

主論文の要旨

**Comprehensive detection of viruses in pediatric patients
with acute liver failure using next-generation sequencing**

〔 次世代シーケンスによる小児急性肝不全症例の病原ウイルス検索 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

鈴木 高子

【緒言】

小児急性肝不全は国内で年間推定約 20 例と比較的稀であるが、70%以上の症例で肝移植を要し、生存率も 50-70%と予後不良な疾患である。成因としては代謝性に次いで、ウイルス感染症が多くを占めるが、40-50%の症例が成因不明である。従来法では検出できないウイルスの関与を示唆する報告もみられ、成因不明の中にウイルス感染症が起因となっている例が含まれている可能性がある。

近年、次世代シーケンス (NGS) が病原検索の新しい手法として注目されている。NGS は全てのウイルスを網羅的・定量的に検出可能であり、感染症の病原体検索への応用が進められている。本研究では NGS を用い、成因不明の小児急性肝不全・重症急性肝炎症例の臨床検体から病原ウイルス検索を行った。

【対象及び方法】

小児急性肝不全および重症急性肝炎 14 例を対象とした。患者背景を表 1 に示す。

入院時の保存検体を用い、NGS による解析を行った。血漿または血清 140 μ L から核酸抽出した後、DNA および RNA ライブラリーを作成し、HiSeq 2500 (Illumina) を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは MePIC v2.0 (国立感染症研究所) を用い解析を行った。解析後ウイルス由来リードが 10 リード以上検出された場合を有意とした。検出されたウイルスについてさらに各ウイルスのゲノム配列へのマッピングを行い検証した (CLC Genomics Workbench 9.5 (CLC bio))。

事前に研究手法の検証を他のウイルス感染症確定診断例の検体を用い行った。

【結果】

複数のウイルス感染症確定診断例の検体を用い、DNA シーケンスの検証を行い、PCR と同等のウイルス検出がみられた。図 1 に DNA シーケンス結果の一例を示す。

RNA シーケンスは、C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリア患児の血清から 3 種類の RNA ライブラリー調整キットを用いてライブラリーを作成し、比較検討を行った。図 2 に Ovation RNA-Seq System V2 (NuGEN) (a, b)、ScriptSeq V2 RNA-Seq (Illumina) (c, d)、SMARTer Stranded RNA-Seq (Takara Bio) (e, f) の RNA シーケンス結果を示す。Ovation で他の 2 キットと比較して 10 倍以上のウイルスゲノム由来リードが検出された。そこで本研究の RNA ウイルス検索には Ovation を用いた。

次に、成因不明の急性肝不全、急性肝炎症例の血漿もしくは血清を用い、NGS による解析を行った。検出されたウイルス由来シーケンスの一覧を表 2 に示す。14 例中 3 例で特定のウイルスの配列が 10 リード以上検出された。

赤血球輸血後に急性肝不全を発症した症例 5 の DNA、RNA 両シーケンスから Torque teno virus 7 (TTV-7) 由来の配列が検出された。症例 5 の TTV-7 に対するカバレッジプロットおよび症例 6 の Adeno-associated virus (AAV) に対するカバレッジプロットを図 3 に示す。症例 9 の RNA シーケンスを Stealth virus に対してマッピングを行ったところ、予想外に多くのリードがマッピングされた。他の RNA シーケン

スでも数リードの **Stealth virus** 由来配列を認めていたため、全 RNA シークエンスについて **Stealth virus** に対するリードマッピングを行ったところ、全てに **Stealth virus** 由来配列を認めた。また、症例 9 の RNA シークエンスを **Stealth virus** と高い相同性を持つ *Agrobacterium vitis* ribosomal RNA operon ゲノム配列に対してマッピングしたところ同等のリード数がマッピングされた。マッピングされたリードを抽出し、**Stealth virus** に対して再度マッピングを行ったところ 83.13%のリードがマッピングされた。

【考察】

今回、臨床検体を用いて 3 種類の RNA ライブラリー調整キットを比較し、**Ovation** が最も HCV ゲノム由来リード検出に優れていることを明らかにした。血漿および血清から抽出される RNA 量は非常に微量であった。**Ovation** は微量な RNA からのライブラリー調整に優れているとの報告がある。また、**Ovation** を用いた RNA シークエンスでは宿主由来の RNA の割合が低く、ウイルス由来の RNA の増幅をより多く認めたとする報告もあり、本研究に **Ovation** が適していると考えられた。

14 例中 11 例から有意なウイルス由来配列の検出を認めなかった。小児急性肝不全では代謝性の頻度が最も高く、成因不明の内訳としても多くを占めている可能性がある。一方で、急性肝不全の初発症状は不明瞭でウイルス感染が起因となっても、入院時には感染活動期を過ぎ、ウイルス核酸検出が難しかった可能性がある。

TTV は輸血後肝炎症例から検出され、疾患との関連が報告されているが、病原性は低いと考えられている。本研究で TTV が検出された症例は、輸血後に急性肝不全を発症し肝移植を要さず回復を認めており、TTV が関与していた可能性がある。しかし、TTV は広くヒトに分布しており、その病原性はいまだ判然としない。

AAV はヘルペスウイルスやアデノウイルスと共感染することが知られているが、病原性の報告はない。AAV が検出された症例から同時に *Herpes simplex virus 2* の配列をわずかに認めていたが、有意な検出とは言えなかった。

Stealth virus の病原性は明らかでない。**Stealth virus** はヘルペスウイルス科に属し、ヒトサイトメガロウイルスと相同性が高い他、細菌由来のゲノムと高い相同性が報告されている。**Ovation** のアーチファクトの 1 つとして細菌のリボソーム RNA が報告されており、本研究で検出された **Stealth virus** のゲノム配列は細菌由来もしくは RNA シークエンスの過程でのアーチファクトであると考えられた。

本研究の課題として、肝組織が検体としてより有用である可能性の他、検査にかかる費用、ライブラリー調整段階での宿主ゲノムの除去、ライブラリー調整やシークエンス反応に起因するコンタミネーション・アーチファクトの解釈が挙げられた。

【結語】

NGS を用いて成因不明の小児急性肝不全、重症急性肝炎の病原ウイルス検索を行った。NGS による網羅的なウイルス検索は有用であると考えられるが、検出されたウイルスと疾患との関連についてはさらなる検討を要する。