症であるが、病因、病態解明を含めいまだ多くの課題が残されている。例えば、感染性脳炎と約 20%を占めるとされる免疫介在脳炎は類似の臨床症状を呈することも多く、臨床症状、生理学検査、神経放射線学検査のみでは鑑別が困難で、適切な診断治療のためには良質なウイルス学的検査法が必須である。小児脳炎・脳症の全国調査によると、本邦では年間約 1000 例の脳炎・脳症が発生し、そのうち 25%をインフルエンザ脳症が占め、次いで human herpesvirus 6 (HHV-6) が 11%、約 30%が原因不明とされている。また、2014 年の Tack らの米国における成人脳炎を対象とした報告 (Neuroepidemiology, 2014) では、1999 年から 2008 年の脳炎死が 12,526 件、その内 68.5%は原因不明で、原因が特定された脳炎死はヘルペスウイルスが 36.7%と最高だった。また水疱形成を伴った皮膚疾患、脳炎・脳症患者において、herpes simplex virus-1 (HSV-1)、HSV-2、varicella-zoster virus (VZV) の 3 種類のヘルペスウイルス亜科の鑑別診断が重要である。この様に、小児、成人共にヘルペスウイルスが主要な起因ウイルスである一方で、最大で 70%がいまだに原因不明という厳しい現実がある。

近年、Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いた高感度な病原微生物検出法の有用性が報告されている。ddPCR 法は検量線を作成することなく、高感度・高精度にターゲット DNA/RNA の絶対定量が可能な新規核酸増幅法である。本研究では ddPCR 法を用いた 3 種のヘルペスウイルス検出法を確立するため、既存 qPCR 法との比較検討を行った。

2. 研究の目的

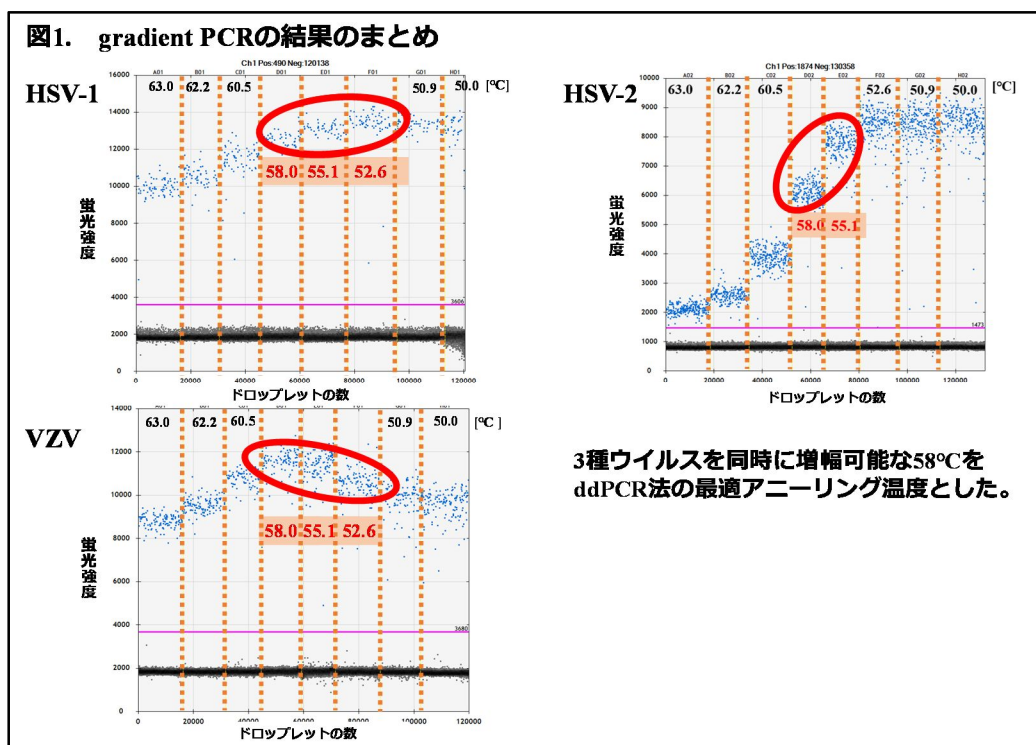
我々が開発した real-time PCR 法のプライマー、プローブを基盤にして、新たに ddPCR 法による 9 種のヒトヘルペスウイルス (HSV-1、HSV-2、VZV、CMV、EBV、HHV-6A、HHV-6B、HHV-7、HHV-8) DNA 検出系を構築し、既存の real-time PCR 法では未診断だった症例の中から新たなヘルペスウイルス感染による脳炎・脳症例を見つけ出す。

3. 研究の方法

本研究では 3 種のヘルペスウイルス検出法について検討した。HSV-1、HSV-2 は実験室株 (KOS 株、186 株)、VZV はワクチン株 (乾燥弱毒生水痘ワクチン「ピケン」) のウイルス液から QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。ddPCR 法のアニーリング温度の検討のため、滅菌水で 1000 倍希釈した 4 種ウイルス DNA を用いて 50.0 ~ 63.0 で gradient PCR を実施した。qPCR 法、ddPCR 法のプライマー、プローブセットは両方法で同一のセットを使用した。qPCR 法は 10 倍段階希釈した DNA 5 μ L に試薬 20 μ L を加え、StepOne™ (Applied Biosystems) Fast mode にて、95 20 秒、95 1 秒、60 20 秒を 50 cycles で PCR を行った。ddPCR 法は 0.1M Tris-HCl / 0.05% Tween20 で 10 倍段階希釈した DNA 2 μ L に試薬 20 μ L を加え、QX200 AutoDG (Bio-Rad) にてドロップレットを作成した。その後 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) を用い 96 10 分反応後、94 30 秒、56 60 秒、98 10 分を 40 cycles で PCR を行った。その後 QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) を使用してドロップレットの蛍光測定を行った。

4. 研究成果

ddPCR 法のアニーリング温度は、HSV-1、HSV-2、VZV の順に 52.6 ~ 58.0 、
55.1 ~ 58.0 、55.1 ~ 58.0 で最も増幅効率が良かった (図 1)。



qPCR 法で 100%検出できた最大希釈倍率は、HSV-1、HSV-2、HHV-6、VZV の順に 10^7 倍希釈、 10^6 倍希釈、 10^6 倍希釈であった。ddPCR 法で 100%検出できた最大希釈倍率は、HSV-1、HSV-2、VZV の順に 10^6 倍希釈、 10^6 倍希釈、 10^5 倍希釈であった (表 1)。

表1. qPCR法とddPCR法の比較結果

HSV-1 希釈倍率	Real-time PCR			Droplet Digital PCR		
	平均 CT値	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)	平均コピー数 (copies/mL)	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)
10	17.2	5/5	100	over	1/1	100
10^2	21.1	5/5	100	4.7×10^7	3/3	100
10^3	24.5	5/5	100	6.7×10^6	5/5	100
10^4	28.1	5/5	100	5.3×10^5	5/5	100
10^5	31.8	5/5	100	4.8×10^4	8/8	100
10^6	35.3	5/5	100	4.2×10^3	9/9	100
10^7	38.4	5/5	100	3.1×10^3	3/8	38
10^8	41.0	2/5	40	-	0/1	0

HSV-2 希釈倍率	Real-time PCR			Droplet Digital PCR		
	平均 CT値	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)	平均コピー数 (copies/mL)	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)
10	17.7	6/6	100	over	1/1	100
10^2	21.6	6/6	100	3.0×10^7	3/3	100
10^3	25.3	6/6	100	3.0×10^6	5/5	100
10^4	30.3	6/6	100	7.1×10^5	5/5	100
10^5	34.3	6/6	100	2.1×10^4	8/8	100
10^6	38.7	6/6	100	2.1×10^3	8/8	100
10^7	38.9	1/6	17	8.0×10^2	2/8	25
10^8	-	0/6	0	-	0/1	0

VZV 希釈倍率	Real-time PCR			Droplet Digital PCR		
	平均 CT値	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)	平均コピー数 (copies/mL)	陽性数 /総数 (%)	陽性率 (%)
10	20.0	5/5	100	6.5×10^7	4/4	100
10^2	23.8	5/5	100	8.9×10^6	7/7	100
10^3	26.9	5/5	100	7.8×10^5	7/7	100
10^4	31.3	5/5	100	6.0×10^4	10/10	100
10^5	35.5	5/5	100	5.8×10^3	10/10	100
10^6	38.8	5/5	100	8.8×10^2	6/10	60
10^7	-	0/5	0	-	0/4	0
10^8	-	0/5	0	-	0/3	0

【考察】

qPCR 法と ddPCR 法を比較検討した結果、HSV-1、VZV は、qPCR 法が ddPCR 法より感度が良く、HSV-2 では、ddPCR 法と qPCR 法は同程度の感度であった。ddPCR 法では現状の qPCR 法を上回る結果を得る事は出来なかった。感度向上のためには、プレート増量、あるいは各ウイルス検出系毎の適切なアニーリング温度の検討など、改善の余地がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ihira Masaru, Kawamura Yoshiki, Miura Hiroki, Hattori Fumihiko, Higashimoto Yuki, Sugata Ken, Ide Tomihiko, Komoto Satoshi, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Molecular characterization of rotaviruses obtained from patients with rotavirus associated encephalitis/encephalopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 541 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Yoshiki, Hattori Fumihiko, Higashimoto Yuki, Kozawa Kei, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Evaluation of varicella vaccine effectiveness during outbreaks in schools or nurseries by cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 2901 ~ 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Noriko, Ihira Masaru, Enya Yasuko, Yumi Takahashi, Izuru Chisato, Rie Igarashi, Higashimoto Yuki, Hiroki Miura, Asaki Takanashi, Kaoru Fujimoto, Kawamura Yoshiki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 2022
2. 論文標題 Dynamics of salivary human herpesvirus 6 and 7 shedding in pregnant women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.27692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Yoshiki, Hattori Fumihiko, Higashimoto Yuki, Kozawa Kei, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Evaluation of varicella vaccine effectiveness during outbreaks in schools or nurseries by cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 2901 ~ 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Masato, Higashimoto Yuki, Toyama Yoko, Horiguchi Tomoya, Hibino Masaya, Iwata Mitsunaga, Imaizumi Kazuyoshi, Doi Yohei	4. 巻 107
2. 論文標題 Diagnostic accuracy of LAMP versus PCR over the course of SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 195 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2021.04.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kozawa Kei, Higashimoto Yuki, Kawamura Yoshiki, Miura Hiroki, Negishi Takumi, Hattori Fumihiko, Ihira Masaru, Komoto Satoshi, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 18
2. 論文標題 Rotavirus genotypes and clinical outcome of natural infection based on vaccination status in the post-vaccine era	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21645515.2022.2037983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Hiroki, Ihira Masaru, Kozawa Kei, Kawamura Yoshiki, Higashimoto Yuki, Hattori Fumihiko, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Lactococcus lactis Strain Plasma on HHV-6 and HHV-7 Shedding in Saliva: A Prospective Observational Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1683 ~ 1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9081683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Fumihiko, Kozawa Kei, Miura Hiroki, Kawamura Yoshiki, Higashimoto Yuki, Yoshikawa Akiko, Ihira Masaru, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 Trend in varicella patients 4?years after implementation of universal two-dose varicella vaccination in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 7331 ~ 7336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2020.09.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部 文彦, 大林 みどり, 浅井 ゆみこ, 須藤 湧太, 畑川 奈都樹, 平井 雅之, 三原 由佳, 川口 博史, 山田 緑, 河村 吉紀, 塩谷 泰子, 井平 勝, 東本 祐紀, 河本 聡志, 谷口 孝喜, 吉川 哲史
2. 発表標題 2018/19シーズンに当院で経験したロタウイルス胃腸炎入院例の検討
3. 学会等名 日本小児感染症学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 小澤慶, 東本祐紀, 三浦浩樹, 服部文彦, 河村吉紀, 井平勝, 河本聡志, 谷口孝喜, 吉川哲史
2. 発表標題 2019年の愛知県下におけるロタウイルス胃腸炎患児の分子疫学的解析
3. 学会等名 日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東本祐紀, 服部文彦, 河村吉紀, 三浦浩樹, 小澤慶, 井平勝, 吉川哲史
2. 発表標題 LAMP法とデルマクイックVZVによる水痘帯状疱疹ウイルス感染迅速診断法の有用性検討
3. 学会等名 日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松裕之, 塩谷泰子, 井平勝, 鈴木竜大, 東本祐紀, 三浦浩樹, 服部文彦, 河村吉紀, 河本聡志, 谷口孝喜, 吉川哲史
2. 発表標題 早産児に対するロタウイルスワクチン接種後の便中排泄と免疫誘導能の検討
3. 学会等名 日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井平勝, 塩谷泰子, 東本祐紀, 平松裕之, 鈴木竜太, 小澤慶, 三浦浩樹, 服部文彦, 河村吉紀, 吉川哲史
2. 発表標題 妊娠期間中の唾液中human herpesvirus6,7排泄の推移
3. 学会等名 日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東本 祐紀
2. 発表標題 LAMP 法とデルマクイックVZV による水痘迅速診断法の有用性解析
3. 学会等名 日本ワクチン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 弘康, 東本 祐紀, 水谷 謙明, 村山 元秀, 北原 公明, 藤田 孝, 齋藤 邦明
2. 発表標題 ロボットを活用したCOVID-19ロボット自動PCR検査システムの評価
3. 学会等名 日本医療検査科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部 文彦, 大林 みどり, 浅井 ゆみこ, 須藤 湧太, 畑川 奈都樹, 平井 雅之, 三原 由佳, 川口 博史, 山田 緑, 河村 吉紀, 塩谷 泰子, 井平 勝, 東本 祐紀, 河本 聡志, 谷口 孝喜, 吉川 哲史
2. 発表標題 2018/19シーズンに当院で経験したロタウイルス胃腸炎入院例の検討
3. 学会等名 日本小児感染症学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷 泰子、井平 勝、服部 文彦、東本 祐紀、平松 裕之、鈴木 竜太、河村 吉紀、小澤 慶、河本 聡志、谷口 孝喜、吉川 哲史
2. 発表標題 Rotarix 接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連
3. 学会等名 日本ワクチン学会
4. 発表年 2021年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関