

厚生科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

微生物系統株の収集・保存事業
(感染症ライブラリー) の構築に関する調査研究

平成10年度研究報告書

研究者名簿

研究者名	所属	分担した研究項目
森次 保雄	国立感染症研究所	代表
吉倉 廣	国立感染症研究所	バンク構想(総括)
大月 邦夫	群馬県衛生環境研究所	地研からのバンク機能への協力
井上 栄	国立感染症研究所 感染症情報センター	病原体情報
田代 真人	国立感染症研究所 ウイルス製剤部	麻疹バンク
小濱 友昭	国立感染症研究所 ウイルス製剤部	麻疹バンク
小船富美夫	国立感染症研究所 安全性研究部 毒性病理室	麻疹バンク
宮村 達男	国立感染症研究所 ウイルス第二部	小型球形ウイルスバンク
渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌部	食中毒細菌バンク
倉田 毅	国立感染症研究所 感染病理部	バンクの活用 バイオセイフティ

目次

総括	1 頁
別紙 1 : 感染症ライブラリー検討課題 (ライブラリー現状アンケート項目)	2
別添資料 1 : 別紙 1 への病原体別回答 細菌 麻疹ウイルス アデノウイルス	3
別添資料 2 : 各分担研究報告書	9
別添資料 3 : 感染研の各部で収集・保存している病原体一覧表	3 4

感染症ライブラリー研究班 平成10年度総括報告

微生物代表株ライブラリー(Type Culture Collection)について

病原体ライブラリーの重要性は多くの方が認めるところであるが、それぞれのライブラリーに対する考え方は非常に異なる。

一般的には、ライブラリーは菌或いはウイルスの代表株（例えば、学生実習等で分離同定に使用出来るようなもの）が想像されるが、このようなものについては米国の ATCC がよく利用されている。これに対応するものを、感染症研究所と地方衛生研究所のネットワークの中に入れるべきか否かについては、議論がある処である。日本は ATCC に匹敵するような病原体のバンクを持つべきである、との意見は世の中に少なくない。他方、本年東京で行われた OECD の Biological Resource Bank(BRC)に関する会議では世界のバンクが連携を取った Virtual BRC を作るべきであるとの考えが打ち出されている。世界のリソースに限りがある時、業務の重複を世界規模で避けると云う考えは重要であると考えられる。

感染症研究所・地方衛生研究所ネットワークにおけるライブラリーのあり方

基本的に感染症サベイランス事業に伴うウイルス・菌株分離を基盤とするライブラリー構築をすると云う事で、意見の一致を見た。

しかし、感染症研究所の中だけでも各病原体の収集の目的は病原体により、必ずしも一致しない。むしろ、大きく違ふと云った方がよい。これは、研究者個人の研究手法の違いによるものではなく、それぞれの病原体の流行伝播、引き起こされる疾患の性質、ワクチンの有無、生ワクチンか不活化ワクチンかなど色々な理由がある、と考えた方がよい。又、感染研と地研では、ライブラリーの意義付けが異なる事は十分ありえる。

以上のような認識から、腸内細菌を中心とした細菌のライブラリー、生ワクチンによる予防接種のあるウイルスの代表として麻疹ウイルスのライブラリー、多数の型に分かれており型毎に病原性の異なるウイルスの典型としてアデノウイルスのライブラリー、につき感染研内部でアンケート調査を行った。別紙1に示す検討課題に対し、別紙資料1に示す回答を得た。

今後の方向として、

1. 病原体の幅を広げ感染研の中で調査を進めると共に、
2. 調査結果を地方衛生研究所に示し、地方衛生研究所のやり方や意見を集めることが必要である。
3. 最終目標として、ライブラリー情報カードの統一化を考える必要がある。この為、代表的な病原体につき感染研、地研共通の情報カードの雛形の作成をする。新法に基づく病原体情報（別紙様式）の利用は、この際、十分考慮されなければならない。

尚、地研からも提起されていた病原体検査に関わる検体採取、保管、搬送、検査法については、1999 年年頭より作業が開始され感染研で原案作成がほぼ終了しているの、地研現場の意見を加え修正後正式に活用することとなる。輸送については、感染研厚生本省で最終的なつめを行っている。

感染症ライブラリー研究班会議：検討課題

1999.3.17

レジメ

1. 目的：

以下の目的のために病原体の収集・保存を行う

- 1) 感染症の動向調査および流行調査の補助手段としての
- 2) 感染症の予防法（ワクチン等）の開発およびワクチン株の選定
- 3) 感染症の検査・診断・治療法の開発のための参照株として

*単なる系統株の保存のためではない

2. 収集・保存すべき病原体の範囲

社会的に対応すべき感染症の原因となる病原体（薬剤耐性病原体も含む）

*「感染症新法」の1-4類のサーベイランスの対象となるものが当面の対象病原体
遺伝子診断のためのDNAプローブ、プライマーも対象とするか？（市販されていないものについて）

3. 収集方法

- 1) 「感染症新法」に基づいて検査のために送付される
- 2) 積極的サーベイランスにより収集

4. 保存施設

- 1) 地方衛生研究所
- 2) 国立感染症研究所

上記の分担をどの様にするか？

5. 保存場所

特定の部屋を確保するか

各病原体担当部署で保存するか

6. 保存株の情報

保存株のリストの作成——統一的フォーマットが必要か？

情報交換の方法——特定の施設に情報を一括するか？

7. 保存株の分与

分与する対象（病原体，施設，研究目的等）をどこまでにするか

分与する方法——バイオセーフティガイドラインを遵守

8. 病原体の輸送

国内での輸送法は他で検討中

9. 上記を継続的に遂行するための資金源は？ 事業予算化？——誰がやるか

地研—感染研の連絡はどうする。連絡委員会が必要か？

病原体毎に内容が異なる。各病原体毎の検討が必要。

10. その他：麻疹のバンク試行について

感染症ライブラリー

感染症研究所細菌部 渡辺治雄

細菌関連について

1. 目的

- 1) 感染症の動向調査および流行調査の補助手段としての――
食中毒原因汚染物質の検索
院内感染ルートの検索のため（薬剤耐性菌等）
- 2) 感染症の検査・診断・治療法の開発のための参照株として
病原性遺伝子・薬剤耐性遺伝子コレクション（検査法の開発のため）
TSLs等の重症疾患をおこす細菌感染症の診断・治療法の開発のため

2. 収集・保存すべき病原体の範囲

社会的に対応すべき感染症の原因となる病原体：

- 1) 食中毒関連細菌（腸管出血性大腸菌、サルモネラ、ビブリオ等）
- 2) 薬剤耐性菌（VRE, PRSP, MRSA等）
- 3) その他の全例報告の対象となっている感染症の原因細菌（劇症型レンサ球菌、ライム病ボレリア、髄膜炎菌等）

3. 収集方法

厚生省との連携による「感染症新法」に基づいた調査のため、地方衛生研究所および病院検査室より提供を受ける

4. 保存施設：

各地で分離される菌は各地方衛生研究所で保存し、各地方を越えた広域的対応を必要とする事件に関連した菌あるいは重要と思われる疾病の原因菌は国立感染症研究所に保存する

5. 保存場所

各病原体担当部署で保存する

6. 保存株の情報

保存株のリストの作成――エクセル等のソフトを用い、分離菌株に関する情報例えば、患者年齢、臨床所見、菌株の分類的特質、遺伝学的特質等の情報を保存する。
情報交換の方法：各施設にある情報をセキュリティのある方法で閲覧できるシステムがあれば望ましい

7. 保存株の分与

分与する対象：調査目的に合致する施設間での菌株の交換分与を行う。ただ研究目的に使用する場合、あるいは系統的解析の場合はATCC等の菌株保存センターを利用してもらう。

分与する方法――バイオセーフティガイドラインを遵守

8. 病原体の輸送

国内での輸送法は決められた方法にしたがう。

9. 上記を継続的に遂行するための資金源は？ 恒常的事業とするためめは予算化が必要である。

感染症ライブラリー研究班

麻疹ウイルス（MV）バンクの構築（案-1）

1999, 03, 22
（ウ製ノ小船）

1. MVバンクの目的

- 1) 麻疹のサーベイランスおよび流行ウイルスの分子疫学的解析
流行ウイルスのタイピング決定（国際的標準手法にしたがう）
重症例：肺炎、脳炎、特に成人麻疹、SSPE症例などからの分離MVの保存
流行MVの変異動向の監視（特に抗原構造、HおよびF遺伝子での変異の蓄積
調査、現行ワクチン株との相違）
- 2) ワクチンの有効性と副反応調査
既ワクチン接種者からのウイルス分離、野外株/ワクチン株の同定、鑑別
- 3) 麻疹の基礎研究と検査、診断法の開発
 - a. 強病原性ウイルス株の入手：サル感染実験に使用
目的 a) 免疫抑制機構の解明（日和見感染症の誘発機構の解明）
b) 回復機構、細胞性免疫の関与
c) 病原遺伝子の同定
 - b. 大型ブラック形成ウイルスの入手：ブラック中和抗体測定法の確立と標準化。
 - c. 強細胞毒性ウイルス株の入手：病原性との相関、中和抗体測定用の攻撃ウイルス。
 - d. 遺伝子診断の標準化
 - e. 異型麻疹の発症機構
- 4) ウイルス毒力マーカーの確立
サル感染実験をもとに強病原性野外MV、弱病原性野外MVの*in vitro* マーカーを確立する。

2. 収集、保存すべき麻疹ウイルスの種類

- 1) 地域代表ウイルス株、流行年代表株、重症麻疹分離株、成人麻疹株、SSPEウイルス株
- 2) 抗原変異株
- 3) 代表的な強病原性野外株および弱病原性野外株

3. 麻疹ウイルス株の収集方法

- 1) 国立感染症研：地研、医療施設から依頼または提供された検体からのウイルス分離と収集
- 2) 地方衛生研究所：地域流行ウイルス株の分離、収集。代表株をバンク（感染症研）へ供与。

4. ウイルス株の保存施設

- 1) 地方衛生研究所 全国6ブロック代表衛研（現在選考中）担当地域の流行株を保存する。
- 2) 国立感染症研究所（MVバンク）国内MV株、アジア地域の流行ウイルス株を保存する。
 - 1) 2) の協力関係の構築、連絡委員会の設置

5. 保存場所

当面、国立感染症研究所ウイルス製剤部麻疹バンク専用フリーザーを使用する。

6. 保存株の情報

保存ウイルス株リストの作成する。フォーマットを統一する。

記載情報の内容：1) 流行年、2) 週、3) 地域、4) 患者情報（性別、年齢、臨床症状の特徴、ワクチン接種歴の有無など

検体情報：検体採取病日、検体（末梢血、咽頭拭い、髄液など）

ウイルス分離情報：使用した細胞名、ウイルスの感染価、ウイルス株の特徴（細胞毒性の程度、赤血球凝集活性、抗原性、遺伝型（タイピング）

7.保存株の分与

1) 分与の条件：研究目的に限って分与する。

研究使用の具体例；分離ウイルスの分子疫学的調査研究（タイピング）、抗原構造の解析、病原性の研究等とする。

2) 分与の方法 バイオセーフティーガイドラインを遵守する。

分与記録を保管する。

8.MV株の輸送

病原体の輸送法についてはバイオハザードの見地から別組織で検討中である。MVの輸送はその決定手順に従う。

9.バンク機能を維持、遂行するための資金源

事業の予算化

当面、病原体ライブラリー研究予算、および厚生科研費「麻疹撲滅プロジェクト研究費」を充当

10.麻疹バンクの試行

既に1984～1998年に分離されたわが国の野外MV 21株について検索した。現在、麻疹バンクの構築、推進に協力可能な医療機関、地方衛研を選定中である。

(Printed for Drs.Yoshikura, Watanabe, Kohama,Tashiro)

アデノウイルスライブラリーの作製

1. アデノの収集目的、

発生動向調査、及び分子疫学的解析のための参照株として収集することが最も有用と思われる。このためアデノDNAの遺伝子型を調べることが必要。しかし、多くの血清型を同定し、遺伝子型を決定するのは、多大な労力を要するので

2. その範囲として、

臨床上重要なアデノ7型、3型及び眼科で問題となるAd8、19を中心にライブラリーを作製したら良いと思う。

3. 収集方法は検査のため送付されたものなど、様々なルートで入ってくるもので遺伝子型が決定されたもの、あるいは、決定することが有用と思われるもので

4. ウイルス分離や検査は地方衛研が主になるので、基本的に株を分離した所で保存してもらおう。あるいは特定の型、遺伝子型はどここの地研、感染研というように分けても良い。

5. 特定の保存場所が確保できれば良いが、当面、アデノに関しては情報センターで保存します。保存方法としてウイルスDNAの形でも可能。

6. 保存株が分散するとそのリストや情報交換が必要となるが、フォーマットは他の病原体と同一が良い。情報交換の方法として情報を一括する施設があると便利。ウイルス学会のアデノウイルス研究ネットワークで、標準株などを保存している感染研が当たるのが適当か。

アデノウイルスライブラリーの作製

感染症情報センター 井上 栄

アデノウイルスは、血清型として現在まで49種知られているが、その約半数は大きな病気を起こさない。临床上重要なのは、B亜属の3型、7型、及び眼科で問題となるD亜属の8、19、37型、さらに胃腸炎を引き起こすF亜属40、41型である。日本でアデノの分離、同定が行われているのは主として地方衛研（地研）及び民間の臨床検査施設である。

1982年より厚生省感染症サーベイランス事業が開始して以来、地研などからアデノの分離、同定が、感染研、情報センターに報告されてきた。型別で多い順に並べると、94年までは3型、2型、1型、4型である。諸外国と比べると、7型（Ad7）の頻度が極端に少ないのが特徴であった。

しかし95年5月に広島市で7型が分離されたのを最初に、以後、全国各地の地研から分離報告が急速に増加、3型、2型に次ぐ頻度となっている。7型は病原性が強く海外ではたびたび流行をくり返し、小児に重症肺炎を引き起こす型として注目されていた。しかし全国的な大流行を引き起こす要因はまだ解明されていない。アデノ7型は、この10-20年来流行がなかったため、若年者を中心に抗体保有率が低く、目下、日本では最も重要なウイルス疾患の一つである。

分子疫学的解析により、流行株の大部分は中国に特有な型であるAd7dの変異型であるが、南米からの輸入株と思われる7h型が国内で確認された。さらに拡大する様相を見せている。これは3型とクロスする抗原性を有しており、本邦では3型の頻度が高く抗体保有者が多いことから、それほど広がらないとの予想も出来るが、感染力や病原性が強いといわれていることから、今後の動向を監視する必要がある。

近隣諸国の発生動向であるが、お隣の韓国でも日本と同様、少なくともこの10年来アデノ7型の流行がなかった。しかし、1995年末頃よりAd7の流行があり、小児肺炎による死亡者が出ている。流行株の遺伝子解析をおこなったところ、Ad7d型が主流であり、本邦の流行株と違いがあるようである。血清疫学調査はまだ行われていない。また中国での発生動向にも注目していく必要がある。

アデノ系統株ライブラリーの構築の目的として、発生動向調査や分子疫学的解析のための参照株としての収集が最も有用と思われる。分子疫学的解析のためにはアデノDNAの遺伝子型を調べることが必要である。しかし多くの血清型を同定、遺伝子型を決定するのは多大な労力を要するので、その対象として7型に加え、同様に小児に咽頭結膜熱や肺

炎を起こす臨床上重要な3型、さらに流行性角結膜炎の起因ウイルスである8、19型を中心にライブラリーを作製していく。ウイルス分離や検査は、地方衛生研究所が主になるので、基本的に株を分離した所で保存してもらう。保存はDNAの形でも可能である。あるいは特定の型、遺伝子型はどここの地研、感染研というように分けても良い。保存株が分散すると、そのリストや情報交換が必要となるが、この情報を一括する施設が必要となる。これには感染研の情報センターが当たるのが適当と思われる。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

地方衛生研究所における微生物バンクと微生物の輸送等に関する調査成績

分担研究者 大月 邦夫 群馬県衛生環境研究所長

研究要旨：地方衛生研究所（地研）における病原体等微生物保存・管理に関する調査を実施した。細菌、ウイルス、リケッチア等の病原体微生物の収集・保存・管理を行う「微生物バンク」を設置していると回答した地研は、細菌単独が6地研、細菌とウイルス（含リケッチア、真菌、原虫）は14地研、合計18バンク（都道府県14、指定都市1、政令市2、特別区1）であった。分離・同定されたウイルス、細菌等の微生物は、地研独自で収集・保存を行っている地研が殆どであった。また、病原体検査を行うための、採取容器、搬送方法等も各地研独自の方法をとっている傾向がみられた。

地研が行う病原体サーベイランスなど感染症の病原体診断機能を強化するためには、全国及び地方微生物バンクの設置及び病原体検査に係る検体の採取・保管・搬送・検査法等についての全国的な標準化が不可欠である。

A. 研究目的

感染症新法に基づき、病原体サーベイランスが本格的に実施されることになっている。感染症の中・長期的サーベイランス等を行う上で、地方衛生研究所（地研）がもつ病原体を主体とした微生物検査機能は重要であり、地研の果たしている役割は大きい。しかし、一般的に地研が行っている細菌・ウイルス等に関する検査は、他種類の微生物の分離同定を行えることが要求される一方で、標準株等を系統的に入手かつ保存・管理することは容易ではないのが現状であろう。

また、感染症発生動向調査等での患者検体の輸送容器、輸送法等に関しても統一した方法で行われていないのが現状であると考えられる。今後、感染症新法の施行に伴い、地研が行う病原体検査への信頼度がますます大きくなることから、正確かつ確実な検査が不可欠となり、標準株等の微生物バンク化の構築及び検体の採取、保管、搬送、検査等病原体検査の標準化が必要となっている。

そこで、各地研における病原体を中心とした微生物の収集・保存状況及び検体の輸送法等の実態把握を目的としたアンケート調査を行った。

B. 研究方法

平成11年2月、全国73地研の検査担当者を対象にアンケート調査を実施した（回収率100%）。調査項目は以下のとおりである。

- 1) 微生物バンク：設置の有無
今後の設置予定の有無
- 2) 微生物バンク：
設置年月 収集・保存株の種類・規模
保存方法（細菌・ウイルス・真菌・病虫等）
収集方法・管理法、
- 3) 微生物の他機関への分与：
分与及びその条件
- 4) 微生物を系統的に収集・保存・管理する場合の必須Mの条件
- 5) 検体の採取容器、輸送容器、輸送方法：
採取容器（ガラス、クイボグエックバイアル、その他）
輸送容器（発砲スチロール容器、保冷器、
セラムメーリングボックス、その他）
搬入方法（地研、保健所、病院、MR、宅急便）

C. 結果

- 1) 微生物バンクの設置の有無等について
細菌、ウイルス、リケッチア等の病原体微生物

の収集・保存・管理を行う「微生物バンクを設置している」と回答した地研は、細菌単独が6地研（8.2%；6/73）、細菌とウイルス（含リケッチア、真菌、原虫）は14地研（19.2%；19/73）、合計18バンク（都道府県14、指定都市1、政令市2、特別区；1）であった。

また、今後設置を予定または検討中は、12地研（16.4%；12/73）であった。

2) 微生物バンクについて

設立は、昭和35年設立～平成11年1月であった。

微生物バンクを設置している地研の微生物の収集規模は、地研によりかなり差が認められた。

細菌は、100～200株が2地研、200～500株が4、500～1,000株が1、1,000～5,000株が11地研、5,000～10,000株が1地研、10,000～20,000株が1地研であった。

ウイルスは、99株以内が2地研、100～200株が2地研、200～500株が3地研、1,000～5,000株が6地研、5,000～10,000株が1であった。

また、リケッチアは、9地研で収集・保存され、その内訳は、100株以内が8地研で200～1,000株は1地研、真菌は、3地研ですべて100株以下、原虫は、4地研で、収集規模はすべて100株以内であった。

地研の菌株収集事例を、表に示す。

保存温度は、細菌、ウイルスともに-80℃が多かった（細菌：10地研、ウイルス：12地研）。細菌、ウイルスの保存は、他に-120℃、液体窒素下及び凍結乾燥等の方法で行われていた。リケッチアは-80℃が8地研、真菌は-80℃が1地研、原虫はホルマリン固定で保存が1地研であった。

分離株の収集は感染症発生動向調査、調査研究、ルーチン検査によるものが主であり、管理については、台帳による管理が14地研、コンピューター管理が7地研、さらに1地研がデータベース化も行っていた。

3) 微生物の分与条件について

研究所で扱っている微生物の分与条件については（微生物バンク未設置の地研を含む）、条件なしが4地研（5.5%；4/73）、条件付きが59地研（82.1%；59/73）分与しないが2地研（2.7%；2/73）であった。

4) 微生物バンク設置に必要な条件について
微生物を系統的に収集保存・管理を行うために

必要な条件として、まず予算措置がなされること（冷凍庫、凍結乾燥機、施設保管等のハード面の充実、保存・管理用専用ソフトウェア等ソフト面の充実）。また、地研レベルでなく国家レベルで微生物バンクの充実が必要との回答も得られた。

5) 検体の採取容器、輸送容器、輸送方法、収集方法について（複数回答）

検体の採取容器は、ガラスの試験管が14地研、クライオジェニックバイアルは9地研で、その他検体採取容器は多種類に及んでいた。

検体の輸送は、クーラーボックスを用いている地研が13地研、発砲スチロール容器が10地研、その他種々の輸送容器が用いられていた。

検体収集は、保健所の職員がすべて行っているのが11地研、衛研または保健所の職員が収集しているのが13地研であった。その他、事情に応じてコマーシャルラボの職員に依頼するを併用している地研が多かった。

D. 考察

感染症の病原体検査に、DNA解析等新たな検査が用いられるようになり、当該の流行株と併せて、過去に分離された野外株、国内外検出された菌株についても検索が一般的に行われることから、全国的な微生物バンクの構築が必要となってきた。

昨年度全国33カ所の地研において、ウイルスを中心に菌株の収集・保管・分与の状況を調査した結果、33全ての研究所で、微生物株を何らかの形で保存していることがわかった。今回は、地研協議会に加盟している73研究所全てに対して、微生物バンクとしての機能を持っているかについて調査した結果、昭和35年設立の古いものから、平成11年1月設置したものまで、全国に18バンク（都道府県；14、指定都市；1、政令市；2、特別区；1）にとどまることが明らかになった。また、今後設置予定及び検討中を含めても全体の半数に満たないことも明らかになった。これは、微生物バンクの必要性を認識しながらも設置に必要な予算、人的問題等によって設置が困難になっていること、各地研が検査に必要なすべての細菌、ウイルス等の標準株をそれぞれバンク化することも困難であること等が考えられる。

今後、各地研の微生物検査機能を強化するにあ

たり、地研全体及び国も含めた論議が必要であり、全国及び地方レベルでの微生物バンクを構築することは、喫緊の課題ともいえよう。また、各地研が所有している微生物は膨大な数にのぼり、さらに分与は条件付きを含めるとほとんどの地研で可能であることから、地研相互間の協力下にこれらの物的財産の活用をはかる必要もあることも示唆された。

次に、検体の採取容器はガラス等破損しやすい容器等が用いられており、バイオハザードの観点からも改善する必要があることが明らかにされた。また輸送容器等は、各地研で様々な方法が取られていることから、今後輸送の温度条件も含めて標準化する必要があることも示唆された。いずれにせよ、今後調査した内容は、地研全体の問題であり、国を含めた積極的な論議及び解決をはかる必要がある。

E. 結論

地研が行う病原体サーベイランスなど感染症の病原体診断機能を強化するためには、全国及び地方微生物バンクの設置及び病原体検査に係る検体の採取・保管・搬送・検査法等についての全国的な標準化が不可欠である。

F. 研究発表

表 地 研 の 菌 株 収 集 事 例

A 県	B 県	C 県	E 県
E.coli(VTEC)	赤痢菌	インフルエンザA(H1N1)	インフルエンザウイルス
Salmonella	チフス菌	インフルエンザA(H3N2)	ポリオウイルス
Campylobacter	バラチフス菌	インフルエンザB	エンテロウイルス
E.coli	その他のサルモネラ	VPス1,2,6型	アデノウイルス
CL.sporogenes	エルシニア	麻疹	RSウイルス
Enterococcus(VRE)	カンピロバクター	ムンプス	ツツガムシ病リケッチャ
Micrococcus	溶連菌	アデノ1,3,4,7型	ムンプスウイルス
Bacteroides	結核菌	エコー4,7,11,18,30型	HIV1,2型
Candida	コレラ菌	ポリオ1,2,3型	ヘルペスウイルス以下
B, subtilis	腸炎ビブリオ	コクサッキーB1~5型	HSV,EBV,HHV6,
st,aureus	その他の病原ビブリオ	コクサッキーA9,16型	HAV
Bordetella pert	エロモナス	エンテロ71型	HTLV-1
V, mimicus	プレジオモナス	クラミジアトラコマチス	
V, fluvialis	E T E C	1~13型とL1~L3まで	
V, valnificus	E H E C		
V, cholerae 01	食中毒患者からの分離株		
V, cholerae 037	食品からの分離株		
Aeromonas lcyd			
Aeromonas sobria	D 県		
Aeromonas caviae	食中毒原因菌全般		
Plesimonas shig 1	コレラ		
legionella pneum	赤痢		
Mycoplasma pneum	リステリア		
M, Crale	エンテロウイルス		
Acholeplasma	アデノウイルス		
	インフルエンザウイルス		
	パラインフルエンザ		
	ムンプスウイルス		
	単純ヘルペスウイルス		

平成10年度
病原体等微生物収集及び保存・管理等に関するアンケート調査

以下の設問にお答え下さい。

1. 貴研究所には細菌、ウイルス、リケッチア等の病原体微生物の収集及び保存・管理を行う微生物バンクがありますか。

微生物バンク (ある 設置年月： 年 月 ・ ない)
今後の設置予定 (ある ・ ない)

2. 貴研究所での微生物の収集規模及び保存状態等について

①収集規模及び株数について

細菌 (株)
ウイルス (株)
リケッチア (株)
真菌 (株)
原虫 (株)
その他の微生物 (微生物名 : 株)
培養細胞等 (株)
合計 (株)
毎年平均 (株)

- ②収集・保存株の種類収集について具体的 (例：RSウイルス Long 株) にお答え下さい。

記載欄 (別紙に記載可) :

③保存方法（例：－80℃で冷凍保存等）について

細菌	()
ウイルス	()
リケッチア	()
真菌	()
原虫	()
その他の微生物（微生物名	：保存方法)
培養細胞等	()

④収集方法について

記載欄：

⑤管理法（例：コンピューターで保存場所等を管理）について

記載欄：

3. もし、営利目的以外であれば、貴研究所の微生物の他機関への分与は可能ですか。

①分与は（ 条件なしで可能 ・ 条件付きで可能 ・ 分与はしない ）

②条件付きで可能な場合、その条件について

記載欄：

4. 微生物を系統的に収集及び保存・管理する場合に必須の条件について

記載欄：

5. その他、微生物バンクに関するご意見など

ご協力ありがとうございました。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築に関する
調査研究 ～麻疹ウイルス（MV）バンク構築の全体計画～

分担研究者 田代 真人（国立感染症研究所部長）

研究要旨 わが国における麻疹は毎年各地で流行しており、ワクチン既接種者の罹患や成人麻疹も増加しつつある。斯様な現状にあつて本研究でのバンク構築は単なるウイルスの分離・収集を目的とするものではなく麻疹の予防行政に寄与しうることを意図する全体計画を立案した。

今回策定された全体計画に基づいて、これまでに分離・収集されている一部の野外ウイルスを解析した結果、麻疹バンク構築に有効であることが確認された。

はじめに

麻疹は小児感染症の最重要疾患であり、とくに途上国における乳幼児死亡の主要因である。WHO（世界保健機構）はその制圧、撲滅を目標とする予防接種拡大計画（EPI）を推進している。流行の実態を明らかにすることはわが国の予防対策のみでなくEPIの推進に不可欠である。

当研究部において確立されたMVの高感度分離システム¹⁾はすでに国内外の研究機関に導入され、多数の野外MV株が各国で分離、収集されている。PCR法の普及と相まって、遺伝子レベルでの麻疹流行の実態解析が可能になった。一方、近年、野外MVは変異を蓄積しつつあり、その変異動向を監視することは麻疹の予防行政に関連する重要課題となっている。

1. MVバンク構築の目的と研究内容

本研究でのバンク構築は単なるウイルスの分離、収集、遺伝型決定にとどまることなく、麻疹の予防行政に資することを主要

目的とする。その具体的内容は以下の通りである。

1) ウイルス株の収集と保存、分与と情報の提供

収集、保存すべき麻疹ウイルス株として
a) 地域流行の代表株、b) 各流行年の代表株、c) 重症麻疹（肺炎、脳炎）症例の分離株、d) 成人麻疹患者の分離株、e) SSP Eウイルス株、f) 抗原変異株、g) 強病原性野外株、h) 弱病原性野外株などを保存する。これらのウイルス株およびその情報を研究機関に提供する

2) 麻疹のサーベイランスおよび流行ウイルスの分子疫学的解析

ウイルスの遺伝型の決定（国際的標準手法にしたがう）、それら流行ウイルスの分布

3) 流行MVの変異動向の監視（特に抗原構造、HおよびF遺伝子での変異の蓄積調査、現行ワクチン株との相違）

現行ワクチンは1950年代の流行ウイルス（Edmonston株）を原株ウイルスとし

て開発されたものが世界的に使用されている。MVは変異しないものと考えられてきたが1980年代からa)赤血球凝集活性を欠落した。b)構成蛋白(H、NP)に分子量増を示す。c)1990年以降、変異はH蛋白のみでなくF蛋白にも波及しているなどその生物性状を変化しつつある。

H、F蛋白は感染防御抗原であり、これら蛋白の変異は現行ワクチンの感染防御効果に劣化を招く可能性が推測される。

4)ワクチンの有効性と副反応調査
既ワクチン接種者からのウイルス分離、野外株/ワクチン株の同定、鑑別2)

5)麻疹の基礎研究と検査、診断法の開発。

a)免疫抑制機構の解明(日和見感染症の誘発機構の解明)

b)回復機構、細胞性免疫の関与

c)病原遺伝子の同定

d)大型ブラック形成ウイルスの入手とブラック中和抗体測定法の確立およびその標準化。

e).強細胞毒性ウイルス株の入手：病原性との相関、中和抗体測定用の攻撃ウイルスとして利用

f).遺伝子診断の標準化

g).異型麻疹の発症機構

h)ウイルス毒力のin vitroマーカーの確立
サル感染実験を併用し強病原性野外M

i)現行ワクチンの有効性評価とワクチン2回接種の是非の検討

j)病原性の研究(遺伝子レベル)

強病原性、弱病原性ウイルスについて検討。

k)アジア地区のMVバンクとしての機能
アジア地域での流行MVの性状把握

遺伝型、抗原構造、病原性等を検索、ウイルス変異を監視する。

これらの活動を通してWHOの推進する

麻疹EPIを支援(技術移転を含む)する。

2.麻疹ウイルス株の収集方法

1)国立感染症研：地研、医療機関等から提供された患者検体を用いてのウイルス分離と保存

2)地方衛生研究所：地域医療機関より提供された患者検体についてのウイルス分離とウイルス株の収集。および、地域流行ウイルス(代表株)をバンク(感染症研)へ分与。

3.ウイルス株の保存

1)地方衛生研究所 全国6ブロック代表衛研(現在選考中)の担当地域における流行株を保存する。

2)国立感染症研究所(MVバンク)
国内MV株、アジア地域の流行ウイルス株を保存する。

3)感染症研バンク、地研の協力関係の構築、連絡委員会の設置

4.保存場所

当面、国立感染症研究所ウイルス製剤部麻疹バンク専用フリーザーを使用する。

5.保存株の情報

保存ウイルス株リストの作成する。フォーマットを統一する。

記載情報の内容：1)流行年、2)週、3)地域(県)、4)患者情報(性別、年齢、臨床症状の特徴、ワクチン接種歴の有無)

検体情報：検体採取病日、検体(末梢血、咽頭拭い、髄液など)

ウイルス分離情報：使用した細胞名、ウイルスの感染価、ウイルス株の特徴(細胞毒性の程度、赤血球凝集活性、抗原性、遺伝型(タイピング))

6.保存株の分与

1)分与の条件：a)分子疫学的調査研

究 b) 抗原の解析、c) 病原性の研究等の研究に限り分与する。

2) 分与の方法 バイオセーフティーガイドラインを遵守研究目的に限り分与する。分与記録を保管する。

7. MV株の輸送

病原体の輸送法についてはバイオハザードの見地から別組織で検討中である。輸送はその決定手順に従う。

8. バンク機能の維持経費

当面、病原体ライブラリー研究予算、および厚生科研費「麻疹撲滅プロジェクト研究費」を充当。今後は事業の予算化が必要。

9. MVバンクの試行

既に1984～1998年に分離されたわが国の野外MV 21株について検索した。現在、麻疹バンクの構築、推進に協力可能な医療機関、地方衛研を選定中である。

2. 方法

患者検体：急性期患者の末梢血、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、髄液および脳組織をウイルス分離検体として使用する。

ウイルス分離：当研究部で確立した細胞(B95a細胞)および手法1)に従う。

抗原変異：当研究部で作製したH蛋白の異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体を用いてウイルス中和試験を行う。必要に応じて免疫沈降試験を行う。

遺伝型の決定とMV株名：国際的に統一された手法に従う³⁾。

野外MV：1977年～1998年に急性期麻疹患児の咽頭拭い、もしくは末梢血液からB95a細胞を用いて分離された野外MV株を用いる。

塩基配列：ゲノムRNAよりRT-PCR法にてN遺伝子の5' 端の532塩基を増幅する。また、上記についてDye Terminator法にて同部位の塩基配列を決定する。塩基

配列をCLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) およびTREEVIEW 1.4 program (Page, 1996) を用いて解析し、系統樹を作成する。

3. 結果

本計画に基づいて野外麻疹ウイルスを検索し、ウイルス系統樹を作成した結果は図-1の通りである。

4. 考察

1970年代のわが国の流行MV株の遺伝型はE、1980年代ではC1およびD3であった。遺伝型C1についてHおよびF遺伝子を現行ワクチンの原株ウイルス(1950年代流行のEdmonston株=遺伝型A)と比較した結果、H遺伝子には58塩基に置換(アミノ酸置換13を伴う)を認めた。一方、F遺伝子では35塩基置換に対してアミノ酸置換は認められなかった。しかし、1990年代にはいりF遺伝子にも2～3カ所にアミノ酸置換を認め(未発表)、野外MVの変異動向は新たな段階にはいりつつあるものと推測される。

近年の野外MVのH蛋白は少なくとも2ヶ所の抗原決定基で変異をしめしている(未発表)。これら感染防御蛋白での変異動向はワクチンの有効性と密接に関連する予防行政上の重要な問題となることが推測される。最近、ワクチン既接種者の罹患も稀ではなくなっている。わが国の麻疹対策の立ち遅れは既に第三国から指摘されている。ワクチンの接種率を高め、麻疹を制圧することは国際社会の一員としての責務である。MVバンクの構築は麻疹のサーベイランス手法として必須であり、今後、麻疹の制圧に極めて有用な情報を提供するものと考えられる。