

## 25. 尼崎市における急性脳炎・脳症の原因ウイルス遺伝子の検出について

○村山 隆太郎 （尼崎市立衛生研究所）

### 【研究目的】

急性脳炎・脳症の原因となる病原体は多種多様であり、ウイルスに限っても何種ものウイルスが原因ウイルスとして考えられている。

尼崎市では、年間平均 10 数件の急性脳炎・脳症例が発生しているが、当所では日本脳炎ウイルスのみ遺伝子検査を実施しており、原因究明に至らないことが多い。今回、尼崎市において急性脳炎・脳症を発生させうる日本脳炎以外のウイルスを検出できるマルチプレックス PCR 法を用いて迅速に遺伝子検出できる体制を整えることを目的とする。

### 【研究の必要性】

急性脳炎・脳症は種々の病原体による脳組織の炎症に起因する疾患群の総称である。原因となる病原体は多種多様であるが、原因ウイルスには単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス等がある。

尼崎市は近隣に関西国際空港を有し、訪日外国人が多数訪れる。また、県立の総合医療センターを有し、感染症対策の中核を担うことから県南東部の患者が集まることが考えられる。

そうした中で尼崎市では、年間平均 10 数件の急性脳炎・脳症例が発生しているが、当所では日本脳炎ウイルスのみ遺伝子検査を実施しており、原因究明に至らない。その他のウイルスについては兵庫県に検査依頼しているところである。

そこで、急性脳炎・脳症例において、より詳細な疫学情報を迅速に得るため、頻繁に検出されるウイルスを効率よく検査できる体制を整えることが必要である。

### 【研究計画】

尼崎市において平成 25 年から平成 30 年までに急性脳炎・脳症例として搬入された検体及び各ウイルスのポジティブコントロールを用い、検査体制を整える。咽頭拭い液・尿・血液等の検体を用い、RNA を抽出後、マルチプレックス PCR 法による単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス等の遺伝子検査を行う。

ウイルス遺伝子が検出された場合、DNA シーケンサーを用い原因となったウイルスの詳細な遺伝子配列等を調べる。

## 【実施内容・結果】

当初の研究計画を一部変更して検討を行った。

マルチプレックス PCR 法により、エンテロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルスの 3 種のウイルスを同時検出できる検査系を検討し、搬入された臨床検体について遺伝子検出を試みた。

当初予定していた単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、人ヘルペスウイルスについては、ポジティブコントロールが手に入らなかったため、PCR 検査系の確立ができず、参考検査とした。

### 1 検体

平成 29 年から令和元年に尼崎市に急性脳炎・脳症疑い例として搬入された 3 名 10 検体を検査対象とした。検体は、咽頭ぬぐい液 2 検体、尿 3 検体、血液 3 検体、髄液 1 検体、糞便 1 検体の計 10 検体であった。

検査検討のために用いたポジティブコントロールについては、麻疹・風疹は国立感染症研究所から、エンテロウイルスについては兵庫県立健康科学研究所から分与していただいたものを用いた。ネガティブコントロールには、水を用いた。

### 2 方法

検体からの RNA 抽出は、High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてキット添付書類に準じて行った。同時に水を検体として RNA 抽出することで、ネガティブコントロールとした。

抽出した RNA を PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。詳細としては、抽出した RNA 10  $\mu$ L、5×PrimeScript Buffer 4  $\mu$ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ L、Random 6mers 4  $\mu$ L、RNase Free dH<sub>2</sub>O 1  $\mu$ L を添加して、総量 20  $\mu$ L にした後、37°C 15 分、85°C 5 秒のインキュベーションにより、cDNA の合成と逆転写酵素の不活性化を行った。

合成した cDNA を用いて、以下の条件でマルチプレックス PCR を行った。

麻疹ウイルスは HA 遺伝子及び N 遺伝子を検出する 2 種類のプライマーペア、風疹ウイルスとエンテロウイルスの 2 種ウイルスを検出する各プライマーペア、合わせて 4 種類のプライマーペアを混合して用いた。マルチプレックス PCR にするためプライマーの相互干渉を考慮して、濃度をそれぞれ調整した。

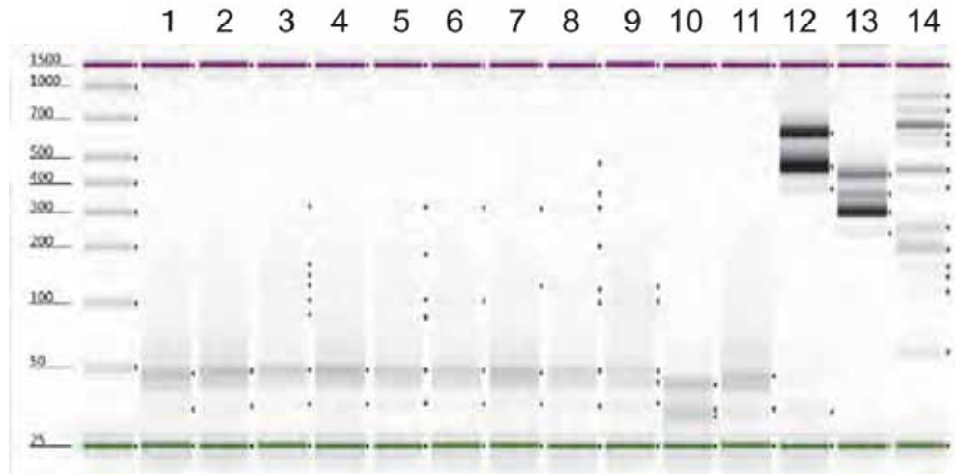
1st PCR 反応は、Tks Gflex<sup>TM</sup> DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、逆転写反応液 2  $\mu$ L を混合し、総量 20  $\mu$ L の反応液を 98°C、1 分後、98°C、10 秒、55°C、15 秒、68°C、30 秒の反応を 30 サイクル行った。この 1st PCR 産物 2.0  $\mu$ L を用い、nested PCR を行った。この増幅はアニーリング温度を 58°C に変更した以外は、全て 1st PCR と同条件で行った。

マルチプレックス PCR を行うにあたり、各プライマーが正常に働くかどうかモノプレックス PCR での確認も行った。

電気泳動は、Agilent 4200 TapeStation を用い、添付書類に準じて行った。

### 3 結果

尼崎市に急性脳炎・脳症疑い例として搬入された3名10検体は、すべてバンド不検出であった。ポジティブコントロールは、モノプレックス PCR でバンドが確認でき、マルチプレックス PCR でも同様のバンドが確認できた。ネガティブコントロールはバンドが確認されなかった(図1)。検体を用いた反応での非特異反応は、モノプレックス PCR 及びマルチプレックス PCR ともに見られなかった。



レーン 1	患者 A	咽頭ぬぐい液
レーン 2	患者 A	尿
レーン 3	患者 A	血清
レーン 4	患者 A	糞便
レーン 5	患者 B	尿
レーン 6	患者 B	咽頭ぬぐい液
レーン 7	患者 B	髄液
レーン 8	患者 C	喀痰
レーン 9	患者 C	血清
レーン 10	患者 C	全血
レーン 11	検体に水を用いたネガティブコントロール	
レーン 12	麻疹 HA 及び N 遺伝子	ポジティブコントロール
レーン 13	風疹	ポジティブコントロール
レーン 14	エンテロウイルス	ポジティブコントロール

図1 マルチプレックス PCR 法による急性脳炎・脳症疑い事例の原因ウイルス遺伝子検出

#### 【考察と今後の課題】

麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスを同時検出するマルチプレックス PCR 法を検討した。各種ポジティブコントロールを用いた結果は良好であり、ウイルス3種を同時に検出することが可能なことがわかった。

このマルチプレックス PCR 法を用いて、尼崎市に搬入のあった検体を調べてみたところ、

すべての検体で陰性であった。しかし、臨床検体由来の陽性検体を所持していないため、臨床検体から検出可能かどうか検討することができなかった。

今回、実施予定であった単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、人ヘルペスウイルスは、ポジティブコントロールが手に入らず PCR 検査系の検討ができなかった。プライマーの合成は可能なので、各種ウイルス遺伝子を標的としたプライマーを合成し、搬入検体を調べたがすべての検体でバンドは見られなかった。ただし、ポジティブコントロールがなく、PCR 検査系が正常に働いていることが証明できないため、参考検査とした。

当所のように、ウイルス培養設備がなく、通常検査で扱っていないウイルスの遺伝子検査を行う場合、ポジティブコントロールを準備することが非常に困難である。今回の検討のように、診断や届出のために検査が必須ではない場合、ポジティブコントロールの準備がいかに困難で重要であることを痛感した。

今回実施できなかった単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、人ヘルペスウイルスについては、引き続き検討し、マルチプレックス PCR の検査系を確立していきたいと考えている。急性脳炎・脳症疑い例からのウイルス遺伝子検出は困難であるが、今後、少しでも多くのウイルス遺伝子を調べることで、症例の原因究明に寄与する考えである。

#### 【参考文献】

病原体検出マニュアル「麻しん」2017年4月版 国立感染症研究所  
病原体検出マニュアル「風しん」2019年7月版 国立感染症研究所  
病原体検出マニュアル「手足口病」2018年2月版 国立感染症研究所  
病原体検出マニュアル「ヘルパンギーナ」2018年2月版 国立感染症研究所  
病原体検出マニュアル「突発性発しん」2015年8月版 国立感染症研究所  
病原体検出マニュアル「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎」2017年3月版 国立感染症研究所

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
プライマー	56,000 円
RNA 抽出キット	50,000 円
PCR 関連試薬	69,500 円
電気泳動関連試薬	83,000 円
ピペットチップ	40,000 円
郵送費	1,500 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円