

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860418

研究課題名(和文) 大分県における過去25年間の小児急性脳炎 - 脳脊髄液からの起因ウイルスの網羅的検索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of acute encephalitis with unknown aetiology in children.

研究代表者

松本 昂 (Matsumoto, Takashi)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：50609667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性脳炎・脳症患者の半数以上では、その原因が不明である。そこで我々は、小児急性脳炎の脳脊髄液から起因となる原因ウイルスの同定を試みた。抽出したRNA及びDNAを用いて、RT-PCRによって各種ウイルスの検出を試み、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。BLAST検索のHuman adenovirus、Human herpesvirus、Human parechovirus、Human echovirus等が検出・同定され、大分県内の小児急性脳炎の原因ウイルスである可能性が示唆された。さらに、NGSを用いた高感度のウイルス検出系の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：More than half of cases of encephalitis remain unknown. We examined the causative virus in cerebrospinal fluid samples from encephalitis children with unknown aetiology by RT-PCR. The nucleotide sequence of viral gene was identified by direct-sequencing of PCR products and phylogenetic analysis was conducted. Human adenovirus, Human herpesvirus, Human enterovirus, Human parechovirus, Human bocavirus and Human echovirus were detected in cerebrospinal fluid samples from encephalitis children. It indicated these viruses might be considered as the causative pathogen of encephalitis in children in Oita, Japan. Moreover, we evaluated high-sensitivity detection method for viral encephalitis using next generation sequencing.

研究分野：微生物学

キーワード：小児急性脳炎 ウイルス感染症 原因不明脳炎 遺伝子診断 分子疫学 大分県 次世代シーケンス

### 1. 研究開始当初の背景

急性脳炎は発熱、頭痛、痙攣、意識障害、麻痺、嘔吐または下痢を伴う重篤な疾患である。全世界で毎年 10 万人に 7.4 人が罹患し (Virology J. 2008)、日本における小児急性脳炎・脳症患者は年間約 1,000 例と推計されている。これら脳炎の臨床症状は、単一または複数の病態を経ることが知られているが、その発症メカニズムは不明である。その為、各症状に対する支持療法が治療の基本である。さらに、急性脳炎患者の約 70% では何らかの後遺症が見られることが知られており、予後が不良であることが多い (Virology J. 2008)。

急性脳炎の主な起因は、ウイルス感染であるとされており (Clin Infect Dis. 2006)、単純ヘルペスウイルスおよび水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス等では、特異的な治療法が確立され、発症早期の鑑別による適切な治療薬が選択可能である (Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2009)。また、国内においてもインフルエンザウイルスが同定可能な迅速診断キットの開発および特異的な抗ウイルス薬の開発・適応によって、約 30% であったインフルエンザ脳炎・脳症の致死率は、大きく改善された。

この様に起因病原体の同定が、その治療法の選択に重要であるにも関わらず、日本における小児急性脳炎・脳症患者の約 30% は未だにその原因が特定できていないのが現状である (Virology J. 2009)。特に、小児脳炎は重症例が多く、患者 QOL を改善するためにも起因ウイルスの特定と有効な特異的な治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

我々は、小児急性脳炎患者の脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid: CSF) から起因病原体と考えられるウイルスの検出および同定を試み、大分県内における小児原因不明脳炎の流行調を行う。

具体的には、①1988 年～2013 年までの期間に大分こども病院にて報告された小児急性脳炎患者の疫学解析、②RT-PCR 法を用いた、ウイルス性脳炎の流行動態の把握、③検出された脳炎起因ウイルスの分子疫学解析、及び、④次世代シーケンスによる小児急性脳炎の virome 解析による脳炎ウイルスの新規同定を試みる。

### 3. 研究の方法

研究目的①及び②：小児急性脳炎の流行状況を把握するため、患者臨床情報 (年齢、体重および転帰等) の収集とデータ化、さらに、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて CSF 検体から DNA 及び RNA を抽出し、既知のユニバーサルプライマーを用いた RT-PCR 法による起因ウイルスの検出を試みた。合計 310 検体から核酸を抽出し、Adenovirus、bocavirus、Herpesviridae、Enteroviridae、Paramyxoviridae、Influenza A

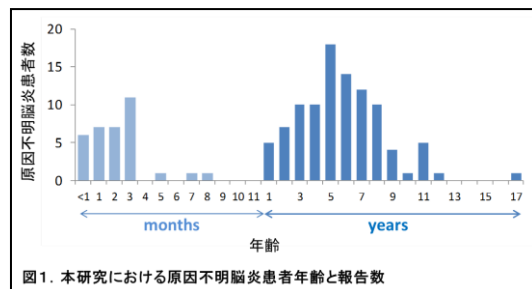
virus、Parechovirus、Flaviviridae、Lyssavirus 及び Bacteria 16S rDNA について RT-PCR を行った。

研究計画③：研究計画②等で得られた病原体の詳細な分子疫学解析を実施する為、RT-PCR 法によって検出された病原体の遺伝子増幅産物について ABI3100 シークエンサー及び BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit を用いてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。更に、これら塩基配列は MEGA software ver5 を用いて Neighbor joining 法を用いてこれまでに報告された既知のウイルス株との系統樹解析を行った。

研究計画④：新たな脳炎ウイルスの同定に向け、原因不明脳炎患者由来 RNA を実験的にプールし、次世代シーケンサー HiSeq を用いた RNA-Seq を実施した。DNase I 処理後 Ribo-Zero Magnetic Gold Kit を用いてヒト由来 rRNA を除去し、複数検体から得られた Pooled RNA ライブラリーを HiSeq 2500 (Paired-end 150 bp) にて解析した。得られたリードから、CLC genomics workbench 8.5.1 (QIAGEN) を用い、Quality score を基にトリミングし、de novo assembly を行い、contig 配列を作成した。ヒトゲノム参照配列 (GRCH37) に対して mapping を行い、これにより得られた unmapped reads を用いて、既知の NCBI virus database を参照し BLAST 検索を実施した。

### 4. 研究成果

研究目的①及び②：大分県内の小児救急病院で 1994 年 7 月から 1995 年 5 月までの期間に収集・保管された原因不明脳炎患者臨床情報のうち、情報の閲覧・回収が可能であった 133 症例の患者平均年齢は、5.3 歳 (男女比 1.9:1) 平均入院日数は 10 日であった。また、生後 3 カ月未満にも急性脳炎の好発期が認められた (図 1)。



研究計画②：大分県内の小児救急病院で 1991 年 1 月から 1995 年 7 月までに収集・保管された CSF 検体を用い、RT-PCR 法による病原体スクリーニングを行った。その結果、310 症例中 43 例 (13.9%) からウイルスが検出された。特に、Human echovirus が 18 例 (そのうち 13 例が type 9) 検出された。その他には、Human adenovirus 41 及び Human parechocirus 3 がそれぞれ 10 例、Human herpesvirus-6 が 3 例、その他 Human

enterovirus 等が原因不明急性脳炎患者 CSF から検出された (表 1)。

検出したウイルス	検出数	%
Human adenovirus 41	10	3.23
Human herpesvirus-6	3	0.97
Human enterovirus 71	1	0.32
Human parechovirus 3	10	3.23
Human bocavirus 1	1	0.32
Human echovirus	18	5.81
type 9	13	4.19
type 3	1	0.32
type 11	1	0.32
type 14	2	0.65
type 20	1	0.32
検出総数	43	13.87

表 1. RT-PCR法によってCSFから検出されたウイルス

研究計画③: さらに、これら検出病原体の内 Echovirus、Herpesvirus 及び Parechovirus に対して系統樹解析を行った。Human echovirus の VP4 遺伝子部分配列 (457 bp) を用いた系統樹解析の結果、今回最も検出数が多かった type 9 は、愛媛と兵庫で同定された type 9 株と同一のクラスターを形成し、株間の相同性も非常に高かった (表 2、図 2)。

大分株(検出数)	BLAST検索結果		同一型間の相同性
	株	相同性 (%)	
Echovirus type9 (13)	Echovirus 9 (U77070)	90-97%	94.0 - 100%
Echovirus type3 (1)	Echovirus 3 (AB282812) 兵庫	99%	-
Echovirus type11 (1)	Echovirus 11 (AJ577594) Romania	80%	-
Echovirus type14 (2)	Echovirus 14 (GQ281597)	78-81%	80.40%
Echovirus type20 (1)	Echovirus 20 (AY302546)	92%	-

表 2. EchovirusのBLAST検索

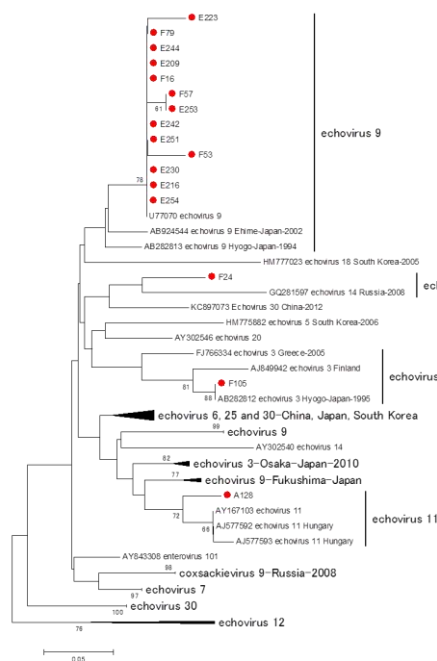


図 2. Echovirus VP4遺伝子領域による系統樹解析

Human echovirus type 3、9、11、14 はこれまでにも各地で急性脳炎患者から検出・報告されており、本研究においても原因不明急性

脳炎の原因病原体であった可能性が示唆された。

次に、今回検出された 3 株の human herpesvirus は、BLAST 検索と系統樹解析の結果から、いずれも human herpes virus type-6 の variant A であることが明らかとなった (図 3)。この variant A は脳炎及び多発性硬化症等の発症に関与することが、既に報告されており、もう一つの variant B と比較して、病原性が高いと考えられている。

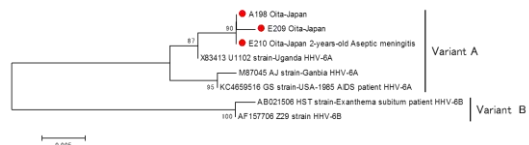


図 3. Herpesvirus DNAポリメラーゼ領域 (530 bp) による系統樹解析

また、今回同定された Human parechovirus は、愛媛、オランダやカナダなどで確認された Human parechovirus 3 と最も相同性が高く、系統樹解析の結果からも、これらの株と同一のクラスターを形成した (図 4)。特に、今回大分で同定された Human parechovirus 3 株は愛知で分離された株と最も高い相同性を示した。

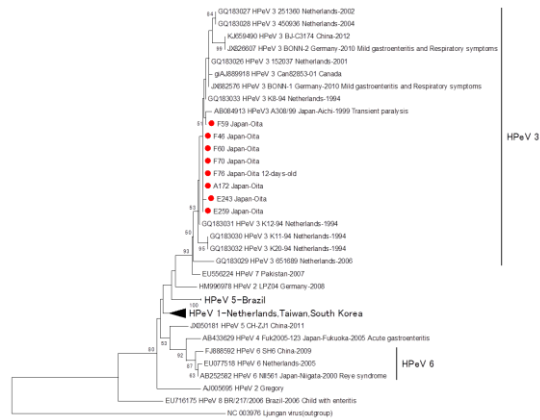


図 4. Human Parechovirus 5'-UTR遺伝子領域 (243 bp) による系統樹解析

本研究において多数検出された Human echovirus 9 と Human parechovirus 3 は、この 20 年間に国内で流行が確認されてきた株とも類似しており、当時から広く流行していた株であると考えられた。また、一般的には、単純ヘルペスウイルスによる脳炎が多いとされているが、年代や地域によって、主要な原因ウイルスが異なる可能性が考えられた。さらに、主に急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られる Human adenovirus type 41 が 10 例検出されたことから、下痢症及び呼吸器感染症の発症に関連したウイルス感染症が脳炎の起こすと考えられるウイルスが急性脳炎の原因となる可能性があることが考えられた。これらの現象は、ウイルス性下痢症を起因とした Rotavirus 脳症や、我々が世界で初めて報告した Bocavirus 脳炎においても確認されている (Clin Infect Dis. 2012)。さらに、本研究においては、国内初となる CSF からの

Human bocavirus の検出に成功し、これら小児ウイルス性下痢症に関連した脳炎・脳症の解明が求められる。

さらに、今回、細菌感染の有無を評価するため、ウイルス PCR 陰性検体を対象に 16S rRNA 遺伝子 V3-4 領域を標的とした追加スクリーニングを行った。しかし、主に環境起因菌のみが検出され、細菌感染については否定的な結果が得られた。

また、発展的な成果として、本研究において確立した CSF からの核酸抽出方法および RT-PCR 法によるスクリーニングを応用し、日本国内だけでなく海外のグループとも積極的に共同研究を展開し、人獣共通感染から脳炎を引き起こす Rabies virus についても疫学調査を実施できた。

#### 研究計画④：

上記 RT-PCR 法によるスクリーニング結果、約 80%の症例では、未だ原因となる病原体の特定に至らなかった。そこで、次世代シーケンスを用いた高感度病原体検出系の確立を試みた。RT-PCR 法によるスクリーニング結果がいずれも陰性であった 5 症例の CSF を実験的にプールし、HiSeq 2500 (Illumina) にて RNA Seq を実施した。ヒト由来のゲノム配列を除去した後、得られたショートリードから contig 配列を作成し、BLAST 検索を行ったところ、3069 contigs において既知のウイルスゲノム配列との相同性が得られた (82~100%, 最長 contig 長: 1,489 nt)。これらの contig 配列のうち、10 以上の contig 配列が確認され、且つ、contig 配列長が 200 nt 以上のものを選択し多結果、Human rotavirus A、Mumps virus 及び Stealth virus (Cytomegalovirus) 等が検出された (図 5)。

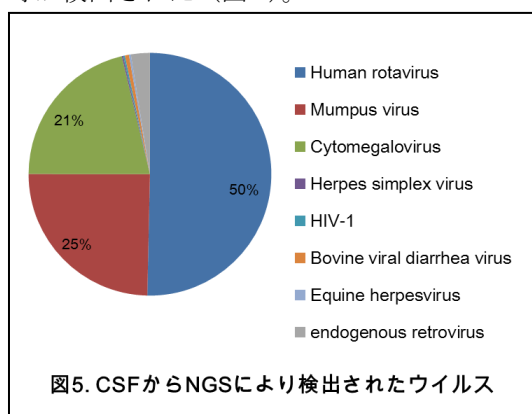


図5. CSFからNGSにより検出されたウイルス

特に、Human rotavirus A については、11 節の RNA ゲノム領域のすべてが検出できたことから、これら症例の内、ロタウイルス感染症に起因した、ロタウイルス脳炎もしくは脳症が存在したことが示唆された。また、RT-PCR 法によるスクリーニングでは陰性を示した検体から Mumpus virus や Herpes simplex virus の遺伝子配列が検出できたことから、次世代シーケンスを用いた解析は、より高感度に病原体を検出できる可能性が

伺えた。

これら研究成果が、今後、日本における小児急性脳炎の流行動態の解明の一助となり、患者と医療機関の双方の負担軽減および新たな診断・治療法の確立に向けた礎になることを期待する。

#### 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 3 件)

1. Matsumoto T, Nanayakkara S, Perera D, Ushijima S, Wimalaratne O, Nishizono A, Ahmed K. Terrestrial Animal-Derived Rabies Virus in a Juvenile Indian Flying Fox in Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 査読有 . 70(6):693-695 (2017). DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.249

2. Ahmed K, Phommachanh P, Vorachith P, Matsumoto T, Lamaningao P, Mori D, Takaki M, Douangneun B, Khambounheuang B, Nishizono A. Molecular epidemiology of rabies viruses circulating in two rabies endemic provinces of Laos, 2011-2012: regional diversity in Southeast Asia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 査読有 .9(3):e0003645 (2015). DOI: 10.1371/journal.pntd.0003645

3. Karunanayake D, Matsumoto T, Wimalaratne O, Nanayakkara S, Perera D, Nishizono A, Ahmed K. Twelve Years of Rabies Surveillance in Sri Lanka, 1999 - 2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 査読有 .8(10):e3205 (2014). DOI: 10.1371/journal.pntd.0003205

[学会発表] (計 3 件)

①Matsumoto T. 15th Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection (Kuala Lumpur, Malaysia) Viral aetiology of acute encephalitis syndrome in Bangladeshi children. (Poster presentation) 26-29 th Nov 2014.

②Matsumoto T. 6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology (Kuala Lumpur, Malaysia) Molecular epidemiology of group A rotaviruses from children in the Philippines. (Oral presentation) 5-7 th May 2014.

③Matsumoto T. 招待講演 Seminar on the laboratory diagnosis and molecular epidemiology of viruses causing encephalitis. Molecular epidemiology of

rabies in Sri Lanka. - Sylvatic rabies and changing trends of human rabies - . Universiti Malaysia Sabah (Kota kinabalu, Sabah, Malaysia). 5 th Mar 2014.

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/>

<http://www.med.oita-u.ac.jp/biseibut/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 昂 (MATSUMOTO Takashi)

大分大学・医学部 環境・予防医学講座・特任助教

研究者番号：50609667

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

アハメド カムルディン (AHMED Kamruddin)

マレーシア国立サバ大学・医学部・教授

森 大輔 (MORI Daisuke)

マレーシア国立サバ大学・医学部・講師

藤本 保 (FUJIMOTO Tamotsu)

大分こども病院・院長

西園 晃 (NISHIZONO Akira)

大分大学・医学部・微生物学講座・教授