

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 幾瀬 樹  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1128 号  
学位授与の日付 令和5年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Development of Novel PCR Assays for Improved Detection of Enterovirus D68.  
(エンテロウイルス D68 のよりよい検出のための新規 PCR アッセイの開発)

論文審査委員 主査 教授 菊地 利明  
副査 教授 藤井 雅寛  
副査 准教授 茂呂 寛

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

エンテロウイルス D68 (EV-D68) は小児の喘息様呼吸器疾患や急性弛緩性脊髄炎の原因ウイルスである。EV-D68 は 2014 年に欧米で流行した以降、周期的に世界中で流行を起こしている。遺伝子変異により、近年流行している EV-D68 については従来のゴールドスタンダードの PCR アッセイでは検出できない事例が散見され、変異に合わせた新規 PCR アッセイを開発した。

#### 方法

##### 1) 新規アッセイの設計

2014 年から 2020 年に流行を起こし、GenBank に登録されている EV-D68 の 81 のシーケンスを使用し、従来のゴールドスタンダードの方法であるワシントン大学が開発した Real-time PCR アッセイ (WashU) のプライマーおよびプローブと米国疾病予防管理センターが開発したシーケンスのための Semi-nested PCR 法 (CODEHOP) の 2nd PCR のプライマーが接合する塩基配列のミスマッチを同定した。同領域 (いずれも VP1 領域) のミスマッチに適合した Real-time PCR アッセイ (NU) のプライマー・プローブと Semi-nested PCR 法の 2nd PCR のプライマー (N-Set) を作成した。

##### 2) 検体

2018 年に新潟県内で流行した EV-D68 陽性呼吸器検体 22 検体、2014~2019 年に呼吸器感染症や中枢神経感染症のため当研究室で収集した呼吸器、血清、髄液検体で EV-D68 以外のウイルスが同定されている検体 135 検体、2015 年と 2018 年の EV-D68 流行期に急性弛緩性脊髄炎 (AFM) を生じた 11 例の患者の咽頭、血清、髄液、便検体 (32 検体) を使用し、NU と WashU、N-Set を使って PCR を実施し、陽性率や Ct 値を比較した。

##### 3) In-silico 解析

GenBank に登録されている EV-D68 のシーケンス (540 例) と非 EV-D68 の EV のシーケンス (3683 例) を使用し、NU および N-Set のプライマー、プローブの塩基配列のミスマッチの有無から各アッセイの in-silico 解析をした。

##### 4) 検出限界

NU および N-Set の 95%検出限界を求めため、各濃度に希釈した EV-D68 を 10 検体ずつ PCR し、その結果から Probit 回帰分析を実施した。

#### 結果

NU で EV-D68 22 検体すべて陽性で、非 EV-D68 135 検体はすべて陰性であった。WashU では EV-D68 は 10 検体 (45%) のみ陽性であった。どちらも陽性であった 10 検体の Ct 値を比較したところ、NU の方が優位に Ct 値が低かった ( $P = 0.005$ )。AFM 症例については、11 症例中、3 症例の 5 検体で NU 陽性であったが、WashU では 1 検体のみ陽性だった。N-Set については、N-Set のみを使った semi-nested しない 1 回の PCR でも 91% (20/22) が陽性で、陰性だった 2 検体がウイルス量の少ない検体であった。

In-silico 解析では、WashU よりも NU の方がミスマッチが少なく、特に 2014 年以降に流行した EV-D68 では WashU でミスマッチが多く、NU で少ない結果となった。

95%検出限界については、NU で 1.64 copies/reaction、N-Set で 1.92 copies/reaction であった。

#### 考察

NU および N-Set はいずれも高い感度特異度を示し、近年流行している EV-D68 に適合したアッセイで、従来では検出できなかった検体からも EV-D68 が検出できるようになり、大きく感度が上昇した。

EV-D68 に関連した AFM は検体から EV-D68 が検出される症例の他に、検体から EV-D68 が検出されないものの、EV-D68 の増加に伴って AFM が増加している疫学的な状況から EV-D68 の関連が疑われる AFM 症例もある。AFM 症例ではもともと各検体で検出される EV-D68 のウイルス量が少なく、検出が難しい以外に、近年流行している EV-D68 と従来の方法との間でプライマーやプローブと結合領域とのミスマッチにより、偽陰性を生じている可能性も否定できない。今回の研究でも、従来の方法では検出できなかった検体から EV-D68 を検出できており、EV-D68 の疫学調査や AFM 症例の精査には感度の高い検査を用いることが重要である。

EV-D68 について、VP1 領域の変異が多く、今後もアッセイの感度が低下し、変異に合わせたアッセイを設計する必要がある。NU で増幅する領域は N-Set で増幅する領域に含まれている。そのため、今後 NU 陽性検体のシーケンスを N-Set で確認することで変異の有無をモニタリングすることができる。

ミスマッチによる感度低下に対応した、EV-D68 に特異的なアッセイを開発し、感度が大きく回復した。従来の方法で EV-D68 が陰性だった検体でも、新規アッセイにより EV-D68 が陽性になる可能性がある。今後の EV-D68 の流行に備え、EV-D68 に特異的なアッセイは継続的にモニタリングされる必要がある。

#### 審査結果の要旨

エンテロウイルス D68 (EV-D68) は小児の喘息様呼吸器疾患や急性弛緩性脊髄炎の原因ウイルスである。近年流行している EV-D68 の遺伝子変異に合わせた新規 PCR アッセイを開発した。検体は、2018 年に新潟県内で流行した EV-D68 陽性検体 22 検体、EV-D68 以外のウイルスが同定されている検体 135 検体、過去に急性弛緩性脊髄炎を生じた 11 例の患者検体を使用した。今回開発した PCR アッセイと従来の PCR アッセイを実施し、陽性率を比較した。その結果、今回開発した PCR アッセイでは、EV-D68 22 検体すべて陽性で、非 EV-D68 135 検体はすべて陰性であった。急性弛緩性脊髄炎症例では、11 症例中、今回開発した PCR アッセイでは 3 症例の 5 検体で陽性であったが、従来の PCR アッセイでは 1 検体のみ陽性だった。今回開発した PCR アッセイは高い感度特異度を示し、従来の方法で EV-D68 が陰性だった検体でも、新規アッセイにより EV-D68 が陽性になる可能性を示した点において、本論文は博士論文としての価値に値する。