

の蘇生を要する疾患と病態(成人) 急性  
中枢神経系感染症 細菌性髄膜炎 日本神  
経救急学会雑誌 27: 43-46, 2015.

亀井 聡:【神経蘇生ガイドライン】神経系  
の蘇生を要する疾患と病態(成人) 急性  
中枢神経系感染症 結核性髄膜炎 日本神  
経救急学会雑誌 27: 46-49, 2015.

亀井 聡:【神経蘇生ガイドライン】神経系  
の蘇生を要する疾患と病態(成人) 急性  
中枢神経系感染症 抗 NMDA 受容体脳炎  
日本神経救急学会雑誌 27: 49-54, 2015.

亀井 聡:【細菌性髄膜炎の臨床と最新の治  
療】 院内感染・施設内感染 Clinical  
Neuroscience 11: 1225-1228, 2015.

亀井 聡:【細菌性髄膜炎の臨床と最新の治  
療】 疫学 Clinical Neuroscience 11:  
1216-1219, 2015.

亀井 聡, 三木 健司, 荒木 俊彦, 高橋 育  
子, 佐々木 秀直, 中嶋 秀人, 松木 充, 高  
橋 輝行, 田村 正人, 石川 晴美, 日本神  
経治療学会治療指針作成委員会: 標準的神  
経治療 結核性髄膜炎 神経治療学 32:  
511-532, 2015.

## 2. 学会発表

塩原 恵慈, 原 誠, 秋本 高義, 南 正之,  
石川 晴美, 野田 博子, 増田 しのぶ, 亀  
井 聡: 中枢神経に局限した PR3-ANCA 陽性  
血管炎の 20 歳女性例 第 212 回日本神経  
学会関東甲信越地区地方会, 東京, 2015. 3

秋本 高義, 石川 晴美, 森田 昭彦, 原 誠,  
齋藤 磨理, 二宮 智子, 高橋 恵子, 南 正  
之, 荒木 俊彦, 三木 健司, 古市 眞, 亀  
井 聡: 当院および関連施設における結核  
性髄膜炎 28 例の検討 第 56 回日本神経学  
会総会, 新潟, 2015. 5

秋本 高義, 塩原 恵慈, 原 誠, 森田 昭彦,  
石川 晴美, 亀井 聡, 楠 進:  
Cytomegalovirus 感染が明らかではなかつ  
た抗 GM2 IgM 抗体陽性 Facial diplegia and  
paresthesia の 1 例 第 213 回日本神経学  
会関東甲信越地区地方会, 東京, 2015. 6

稲垣 喜則, 蓮見 禎行, 佐野 太一, 大木

隆史, 高橋 恵子, 小川 克彦, 鈴木 裕, 相  
馬 正義, 亀井 聡: 迅速な治療で良好な転  
帰を得た超高齢者脳炎の 1 例 第 616 回日  
本内科学会関東地方会, 東京, 2015. 7

亀井 聡: 細菌性髄膜炎の診断と治療 ガ  
イドラインから 第 33 回日本神経治療学  
会総会, 名古屋, 2015. 11

高橋 輝行, 田村 正人, 三木 健司, 亀井  
聡, 高須 俊明: Crowned Dens  
Syndrome (CDS) 35 症例の臨床的解析 第  
33 回日本神経治療学会総会, 名古屋,  
2015. 11

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当事項無し。
2. 実用新案登録  
該当事項無し。
3. その他  
該当事項無し。

日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発

「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」

研究分担者	高崎智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部	室長
研究協力者	田島 茂	国立感染症研究所	ウイルス第一部	主任研究官
	池田真紀子	国立感染症研究所	ウイルス第一部	非常勤職員

**研究要旨** 近年、日本国内で分離される日本脳炎ウイルス（JEV）は遺伝子型Ⅰ型株である。現行ワクチン株は遺伝子型Ⅲ型株であるが、Ⅰ型に対して有効であることは確認されている。しかし、Ⅴ型ウイルスに対する有効性はやや劣ることが報告されている。このⅤ型ウイルスが2009年に中国で、2010年に韓国で検出同定され、韓国では2012年から2014年にかけて毎年蚊から検出されていることが、The 6th Informal Consultation on WHO Global & Regional Specialized JE Laboratories in the Western Pacific Region の会議において情報を得た。今後日本脳炎ウイルスⅤ型株の国内への侵入を注意深く監視していくとともに、蚊での媒介能力など詳細な性状解析が必要である。そのため、日本脳炎ウイルスⅤ型検出法を地方衛生研究所に提示しⅤ型ウイルス検出サーベイランスに協力を求めた。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の感染が原因の中枢神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は20～40%に達する重篤な感染症である。JEVは水田等に発生するコガタアカイエカなど、イエカにより媒介され、ブタや水鳥などのウイルス増殖動物とともに感染環を形成する。一方ヒトは終宿主に当たる。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は1990年以降10例以下で推移している。しかしWHOの推計では、世界で年間約4万3千人が日本

脳炎を発症し、うち約1万1千人が死亡、約9千人が重篤な超える後遺症に苦しんでいるとされる。このように世界的にみれば日本脳炎は決して過去の疾患ではなく、現在も警戒すべき感染症である。また日本国内でもJEVは現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEVには5つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは90年代初頭を境にⅢ型からⅠ型へと変化した。同様の変化は日本だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっていた。さらに近年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の変化が認められている。現在流通

している日本脳炎ワクチンは開発された50年以上前よりⅢ型のJEVより製造されて今日に至っている。近年、中国と韓国で相次いで遺伝子型V型の日本脳炎ウイルスが蚊から検出、同定された。V型ウイルスは今回の中国、韓国のもを含め3株しか分離されていない。わが国でV型ウイルスへの遺伝子型シフトが起こる可能性を中国CDC、韓国CDCと検討、意見交換した。

また、夏季の原因不明の急性脳炎に関して抗日本脳炎IgM抗体検査を実施した。

## B. 研究方法

1) 我々が開発した日本脳炎ウイルスV型用TaqManリアルタイムPCR法、V型ウイルスに対する日本脳炎不活化ワクチンの有効性の検討結果を提示することで、V型ウイルスのサーベイランスの重要性を認識し、中国CDC、韓国CDCともにサーベイランスを開始し、情報交換・収集した。

### 2) 抗日本脳炎ウイルスIgM抗体検査

平成27年度は26症例に関して血清中、髄液中の抗日本脳炎IgM抗体検査を実施した。ELISAの方法は以下の如くである。

抗ヒトIgM抗体単クローン抗体を96穴ELISAプレートにコーティングし、ブロッキングの上、100倍希釈した血清を検査検体とし、1時間室温で反応させた後、プレート洗浄後、そこに細胞培養不活化日本脳炎ウイルス抗原を加え、2時間室温で反応させる。プレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗フラビウイルスIgG抗体を30分間室温で反応させプレートを洗浄した後、TMB(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)ペルオキシダ

ーゼ気質液を加え遮光下に8分間反応させ、1規定硫酸を等量加えて反応を停止し、ELISAリーダーにより測定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認済である(H25/9/25 No. 445)。試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者IDがつけられた状態で感染研に送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する(連結可能匿名化)。したがって、検査実施者が試料提供者個人を特定することはできない。

## C. 研究結果

中国では2014年に蚊から日脳ウイルスV型を1株蚊から分離した。また韓国では2012年～2014年に、蚊からのプールから計8プールから検出しているという重要な知見が報告された(図)。

抗日本脳炎ウイルスIgM抗体を検査した結果、26症例いずれも陰性であった。

## D. 考察

日本国内に蔓延しているJEVの主要型は現在I型と考えられる。しかし一方で使用されている日本脳炎ワクチンはIII型から製造されたものである。しかし近年、中国および韓国で立て続けに新たな遺伝子型V型のウイルスが同定された。現行日脳ワクチンはV型ウイルスに対して効果が低いという報告がある。V型株は1952年に初めて分離されたのだが、V型による流行はこの一度きりでその後約60年間報告がなかった。最近、韓国でV型株への遺伝子型シフトが発生している可能性を考慮して、日本でも日脳ウイルスV

型株に関するサーベイランスを開始する必要がある。今年度は日本脳炎 IgM 抗体陽性の急性脳炎症例はなかったが、今後とも隠れた日本脳炎症例の掘り起こしも重要である。

#### E. 結論

近年中国と韓国で相次いで分離同定された遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスに対する現行の日本脳炎ワクチンの中和効果は、遺伝子型 I 型や III 型株に比べて弱いという報告がある。国内で V 型株が確認されたとの報告はないが、日本脳炎ウ

イルス V 型検出法を地方衛生研究所に提示し V 型ウイルス検出サーベイランスに協力を求めた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

- #### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- なし

### 不明脳炎症例におけるウイルスの網羅的検索

研究分担者	片野晴隆	国立感染症研究所	感染病理部	室長
研究協力者	福本 瞳	国立感染症研究所	感染病理部	
	保科しほ	国立感染症研究所	感染病理部	
	高橋健太	国立感染症研究所	感染病理部	
	峰宗太郎	国立感染症研究所	感染病理部	
	長谷川秀樹	国立感染症研究所	感染病理部	部長
	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター長	
	関塚剛史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター第三室	
	高崎智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部	室長

**研究要旨** 原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿の検体からウイルスの網羅的検索を行った。今年度に検討を行った症例は平成 28 年 2 月末までで 43 例であり、全例につき、multivirus real-time PCR を施行した。9 例から、病態と何らかの関連があると考えられる病原体が検出された。内訳はコクサッキーウイルス A6、ヒトヘルペスウイルス 6、パレコウイルス 3、サイトメガロウイルス、パルボウイルス B19 などであった。このほかに multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった 1 例について、次世代シーケンサーによりヒトアストロウイルス MLB 株が検出されている。これらの結果は本ウイルス検索の有用性を示すとともに、日本の脳炎症例における微生物学的なエビデンスを提供するものと期待される。

#### A. 研究目的

急性脳炎（ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く）は、年間、数百の症例が存在し、少なくとも 3 割程度は、原因不明とされている。本研究班では、原因不明の急性脳炎・脳症例から検体を収集し、日本脳炎の紛れ込みがどの程度あるのかを鑑別すると共に、網羅的な病原体検索を行い、脳炎・脳症、急性散在性脳脊髄炎（acute disseminated encephalo myelitis; ADEM）の実態・病因解明に資するデータを採取することを目的とする。本分担研究では原因不明の脳炎症例のサンプル（髄液、血清、咽頭ぬぐい液、便、尿）から、原因ウイルスの同定を行う目的で、real-time PCR を応用したウイルスの網羅的検出法を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) 臨床検体

検体収集の方法と、感染研における検査の役割分担は研究代表者の報告書を参照されたい。感染研に到着した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）は、原則として日本脳炎ウイルス（研究分担者：高崎智彦）→real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法（研究分担者：片野晴隆）→次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査（研究分担者：黒田誠）の順に実施するが、ウイルスの網羅的検索で原因が判明したものや、検体内の核酸が分解していることが判明した症例については次世代シーケンサーによる検索は行っていない。また、蚊の活動性がない冬期に発症した症例については日本脳炎の検索は行わない。

##### 2) 核酸抽出

髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便のそれぞれ

れの検体から QIAamp MinElute Virus Spin Kit (キアゲン社) を用い DNA と RNA を混和した形で抽出した。後の次世代シーケンサーの検索に適するよう、carrier RNA は使用していない。

### 3) Real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法

本研究室で独自に開発した、ヒトに病原性を持つと考えられる約 170 種類のウイルスを 96 穴プレート上で一度に検出できる real-time (RT-)PCR システムにより RNA および DNA サンプルからウイルスの検出を試みた (Katano H et al. J Med Virol 2011) (表 1)。定量的 PCR は MX3005P、MX-3000P (アジレント社)、または ABI 7500、7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認済である (H25/9/25 No. 445)。試料提供者の個人情報は、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられた状態で感染研に送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する (連結可能匿名化)。したがって、検査実施者が試料提供者個人を特定することはできない。

### C. 研究結果

平成 27 年 4 月から平成 28 年 2 月までに 43 件の解析依頼があり、当部ではこのうちの 9 例で multivirus real-time PCR により原因ウイルスを同定した (表 2)。

検出されたウイルスの内訳はパレコウイルス 3 型が 2 例、HHV-6B が 2 例、パルボウイルス B19 が 2 例、コクサッキーウイルス A6 と A10 が 1 例ずつ、さらに CMV とライノウイルスが検出された例が 1 例である。これとは別に multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった 1 例から、次世代シーケンサーによりヒトアストロウイルスの新しい株である MLB 株が検出されている。

コクサッキーウイルスが検出された例ではいずれも、pan-enterovirus のプローブ、プライマーセットでウイルスが検出され、その後、VP4 領域を広く増幅するプライマーを用い、シーケンスを行ったうえで、型判別を行った。コクサッキーウイルス A6 が検出された症例では髄液からもウイルスが検出され、脳炎、脳症との関連が示唆されたが、コクサッキーウイルス A10 が検出され

た症例では、ウイルスは咽頭ぬぐい液のみから検出され、髄液からは検出されなかった。

パレコウイルス 3 型が検出された 2 例はいずれも臨床的にパレコウイルス感染が疑われていたものの、依頼施設、あるいは、担当する地方衛生研究所では検索ができず、当班に検索依頼された症例であった。パレコウイルス 3 が陽性であった 2 症例はいずれも髄液からウイルスが検出されており、脳炎、脳症との関連が示唆される。また、1 例では全血で比較的高いコピー数が検出されている。

HHV-6B が検出された 2 例はいずれも 1 歳の小児であり、1 例では髄液からも HHV-6B が検出された。

ウイルスが検出されなかった症例は多く、43 症例中 7 例 (16%) では RNA のヒト内因性コントロールも検出されない症例であった。

2015 年 9 月頃から、急性弛緩性麻痺を伴う脳炎、脳症患者が複数例、当班に報告されたことから、これらの患者検体も検索を行っている。脳炎班の症例として検討した検体は少なく、最終的な結論を得ていないが、脳炎を伴わない症例を含めた急性弛緩性麻痺の患者検体が収集され、現在、検体の整理が行われている。今後、症例を選んで検索する予定である。

### D. 考察

本年度は平成 28 年 2 月末までに 43 件の不明脳炎の検体を検索し、これまでの症例を合わせると検索した症例は 95 件に達する。本年度は 43 件中 9 例で multivirus real-time PCR での検索が原因ウイルスの同定に貢献したことから、同定率は約 21% である。昨年 11% よりは上昇しており、一見、検出率が向上しているように見えるが、送付された検体がどのような検査を経たものか、適切な時期に採取された検体であるか、検体の保管、輸送状況、などの複合的な要因により検出率は変動することから、単純な比較は困難である。本年度に検出されたウイルスのうち、HHV-6B、パレコウイルス 3 が検出された患者では、それぞれのウイルスに定型的な臨床経過が報告されており、何らかの事情で当該ウイルスの検査ができなかった、あるいは、検査感度の問題などがあった症例であることが推察される。

本研究により、日本における不明脳炎の原因となりうる微生物について、いくつかの種類が同定されたが、原因が明らかにされた症例はごく一部であり、脳炎の原因となる病原微生物は多種多様である。また病原体が関与しない脳炎、脳症も多く存在し、各医療施設や地方衛生研究所でその検

査を対応するには限界がある。将来的には、全国どこからでも、脳炎に關与するウイルス、細菌などの病原体を迅速に検索できる検査体制の構築が切に望まれるところであり、本研究班で得られたデータが、検査体制の構築に向けて、微生物学的なエビデンスを提供するばかりでなく、脳炎検体の取り扱い、輸送法や必要な検査項目について、参考となるものと期待される。

#### E. 結 論

原因不明の急性脳炎・脳症の症例につき、その原因を究明すべく、ウイルスの網羅的検索を行った。当研究班で収集した 43 例の不明脳炎の検体のうち、9 例から原因ウイルスを同定した。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

- (1) Yamamoto S, Takahashi S, Tanaka R, Okayama A, Araki A, Katano H, Tanaka-Taya K, Azuma H: Human herpesvirus-6

infection-associated acute encephalopathy without skin rash. Brain Dev 2015. 37:829-832.

- (2) Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Saeki H, Katano H: Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. Int J Clin Exp Pathol 2015. 8:15479-15488.

##### 2) 学会発表

- (1) 高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹. 不明脳炎症例の病理組織検体における原因ウイルスの網羅的検索. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日 名古屋国際会議場

- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
該当なし

表1 Multivirus real-time PCR で検出可能なウイルスの一覧

DNA viruses	
Polyomavirus: JC virus, BK virus, KI virus, WU virus, Merkel cell polyomavirus, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus, Human polyomavirus6, 7, 9, 10, 11, 12	
Papillomaviruses: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73	
Parvoviruses: adeno-associated virus 1, 2, 3 and 5; parvovirus B19; human bocavirus; adenovirus A-F	
Herpes viruses: HHV 1-8, B virus	
Poxviruses: variola virus, monkey pox virus, molluscum contagiosum virus	
Anellovirus: TTV	
Hepadnavirus: Hepatitis B virus	
RNA viruses	
Filoviruses: Ebola virus, Marburg virus	
Bunyaviruses: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, hemorrhagic fever with renal syndrome virus (Hantaan, Dobra, Puumala, and Seoul), Rift valley fever virus, sin nombre virus	
Arenaviruses: Lassa virus, Junin, Guanarito, Machupo and Sabia viruses	
Togaviruses: equine encephalitis virus (Venezuelan, Eastern, and Western), Sindbis virus, Mayaro virus, Getah virus, Chikungunya virus, rubella virus	
Enteroviruses: enterovirus 68 and 71; poliovirus 1-3; coxsackievirus A2-A6, A8-A10, A16, A21, A24, B1-B6; echovirus 5, 6, 7, 9, 11, 13-18, 25, 30; parechovirus 1 and 3; rhinovirus A and B; rotavirus; reovirus 1-4; Melaka virus; Colorado tick borne fever virus	
Flaviviruses: dengue virus 1 and 2; Japanese encephalitis virus; Murray Valley encephalitis virus; St. Louis encephalitis virus; West Nile virus; Tick-borne encephalitis virus; yellow fever virus	
Orthomyxoviruses: influenza virus A-C, H5N1, H7N9 and H1N1	
Paramyxoviruses: parainfluenza virus 1-3; Hendra virus; mumps virus; measles virus; Sendai virus; RS virus A and B; metapneumovirus; Nipah virus	
Rabdoviruses: rabies virus, lyssavirus 5 and 6, Chandipura virus, Duvenhage virus	
Coronaviruses: coronavirus OC43, 229E and NL63; SARS virus, MERS coronavirus	
Caliciviruses: sapovirus, Norwalk-like virus 1 and 2	
Hepatitis viruses: hepatitis A virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, hepatitis E virus, GB virus	
Retroviruses: human immunodeficiency virus 1, human T cell leukemia virus 1 and 2	
Others: astrovirus, Simian endogenous retrovirus	

表2 本研究班で収集された脳炎サンプルの解析結果(有意なウイルスが検出されたもののみ)

患者 No	検体の種類	臨床的事項			結果		
		性別	診断時年齢	感染研受付日	日本脳炎	Multivirus PCR	次世代シーケンサー
P54	5点	男	4歳	2015/6/5		human bocavirus 20copy/ $\mu$ l	Human astrovirus MLB-1 69本
P64	5点	女	0歳	2015/8/28	陰性	Parechovirus 3 (209 copy per	未検



						uL)	
P66	5点	女	0歳	2015/9/8	陰性	Parvovirus B19 (220 copy per uL)	未検
P69	5点	男	7歳	2015/10/21	陰性	Cox A10 (6.15.E+06)	未検
P74	髄液、血清、尿	男	8歳	2015/9/29	陰性	Parvovirus B19 (48198 copy per uL)	未検
P76	血清、便	男	1歳	2015/10/2	陰性	Cox A6 (7.77x10E4)	未検
P81	5点	男	0歳	2015/10/9	陰性	Parechovirus 3 (177copy)	未検
P84	4点	女	1歳	2015/12/15		HHV6B 812.5copy/ $\mu$ L	未検
93	5点	男	1歳	2016/2/9		HHV-6B 8.24copy/ $\mu$ L	未検
96	5点	男	0歳	2016/2/19		CMV, Rhinovirus	未検

他に NGS で微生物が検出された症例あり。ただし、病因との関連が不明であるため本表には未記載。

不明脳炎症例における網羅配列解読・病原体データベースの作成

研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室
	高崎智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部	室長
	片野晴隆	国立感染症研究所	感染病理部	室長

**研究要旨** 全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEMの実態・病因解明に資することを目的とする。分担研究者は、急性脳炎・脳症の原因究明を目的とした次世代シーケンサー(next-generation sequencing: NGS)による網羅的病原体検索を担当した。

本年度は23名の不明脳炎・脳症患者について、網羅的病原体検索が必要と判断された検体の検査を行った(P45-P89, 45症例のうち7症例はNGS検査前に当該病原体が確定、15症例はRNA分解等で不適当な臨床検体であったためNGS検査未実施)。それぞれの患者髄液からHuman astrovirus MLB-1, HHV-3, 細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液からHuman parainfluenzavirus 4, Human parechovirus 6, Saffold virus 2を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。血液関連検体(血清、血漿、全血)から、主にTorque teno virus(亜種含む)を検出する症例が多く、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症ともなって再活性化している可能性が示唆された。Enterovirus等を起因病原体として疑う場合、便検体の検査は有効である。

個別PCR(対象配列が短く限定的)で検出できない症例においても、NGSは病原体ゲノムDNAの欠片でも検出でき、感度もおよそ10倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑いが濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の高度な核酸検査法であって確定検査診断ではないため、抗体検査法によるIgM陽性を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。

## A. 研究目的

本研究班では、原因不明の急性脳炎・脳症、予防接種後急性脳炎・脳症、ADEM 症例から症状・所見とともに臨床検体を収集し、日本脳炎の鑑別を実施すると共に、急性脳炎・脳症の原因究明を目的として網羅的な病原体検索を行い、脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。

全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 臨床検体の収集と微生物検査の流れ役割分担

研究代表者の多屋と研究分担者の倉根は感染研の研究分担者高崎、片野、黒田との連携を密にして、原因究明に適切な臨床検体が感染研に届けられるよう調整し、医療機関と感染研、感染研各部を結ぶ情報交換システムを確立し、医療機関と感染研間で迅速な情報共有が可能となるようシステムを構築する。

保健所に報告された急性脳炎、厚生労働省に報告された脳炎・脳症、ADEM の患者の症状・所見に基づき統一的な方法で収集し解析すると共に、適切な臨床検体（血液（急性期と回復期のペア）、髄液、鼻咽頭ぬぐい液、便、尿）が感染研に届けられるよう調整し、また、日本脳炎として報告された患者の予後（転帰）については、厚生労働省と連携して調査を実施する。

収集した検体（髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便）から微生物検査を行う。検査の流れは、日本脳炎ウイルス（研究分担者：高崎智彦）→ 包括的ウイルス PCR 検査（研究分担者：片野晴隆）→ 次世代シーケンサーNGS による網羅的病原体検査（研究分担者：黒田誠）の順に遂行し、不明症例を積極的に解明していく。具体的には、高

崎は、日本脳炎特異的 IgM 抗体補足 ELISA 法を用いて、髄液及び血清中の抗日本脳炎 IgM 抗体を測定することで日本脳炎の鑑別を行う。日本脳炎が否定的であるならば、感染研の片野は real-time PCR 法を用いて、網羅的なウイルス検索を実施する。それでも病原体が判明しなかった場合、黒田は次世代シーケンサーにより大量の核酸配列を網羅的に解読し、従来法で特定できない易変異性 RNA ウイルスや未知のウイルスの検索を行う（図 1）。感染研・病原体ゲノム解析研究センターにベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq（本研究課題でリース賃借）と情報解析サーバーが整備されている。

3年間で症例を蓄積し、結果をまとめ、長期的な視野に立ってこれらの疾患の原因究明に資する病原体検索を全国的な規模で実施継続していく体制の構築、継続について検討する。

### 2) 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検索

研究分担者：片野博士から臨床検体由来の精製 DNA/RNA を引き継ぎ、Multivirus-PCR 法でも検出できなかった病原体の検出を遂行する（図 2）。

#### • DNA-seq (DNA の網羅的解読)

片野博士から提供された DNA 1 ng をもとに、Illumina NEXTERA XT DNA sample Prep kit にて網羅配列解読用の DNA ライブラリーを作成した。

#### • RNA-seq (RNA の網羅的解読)

片野博士から提供された RNA ~10 ng をもとに ScriptSeq V2 RNA-seq library preparation kit にて網羅配列解読用のライブラリーを作成した。

#### • 配列解読

調整したライブラリーを ベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq にて 150 mer シングルエンド法で解読した。検体あたり、およそ~300 万本の解読リードを得られるよう調整した。

#### • 配列解析

解読リードには患者由来のヒト配列が含まれており、倫理規定上、削除して以降の解析から除外する必要がある。Bwasw リードマッピング法にてヒトゲノム配列 (hs\_ref\_GRCh37.p2) にマッピングし、マッピングされなかったリードを病原体候補とした。

megablast 法にて NCBI nt データベースに配列照合し、MEGAN 5 にて各リードを生物種ごとに分類した。病因論が明確なウイルス種を優先的に検索し、ウイルスが検出されなかった場合には細菌性の症例であったかどうか検討した。CLC Genome workbench を用いて De novo assembly を行った。

- 分子系統解析

MEGA6.0 を用いて 1,000 回ブートストラップを加えた最尤法による分子系統解析を行った。

(倫理面への配慮)

試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられる。医療機関で急性脳炎・脳症、ADEM 等、本研究班で対象となる患者から検体を採取する場合は、各医療機関の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。緊急の対応が必要であったり、各医療機関の倫理委員会で検討できない場合は、感染研の倫理委員会で包括的に審査されるものとする。

連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々の ID とし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこの ID を運用して行う。

申請者には ID が付けられた検体と添付の情報が送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する(連結可能匿名化)。したがって、申請者において個人を特定することはできないようにする。本計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認を受けた (H25/9/25 No. 445)。

## C. 研究結果

### 1) 本研究課題で収集した急性脳炎・脳症検体の病原体検索

基本、日本脳炎ウイルスが陰性で、Multivirus-real-time PCR でも不明症例になった検体のみ網羅的病原体検査法を執り行った (表 1)。

髄液から検出された病原体が脳炎の主たる要

因と考えられる。本年度の髄液 NGS 検査結果を表 1 にまとめた。患者 P54 の髄液から Human astrovirus (HAstV) MLB-1 が検出され、全ての臨床検体で HAstV が陽性であったことから本症例は HAstV MLB-1 による脳炎である可能性が示唆された (表 2)。便検体から得られた RNA-seq リードを用いて de novo assembly を行い、6,181 nt の HAstV 全長ゲノム配列を得て「HAstV MLB-1 NAGAN01545」と命名した (GenBank ID: LC064152 として登録)。NAGAN01545 配列は全ゲノム配列長に渡って中国のヒト糞便から分離された SY071 (GenBank ID: JQ086552) と 99%以上の相同性を有し、近隣国との類似性が見られた。公開されている HAstV のゲノム情報が乏しいため、分子系統解析で分類に使用される RNA-dependent RNA polymerase 遺伝子の部分配列を抽出し (LC064152.1|Human\_astrovirus\_MLB1\_NAGAN01545, 3173-3495: 323 nt)、1,000 回ブートストラップを加えた最尤法にて分子系統樹を作成し評価した (図 3)。部分配列での分子系統解析から、2013 年 5 月に日本で分離された HAstV MLB-1 JP11710 と近縁であることが判明した。繰り返す下痢症状の激しい患者でもあったことから、腸管症状から起因する脳炎へと進展したものと推察された。

他それぞれの患者髄液から、HHV-3 を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液から Human parechovirus 6, Saffold virus 2 を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。

## D/E. 考 察・結 論

本年度は 23 名の不明脳炎患者のうち、髄液からそれぞれ異なる病原体配列を検出することができた。個別 PCR (対象配列が短く限定的) で検出できない症例においても、NGS は病原体ゲノム DNA の欠片でも検出でき、感度もおよそ 10 倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑い

が濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の単なる高度な核酸検査法であって確定検査ではないため、抗体検査法による IgM 陽転を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。

不明脳炎・脳症の解明には、臨床情報・検査法を含む総合的な基盤データベースの構築が不可欠であり、少しでも不明症例を効率良く検査・解析することが先決である。

F. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

## 網羅検査法としてのメタゲノム解析

～新興・再興感染症対策～  
従来の検査法で特定できない病原体を想定

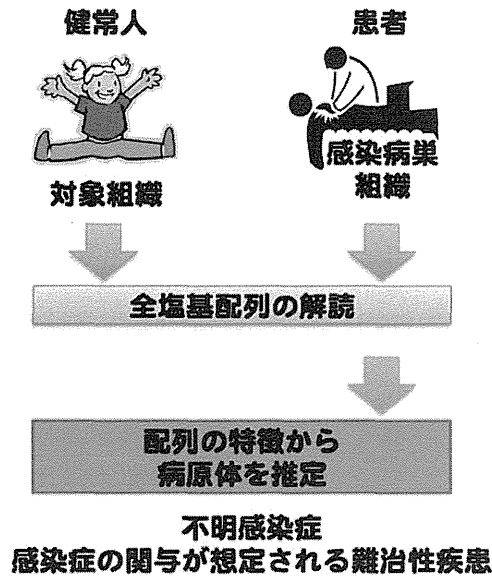


図1 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査法の基本的概念図  
患者由来検体から検出される特徴的な配列を用い、総合的に病原体候補を特定していく。

## Detection of potential pathogens by deep sequencing

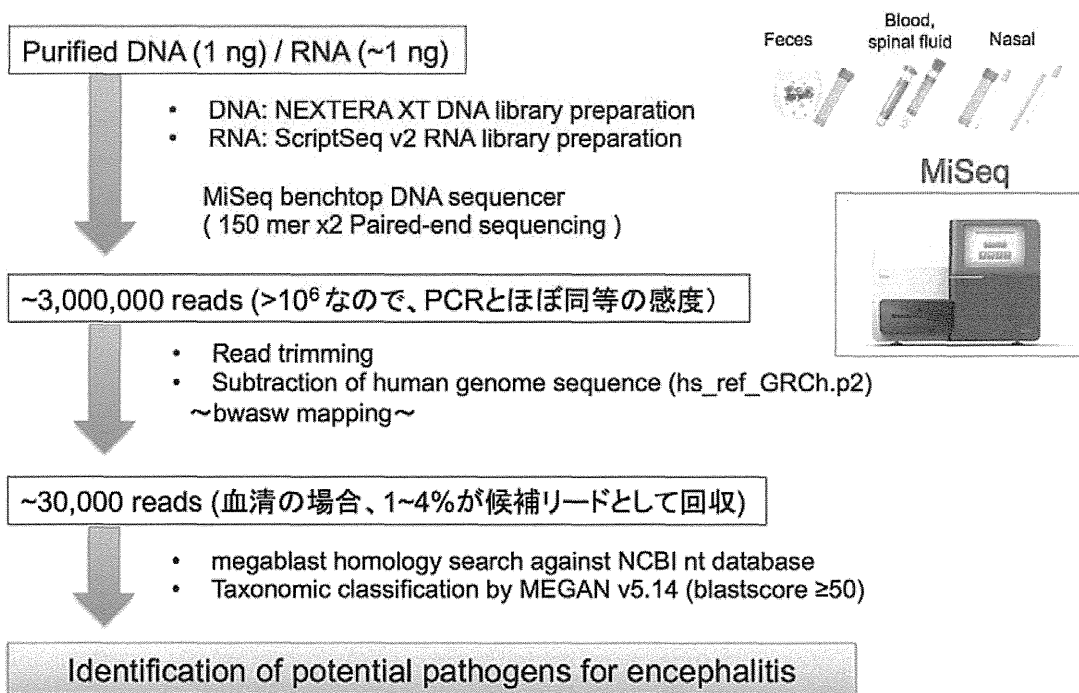


図2 次世代シーケンサーによる網羅的病原体検査法の流れ図

表1 NGS検査にて脳炎・脳症の髄液から検出された候補病原体の一覧。

患者No	検体No	検体の種類	診断時年齢	診断名	発病日(脳炎脳症)	検体採取日	次世代シーケンサー	NGS (DNA-seq, RNA-seq)
P49東京7F	P49-1	髄液	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/18	Klbbiella 等腸内細菌科が少し	
	P49-2	血清	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/19	Human adenovirus 4 が1本	
	P49-3	便	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/27	Escherichia, Salmonella 等腸内細菌科が多め	
	P49-4	尿	7歳	急性脳炎	2015/3/16	2015/3/28	Klbbiella 等腸内細菌科が多数	
P52兵庫3M	P52-1	髄液	3歳	急性脳症	2015/3/3	2015/3/4	特筆すべき病原体無し	
	P52-2	血清	3歳	急性脳症	2015/3/3	2015/3/4	特筆すべき病原体無し	
P54長野4M	P54-1	髄液	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/30	Human Astrovirus MLB-1 81本	
	P54-2	血清	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/30	Human astrovirus MLB-1 69本	
	P54-3	咽頭ぬぐい液	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31	Human astrovirus MLB-1 177本, Human bocavirus 1本	
	P54-4	便	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31	Human astrovirus MLB-1 147,610本(2.3%)	
	P54-5	尿	4歳9か月	急性脳症	2015/5/30	2015/5/31	Human astrovirus MLB-1 321本	
P55愛知9F	P55-1	血清①	9歳	急性脳症	2015/5/25	2015/5/29	特筆すべき病原体無し	
	P55-2	血清②	9歳	急性脳症	2015/5/25	2015/6/8	特筆すべき病原体無し	
	P55-3	気管内吸引液	9歳	急性脳症	2015/5/25	2015/6/9	HPV type 5b 1本です。	
	P55-4	便	9歳	急性脳症	2015/5/25	2015/6/4	Bifidobacterium 多数(ヨーグルト等整腸剤の影響)、Gokushovirinae 21本	
	P55-5	尿	9歳	急性脳症	2015/5/25	2015/5/25	特筆すべき病原体無し	
P57長野0M	P57-1	髄液	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/7	特筆すべき病原体無し	
	P57-2	血清	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/7	特筆すべき病原体無し	
	P57-3	咽頭ぬぐい液	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/8	偏性嫌気性菌のPrevotella, Veillonella が多数	
	P57-4	便	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/10	特筆すべき病原体無し	
	P57-5	尿	0歳7か月	急性脳症(HSES疑い)	2015/6/7	2015/6/8	特筆すべき病原体無し	
P58奈良16F	P58-1	髄液	16歳	無菌性髄膜炎	2015/6/11	2015/6/15	特筆すべき病原体無し	
	P58-2	血清①	16歳	無菌性髄膜炎	2015/6/11	2015/6/15	特筆すべき病原体無し	
	P58-3	咽頭ぬぐい液	16歳	無菌性髄膜炎	2015/6/11	2015/6/15	特筆すべき病原体無し	
P59兵庫2F	P59-1	髄液	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/5	特筆すべき病原体無し	
	P59-3	咽頭ぬぐい液	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9	偏性嫌気性菌の Fusobacterium が多数	
	P59-4	尿	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9	Staphylococcus属の尿路感染症?(無症候性かも)	
	P59-5	鼻腔ぬぐい液	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9	Moraxella catarrhalis が多数、かつ Torque teno virus 13本	
	P59-6	血漿	2歳4か月	急性脳症(MERS)	2015/6/5	2015/6/9	特筆すべき病原体無し	
	P60奈良30M	P60-1	髄液	30歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/6/24	特筆すべき病原体無し
P60-2	血清	30歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/6/24	特筆すべき病原体無し		
P63岡山1F	P63-1	髄液	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17	特筆すべき病原体無し	
	P63-5	尿	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17	大腸菌多め 4150本	
	P63-6	血清②	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17	Torque teno virus 3本	
	P63-7	全血	1歳	急性脳症	2015/7/14	2015/7/17	特筆すべき病原体無し	
P65山口2F	P65-1	髄液	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/25	特筆すべき病原体無し	
	P65-2	血清	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/30	特筆すべき病原体無し	
	P65-3	尿	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/30	特筆すべき病原体無し	
	P65-4	咽頭ぬぐい液	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/30	特筆すべき病原体無し	
	P65-5	便	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/31	ほぼ大腸菌のみ。食中毒の可能性有り	
	P65-6	全血	2歳8か月	急性脳症	2015/7/25	2015/7/30	特筆すべき病原体無し	
P67福岡2M	P67-1	髄液	2歳5か月	急性脳症	2015/8/26	2015/8/26	特筆すべき病原体無し	
	P67-2	血清	2歳5か月	急性脳症	2015/8/26	2015/8/26	特筆すべき病原体無し	
	P67-3	咽頭ぬぐい液	2歳5か月	急性脳症	2015/8/26	2015/8/26	特筆すべき病原体無し	
	P67-4	便	2歳5か月	急性脳症	2015/8/26	2015/8/26	特筆すべき病原体無し	
	P67-5	尿	2歳5か月	急性脳症	2015/8/26	2015/8/26	特筆すべき病原体無し	
P68秋田10F	P68-1	髄液	10歳	脳幹脳炎	2015/8/15	2015/8/21	特筆すべき病原体無し	
	P68-2	血漿	10歳	脳幹脳炎	2015/8/15	2015/8/16	特筆すべき病原体無し	
	P68-3	咽頭ぬぐい液	10歳	脳幹脳炎	2015/8/15	2015/8/17	特筆すべき病原体無し	
	P68-4	便	10歳	脳幹脳炎	2015/8/15	2015/8/17	Faecal-associated gemycircularvirus 1b, 1本、恒常者の便とは似ても似つかない、Gardnerella vaginalis, Porphyromonas asaccharolytica 等の偏性嫌気性菌が優位	
	P68-5	尿	10歳	脳幹脳炎	2015/8/15	2015/8/17	特筆すべき病原体無し	

P71福岡(市)9M	P71-1	髄液	9歳	急性脳脊髄炎	2015/9/14	2015/9/16	特筆すべき病原体無し
	P71-2	血清	9歳	急性脳脊髄炎	2015/9/14	2015/9/16	特筆すべき病原体無し
	P71-3	咽頭ぬぐい液	9歳	急性脳脊髄炎	2015/9/14	2015/9/16	特筆すべき病原体無し
	P71-4	便	9歳	急性脳脊髄炎	2015/9/14	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
	P71-5	尿	9歳	急性脳脊髄炎	2015/9/14	2015/9/16	特筆すべき病原体無し
P72大阪43F	P72-1	髄液	43歳	急性脳炎	2015/8/2	2015/8/3	特筆すべき病原体無し
	P72-2	血清	43歳	急性脳炎	2015/8/2	2015/8/5	特筆すべき病原体無し
	P72-3	咽頭ぬぐい液	43歳	急性脳炎	2015/8/2	2015/8/5	特筆すべき病原体無し
	P72-4	便	43歳	急性脳炎	2015/8/2	2015/8/9	特筆すべき病原体無し
	P72-5	尿	43歳	急性脳炎	2015/8/2	2015/8/5	JCV 12本
P73福岡(市)2F	P73-1	髄液	2歳	急性脳脊髄炎	2015/9/17	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
	P73-2	血清	2歳	急性脳脊髄炎	2015/9/17	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
	P73-3	咽頭ぬぐい液	2歳	急性脳脊髄炎	2015/9/17	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
	P73-4	便	2歳	急性脳脊髄炎	2015/9/17	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
	P73-5	尿	2歳	急性脳脊髄炎	2015/9/17	2015/9/17	特筆すべき病原体無し
P75宮崎42M	P75-1	髄液	42歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/7/14	特筆すべき病原体無し
	P75-2	血漿	42歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/7/14	特筆すべき病原体無し
	P75-3	咽頭ぬぐい液	42歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/7/14	特筆すべき病原体無し
	P75-4	血清	42歳	急性脳炎	2015/6/24	2015/7/14	特筆すべき病原体無し
P77兵庫(尼崎)7F	P77-1	髄液	7歳	急性脳症	2015/8/21	2015/8/21	特筆すべき病原体無し
	P77-2	血清	7歳	急性脳症	2015/8/21	2015/9/25	特筆すべき病原体無し
	P77-3	咽頭ぬぐい液	7歳	急性脳症	2015/8/21	2015/8/26	特筆すべき病原体無し
	P77-4	便	7歳	急性脳症	2015/8/21	2015/8/21	特筆すべき病原体無し
	P77-5	髄液②	7歳	急性脳症	2015/8/21	2015/8/22	特筆すべき病原体無し
P78兵庫1F	P78-1	髄液	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8	特筆すべき病原体無し
	P78-2	血清	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8	特筆すべき病原体無し
	P78-3	咽頭ぬぐい液	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8	HPIV4. 72本; Human parechovirus 6, 229本
	P78-4	便	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8	特筆すべき病原体無し
	P78-5	全血	1歳	急性脳症	2015/8/8	2015/8/8	Magpie-robin coronavirus HKU18. 1本; Human parechovirus 6, 1本; Torque teno virus. 16本
P83兵庫6M	P83-1	髄液	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15	HHV-3. 1本
	P83-2	血清	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15	特筆すべき病原体無し
	P83-3	咽頭ぬぐい液	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15	特筆すべき病原体無し
	P83-4	鼻腔ぬぐい液	6歳	急性脳症	2015/9/15	2015/9/15	HHV-4. 1本
P86北海道9F	P86-1	髄液	9歳	急性脳症	2015/11/2	2015/11/5	特筆すべき病原体無し
	P86-2	血清	9歳	急性脳症	2015/11/2	2015/11/5	特筆すべき病原体無し
	P86-3	咽頭ぬぐい液	9歳	急性脳症	2015/11/2	2015/11/6	Sewage-associated gemycircularvirus-1. 1本、Prevotella のみの偏性嫌気性菌が多数(7585本)
	P86-4	便	9歳	急性脳症	2015/11/2	2015/11/6	特筆すべき病原体無し
	P86-5	尿	9歳	急性脳症	2015/11/2	2015/11/6	Acinetobacter baumannii 61本(院内に感染?)
P87北海道10F	P87-1	髄液	10歳	急性脳症	2015/9/27	2015/9/28	特筆すべき病原体無し
	P87-2	血清	10歳	急性脳症	2015/9/27	2015/9/28	特筆すべき病原体無し
	P87-3	咽頭ぬぐい液	10歳	急性脳症	2015/9/27	2015/9/29	特筆すべき病原体無し
	P87-4	便	10歳	急性脳症	2015/9/27	2015/9/29	特筆すべき病原体無し
P88大阪2M	P88-1	髄液	2歳	急性脳炎	2015/12/18	2015/12/18	特筆すべき病原体無し
	P88-2	血清	2歳	急性脳炎	2015/12/18	2015/12/18	特筆すべき病原体無し
	P88-3	咽頭ぬぐい液	2歳	急性脳炎	2015/12/18	2015/12/18	特筆すべき病原体無し
	P88-4	便	2歳	急性脳炎	2015/12/18	2015/12/20	Cucumber green mottle mosaic virus 43本(食品由来か?)
	P88-5	尿	2歳	急性脳炎	2015/12/18	2015/12/22	特筆すべき病原体無し
P89岡山9M	P89-1	髄液	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25	特筆すべき病原体無し
	P89-2	血清	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25	Enterococcus faecalis 4,361本
	P89-3	咽頭ぬぐい液	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25	Saffold virus 2. 1本、他、Prevotella, Veillonella 等の偏性嫌気性菌
	P89-4	便	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25	Chicken anemia virus 2本、Shallot latent virus 1本(食品由来か?)
	P89-5	尿	9歳	急性脳症	2015/12/25	2015/12/25	Enterococcus faecalis 1,342本



## P54長野4Mの臨床および事前の検査概要

- ❖ 長野県 4歳男児
- ❖ 再生不良性貧血のため骨髄移植後
  - ◇ 5/28から3日間下痢症状
  - ◇ 5/28から2日間嘔吐あり。
- ❖ ロタウイルス、アデノウイルスの迅速診断キット陰性。
- ❖ ノロウイルスについては、検査できていない。
- ❖ 5/30から38℃以上の発熱、意識障害、けいれんを発症し、現在脳低温療法中。
- ❖ 5/30の血液、5/30の髄液、5/31の喀痰から細菌培養はいずれも陰性。
- ❖ 髄液細胞数増多なし。
- ❖ 5/30の髄液と血清から、
  - HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, VZV DNAはいずれも陰性。
- ❖ 頭部MRIで右前頭葉白質にDWI高信号域+、以前からあるPVL様の脳室周囲白質病変+

表2 P54 臨床検体のNGS検査結果

検体	解読リード数	検出リード数	HAstV
髄液	73,478	81 (HAstV MLB-1)	0.110%
血清	988,499	69 (HAstV MLB-1)	0.007%
咽頭拭い	7,504,554	177 (HAstV MLB-1); 1 (HBoV)	0.002%
便	6,484,968	147,610 (HAstV MLB-1)	2.276%
尿	698,655	321 (HAstV MLB-1)	0.046%

HAstV: Human astrovirus, HBoV: Human bocavirus

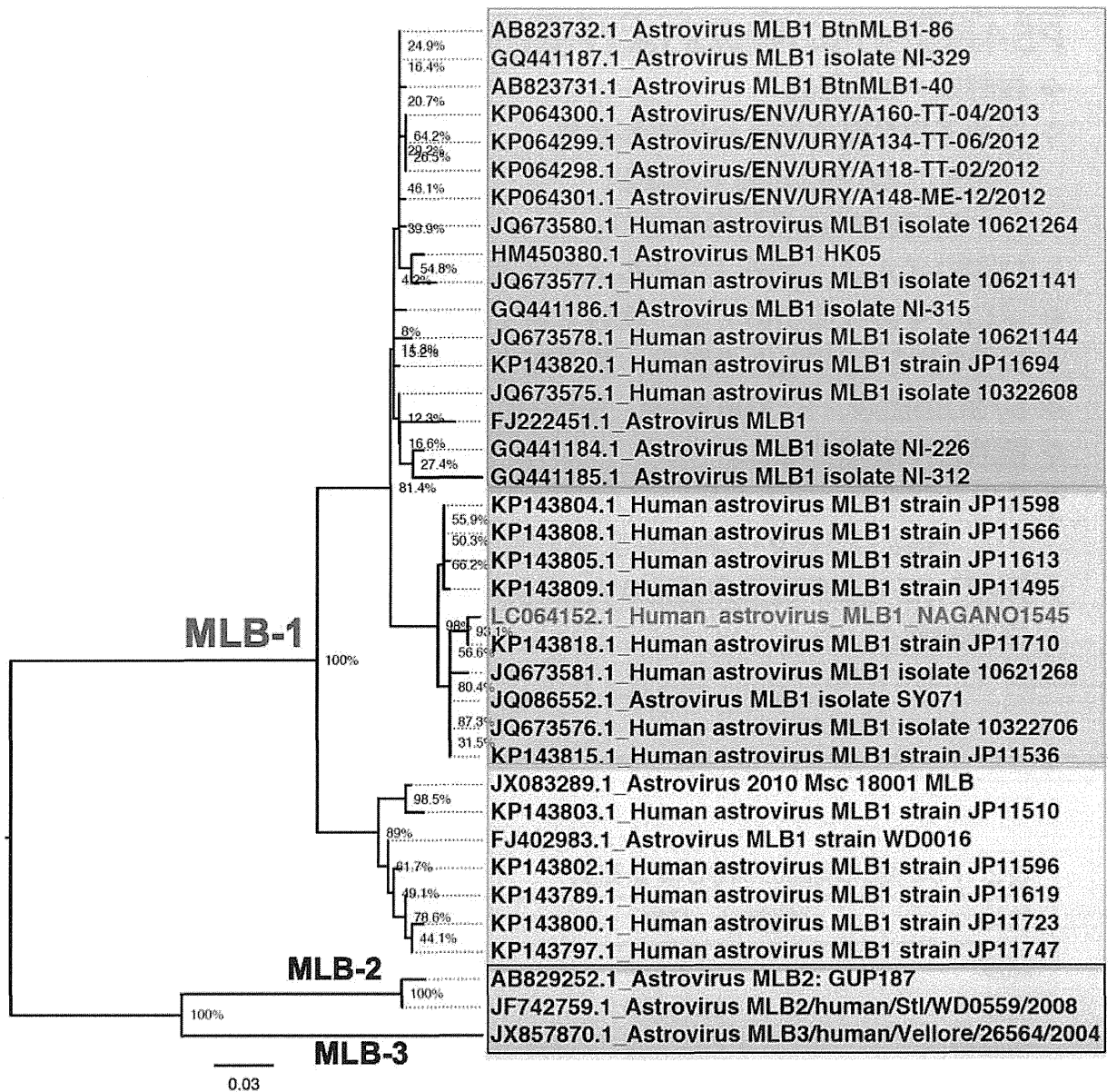


図3 Human astrovirus の分子系統解析。分子系統解析で分類に使用される RNA-dependent RNA polymerase 遺伝子の部分配列を抽出し (LC064152.1|Human\_astrovirus\_MLB1\_NAGANO1545, 3173-3495: 323 nt)、1,000 回ブートストラップを加えた最尤法にて分子系統樹を作成し評価した。スケールバーは塩基当たり 0.03 箇所の置換を示す。ブランチにブートストラップ値を示す。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
八代将登 森島恒雄	インフルエンザ急性肺障害におけるチオレドキシシン (TRX-1) の役割	淀井淳司、平家俊男	医学の歩み レドックスUP DATE	医歯薬出版株式会社	東京	2015	179-182
八代将登	重症インフルエンザ、そのメカニズムと診療 脳症	岡部信彦	Pharma Media	メディカルレビュー社	大阪	2015	23-28
Masato Yashiro, Hirokazu Tokuzumi, Takahara, et al.	The Science of Free Radical Biology and Disease	Donald Armstrong, Robert D. Strattin	Oxidative Stress and Antioxidant Protection	Wiley Blackwell		2016	
亀井 聡	細菌性髄膜炎, 結核性髄膜炎, 脳膿瘍, 静脈洞感染症, 脊髄硬膜外膿瘍, その他の細菌感染症	矢崎義雄, 伊藤貞嘉, 水澤英洋ほか	内科学第11版	朝倉書店	東京	2016 (印刷中)	
単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン2016作成委員会(作成委員会委員長 亀井 聡)			単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン2016	南江堂	東京	2016 (印刷中)	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masanori Sato, Makoto Kuroda, Masashi Kasai, Hikoro Matsui, Tetsuhiro Fukuyama, Harutaka Katano, Keiko Tanaka-Taya	Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing	Journal of Clinical Virology	78	66-70	2016