

厚生労働科学研究費補助金  
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉田 毅

平成15(2003)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14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	奈良県保健環境研究センター	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第3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第1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第2部	部長
遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部	部長	
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14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. 感染症発生動向調査における Echo virus Type 13 の分離・培養・同定法の改良に関する研究…………… 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…………… 15  
今井 俊介（奈良県保健環境研究センター所長）
3. ヘルペスウイルスの診断法についての研究…………… 20  
林 皓三郎（神戸市環境保健研究所長）
4. プリオン病に関する迅速診断法の開発についての研究…………… 24  
田中 智之（堺市衛生研究所長）
5. アデノウイルスの検査法に関する研究…………… 27
  - I. 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
  - II. 感染性胃腸炎におけるアデノウイルス検出法に関する研究荻野 武雄（広島市衛生研究所長）
6. エーリキア（アナプラズマ）の検査法（同定）に関する基礎的研究…………… 36  
兒嶋 昭徳（名古屋市衛生研究所長）
7. 感染性下痢症病原体検査の標準化についての研究…………… 42  
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…………… 58  
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…………… 65  
岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター長）
10. インフルエンザ HI 抗体測定法の改良、麻疹 IgG 抗体の親和性測定法の確立、麻疹中和抗体測定法の改良及び簡易麻疹 IgM 抗体測定法の開発…………… 69  
田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第3部長）
11. BK ウイルス中空粒子の作製と診断への応用…………… 73  
宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第2部長）

12.	劇症を示す G 群レンサ球菌の疫学と遺伝子型別法の検討	77
	渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌第 1 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	80
	倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部長)	
14.	ピコルナウイルス感染症の感染病理学的診断法の開発	83
	佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)	
15.	セフトキシム耐性を付与する CTX-M 型 $\beta$ -ラクタマーゼの識別	89
	荒川 宜親 (国立感染症研究所細菌第 2 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	98
	遠藤 卓郎 (国立感染症研究所寄生動物部長)	
17.	細菌感染症・炭疽の診断法の標準化に関する研究	104
	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	111

# 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しマニュアルを完成する、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 (福島県衛生公害研究所長)	田代 真人 (国立感染症研究所 ウイルス第3部長)
今井 俊介 (奈良県保健環境研究センター 所長)	宮村 達男 (国立感染症研究所 ウイルス第2部長)
林 皓三郎 (神戸市環境保健研究所長)	渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌第1部長)
田中 智之 (堺市衛生研究所長)	倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス第1部長)
萩野 武雄 (広島市衛生研究所長)	佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)
児嶋 昭徳 (名古屋市衛生研究所長)	荒川 宜親 (国立感染症研究所細菌第2部長)
井上 博雄 (愛媛県立衛生環境研究所長)	遠藤 卓郎 (国立感染症研究所寄生動物部長)
宮崎 豊 (愛知県衛生研究所長)	牧野 壮一 (帯広畜産大学獣医学科助教授)
岡部 信彦 (国立感染症研究所 感染症情報センター長)	

## 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 4 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り、一部のマニュアル(第 1 版)を作成した。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・検査法を全国的に普及させるため技術研究会のシステムを構築する、(4) 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、(5) 上記の検査法の開発、改良に基

づいて感染症の診断・検査マニュアルの作製に役立てる。

### 1. 感染症患者・病原体サーベイランスについて

サーベイランス情報の収集、まとめてその選元を行っているが、情報としてより有益な出し方等について検討し、また検査法に関する講習会(感染症危機管理研修会、診断技術向上連絡会議)実施を効率的に有効に行う。

### 2. 診断・検査法の開発、再検討に関する研究

感染研、地研の担当者により病原体診断法、血清診断法(感染症新法に含まれるもの、含まれないもの)の確立、また従来法の再検討を行う。対象ウイルスはエンテロウイルス(分子生物学的診断)、単純ヘルペスウイルス(角膜ヘルペス)、アデノウイルス(血清診断、核酸診断法比較)、エーリキア(血清診断と遺伝子解析)、デングウイルス(中和法の確立)、チクングニヤ、セントルイス脳炎、西・東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎(IgM 捕捉 ELISA 法の確立)、プリオン(血中の抗プリオンモノクローナル抗体との反応物質の確認、測定法の確立、CJD 患者材料での検出系の確立)、ノーウォーク様ウイルス(EIA に用いる反応性の強い単クローン抗体を選択する)、レンサ球菌(遺伝子を用いた M 型分類の現場での応用可能性を検討する)。

### 3. 検査法の標準化と普及

研究成果を全国関連機関に普及すべく試みる。

- ① 感染性下痢症病原体検査法の標準化
- ② 炭疽菌検査法の標準化

(倫理面への配慮)

ヒト検体を使用する場合は、研究の目的、方法、研究対象者の不利益、危険性とその排除について十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で行う。

## C&D. 研究結果と考察

### 1. 感染症情報について

国立感染症研究所感染症情報センターでは疾患のサーベイランスに加えて一部病原体のサーベイランスも実施している。平成 12 年度以来個別あるいは集団発生の個票がオンラインで情報センターに集まり、全国で分離され



た病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況について検体採取日順に並べた一覧表を作り、厚生労働省の WISH ネットに掲載するようにした。さらに FTP 転送システムの導入で保健所、地研などで集計された還元情報が速やかに得られるようになった（岡部）。

## 2. 地方衛生研究所における研究

### 1) エンテロウイルス 13 型の検査法の改良

感染症発生動向調査における病原体発生動向調査は地方衛生研究所が第一義的に行う事であるが、近い過去に流行したり、流行を繰り返している病原体に関する分離・同定は比較的容易に行える体制が整いつつある。しかし、予算あるいは人的要因から長期間に亘り流行をみていない病原体に関しては必ずしも容易ではない。平成 13 年 8 月中旬から 9 月末にかけて無菌性髄膜炎の地域的流行を経験した際に、ウイルス分離は容易であったにも拘わらず、既存のプール血清では中和されずに同定に難渋した。汎エンテロブライマーセットを用いた RT-PCR を行い、その増幅産物を遺伝子解析することによってエコーウイルス 13 型による髄膜炎の流行と診断し得た。そこで、長期間流行を経験していない病原体の分離・培養・同定法について検討し、備えるべき血清群を明らかとした。これにより、迅速かつ経済的かつ効率的な病原体発生動向調査が行えるものと考えられた（加藤）。

### 2) エンテロウイルスの診断法に関する基礎的研究

2001 年、奈良県中・南部でコクサッキー B 群 5 型ウイルス (CB5) を原因ウイルスとした無菌性髄膜炎が流行した。患者は明らかな地域流行と散発流行に区別され、また発生期間も異なることから両者間にはウイルス学的に異なる遺伝子型による発生の可能性が示唆された。本研究では、これらウイルスの遺伝子学的差異を診断する方法として、VP1 から 2C 領域での 4 種の制限酵素による多型性解析を行った。結果、全症例の標的遺伝子領域で *Dde*I および *Hpa* II では 3 断片、*Hae* III では 4 断片が得られ *Sma* I では断片化は観察されなかった。以上の事から、遺伝子学的差異を明らかにする“簡易的診断法”としての PCR と RFLP 法の組み合わせは、将来的に新たな多型性解析診断法の確立を目指すもので、特に疫学的検索に有益であると期待される（今井）。

### 3) ヘルペスウイルスの診断法に関する基礎研究

Real Time PCR 法によって眼ヘルペス感染症の際のウイルス DNA 量を定量的に検出した。角膜上皮炎、角膜実質炎、ブドウ膜炎患者の涙液から得られたウイルス DNA 量はウイルスの活動性病変の程度によく一致した。本法によるウイルス DNA 量の定量的検出は角膜病変の病型診断に有用であるとともに、抗ウイルス薬の治療効果の判定にも有用であった。角膜実質炎の際にも上皮性活動病変があると、急性期の樹枝状角膜炎と同程度のウイルス量が検出されるので抗ウイルス薬によって治療を続ける必要性の判定に役立つ。実験的マウス角膜ヘルペスでは、涙液と角膜からのウイルスの検出は急性期に限られるが、三叉神経節からは急性期に上昇後、約 1 log 程度のウイルス DNA 量の低下があるがそのまま長期に存続する。緑内障治療薬として使われるラタノプロスト、ステロイド（ベタメタゾン）をマウスに点眼すると涙液中のウイルス量が増えることがわかった。マウスに潜伏感染したウイルスは角膜に UV 照射すると再活性化し涙液に放出される。この際細胞の CdK インヒビターであるロスコピチンを投与すると、その再活性化が抑えられるので、涙液中のウイルス DNA 量も低下する（林）。

### 4) プリオン病に関する迅速診断法の開発に関する研究

これまでプリオン病の診断に、血清などの体液を用いるより簡便な測定方法、プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法と免疫磁気ビーズを用いた方法、の構築を検討してきた。併せてこれらの系で反応する蛋白質についてウエスタン・ブロット法解析し、約 30kD の蛋白質が認められた。検出系に用いた #4 モノクローナル抗体はウエスタンブロット法で、市販の PrP<sup>Sc</sup> 特異的抗体と類似の反応性を示した。しかし、反応生成物のサイズは PrP<sup>Sc</sup> とは異なり、#4 モノクローナル抗体が PrP<sup>Sc</sup> を認識している可能性について、今後の更なる解析が必要であることが判明した（田中）。

### 5) アデノウイルスの検査法に関する研究：

①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及び②感染性胃腸炎におけるアデノウイルス検出法の研究

① 広島市で分離されたアデノウイルス 22 型中間型株 Ad22/H8, 9 型および Ad22/H10, 19, 37 型はヘキソンおよび

ファイバー領域の塩基配列分析により、それぞれAd22/H8型およびAd22/H19、37型であることを明らかにした。

- ② 全国の地方衛生研究所における感染性胃腸炎の検査体制をアンケートにより調査し、各自治体におけるアデノウイルス検査体制の実態を把握した。また、実例として広島市での感染性胃腸炎のアデノウイルス検査を電子顕微鏡観察法、免疫学的抗原検出法、細胞培養法で行い、得られた検査結果について比較検討した(荻野)。

#### 6) エーリキア(アナプラズマ)の検査法(同定)に関する基礎的研究

昨年スクリーニング法に続き、今回 *E.muris* を用いたウエスタンブロッティング法が確認試験に有用であることを示した。また北海道で採取されたダニ、野鼠、東京都で捕獲された野鼠、広島県などで捕獲されたドブネズミ、島根県で捕獲されたシカについて、数種類のプライマーを用い PCR を行なったところ、ダニ、野鼠、シカから合計 35 サンプルが陽性になった。これらの株について PCR 産物の遺伝子配列を決定し詳しい遺伝子解析を行った。その結果、ヤマトダニ (*Ixodes ovatus*) から HF565 株、IS58 株、IS136 株が、シュルツマダニ (*Ixodes persulcatus*) および北海道の野鼠からは *E.muris* が検出された。日本で *I.persulcatus* から *E.muris* 遺伝子が検出されたのはこれが初めてである。この *E.muris* 遺伝子は北海道の野鼠であるエゾヤチネズミの脾臓からも検出された。この 2 株について、約 1400bp の塩基配列を決定し比較したところ、この 2 株は 100%一致し、エゾヤチネズミがこの *E.muris* の宿主である可能性が考えられた。これらの株は標準株 (AS145 株) と比較すると 99.9%の相対率であった。ヒト血液での病原体の検出については倫理指針に則り、研究者と臨床医との協力体制を作り実施する予定である(児嶋)。

#### 7) 感染性下痢症病原体検査の標準化についての研究

多様な病原体に起因する感染性胃腸炎は、感染症法 4 類定点把握疾患として、患者および病原体サーベイランスの対象となっている。病原体サーベイランス検査は、各衛生研究所(衛研)で実施されており、当研究では検査の標準化に資するため、その現状を調査した。その結果、病原体サーベイランス検査は 83%

の衛研で実施されていて、対象病原体のうちウイルスは 98%とほぼ全てで検査されているが、細菌は 72%と低く、原虫は 19%と極めて低かった。さらに、検査の標準化に資するため、検査方法についても調査し、検査方法の普及度を含めて調査結果を解析し、その現状を把握した。病原体の保存は、病原体サーベイランス検査として重要な機能と考える。今回の調査でほとんどの衛研が何らかの方法で保存を行っていた。近い将来検査法のキット化や遺伝子検査の進歩で、病原体の分離培養と保存、検体保存が低下する恐れもあり、病原体バンクについて衛生微生物協議会で検討する必要がある(井上)。

#### 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

手足口病及びヘルパンギーナの原因ウイルスであるヒトエンテロウイルス A 群は、中和反応が難しいものや、乳のみマウスが必要なものが多く、遺伝子型によるウイルス同定の必要性が高い。そこで、本ウイルス分離株 (53 株、8 血清型) について、VP4、VP0 および VP1 領域の遺伝子解析によるウイルス同定の可能性の有無と、その信頼性の比較をおこなった。系統樹解析では、いずれの領域を用いても血清型と一致したグループに分類することができた。しかし、コクサッキーウイルス A8 型および A10 型では VP4 領域を用いた場合、異なる血清型標準株の中に同一血清型の標準株よりも相同性の高い株が存在した。系統樹解析の信頼度の指標となる bootstrap 値は VP1 領域が最も高く、VP4 領域が最も低かった。このことから遺伝子型によるウイルス同定には VP1 領域の解析が最適と考えられたが、そのプライマーに反応しない株の存在の可能性も考慮して、VP0 領域による同定手段も準備しておくべきであると思われる(宮崎)。

#### 3. 国立感染症研究所における研究

##### 1) インフルエンザ H1 抗体測定法の改良、麻疹 IgG 抗体の親和性測定法の確立、麻疹中和抗体測定法の改良及び簡易麻疹 IgM 抗体測定法の開発

- ① 最近のインフルエンザウイルスは従来の動物赤血球を凝集しない傾向が強くなり、HI 試験を施行するのに困難が生じている。そこで、すべてのウイルス株に使用可能なインフルエンザ HI 抗体測定用の標準人工赤血球の開発を試みた。

- ② 最近増加している成人麻疹では、初感染かワクチン接種後の二次性ワクチン効果不全(SVF)かの鑑別は容易ではない。そこで、初感染と再感染を鑑別するために、既存の ELISA キットと 6M 尿素処理を用いた IgG アビディティ測定法を開発し、その有用性を確認した。
- ③ Vero 細胞を用いて分離・継代された従来の麻疹ウイルス株は、リンパ球で分離された最近の流行ウイルスとはレセプター特異性が異なっており、これらに対する中和抗体を同時に比較定量することは技術的に困難である。この問題解決のために、両ウイルスのレセプターを発現する SLAM/Vero 細胞を用いた中和抗体測定法を開発し、その有用性を示した。
- ④ 麻疹サーベイランスでは、他の発疹性疾患との鑑別が必要である。その手段として急性期麻疹患者における簡便な IgM 抗体測定法を開発し、その有用性を確認した(田代)。

2) 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

ウエストナイルウイルスは現在日本には侵入しておらず、日本においては輸入症例の報告もないが、米国においては 2002 年に 3,000 人を越す患者発生が報告され大きな問題となっている。ウエストナイルウイルスは他のフラビウイルスと抗原性が交叉するが、日本においては特に日本脳炎ウイルスとの交叉が問題となる。本研究においてはウエストナイル熱の血清診断法としてウエストナイルウイルス抗体に対する中和法を確立し、さらに中和法によってウエストナイルと日本脳炎ウイルス感染の鑑別が可能であることを確認することを示した。中和法をこれまでに確立した IgM 捕捉 ELISA 法、および PCR 法等と組み合わせることにより、発症後の血清採取時期によらず実験室診断を行う(倉根)。

3) BK ウイルス中空粒子の作製と診断への応用

BK ウイルス (BKV) はヒトポリオーマウイルスとして知られている。このウイルスに対する成人の抗体保有率は高いが、病気との関連はまだ明らかではない。また、抗体検出を目的とした診断系が構築されていない。本研究では、組換えバキュロウイルスを用いて BKV のウイルス様中空粒子 (rBK-VLP) を作製し、これを用いた抗体検出 EIA および抗原検出 EIA を樹立した。高感度と特異性を併せ持つ検出系が確立できたことから、

BKV の疫学調査及び病気との関連を究明する手段が確立できた(宮村)。

4) ピコルナウイルス感染症の感染病理学的診断法の開発

ピコルナウイルス感染症の中で、特に中枢神経系に病原性を発揮することが知られているエンテロウイルス 71 (EV71) の感染病理学的鑑別診断法の開発を目的にした。EV71 と同様に手足口病の原因となるコクサッキー A16 (CA16) と弛緩性麻痺を発症するポリオウイルス (PV) に的を絞って、これらのウイルスについてパラフィン切片を用いた病理組織学的診断に有用なポリクローナル抗体および陽性コントロール組織標本作製した。また、パラフィン切片からの total RNA 抽出を行い、RT-PCR 法によるウイルスゲノムの検出方法も確立した。これらの材料はエンテロウイルスの感染が疑われる患者検体の診断に際して陽性対照として用いることができることが判明した(佐多)。

5) 劇症を示す G 群レンサ球菌の疫学と遺伝型別法の検討

近年、A 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症に加えて、同様の症状を示す G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の症例が見られている。劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす G 群レンサ球菌に共通の因子があるか調べるため、*emm* 遺伝子型別、パルスフィールド電気泳動、病原性遺伝子の保有について調べた。1995 年から 2001 年に劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者から分離された G 群レンサ球菌 16 株について解析した。*emm* 遺伝子を調べたところほとんどが異なる型を保持していた。また、*Sma*I によるパルスフィールド電気泳動による解析でも多様性を示した。ところが、A 群レンサ球菌の病原性因子である *scpA*, *ska*, *slo*, *sagA*, *sla*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* 遺伝子の保有状況について調べたところ、全ての株が *scpA*, *ska*, *slo*, *sagA* 遺伝子を保持していた(渡辺)。

6) セフトキシム耐性を付与する CTX-M-型 βラクタマーゼの識別

近年、欧米では、セフトジジム(CAZ)やセフトキシム(CTX)などの第三世代セファロスポリンに耐性を獲得した肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)や大腸菌(*Escherichia coli*)が増加し、これらの多くは、いわゆる ESBL

(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: 基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ)を産生する株と考えられている。我が国では、この種の耐性株は未だ希である。しかし、国内では、CTX に高い分解活性を示すものの CAZ などは殆ど分解できない CTX-M-型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株が臨床現場で多く分離される傾向がある。ESBL と CTX-M-型 $\beta$ -ラクタマーゼは、クラス A 型 $\beta$ -ラクタマーゼに属し、ともにクラブラン酸により強く阻害されるが、分解可能な $\beta$ -ラクタム薬のスペクトルが若干異なる為、臨床的に識別が必要となっている。今回、我々は、ESBL と CTX-M-型 $\beta$ -ラクタマーゼを識別する試験・検査法を開発し一般の細菌検査室に普及すべく、臨床分離菌における $\beta$ -ラクタム薬耐性のパターンや阻害剤に対する挙動などの表現型から、それらを簡便に鑑別、識別する方法を検討した。具体的には、表現型と遺伝子型を対比させつつ、詳細なバリエーション型を確定し、そのデータを蓄積した。その結果、CTX-M-型 $\beta$ -ラクタマーゼには、全てスルバクタム(SBT)により阻害され難いという特徴に着目することで SBT に阻害される ESBL 産生株と大まかに識別する事が可能であることが示唆され、簡便にこの種の拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株を識別する事が可能となることが期待された(荒川)。

#### 7) 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

4 類感染症である赤痢アメーバ症の診断に関してはいわゆる赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と感染病原性を持たないとされる *E. dispar* との鑑別診断が重要である。すでに指摘されて久しいが、これまでの形態分類では上記の 2 種の区別は不可能で、抗体産生の有無、原虫の DNA 鑑定、その他の方法による鑑別が求められている。一方、寄生虫症一般に当てはまることであるが、診断用の検査キットがほとんどの場合に検査用試薬として未承認で、入手困難なことが多い。地研等でのフォローアップや行政対応に際しては、検査・診断に係る技術的整備が求められるところである。

いうまでも無く、赤痢アメーバ症は侵襲性のある原虫(アメーバ)に起因する感染症であることから患者では抗体価の上昇が期待される。両者の区別(赤痢アメーバ症の診断)は抗体価の変化を指標とすれば容易である。本研究事業では ELISA 法による抗体測定方法の標準化を目指した。また、市販の診断用キットが入手し易い状況にないことから、赤痢

アメーバの抗原の提供体制を整備し、あわせて他の原虫症の検査への応用範囲を広めるべくクリプトスポリジウム症の血清診断への有用性につき検討した(遠藤)。

#### 4. 大学における研究：細菌感染症・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、昨年度までの実績を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、動物実験による検査過程を再現し、それらの有用性について検討した(牧野)。

#### 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。今後は病院の診断の大部分を分担している民間検査センターを含めて検査法を標準化し、普及させる必要がある。また時代の技術の進歩に応じマニュアルを改定するべきである。

**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（予定を含む。）**

なし



## II. 分担研究報告





# 1. 感染症発生動向調査における Echo virus Type13 の 分離・培養・同定法の改良に関する研究

分担研究者 加藤 一夫 (福島県衛生研究所長)

**研究要旨** 感染症発生動向調査における病原体発生動向調査は地方衛生研究所が第一義的に行うものであるが、近い過去に流行したり、流行を繰り返している病原体に関する分離・同定は比較的容易に行える体制が整いつつある。しかし、予算或いは人的要因から長期間に亘り流行を見ていない病原体に関しては必ずしも容易ではない。平成13年8月中旬から9月末にかけて無菌性髄膜炎の地域的流行を経験した際に、ウイルス分離は容易であったにも拘わらず、既存のプール血清では中和されず同定に難渋した。汎エンテロプライマーセットを用いたRT-PCRを行い、その増幅産物を遺伝子解析をすることによってエコーウイルス13型による髄膜炎の流行と診断し得た。そこで、長期間流行を経験していない病原体の分離・培養・同定法について検討し、備えるべき血清群を明らかとした。これにより、迅速に経済的かつ効率的な病原体発生動向調査が行えるものと考えられた。

## A. 研究目的

平成11年4月から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(以下、感染症法)では、病原体サーベイランスに法的位置付けがなされ、局長通知によって地方衛生研究所が検体検査の任を負うこととされた。そして、その対象として咽頭結膜熱、A群溶血性連鎖球菌咽頭炎、百日咳、感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、手足口病、麻疹、流行性耳下腺炎、インフルエンザ、急性出血性結膜炎、流行性角結膜炎、急性脳炎(日本脳炎を除く)、細菌性髄膜炎、成人麻疹および無菌性髄膜炎の15疾患が挙げられている。このことは、全ての都道府県及び保健所を設置する市(特別区を含む)の衛生研究所は、これら疾患の病原微生物検査の体制を確保することが求められている。即ち、感染症予防法においては、これら感染症に対する病原体診断は全ての地方衛生研究所が備えておくべきものであり、さらにこれらに加え発生頻度が高く流行規模の大きくなる感染症に対する検査能力が求められている。そしてここ数年来、全ての研究所が同一レベルにあるものではないが、多くの地方衛生研究所

では、これら感染症に関する検査能力を備えつつあり、感染症法施行以来、その責務を果たしてきた。

この中において、これまで流行を繰り返したり、近い過去に流行した病原体の検出・同定に関しては、比較的容易にかつ迅速に分離・同定を行い、病原体情報として患者情報と併せて有益な感染症発生動向調査情報となって関係各機関や医療機関への提供を行ってきている。しかしながら、長期間に亘り流行を経験していない病原体に関しては、限られた予算と人員での対応が求められていることから、あらゆる種類の病原体検出・同定には常時十分に対処できる状態にはなく、そのような際には迅速かつ効率的同定及びその結果報告は必ずしも容易ではない。

著者は、平成13年8月中旬から9月末にかけて無菌性髄膜炎の地域的流行を経験した際に、ウイルス分離は容易であったにも拘わらず、現在流通している既存のプール血清では中和されず、同定に至るまでに難渋をした。そこで、長期間流行を経験していない病原体の分離・培

養・同定法について検討し、備えるべき血清群を明らかとし、経済的かつ効率的な病原体発生動向調査を行うことに資することを目的とした。

## B. 研究方法

材料は平成13年8月から平成14年に発症した無菌性髄膜炎を含む感染症発生動向調査病原体検査対象37検体で、それぞれ咽頭拭い液、直腸拭い液及び髄液を採取し、ウイルス分離にはRD-18S、Vero、HEp-2、HMVⅡ細胞を用いて分離した。この内RD-18Sのみに強い細胞変性効果(図)を認めた病原体をEP95及びエンテロプール(デンカ)を用いて中和法を行い、その後単味抗血清を使用して同定を試みた。EP95及びエンテロプール(デンカ)で中和されない場合は、汎エンテロプライマーセット(CDC)を用いたRT-PCRを行った。

次に、過去のエンテロウイルスによる髄膜炎の流行状況を調査し、市販プール抗血清とどのような抗血清の組み合わせが、長期間流行を認めていない病原体の同定に有効であるかの検討を行った。

### (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

地方衛生研究所は、これまで感染症の拡大防止のため、地方並びに国における感染症対策への“Evidence”を提供することを目的に、疫学調査に有効な病原体検索を行ってきた。そして、感染症法が施行されてからは、その役割が法的に明確となり、主として国立感染症研究所との役割分担と連携によって感染症の予防に対処することとなった。このためには、全ての地方衛生研究所が少なくとも病原体サーベイランス対象疾患に対する検査能力を持つと共に、全国的発生傾向と地域での発生状況とを科学的

に比較するためには、完全に同一の検査方法ではなくともその妥当性が検証されている広く認められている検査法でなされている必要がある。これに対して、国立感染症研究所と地方衛生研究所とで検討を加え、両者が認知した病原体検査マニュアルが作成され、標準化に向けその検証が進行中である。

さて、病原体の培養・分離・同定には、地方衛生研究所はこれまで多くの知見と経験を積み重ねて、迅速化及び効率化に努めてきた。このため、流行を繰り返している病原体の検出・同定には容易に対応する能力を備えてきている。しかし一方で、地方財政の逼迫から人的・予算的制限が厳しくなり、それに伴い微生物同定に通常準備する抗血清等の制限がなされてきている。このため、長期間に亘り流行を認めていない微生物に関する分離・同定は必ずしも容易ではない。特に毎年夏期から秋期にかけ流行を見るエンテロウイルス属による無菌性髄膜炎に対する備えは十分とは言えないのが現状である。

著者は、平成13年8月中旬から9月末にかけて無菌性髄膜炎の地域的流行を経験した際に、ウイルス分離はRD-18Sにのみではあるが、検体(咽頭拭い液、直腸拭い液及び髄液)より、容易にCPFが観察されるウイルスが分離された。しかし、その同定に当り、EP95及びエンテロプールにては中和されなかった。次にCoxsackievirus A群に対する中和抗血清を用いたところ抗Coxsackievirus A6,A9で弱いながら抑制を認めたが、明確な中和反応ではなかった。そこで、汎エンテロプライマーセット(CDC)を用いたRT-PCRを行ったところ、VP1領域で増幅産物を得ることができた。これの遺伝子解析は、国立感染症研究所ウイルス第二部に依頼して、エコーウイルス13(以下E-13)型のDel Carmen株と約80%のホモロジーを有するとの回答を得た。このため同ウイルスに対する抗血清による中和試験を行い、E-13と同定に至った。

本邦におけるE-13は、1980年に分離報告があるものの、それ以降には認められていない。今回の地域的流行は20年を経過しての発生であり、また無菌性髄膜炎の原因となったかなり希な事例であった。通常の同定過程では、培養細胞への親和性からウイルス系統を予測し、エンテロ系が考えられる場合には、プール血清によ

るスクリーニング後に、単味抗血清による同定確定へと進む。しかし、E-13 のように長期間分離実績のないウイルスでは、市販プール抗血清及び現在国立感染症研究所から地方衛生研究所に提供されている EP95 では中和されず、抗血清による診断にはあらゆる種類の単味抗血清による同定が必要となってくる。これは現実的対応とは考えられないため、汎エンテロプライマーセット (CDC) を用いた RT-PCR を行った。これにより、VP1 領域で増幅産物を得ることができ、これの遺伝子解析 (国立感染症研究所ウイルス第二部に依頼) から、E-13 の Del Carmen 株と約 80% のホモロジーを有することが明らかとなり、単味抗血清にて E-13 と確定に至った。エコーウイルス感染症は、毎年夏期から秋期にかけ、主として夏カゼの原因として流行するが、無菌性髄膜炎を比較的高頻度に惹起する。また、その流行ウイルス型は、最近の傾向では毎年異なったものであることが特徴である。このようなウイルスの分離・同定に当たり、市販のエンテロプール及び EP95 を用いるが、当然のことながら長期間に亘り分離されていない或いは流行を認めていない型 (エコー 2, 8, 10, 13, 15, 20, 23, 26-29, 31-34) は中和できないものとなっている。この中には、海外で分離されている型 (エコー 2, 15, 20, 23, 27) も含まれており、本邦への侵入が危惧されるものが少なくない。即ち、長期間に亘り分離されていない或いは流行を認めていない型での同定には、自験例のように汎エンテロプライマーセット (CDC) を用いた RT-PCR が非常に有用であり、時間と経費の大いなる節約となることが示されたものと考ええる。なお E-13 は、シュミットプールで診断が可能であるが、現在この供給が停止している状況からすると、感染症発生動向調査でのプール抗血清での同定作業は、かなり限定されるものと考えられることから、シュミットプールと同様の抗血清構成を持つプール抗血清の開発とその供給・分与体制が強く望まれる。今回は、私ども地方衛生研究所のリファレンスセンターである国立感染症研究所の協力を得て、VP1 領域で増幅産物のシークエンスを行ったが、この検査にはシークエンサーが必要となる。しかしながら、本機器は高額であることや技術を必要とすることから、全ての地方衛生研究所が備えて対応することはかなり困難であることを考慮する時、シュミットプール様の抗血清を供給することは、感染症発生動向調査を迅速かつ正確なものとし、財政的効果

も大きいものとする。

## E. 結論

1. 20 年以上に亘り、分離されていなかった E-13 型ウイルスによる無菌性髄膜炎の流行を経験し、その原因ウイルスの同定に際し、有用な市販プール抗血清が存在しないことより、難渋をしたが、汎エンテロプライマーセット (CDC) を用いた RT-PCR が時間的、経済的節約に有効であった。
2. VP1 領域で増幅産物は、国立感染症研究所の協力によるシークエンスで診断に至ったが、どの地方衛生研究所においてもシークエンサーを準備・保持することは困難で、現行のプール抗血清での対応が不可能である、今回のような事例は今後も起こり得る事態であることから、シュミットプール血清と同様の幅広く対応可能な組成 (Cox.B1-6, Echo1-33) を持つプール血清の提供・分与が望まれた。

## F. 健康危険情報

特になし

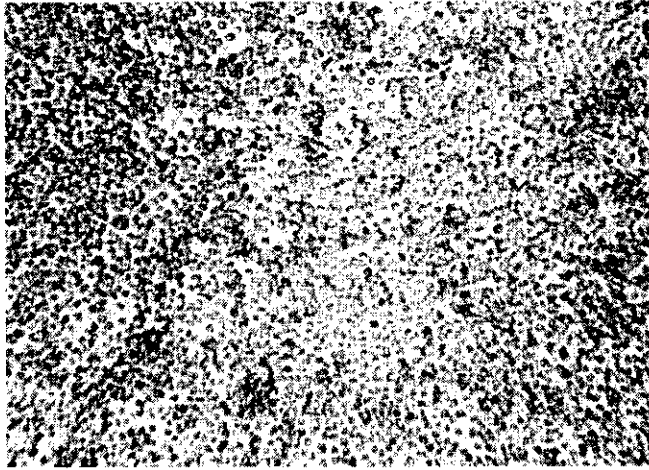
## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Isolation of Echovirus Type 13 from Patient of Aseptic Meningitis: Masaaki Keino, Masahiko Kanno, Kyoko Hirasawa, Tomoko Watari, Masahide Mikawa, Kimio Saito, Kazuo Kato, Masahiko Katayose and Hiromu Yosida. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54(6): 249-250. 2001.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



図： RD-18S の E-13 による細胞変性効果