

厚生科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

感染症診断・検査手法の精度管理並びに
標準化及びその普及に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 14 (2002) 年 3 月

感染症診断・検査手法の精度管理並びに標準化
及びその普及に関する研究班
(平成 13 年度)

| 区分 | 氏名 | 所 属 | 職名 |
|-------|------------------------|-------------------|-------|
| 班 長 | 倉田 毅 | 国立感染症研究所 | 副所長 |
| 班 員 | 加藤 一夫 | 福島県衛生研究所 | 所長 |
| | 今井 俊介 | 奈良県衛生研究所 | 所長 |
| | 林 皓三郎 | 神戸市環境保健研究所 | 所長 |
| | 田中 智之 | 堺市衛生研究所 | 所長 |
| | 荻野 武雄 | 広島市衛生研究所 | 所長 |
| | 兒嶋 昭徳 | 名古屋市衛生研究所 | 所長 |
| | 井上 博雄 | 愛媛県立衛生環境研究所 | 所長 |
| | 宮崎 豊 | 愛知県衛生研究所 | 所長 |
| | 岡部 信彦 | 国立感染症研究所感染症情報センター | センター長 |
| | 田代 真人 | 国立感染症研究所ウイルス製剤部 | 部長 |
| | 宮村 達男 | 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 | 部長 |
| | 渡辺 治雄 | 国立感染症研究所細菌部 | 部長 |
| | 倉根 一郎 | 国立感染症研究所ウイルス第 1 部 | 部長 |
| | 佐多 徹太郎 | 国立感染症研究所感染病理部 | 部長 |
| 荒川 宜親 | 国立感染症研究所細菌・血液製剤部 | 部長 | |
| 遠藤 卓郎 | 国立感染症研究所寄生動物部 | 室長 | |
| 牧野 壮一 | 帯広畜産大学畜産学部獣医学科家畜微生物学講座 | 助教授 | |

目 次

I. 総括研究報告（平成 13 年度）

- 感染症診断・検査手法の精度管理並びに標準化及びその普及に関する研究…………… 1
班長 倉田 毅（国立感染症研究所副所長）

II. 分担研究報告

1. 劇症型溶連菌感染症と咽頭炎由来 A 群 β 溶連菌の差異に関する研究…………… 11
加藤 一夫（福島県衛生研究所長）
2. エンテロウイルスの診断法に関する基礎的研究…………… 14
今井 俊介（奈良県衛生研究所長）
3. 1) 角膜ヘルペス患者涙液中の単純ヘルペスウイルス（HSV-1）遺伝子の
Real Time PCR 法による定量
2) 角膜ヘルペスにおけるサイトカイン・ケモカインの発現と浸潤細胞による
実質免疫病変発症の機序について…………… 19
林 皓三郎（神戸市環境保健研究所長）
4. 磁性ビーズを用いたプリオン病診断方法の構築に関する研究…………… 23
田中 智之（堺市衛生研究所長）
5. アデノウイルス感染症診断における適切な検査法の選択に関する研究…………… 25
荻野 武雄（広島市衛生研究所長）
6. エーリキアの検査法（同定）に関する基礎的研究…………… 33
児嶋 昭徳（名古屋市衛生研究所長）
7. 髄膜炎菌検査法の標準化についての研究…………… 39
井上 博雄（愛媛県立衛生環境研究所長）
8. 手足口病及びヘルパンギーナの検査法に関する開発・改良についての研究…………… 45
宮崎 豊（愛知県衛生研究所長）
9. 診断・検査法の普及に関する研究…………… 49
岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター長）
10. 麻疹ウイルス診断・検査法
野外麻疹ウイルスの分離と遺伝子型解析及びゼラチン粒子凝集法（PA 法）を
用いた新しい麻疹 IgM 抗体測定法の開発…………… 53
田代 真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部長）
11. E 型肝炎診断法の開発に関する研究…………… 60
宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第 2 部長）

| | | |
|------|---|----|
| 12. | レンサ球菌の <i>emm</i> タイピングの導入と比較…………… | 65 |
| | 渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌部長) | |
| 13. | アルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立と標準化に関する研究…………… | 68 |
| | 倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第1部長) | |
| 14. | 病理組織材料を用いた病原体の検出と感染症診断への応用に関する研究 —新規に発見されたウイルス「ヒトヘルペスウイルス8」の診断—…………… | 75 |
| | 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長) | |
| 15. | 通常の細菌学的同定検査により同定不可能な菌種の同定法に関する検討…………… | 81 |
| | 荒川 宜親 (国立感染症研究所細菌・血液製剤部長) | |
| 16. | 赤痢アメーバ (<i>Entamoeba histolytica</i>) 症の血清診断法の標準化及びその普及…………… | 87 |
| | 遠藤 卓郎 (国立感染症研究所寄生動物部室長) | |
| 17. | 細菌感染症・炭疽の診断法の標準化に関する研究…………… | 91 |
| | 牧野 壮一 (帯広畜産大学獣医学科家畜微生物学講座助教授) | |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表…………… | 99 |

1. 総括研究報告書

感染症診断・検査手法の精度管理並びに標準化 及びその普及に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨 感染症の発生情報を正確に把握し、その結果を国民や医療関係者に的確に提供することは、感染症の制圧に向け最も重要な方策の一つである。血清および病原体診断の感染症確定診断における持つ意義は大きい。しかし、検査・診断方法の選択は施設ごとに異なっている場合が多く、同様の方法を用いていたとしても、全国的に標準化されたものではなく、精度やレファレンスは施設ごとに異なっていることが多い。本研究においては、このような問題を解決するために、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において規定される 73 疾患を中心として、診断検査手法の標準化と普及が遅れている感染症に関し、(1) 血清および病原体診断法を確立あるいは再検討する、(2) 広く行われている診断・検査法については標準化、精度管理、レファレンス供給のシステムを構築する、(3) 診断・検査法を全国的に普及させるための基礎資料を作製する、(4) 検査法マニュアル作製の基礎資料を作製する、ことを目的とする。これまで、感染症の検査・診断法、精度管理、標準化および普及に関しては、感染症研究所や地方衛生研究所の担当部局、あるいは学会等が独自の形で各々の病原体に対処してきた部分が多い。また、病院検査室、大学、民間検査会社への検査・診断法の普及も十分とはいえない。本研究は、感染症の検査・診断法の精度管理、標準化、レファレンス供給のシステムを全国規模で構築するという点で、国民の保健・医療の向上に大きく貢献する。

分担研究者

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 加藤 一夫 (福島県衛生研究所長) | 宮村 達男 (国立感染症研究所 ウイルス第 2 部長) |
| 今井 俊介 (奈良県衛生研究所長) | 渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌部長) |
| 林 皓三郎 (神戸市環境保健研究所長) | 倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス第 1 部長) |
| 田中 智之 (堺市衛生研究所長) | 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所 感染病理部長) |
| 荻野 武雄 (広島市衛生研究所長) | 荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部長) |
| 兒嶋 昭徳 (名古屋市衛生研究所長) | 遠藤 卓郎 (国立感染症研究所 寄生動物部室長) |
| 井上 博雄 (愛媛県立衛生環境研究所長) | 牧野 壮一 (帯広畜産大学獣医学科助教授) |
| 宮崎 豊 (愛知県衛生研究所長) | |
| 岡部 信彦 (国立感染症研究所 感染症情報センター長) | |
| 田代 真人 (国立感染症研究所 ウイルス製剤部長) | |

A. 研究目的

近年、感染症は国民の健康にとり益々大きな脅威となっている。感染症の発生情報を正確に把握し、その結果を国民や医療関係者に的確に提供することは、感染症の制圧に向け最も重要な方策の一つである。新たに、施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」においては、73 疾患について報告が義務づけられている。診断にあたっての臨床所見の重要性は言うまでもないが、血清および病原体診断の確定診断における持つ意義は大きい。血清や髄液中の特異抗体を調べる方法として ELISA、HI 法、中和法等が用いられるし、一方、病原体診断においても病原体分離や Polymerase chain reaction (PCR) 等種々の方法が用いられる。しかし、診断方法の選択は施設ごとに異なっている場合が多い。さらに、同様の方法を用いていたとしても、多くの場合全国的に標準化されたものではなく、精度、特異性やレファレンスは施設ごとに異なっていることが多い。このことは、種々の感染症の発生に関する情報の信頼性を損なうことにもなりうる。本研究においては、このような問題を解決するために、上記 73 疾患を中心として、以下の 5 点を目的として行うものである。(1) 各感染症に対する血清および病原体診断法を確立、あるいは再検討する、(2) 広く行われている診断・検査法については標準化、精度管理のシステムを構築する、(3) 診断・検査法を全国的に普及させるための基礎資料を作製する、(4) 検査法マニュアル作製の基礎資料を作製する、(5) 地研と共に感染症診断マニュアルを疾患毎に作成中であり、完成した物から順次印刷する。以上のように、本研究は、感染症の診断・検査をとおして、その制圧に直接的に関わるものである。従って、国民の保健・医療の向上に大きく貢献する。

B. 研究方法

本研究は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に含まれる疾患及び新たな感染症のうち診断・検査法の開発、精度管理と標準化が遅れているものを対象として、次の点を目的として行うものである。(1) 各感染症の血清、病原体診断法を確立する、(2) 診断・検査法について標準化、精度管理のシステムを構築する、(3) 診断検査法については感染研、地方衛生研究所、病院検査室、大学医学部、民間検査機関で共通の方法で検体が扱えるよう技術の普及をはかる、(4) 上記の検査法の開発、

改良に基づいて感染症の診断・検査マニュアルを作製する。

研究計画は下記のようになるが、研究は分担研究者各自の機関において実施した。

I. 診断・検査法の新たな開発、および再検討に関する研究

以下、各病原体ごとに、感染症研究所・地方衛生研究所の担当者によるグループを作り対応する。

- 1) 各感染症に対する血清診断法を確立する。すでに、確立されているものについては、その再検討を行う。(赤痢アメーバ、麻疹、デング熱、髄膜炎菌等)
- 2) 各感染症に対する病原体診断法を確立する。すでに、確立されているものについては、その再検討を行う。(麻疹、下痢症ウイルス、エンテロウイルス、E 型肝炎、デング熱等、種々の菌の遺伝学的菌種同定法の精度の向上)
- 3) 感染症の病理診断に必要な検査法の確立：病理材料診断に使用しうるエンテロウイルス等のプローブ開発、HybriAT 法の応用技術開発。(カポジ肉腫とヒトヘルペスウイルス 8)

II. 精度管理と標準化に関する研究

- 1) 感染症研究所・地方衛生研究所及び臨床の病原体、血清診断の多くを担当している民間検査機関の担当部局において、各診断・検査法の精度を確認する。
 - 2) 国際標準との整合性をとりながら、診断・検査法の標準化を行う。(ウイルス学会検査体制委員会との連携)
 - 3) 標準サンプルの維持、供給のためのレファレンスシステムを構築する。
 - 4) 精度維持のためのシステムを構築する。
- 3)、4) については今後に残されている。

III. 診断・検査法の普及に関する研究

感染研、地方衛生研究所、病院検査室、大学、民間検査機関への普及

- 1) 感染研、地方衛生研究所、病院検査室、大学、民間検査機関への診断・検査法の普及のための、講習会や実習のシステムを構築する。
- 2) 診断・検査マニュアルの作製を行う。
- 3) 新しい診断・検査法や方法の変更を上記各機関に伝達し、逆に質問、問題点の指摘を受ける連絡システムを構築する。

上記 I.及び II.の成果をもとに診断・検査マニュアルの作製のための基礎資料を作製する。

C&D. 研究結果と考察

1. 感染症の実験室診断・検査法（血清、病原体）の開発・改良

(1) ウイルス関係

① デング出血熱の病原体診断法と西ナイル熱の血清・病原体診断法の確立と標準化

デング熱ではウイルス分離、PCR 法では発熱時にはどの患者でも陽性であるが、解熱後は陰性となる。IgM 捕捉 ELISA 法と併用することにより発症からの時期によらず実験室診断が可能となる。また西ナイル熱ウイルスは日本脳炎ウイルスと抗原の交差反応がある。西ナイル熱ウイルスに対する IgM 捕捉 ELISA を作製し、日本脳炎患者血清を用いて検討した結果、IgM 抗体においても交差反応が認められた。そこで日本脳炎に対する IgM 捕捉 ELISA を同時に実施したところ全ての血清が日本脳炎に対してより強く反応し、IgM 捕捉 ELISA が鑑別診断に用いることが示唆された。また西ナイル熱ウイルスの PCR 法による遺伝子検出法も確立した。これらから西ナイル熱についても病原体診断法と血清診断法を併用することにより発症からの時期によらず実験室診断が可能となると考えられる（倉根）。

② 野外麻疹ウイルスの分離と遺伝子解析及びゼラチン粒子凝集法（PA 法）を用いた新しい麻疹 IgM 抗体測定法の開発

ウイルス分離：2001 年 4-10 月の間に患者血液、咽頭ぬぐい液、尿等をマーマセトリンバ球 B95a 細胞に接種し、7 株が分離された（札幌から沖縄まで）。札幌と沖縄の例は地方衛生研究所で分離された。患者年齢は 1 才以下～21 才以上に分布する。分離ウイルスは N 遺伝子の C 末端（1230～1685）の塩基配列から遺伝子型を CLUSTAL W（解析ソフト）を用いて系統樹を作製すると日本全国の大部分はどこでも D5 型で、沖縄では全て D3 型であった。また川崎と東京では H1 型もみられているが、これは中国、韓国の流行株である。この型が今後日本国内でどのように拡がるかは長期間の追跡が必要であろう。また野外

分離株は MWi/City·Country/Weeks-Year/Strain number [Genotype] と表示する。

PA 法による麻疹 IgM 抗体測定法について：麻疹自然感染者の血漿、血清検体で PA-IgM 抗体価を測定したところ、発疹出現第 1 日目から 5 日までの間に全例陽性となった。PA 抗体は発疹出現後 7～14 日の間に最高値を示し約 3 ヶ月間持続した。また弱毒生麻疹ワクチン接種後 PA 法により IgM 抗体は 10 日目以降に検出されるようになる。3 週に入ると大部分の接種者の IgM 抗体は低下する。自然感染に比べ抗体持続期間が短かった。この PA 法はマイクロピペット 1 本で測定可能であること、手技が簡単であること、電気を使用しないことからいかなる場所でも測定が可能であり、凝集パターンを最終的に肉眼で可能なことが最も重要な点で WHO の麻疹根絶計画において簡便な IgM 抗体測定法の開発が望まれていることからこの方法の有用性についてアフリカ、南米等の開発途上国で検討中である（田代）。

③ アデノウイルス感染症の診断における適切な検査法の選択

広島市で 1983～2000 年の間に分離されたアデノウイルス 22 型株は、いわゆる中間型で中和試験では 22 型を、HI では 8 または 9 型（Ad22/H8、9）と 10、19 または 37 型（Ad22/H10、19、37）を示す 2 種類が認められた。全ウイルスの DNA の制限酵素切断解析によりそれぞれに 2 種の遺伝子型が認められた。ヘキソン領域増幅 PCR と制限酵素切断との組み合わせによる型別ではプロトタイプとは異なる遺伝子型であるが、22 型と同定可能であった。これらをふまえ中和、HI、遺伝子検査によるアデノウイルスの同定上の問題点、利点を検討した。その結果従来法での中和、HI 法と遺伝子検査法は互いに排他的ではなく相補的であり、適宜組み合わせでよりの確な同定が行えらるゝと考えられる（荻野）。

④ 手足口病及びヘルパンギーナの検査法に関する開発・改良に関する研究

エンテロウイルスの全血清型 63 種のうち遺伝子翻訳開始部位から 400 塩基（VP4 全域と VP2 の一部：VP0）の配列が未だ報告されていない 41 血清型について、その標準株を用いて塩基配列の決定を試みた。既に公表されている 22 種の血清型についての塩基配列と今回我々が得た結果を合わせて解析したところ、63 種の血清型ウイ

ルスは 4 つのグループに分けられ、それぞれ A～D 群のヒトエンテロウイルスの分類と一致した。また、実際に分離されたヒトエンテロウイルス A 群 53 株 (8 血清型) について、同様の系統樹解析を行なったところ、それぞれの血清型と一致したグループに分類することができた。さらに、中和反応によっては血清型別分類が不能であった 25 株も塩基配列の系統樹解析により CA16 型と EV71 型に分離可能であった。以上の結果から、遺伝子解析による血清型別分類はエンテロウイルスの診断において有効な手段となる可能性が強く示唆された (宮崎)。

⑤ エンテロウイルスの診断法に関する基礎的研究

2000 年 4 月から 9 月に、奈良県内でエコーウイルス 9 型を原因とする無菌性髄膜炎、発疹症ならびに発疹を伴う上気道炎患者が多発した。その原因ウイルスはエコーウイルス 9 型であったが、型別を決定する中和反応の結果は、必ずしも良好ではなかった。本研究では、エコーウイルス 9 型の診断法として PCR による遺伝子検索法の導入を試みた。結果は、標準株: Hill 株、準標準株: Barty 株両者に共通する VP1 領域内での 9 型特異配列を見出したことで、2C 領域との間で良好なシンプルバンドが得られた。現在、遺伝子産物の塩基配列の判読を試みている。以上の結果より、PCR 法を用いた新たなエンテロウイルスの診断法の確立に向けての基礎的研究成果が得られたと考えている。

⑥ ヒト角膜ヘルペス患者涙液中の HSV-1 遺伝子の検出

Real Time PCR 法により各病型の角膜ヘルペス涙液中の HSV-1 DNA 量を測定した。上皮型角膜ヘルペス HSV-1 DNA 量は平均 1.0×10^5 copies/シルマー試験紙採取サンプル、実質型 (活動期) 角膜ヘルペス DNA 量は 8.0×10^4 copies/サンプル、実質型 (沈静期) 角膜ヘルペス DNA 量は 0/サンプルであった。治療中の症例では検出限界以下であった。また両側の帯状角膜変性患者の角膜にエキシアレーザー切除術実施 3 日後の涙液から 2.0×10^5 、 1.3×10^5 copies/サンプルの HSV-1 DNA が検出された。これから Real Time PCR 法により角膜ヘルペスの各病変時のウイルス量を知ることが可能である。さらに活動期実質型角膜炎でのウイルス量が急性期の上皮型角膜炎と同様のウイルス量を示したこ

とは病変阻止の上でウイルス増殖抑制が重要であることを示している (林)。

⑦ E 型肝炎診断法の開発に関する研究

E 型肝炎ウイルスの組換え中空粒子を発現し、これを抗原に用いた抗体検出 EIA を構築し E 型肝炎の血清診断法を確立した。また、中空粒子を免疫して高力価血清を作製し、抗原捕獲 EIA を構築し、抗原検出法を確立した。血清疫学調査から E 型肝炎が少なからずわが国にも存在することが示唆された。依頼検査で試験した非 A 非 B 非 C 型急性肝炎の 25% が E 型肝炎であった。そのうちの一例は外国渡航歴が全く無く、わが国にも E 型肝炎が土着していることが示唆された (宮村)。

⑧ 病理組織材料を用いた病原体の検出と感染症診断への応用に関する研究—新規に発見されたウイルス”ヒトヘルペスウイルス 8”の診断—

新規に発見されたウイルスにつき、生検剖検組織を用いたウイルス感染症の病理学的診断および血清抗体を検出する血清診断法を確立し、実際の症例で検討した。新種のヘルペスウイルスであるヒトヘルペスウイルス 8 につき、その感染細胞から cDNA ライブラリーを作成し、感染者血清を用いて免疫スクリーニングをすることにより、ウイルスの抗原蛋白を同定した。これら抗原蛋白のリコンビナント蛋白を作成し、血清抗体検出法を確立した。この系を用い、日本人健常人の血清を検討、日本人における感染率を明らかにした。また、このリコンビナント蛋白をもちいてウサギポリクローナル抗体を作成し、組織における感染細胞の同定に成功した。この抗体を用いて、カポジ肉腫症例 25 例につき免疫組織を行ったところ 25 例すべてに感染細胞が同定された。ここで確立された手法は新たに発見された病原体に対する診断法確立のモデルとなるものと考えられる (佐多)。

(2) 細菌関係

① エーリキアの検査法 (同定) に関する基礎的研究

蛍光抗体法によるスライドガラス上での抗体検出のため、エーリキア属に分類される E.muris および HF565 株 (E.muris と遺伝学的に異なる) の抗原作成法を検討した。マウスを用いた方法では、E.muris は腹水浸出細胞 (マクロファージ) を用いる事で良好な結果を得たが、HF 株は腹水浸出細

胞には感染が認められず、抗原作成が困難であった。また、抗原を安定して作成するためにはアナプラズマの培養細胞での増殖が不可欠となるため、これらアナプラズマの株化細胞による培養を試み、両者とも細胞への感染および継代に成功した。E.muris は培養細胞での継代を重ねることにより、ほぼ 100%の細胞に感染させることができ、蛍光抗体検査用抗原としても良好であった。しかし、HF 株は 2~4%の感染細胞しか得られず今後の検討が必要であった。E.muris 抗原および分類を異にするヒトに感染するアナプラズマ (Anaplasma phagocytophila) を抗原として、197 件の北海道在住のヒト患者血清を用いアナプラズマ抗体検出を試みた。その結果、E.muris 抗原に対し 5 人の血清中に抗体が検出された。しかし、A.phagocytophila に対する抗体は検出されなかった。一方、アナプラズマ遺伝子を PCR で検出する方法についても検討した。E.muris、HF 株、および A.phagocytophila の 16S rRNA シークエンスからプライマーを作成し、PCR を試みた。いずれのプライマーを用いても良好な結果が得られた。そこで、実際にアナプラズマのベクターであるダニを採取し遺伝子検出を行った。北海道をはじめとして日本各地で採取された約 400 個体のダニについて PCR を行ったところ、複数の PCR 産物を得た。そこでそれらについてシークエンスを行ったところ、E.muris および HF 株の検出に成功すると共に、それらとは異なる新しいアナプラズマ遺伝子を検出した。A.phagocytophila は検出できなかった (兒嶋)。

② 通常の細菌学的同定検査により同定不能な菌種の同定法に関する検討

臨床現場では、アミノ酸や糖の分解性、ガス産生性、運動性などが細菌の同定検査の基本的指標として用いられており、これらにより大半の菌種の同定が可能となっている。しかし、本同定法では、属までしか同定できない菌株や「同定不能」と処理されている臨床分離株も少なくない。そこで、本研究では、国内の医療施設で患者の血液などから分離された菌株について、細菌の菌種に特異的な遺伝子例えば、16S rRNA 遺伝子や DNA polymerase 遺伝子の塩基配列から菌種を特定し、同定困難菌の同定を行う方法を検討した。対象菌種としては、非結核性抗酸菌群、コアグラウゼ陰性ブドウ球菌属、Enterococcus 属、Bartonella

属、Streptobacillus 属、Campylobacter 属などを想定しその実用性を検討した。

その結果、テイコプラニンに中等度耐性 (MIC, 16 μ g/ml) を示した Staphylococcus capitis、ネズミ咬傷後の敗血症患者の血液から分離された Streptobacillus moniliformis、バンコマイシンに高度耐性 (MIC, >128 μ g/ml) を示す Enterococcus raffinosus など通常の同定検査法では菌種の同定が困難な希少な菌種が同定された。本同定検査法は、従来の同定法により菌種の同定が難しい菌株についても、菌種を推定ないし特定する事がある程度可能であり、実用上有用である事が確認された。しかし、一般の細菌検査室などにおいて常時、実施することは、手間やコストの面で無理があるものの、感染症危機管理などの視点から、地方衛生研究所や国立感染症研究所などの後方支援研究施設における特殊検査として確立し技術を温存する必要がある (荒川)。

③ レンサ球菌の emm タイピングの導入と比較

レンサ球菌の型別には M 型別と T 型別が使用されてきている。T 型別用の抗体は市販されており、研究及び調査用に利用されている。一方、M 型別は、レンサ球菌の菌体表面のタンパク質抗原の構造の多様性を利用しており、菌の型別と疾病との関係があるとされ臨床的にも有用であるが、M タンパク質が不安定であるためその精製が難しく、81 種類あるすべての M 抗原に対する抗体が作成しにくい状況にある。そのため検査用抗体は市販されておらず、in house で作成して用いているのが現状であり、どこでもできるというものではない。近年 M タンパク質抗原に対する遺伝子 (emm) の配列の多様性を利用して、型別に供することが可能になった。本研究においてはその方法を導入し、我が国で分離されるレンサ球菌において emm 遺伝子型別が可能であるのかおよび既存の M 型別との相関性があるのかを調査した。その結果、相関性があり、実際に使用できることを明らかにした (渡辺)。

④ 劇症型溶連菌感染症と咽頭炎由来 A 群 β 溶連菌の差異に関する研究

劇症型 A 群溶連菌感染症における、菌側の問題点を検討する目的で、劇症型溶連菌感染症由来 A 群 β 溶連菌と同時期に咽頭炎患者より分離された A 群レンサ球菌との異同を明らかにする目的で、T 型別および M 型

別と発熱毒素の検討を行った。その結果、これら通常行っている検査によっては、両者間には差を認めることは出来なかった。これは、劇症型A群溶連菌感染症の発症には、溶連菌の持つ性質の差のみならず、宿主側の因子が加味されている可能性が示唆された（加藤）。

(3) プリオン

磁性ビーズを用いたプリオン病診断法の構築に関する研究

プリオン病の診断に繁用されている免疫組織染色法やウエスタン・ブロット法に対し、血清などの体液を用いて、より簡便な測定方法の構築を検討した。免疫磁気ビーズ法を応用したモノクローナル抗体と免疫ウサギ抗血清を用いた検出系は、大腸菌発現プリオン蛋白を 50pg/ml の感度で検出できた。この測定系が果たしてどの程度の臨床的応用に供しうるかは今後の検討課題である。即ち健康人血清、CJD を含む種々の患者血清との反応性の検討、血液以外の体液、尿等での測定の可能性、モノクローナル抗体のみでの検出系の構築等である（田中）。

2. 実験室診断検査法の標準化に関する研究

(1) 細菌関係

① 炭疽の診断法の標準化に関する研究

一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言える。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。炭疽菌の迅速検出法は確立されつつあるが、今回のアメリカで起きた炭疽菌テロ騒動に引き続いて我国で起きた『白い粉騒動』では、炭疽菌に対する検査体制が国内で整備されていない現状が明らかにされた。炭疽菌自体の認知度の低さもさること

ながら、国内における迅速かつ確実、そして画一的な検査法が確立していないことが大きな原因であった。そこで、現在までの炭疽菌の検査に関わってきた基礎研究を応用して、迅速な診断キットを作製したので、その評価を行った（牧野）。

② 髄膜炎菌検査法の標準化についての研究

感染症法 4 類全数報告に該当する髄膜炎菌性髄膜炎は、わが国では近年毎年 10 例前後と僅少であり、臨床的関心も薄らぎ、診断能力・検査能力の低下が危惧される。当研究では、再興感染症として突発的に集団感染や地域流行など健康危機の事態が発生する可能性のある髄膜炎菌性髄膜炎への関心を啓発するとともに、衛生研究所や病院検査室へ検査法の標準化とその普及を図った。又その検査法を用い、扁桃摘出術を行った扁桃からナイセリア菌分離・同定を行い 45 検体中 1 検体、また臨床での咽頭ぬぐい液から 170 検体中 1 検体、それぞれ *Neisseria lactamica* を分離した。更に、感染症診断・検査手法の計画的な維持、向上、開発及び普及とその精度管理を可能とするためには衛生微生物協議会での感染研-地研レファレンスネットワークの活用と充実、ひいては制度化が望まれることを考察した（井上）。

(2) 寄生虫・原虫関係

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 症の血清診断法の標準化及びその普及

アメーバ赤痢の診断に際しては *Entamoeba histolytica* と形態的同種である *E. dispar* との鑑別診断が重要である。我が国では検便による虫体の検出が広く用いられているが、検便では「病原種 / 非病原種」の鑑別診断には至らず、血清抗体価または PCR による特定の遺伝子配列の増幅・検出などの補助的確認が求められている。ELISA 法はすでに多くの疾病の検査方法として普及しているもので、アメーバ赤痢の診断にも採用されるべき方法と考えられることから、本研究事業においてアメーバ赤痢診断に向けた ELISA 法の条件設定を行った。すなわち、赤痢アメーバの大量培養による抗原作製、反応系における抗原至適濃度の検討、カット・オフ値の選択など、試験条件の至適化を行った。試験方法の普及に向けては抗原および陽性血清の入手が必須要件で、今後は医療機関の協力を得たいと考えている。また、ELISA の特徴として、抗原を換えることで多くの疾患の血

清診断として適用することができることから、赤痢アメーバにとどまらず水系感染の原虫類として注目されるクリプトスポリジウム、ジアルジア、サイクロスポラ、イソスポラ、トキソプラズマ等々の抗原を順次供給することを本研究事業の構想に加えている（遠藤）。

3. 病原体情報システムの構築と強化

感染症情報センターでは疾患のサーベイランスと共に病原体のサーベイランスを行っている。平成 12 年には全国で分離された病原体につき、疾患別、病原体別、発生状況別に検体採取日順に並べ WISH ネットに掲載している。平成 13 年度はこれらに関するシステムの一部変更などが行われた。感染研および地研が協力して診断・検査マニュアルの作製が行われているが、感染症情報センターでもその一部を担当し作成中である。検査法を含めた感染症対策に関する講習会の実施などについては、現在感染症情報センターにおいて、全国あるいは各地を対象とした感染症危機管理研修会の開催などを行っている（岡部）。

4. 病原体診断マニュアルについて

平成 13 年度末までに“感染症法（仮）”にある全疾患とその他必要と考えられる疾患についての、あるいは持続的診断法、バイオセーフティ上の対応等について一定のフォームに沿い感染研と地研の合同メンバーで素案を作成した。現在全マニュアル集を全ての地研担当者に送付し修正中である。完成度の高いものから、冊子として公表する予定である。

E. 結論

病原体の検出とその解析技術は日進月歩の状態であることは上記の結果をみても一目瞭然である。かなり完成度の高い状況の診断法については次々とマニュアル化し、全国で同一基準で測定した結果を抗体、遺伝子等につき比較可能となるようにする必要がある。

F. 研究発表

別紙参照。

G. 健康危険情報

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

II. 分担研究報告

1. 劇症型溶連菌感染症と咽頭炎由来A群β溶連菌の差異に関する研究

分担研究者 加藤 一夫 福島県衛生研究所長

研究要旨 劇症型A群溶連菌感染症における、菌側の問題点を検討する目的で、劇症型溶連菌感染症由来A群β溶連菌と同時期に咽頭炎患者より分離されたA群レンサ球菌との異同を明らかにする目的で、T型別およびM型別と発熱毒素の検討を行った。その結果、これら通常行っている検査によっては、両者間には差を認めることは出来なかった。これは、劇症型A群溶連菌感染症の発症には、溶連菌の持つ性質の差のみならず、宿主側の因子が加味されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

A群溶連菌感染症は、紀元前からその存在が知られていた比較的歴史的には古い感染症の一つである。加えて、小児の細菌性上気道炎の過半数を占めるごくありふれた常在菌でもある。しかしながら、それによってもたらされる病態はさまざまであり、その発症機序も完全に解明されているとは言い難い。更に、近年その存在が明らかとなった劇症型A群溶連菌感染症(Severe invasive streptococcal infectionsまたはStreptococcal toxic shock-like syndrome)は、猩紅熱が減少してきた1980年代中頃にその存在が確認されてから、1990年以降に症例の報告数が急増してきた。劇症型A群溶連菌感染症は、発症に至ると軟部組織炎、多臓器不全等を生じ、その予後がかなり不良であることと共に、その発症機序がほとんど解明されていないことが大きな問題である。そして、本症の家族から同一型の菌が分離されても、患者以外に二次発症を認めないこと、突然変異株や新種の毒素が発見されていないことなどから、宿主側にも発症要因があるとの意見がある。一方、宿主側に特記すべき既往症や基礎疾患を認める場合は決して多いものではない。以上より、菌側の問題点の有無を検討する目的で、劇症型溶連菌感染症由来A群β溶連菌と同時期に咽頭炎患者より分離されたA群レンサ球菌との異同の検討を行った。

B. 研究方法

対象： 2000年に経験した劇症型溶連菌感染症6例由来A群β溶連菌6株及び同年に咽頭炎患者より分離されたA群連鎖球菌のうちT1型の18株を対象とした。

方法： 両者について、Lancefield血清型による群別、菌体成分に対する血清学的な反応であるT型別およびM型別を行った。T型別は抗血清によるスライド凝集反応、M型別についてはゲル内沈降反応であるOuchterlony法により実施した。そして菌体外毒素としての発熱毒素(streptococcal pyrogenic exotoxin；以下SPEと略す)A、B、Cをコードする遺伝子speA、speB、およびspeCについてPCR法による検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究遂行上、個人情報に関するものを取り扱わず、動物実験等を行っていないので倫理面で問題を生じるおそれはない。しかし、対象病原微生物はヒト由来であるため、その使用にあたっては個人を特定する情報を含まぬように人権擁護上の配慮を行い、不利益を被ることはないように留意した。

C & D. 研究結果と考察

劇症型溶連菌感染症は、猩紅熱が減少してきた1980年代中頃にその存在が確認されてから、90年以降に症例の報告数が急増してきた。そして、その大部分がA群連鎖球菌によるものであった。今回の6症例も同様で、劇症型溶連菌感染症患者由来菌株の検査結果（表1）は、6株ともにA群連鎖球菌となり、T型別はT1型とT28型であった。M型別では、T1型を示した菌株は抗M1血清に沈降線がみられてM1型となり、T28型は2株のうち1株がM28型、1株は明確な沈降線が得られず判定不能であった。SPEに関しては、T1型がspeAとspeBを保有し、T28型がspeBとspeCあるいはspeBのみを保有していた。咽頭炎由来A群β溶連菌T1型18株（表2）について、M型別を実施した結果はすべてM1型となり、SPEはspeAおよびspeBを保有していた。

劇症型溶連菌感染症から分離される割合が多いのは、M1とM3型菌といわれているが、今回の6株のうち4株がM1型であった。2株のT28型のうち1株についてはOuchtelony法では判定不能であったが、DNA解析からはM28をM蛋白として持っていることより、M28型と考えられた。なお、T28型は前年の咽頭炎患者からの分離溶連菌に占める検出割合が、高い傾向であった。

A群溶連菌感染症は、歴史的には古くからその存在が知られていた感染症の一つであり、小児の上気道炎起因菌の過半数を占める比較的ありふれた細菌感染症である。しかし、それによって引き起こされる病態は扁桃炎、咽頭炎などの軽症なものから毒素性疾患としての猩紅熱、二次性疾患としての急性糸球体腎炎やリウマチ熱、死亡率の高い劇症型溶連菌感染症と多彩であると同時に、それらの多くは発症機序に関して明確とはなっているものは少ない。特に劇症型溶連菌感染症は、その発症機序がほとんど解明されていないのが現状である。本症の家族から同一型の菌が分離されても、患者以外に二次発症を認めないこと、突然変異株や新種の毒素が発見されていないことなどから、宿主側の発症要因が大きいとの意見がある一方で、宿主側に特記すべき既往症や基礎疾患を認める場合は決して多いものではなく、診断基準に免疫不全をきたす可能性のある基礎疾患を有しないことを追加しようとする考えも認められている。

本研究では、劇症型溶連菌感染症由来A群β溶連菌株と及び同年に咽頭炎患者より分離されたA群連鎖球菌との異同を、感染防御に関係するM蛋白の分類と菌体外毒素として重要

なSPE遺伝子の検出によって検討したが、両者には全く差は認められなかった。これは、これらの検査では検出できない、今までにはない未知の病原因子を獲得したこと、或いは生体内の環境ですでに細菌が保持している病原因子の発現量が上昇するような変異を獲得したなどを否定は出来ないものの、宿主側の要因も加味して発症に至るという複合的なものと考えないと、これまで明らかとなった事象を説明することは困難であることを示しているものと思われた。そして、発症病態を明らかにするためには、今後更なる詳細な細菌学的検討を加えることが必要であると考えられる。

E. 結論

劇症型溶連菌感染症と咽頭炎由来A群β溶連菌の差異をLancefield血清型による群別、T型別およびM型別およびSPE遺伝子型別を比較検討した。その結果、劇症型溶連菌感染症患者由来菌株は、通常分離される咽頭炎患者由来A群連鎖球菌と何ら変わりがなく、これらからは両者に差を見出すことはできなかった。

以上から、劇症型溶連菌感染症の発症機序として、宿主と細菌双方の複合的要因を考える必要があることが示唆されたが、発症病態を明らかにするためには、今後更なる詳細な細菌学的検討を加えることが必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的所有権の取得状況

なし。

表 1. 劇症型溶連菌感染症患者由来菌株の結果

| 症例No. | 発症年月 | 年齢 | 性別 | 群別 | T型別 | M型別 | spe(PCR) | 転帰 |
|-------|-------|----|----|----|-----|------|----------|----|
| 1 | 00/2 | 76 | 男 | A | 1 | 1 | AB | 死亡 |
| 2 | 00/4 | 39 | 男 | A | 1 | 1 | AB | 死亡 |
| 3 | 00/4 | 49 | 女 | A | 28 | 判定不能 | BC | 軽快 |
| 4 | 00/7 | 69 | 男 | A | 1 | 1 | AB | 軽快 |
| 5 | 00/10 | 80 | 男 | A | 28 | 28 | B | 死亡 |
| 6 | 00/10 | 3 | 男 | A | 1 | 1 | AB | 軽快 |

表 2. 咽頭炎患者由来溶連菌 T1 型株の検査結果

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| M型 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 |
| SPE 遺伝子 | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB |
| | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| M型 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 | M1 |
| SPE 遺伝子 | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB | AB |

2. エンテロウイルスの診断法に関する基礎的研究

分担研究者 今井 俊介 奈良県衛生研究所長

研究要旨 2000年4月から9月に、奈良県内でエコーウイルス9型を原因とする無菌性髄膜炎、発疹症ならびに発疹を伴う上気道炎患者が多発した。その原因ウイルスはエコーウイルス9型であったが、型別を決定する中和反応の結果は、必ずしも良好ではなかった。本研究では、エコーウイルス9型の診断法としてPCRによる遺伝子検索法の導入を試みた。結果は、標準株：Hill株、準標準株：Barty株両者に共通するVP1領域内での9型特異配列を見出したことで、2C領域との間で良好なシンプルバンドが得られた。現在、遺伝子産物の塩基配列の判読を試みている。以上の結果より、PCR法を用いた新たなエンテロウイルスの診断法の確立に向けての基礎的研究成果が得られたと考えている。

A. 研究目的

エコーウイルスはエンテロウイルス属に分類され、現在32種が知られている。その特徴は、夏季に流行がみられる無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナならびに発熱と上気道炎を主症状とする夏かぜや発疹症など、広い範囲の諸器官系で、多彩な臨床症状を引き起こすことである。2000年、4月から9月にかけて県内各地で無菌性髄膜炎、発疹症ならびに発疹を伴う上気道炎患者が蔓延した。ウイルス同定の結果から主原因は、エコーウイルス9型であることが判明した。型識別では単味9型抗血清での中和試験は良好であったが、混合抗血清およびプール抗血清とは不一致例がいくつか観察され、型別を決定するまでにいたらなかった症例を経験した。一方、エンテロウイルス属の構造解析に分子生物学的手法の導入が進み、VP1領域のアミノ酸配列が中和試験のantigenic siteを良く反映することが指摘されている¹⁾。2001年、Caro V²⁾らは、エンテロウイルスの“serotyping”を目的としたエンテロウイルス共通の特異的プライマーの作成をVP1から2C領域で遺伝子増幅することに成功した。今回の研究は、遺伝子増幅法を用いCaro V²⁾らの示したVP1から2C領域においてエコーウイルス9型に特異的な配列を見出したもので、PCR法が型識別法の新たな手段として期待で

きるものと思われる。

B. 研究方法

1. 材料と標準株

材料は2000年4月から9月の間に、県内の感染症発生動向調査協力医療機関で無菌性髄膜炎と診断された生後3ヶ月児から16歳児までの患者咽頭ぬぐい液である。ウイルス分離が試みその中でエコーウイルス9型に対する単味抗血清で中和試験が成立したが、混合抗血清ならびにプール抗血清では不一致であった12例と、いずれの混合抗血清とも反応が不十分であった7例を対象とした。標準株：E5, E9, E15, E16, E17, E30, Cox A9, Cox B5, Polio (Sabin)については国立感染症研究所、米山徹夫博士から提供を受けた。

2. ウイルス分離と中和試験

ウイルス分離はMA-104, Hep-2およびRD-18S細胞を用い、形態学的に細胞変性をきたした検体の培養上清から血清学的にウイルス種および型別を決定した。中和試験に用いた混合抗血清は市販抗血清（デンカ生研株式会社、東京）、プール抗血清（EP-95）および各型の単味抗血清（デン

カ生研株式会社、東京)を用い常法に従って行った。

3. RNA抽出とcDNA合成

ウイルスからのRNA抽出はRNAzol (Tel-Tese Inc., TX)を用いた。cDNAの合成はSuperScript RNase H逆転写酵素(Gibco BRL)で42℃、1時間の反応を行った。

4. エコーウイルス9型の特異プライマーの作成とPCR

VP1領域内でのエコーウイルス9型の特異配列の選択は、DBGET databaseに登録されるエンテロウイルス属の各標準株から5'側プライマーとして、Hill株では-AGGTCACCAGTT ACATTA-, Barty株では-AGGTTACCAGTTACATCA-領域を特異的配列として選択した。PCRの方法はcDNA合成後、基本的にCaro Vらの方法に沿い5'-側に先に示した2種のプライマーと、-3'側プライマー(5'-TTTGCACCTTGAAGTGTATGTA-3')を添加し遺伝子増幅を行った(図1-A)。尚、Taq DNA polymeraseはTAKARA Ex Taqを使用した。

C. 研究結果

エコーウイルス9型の遺伝子増幅

図1-Bはエコーウイルス9型を含む9種のエンテロウイルス属の標準株と陰性対象としたムンプスウイルスに対する9型特異PCRの結果を示すものである。エコーウイルス9型でのみ特異的な1273 bpに鮮明なシングルバンドが観察された。同時に、エコーウイルス5および16型にもバンドが観察されたが明らかにサイズが異なっていた。19例の検索材料を用いたPCRの結果は図2に示した。検体番号2、3、4、6、7、8、11、13、14、16、17および18では標準株と類似するサイズの鮮明なシングルバンドが観察されたが、番号11および17は少し異なるサイズである可能性があり、これらの遺伝子産物は詳細な検討が必要で現在配列の判読を検討中である。なお、シングルバンドが観察されたすべての検体は中和試験でエコーウイルス9型の単味抗血清に対して中和が成立したものと一致していた。

D. 考察

エコーウイルス9型の同定において、従来の中和試験では一部の検体で型識別の判定が困難であったことから、今回新たな検出法としてPCR法の導入を試みた。遺伝子増幅領域はCaro V²⁾らが報告したエンテロウイルス共通領域VP1から2C領域で、エコーウイルス9型の標準Hill株および準標準Barty株に特異的、且つ両者に共通な配列を独自に見出したことで9型に特異的なPCR法の開発に成功した。エンテロウイルスにおける血清型と遺伝子配列との関連性に関する研究は、ポリオウイルス³⁾で重点的に検討がなされた結果、血清型を反映する遺伝子領域としてVP1領域の重要性が明らかとなりつつある。近年では、エンテロウイルス属の全てでVP1配列が判読され、従来から重要であると考えられていたVP4-VP2 junctionあるいは5'-nontranslated region (NTR)^{4, 5)}より、VP1領域の塩基配列が血清型と相関することがより明らかとなってきている¹⁾。しかし、エンテロウイルスに共通な遺伝子増幅は可能となっているが、個々の種あるいは血清学的型別を区別できるPCR法は報告されていないのが現状で、我々が日常行うウイルス分離・同定法では分類不能なウイルスに対してはPCRを含む他の手技の導入が不可欠で、且つ急務であると言える。今回、我々がプライミングした領域はまさしくVP1の下流域にあたり、遺伝子産物の大きさもおおよそ1300 bpで、今後、この領域を基本とした多くの血清型の異なるプライマーの開発が期待できると考えている。

E. 結論

従来から行われている、ウイルスの型識別法は血清学的手法によるところが一般的であったが、我々はエコーウイルス9型の判定に分子生物学的手法のPCR法を導入して検討をおこなった。2C領域との間でPCRを行った結果、VP1領域内で9型特異配列が見出された。この結果は、PCRがエコーウイルスの診断法の確立に向けての一助となり得るものと思われる。

参考文献

1. MS Oberste, K Maher, DR Kilpatrick, et al.: J Clin. Microbiology, 37, 1288-1293 (1999)

2. V Caro, S Guillot, F Delpeyroux, et al.: J General Viro., 82, 79-91 (2001)
3. OM Kew, MN Mulders, G Lipskaya, et al.: Seminars in Virology, 6, 401-414 (1995)
4. MS Oberste, K Maher and MA Pallansch,: Virus Res., 58, 35-43 (1998)
5. MS Oberste, K Maher, DR Kilpatrick, et al.: J Virol., 73, 1941-1948 (1999)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

北堀吉映、足立 修、田口和子、立本行江、大前利一、青木喜也：エコーウイルス9型に特異的PCR法の検討、奈良県衛研年報、35、59-61、2001.

2. 学会発表

北堀吉映、足立 修、田口和子、木元聖子、立本行江、青木喜也：本県で流行をみたエコーウイルス9型の同定法における遺伝子学的アプローチ、第37回近畿地区ウイルス疾患協議会研究会、和歌山、2001.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

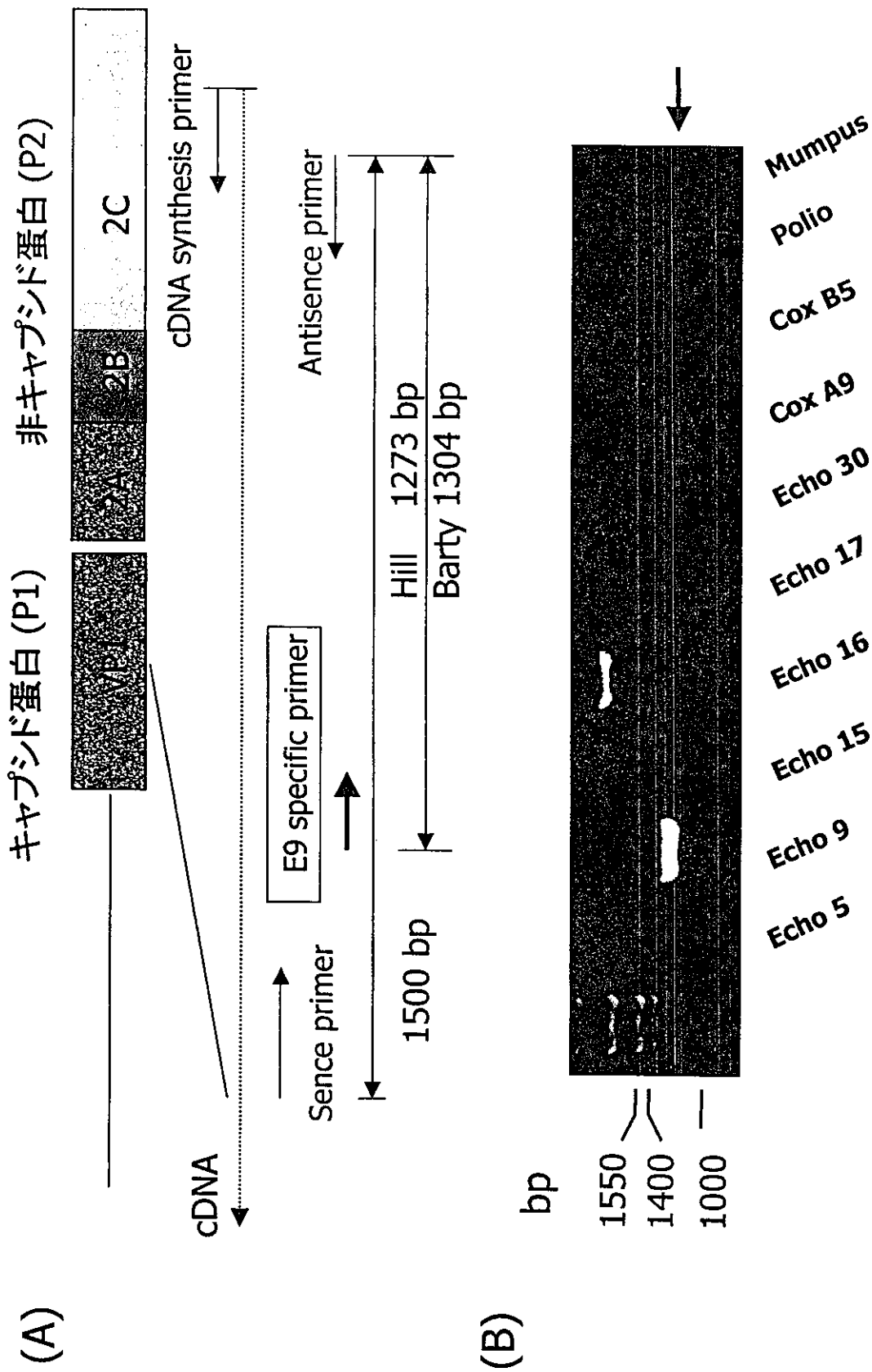


図1 VP1-2C領域での、エコーウイルス9型特異プライマーによる遺伝子増幅