

Fig. 1 The number of Transfers and Aberration Detection in Surveillance for Ambulance Transfer in Nagoya

30日で、守山保健所管内の医療機関より報告があった。患者は、54歳男性、ウイルス性発疹症（異型手足口病疑い）で、両手掌および足底に水疱と激しい疼痛、水疱膿疱が大きく重症の症状であった。発症日は、10月27日で、初診日および診断日は10月30日であった。推定される感染原因は、患者の娘が手足口病を発症しており、抗生物質投与されていた。対応は市役所から報告医療機関へ検体採取について依頼し、11月2日に咽頭ぬぐい液、水疱内容物、痂皮の検体を医師が採取し、管轄保健所が検体を名古屋市衛生研究所へ搬入した。細胞培養によるウイルス検査を衛生研究所が行った。12月20日3検体ともウイルスは検出されなかった。

2. 救急搬送サーベイランス

Fig. 1に期間中の搬送数と異常探知を示した。名古屋市全体で、9時の段階で高いレベルの異常探知は発熱で12回、呼吸苦1回、下痢19回、嘔気・嘔吐2回、痙攣9回であった。救急搬送記録について照会をかけたのは計6回ですべてにおいて、地域集積性および年齢集積性は認められなかった。対応が必要であると判断される事例はなかった。また、一部に誤入力があったが、回答時には修正されていた。

3. 薬局サーベイランス

Fig. 2に期間中を含めて4カ月分の名古屋市の抗インフルエンザウイルス薬処方数による推定患者数を示した。期間中は、抗インフルエンザウイ

ルス薬による処方の異常探知はみられなかった。その後、1月になってから2010/2011インフルエンザシーズンの流行が開始されたことがわかり、開催中はインフルエンザの流行はなかった。Fig. 3に期間中を含めて4カ月分のアシクロビル製剤処方数による推定患者数を示した。期間中は、アシクロビル製剤による処方の高レベルの異常探知はみられなかった。その後も同程度の処方数であり、ベースラインから大きな離れはなかったことがわかる。他の薬剤では解熱鎮痛剤単独と、解熱鎮痛剤・総合感冒薬・抗生物質での増加がみられた時に、当該区の感染症発生動向調査の結果を確認し、保健所を通じて管内の医療機関に対して、疑似症の症例定義に合致する症例の有無について確認をしたのは2回あった。2010年10月26日から27日天白区と、2010年11月10日から11日千種区に、区内の医療機関に問い合わせをし、異常がないことを確認した。健康危機対応事案につながるような現象は見受けられなかった。

4. 強化監視の評価

期間中毎日、感染症法に基づく疑似症定点、救急搬送サーベイランスおよび薬局サーベイランスのデータを取りまとめた。閉庁日も含めて毎日午前10時を目途に取りまとめたデータから国立感染症研究所感染症情報センターが日報を作成し強化監視の評価をした。全体統括は、名古屋市健康福祉局健康部1名、国立感染症研究所感染症情報センター2名で、期間中の評価体制は名古屋市1名、国立感染症研究所5名（うち事務局2名）で

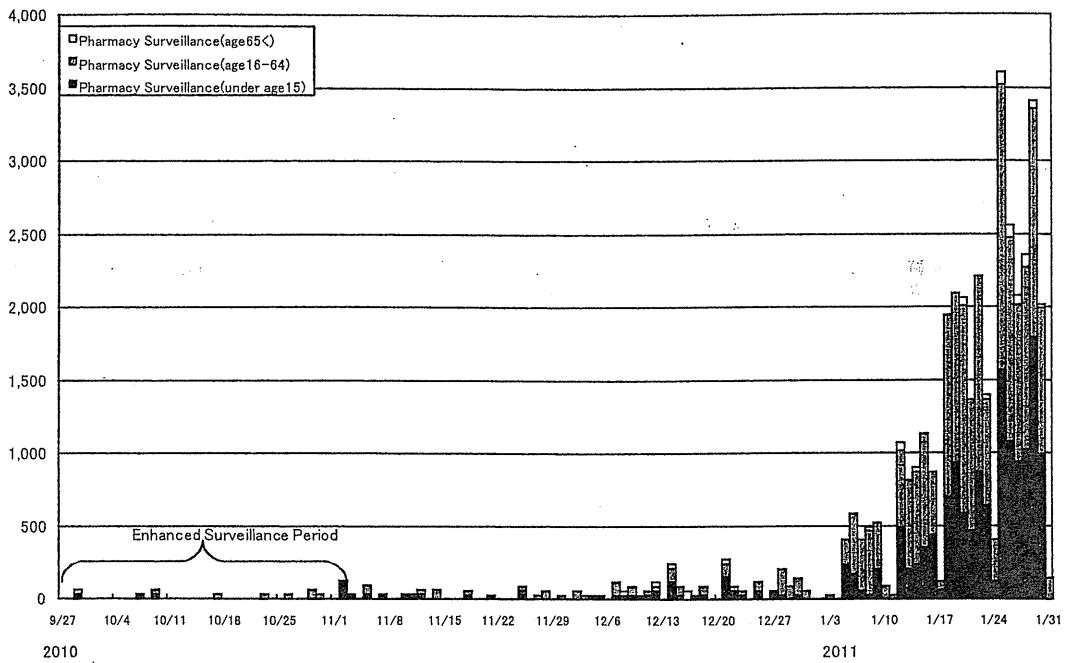


Fig. 2 The Estimated Number of Influenza Patients from the Number of Prescription of the Neuramitaze Inhibitor in the Surveillance for Prescriptions in Nagoya

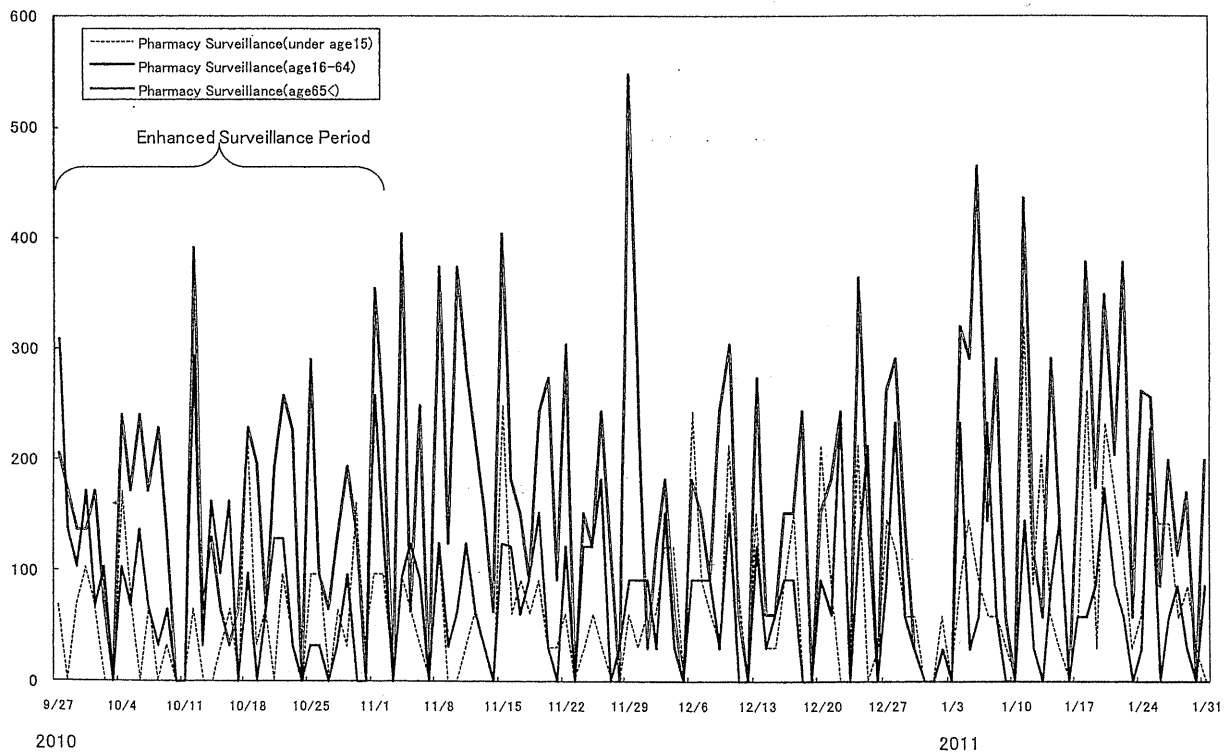


Fig. 3 The Estimated Number of Patients from the Number of Prescription of the Acyclovir Drug in the Surveillance for Prescriptions in Nagoya

実施した。事前打ち合わせは2回した。実施期間中は、特段の異常が探知されなければ日報作成および評価に30分、異常が探知された場合には情報収集の時間が必要とされた。

強化監視による異常探知の対応は、感染症法に

基づく疑似症定点が報告された時と、他2つのサーベイランスで高いレベルが表示されていた場合とした。対応は名古屋市健康福祉局健康増進課が市役所内関係部局、保健所、消防局救急対策室および管轄保健所を経由して医療機関等へ、詳細

な問い合わせをし、地域集積性および年齢集積性等、疫学的特徴について確認した。通常（異常が発生していない場合）は、これで終了となるが、「さらなる対応が必要」と判断した場合、追加調査および収集された情報からの現状分析を行うこととした。この問い合わせは9回あり、下記の内容を確かめた。

10/10：痙攣、下痢の患者、市内3区5件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

10/11：発熱、下痢の患者、市内7区19件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

10/24：発熱の患者、市内4区10件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

10/26～27：解熱鎮痛剤処方数増加、感染症週報および区内の感染症定点医療機関からの聞き取りをしたが、感染症の発生等見つけられず地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

10/30：守山区から感染症法に基づく疑似症定点の報告あり、11/2 検体（咽頭ぬぐい液、水疱内容物、痂皮）採取し、組織培養によるウイルス検査をした。12/20検査結果判明、ウイルス検出されなかった。

11/2：痙攣の患者散発、市内2区4件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めず、小児の発熱が多い傾向が認められた。

11/8：痙攣の患者、市内1区2件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

11/9：発熱の患者、市内1区4件の救急搬送内容を確認したが、地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

11/9～11：千種区にて解熱鎮痛剤・総合感冒薬・抗生物質の処方数増加、保健所経由で、管轄区域内の感染症発生動向調査定点医療機関からの聞き取りをしたが、感染症の発生等見つけられず地域集積性および年齢集積性は認めなかった。

5. 救急搬送サーベイランスの検討

救急隊員による実施してよかった点と今後の改善点について記載内容を3点にまとめた。1つ目は「関係者の安心感」である。メイン会場を管轄する熱田区の救急隊員からは「生物テロ等の災害を懸念していたが、サーベイランスシステムの導入で安心して業務につくことができた」というコメントが寄せられた。2つ目は「他機関との連携

事例の経験」である。「他機関との連携により感染症監視体制の強化を図り、市民および救急隊員等の安全を資するという試みは有意義であった」というコメントが寄せられた。3つ目は「有事対応として必要」である。「疫学上、重要な調査であり、今後続けていく必要があるのではないか。今後発生する恐れのある、健康危惧事象における対策としても有用である」というコメントが寄せられた。

一方、今後の改善についての意見については、救急活動に直接的に生かせなかったこと、救急活動においてその有効性が実感できなかったこと、数多くある救急事務処理に加え、新システムへの移行時期でもあり、入力負担であったこと、救急活動上および隊員の安全管理等に関連したフィードバックを望むこと、警告や注意が必要だということコメントが出されても、その後のフォローがわかりづらかったこと、などがあげられた。

IV. 考 察

2009/2010 インフルエンザシーズンの新型インフルエンザの流行の経験を通して、また天然痘ウイルスなどによるバイオテロに備えることは、住民の健康をまもる健康危機管理の上では最重要であり、感染症の兆候をいち早く捉えるサーベイランスは、欠かせない。従来研究成果から、個々のサーベイランスの特性を生かし、相互に補完して結果を解釈することでより質の高いサーベイランスになることが示唆されている⁷⁾。

今回、期間中健康危機事案は幸いにもみられなかった。これまで国が実施主体となって行った強化監視はあるが^{1)~3)}、市町村が実施主体となるのは今回が初めてであり、実施できたことが日本においては新しい発見となった。

感染症法に基づく疑似症定点は、届出基準があること、医師による診断であることであり、法に基づいているために、異常を感知した後の対応がとりやすいという利点がある。追加的なシステム構築や新たな事務経費等は発生せず、医師が診断して報告を行うため、特異度は高いことが期待されるが、一方の短所は、現場での周知が不十分であること、ゼロ報告をしないため発生していないということが日ごろから確認することができず、ベースラインがないという大きな課題がある。今回の届出例は、当該医師が目的を十分理解していたことが、対応成功の基本にあったとも考えられる。今後は、感染症法に基づく疑似症定点の目的が、眼前の患者の治療に直結はしないものの、公

衆衛生対応として意義あることをさらに医療機関に向けて周知していく必要があると考えられた。また、検体を搬送する保健所およびウイルス分離を行う衛生研究所の動きも円滑であり、このように関係機関の円滑な対応には、法的な位置づけが非常に重要であることを再確認できた。

救急搬送サーベイランスは、迅速な情報収集、全住民をカバーしていること、症状等の簡単な入力であること、発生地域がわかることが長所であるが、手入力方式を採用せざるをえなかったため、救急隊員の入力作業が発生し負担があった。今後の入力負担感を軽減する対策として、手入力を採用する場合には、十分な説明を行い、救急隊員が意義を理解し、入力した情報に対してのフィードバックがあることが必要と考えられた。今回は準備期間が短かったため説明会等の開催ができなかったが、業務にかかわる職員のモチベーションを維持するためには、このプロセスはできる限り省略するべきではないと考えられた。また入力WEBサイトでは、1時間ごとに解析結果が参照できるように組み込まれていたものの、その解析結果に基づく情報提供は十分に行われていなかった。フィードバックの内容を入力画面のトップ画面に入れるなど、作業に係る職員に徒労感が発生しないような工夫が重要であると考えられた。また、別の視点からの解決方法としては、出勤記録から自動的にデータを抽出し共有する方法であるが、次回の出勤記録に関するシステムの更新時期を待って検討しなければならず、自動化については今後の課題である。また、救急活動に従事する職員の安全に寄与できた事例がなかったため、有効性が実感できなかったが、実施前の説明会等を開催したならば、救急隊員が好意的に理解できたのではないかと示唆された。

薬局サーベイランスは、抗ウイルス薬以外は疾患の特定は困難であるが、システム内で自動処理できる情報収集で負担感はなく、保健所への問い合わせ対応に担当者が注力できたのは利点であった。

強化監視の成果は3点あった。1点目は、市役所内（特に健康福祉局と消防局）の連携を強めることができたことがあげられる。これらは互いに市民の生命や健康をまもることを目的としている組織であるが、通常業務での直接的なかわり合いが少ないため、実施に向けての打ち合わせや説明会を開催することで、より連帯感が強まった。

2点目は、健康危機管理マニュアルを健康福祉局内で再確認できたことである。この種のマニュアルは行政では多く作成されているところである

が、「〇〇（健康危機事例を引き起こす原因）発生時マニュアル」等、原因が判明していることを前提とした対応マニュアルであることが多い。しかしながら、ある異変が健康危機事例に繋がるものか否かを見極めるための手順から想定されているものは意外に少ない。本稿で示したようなイベント開催時における強化監視は、これまで想定していた脆弱性を強化するための実証であり、その意義は大きいと考えられた。既存の「健康危機管理マニュアル」を健康福祉局内で再確認することができたことは、「健康危機事例の端緒」を把握することの難しさを関係者で共有できたという点で一定の成果は得られたと考える。本来ならば、それを踏まえた健康危機事案発生時の訓練を実施した上でCOP10に臨めればよかったのであろうが、導入に向けての調整で時間的余裕がなかったのは残念であった。APECやサミットの対応のように国からの実施の通知が出されていれば、自治体内の動きはずいぶん違ったことが想定される。しかしながら、危機管理対応の任務にあたる者は、健康危機の知識や熱意はもちろん必要であるが、組織内の仕組みを熟知していること、組織内における信頼度など総合的な実力が求められ、組織にとってもその人選は重要な要素であることは再認識できた。

3点目は、COP10の会場を担当する救急隊員やCOP10事務局から「サーベイランスを実施してくれたおかげで、安心して任務につくことができた」というコメントが寄せられたことである。従来はイベント会場を管轄する地区だけの危機管理対応になりがちであるが、全市域的な取り組みが現場職員への安心感を増加させる効果が表れていたのであった。自治体職員の業務が増加するなかで、新たな業務の導入についての実施は困難な場面も多く、特に危機管理対応は、誰もが実施したほうがよいと思う反面、「危機管理に費やす労力」と「危機が発生する頻度」とのバランスにより、導入の可否がシビアに判断される。例えば、症候群サーベイランスとして他の情報、学校欠席者情報収集システムや保育園欠席者発症者情報収集システムの導入も検討されたが、実現は難しく、学校や保育関係者と連携が図れなかったが、実施しなければ成果も得られないと思われた。

V. 結 論

COP10名古屋開催により、日常行われている薬局サーベイランスおよび感染症法に基づく疑似症定点に加え、名古屋市消防局救急搬送サーベイ

ランスを実施し、強化監視の意義および課題等を明らかにした。また、早期探知された場合には直ちに名古屋市健康福祉局および名古屋市内の16保健所で現地調査を行うよう備えたが、幸いにも健康危機事案に該当するような感染症の発現はなかった。

本研究は、2010年度厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策研究事業「健康危機事象の早期探知システムの実用化に関する研究」(研究代表者：国立感染症研究所感染症情報センター大日康史)の研究成果の一環である。

文 献

- 1) 松井珠乃, 高橋央, 大山卓昭, 他: G8福岡・宮崎サミット2000に伴う症候群サーベイランスの評価. 感染症誌 2002; 76: 161-6.
- 2) 鈴木里和, 大山卓昭, 谷口清州, 他: 2002年FIFAワールドカップ開催に伴う感染症・症候群別サーベイランス. 病原微生物検出情報 2003; 24: 37-8.
- 3) 大日康史, 山口亮, 杉浦弘明, 他: 北海道洞爺湖サミットにおける症候群サーベイランスの実施. 感染症誌 2009; 84: 159-64.
- 4) Henning KJ: what is Syndromic Surveillance? MMWR 2004; 53 (Suppl): 7-11.
- 5) Buehler JW, Berkelman RL, Hartley DM, Peters CJ: Syndromic surveillance and bioterrorism-related epidemics. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1197-204.
- 6) 大日康史, 杉浦弘明, 菅原民枝, 他: 症状における症候群サーベイランスのための基礎的研究. 感染症誌 2006; 80: 366-76.
- 7) 大日康史: 平成19-21年度厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業「地域での健康管理情報の早期探知, 行政機関も含めた情報共有システムの実証的研究」総合報告書.
- 8) 杉浦弘明, 秦正, 児玉和夫, 他: 学校欠席者情報システムを用いた新型インフルエンザに対する学級閉鎖の有効性. 学校保健研究 2010; 52: 214-8.
- 9) 菅原民枝, 大日康史, 川野原弘和, 他: 2009/2010インフルエンザパンデミックにおけるリアルタイム薬局サーベイランスとインフルエンザ推定患者数. 感染症学雑誌 2011; 85: 8-15.
- 10) 大日康史, 川口行彦, 菅原民枝, 他: 救急車搬送数による症候群サーベイランスのための基礎的研究. 日本救急医学会雑誌 2006; 17: 712-20.
- 11) 平成19年3月29日付 健発第0329005号「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等の一部を改正する法律等の施行について(施行通知)」厚生労働省健康局長通知
- 12) 平成22年5月31日付 健感発0531第1号「2010年日本APEC首脳会議等開催に伴う感染症発生動向調査の徹底について」厚生労働省健康局結核感染症課長通知

2

応用編

病原体と遺伝子検査

呼吸器・消化器ウイルス

FUJIMOTO TSUGUTO

藤本嗣人

◎国立感染症研究所感染症情報センター

要旨 呼吸器および消化器感染症などの病原体検査における分子生物学的検査は日常的に行われ、実験室診断における中心的な検査法となっている。呼吸器感染症、消化器感染症およびその両方を引き起こすウイルスについて、PCRを中心とした遺伝子増幅検査法が主要な検査法である。その基礎から応用までを包括的に概説した。

はじめに

病原体検査において、分子生物学的検査は必要不可欠なツールとなっている。呼吸器・消化器ウイルスについて1990年代の半ばまでは、培養細胞を利用したウイルス分離、ELISA等の抗原検出が中心であり、消化器ウイルスに関しては電子顕微鏡による観察が中心であった。消化器ウイルスに関して培養があまり使用されなかったのは、ノロウイルス〔当時は小型球形ウイルス(SRSV)〕、腸管アデノウイルスなどのウイルス分離が困難なためである。

1997年頃から、PCR (polymerase chain reaction) 法を中心とした分子生物学的検査が実験室レベルの検査法として導入され、多くの呼吸器・消化器ウイルス(図1)の検査に導入された。本稿ではその現状と課題について述べる。

1 呼吸器ウイルスの検査診断

●呼吸器感染症の起因ウイルス

季節によって流行状況が変動する。冬季のインフルエンザ、夏季のエンテロウイルスは典型例である。しかし、近年になって季節はずれの検出も

みられることが多く報告されるようになった。これはPCR法等の遺伝子検査が日常的に実施されているようになったことも関与しているものと思われる。新型インフルエンザが春季から夏季に流行したことにみられるように、新型のウイルスで出現当初は季節性がみられないこともある。

主要な起因ウイルスとしては、上記の他にRSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、パレコウイルスなどがあげられる¹⁾。

日本感染症学会・日本化学療法学会の『JAID/JSC 感染症治療ガイド2011』によると、気道性感染症を、①急性上気道炎〔上気道炎(普通感冒)、急性咽頭・扁桃炎、急性喉頭蓋炎〕、②インフルエンザ、③急性気管支炎、④小児の気道感染症等に分類している。

このうちウイルス性が主体なのは、上気道炎および小児の気道感染症であり、前者は咳、鼻汁、咽頭痛の3つを同程度に訴えることが多く、後者は発熱、鼻汁、咳が多い。いずれもウイルス感染と細菌感染の鑑別が重要とされる。

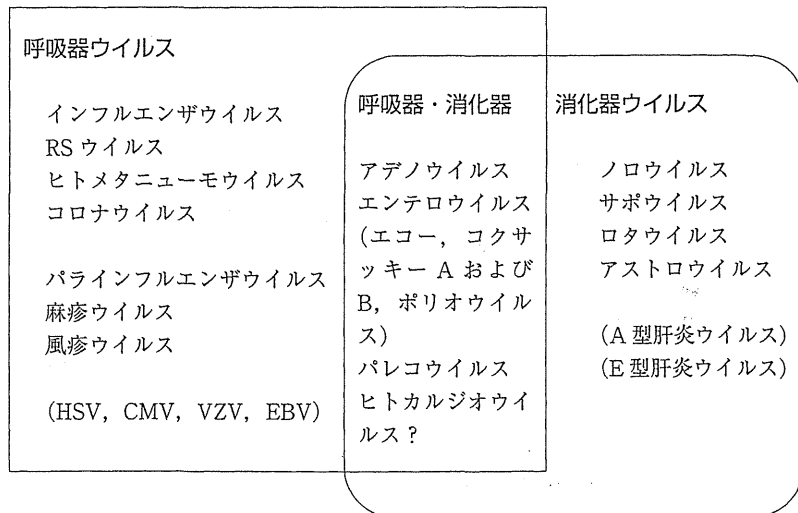


図1 呼吸器ウイルス、消化器ウイルスおよび呼吸器・消化器の両方に関与するウイルス

●臨床現場における呼吸器ウイルスの検出

呼吸器感染症において最もインパクトのある疾患はインフルエンザであり、医療現場では迅速診断キットが多用されている。また、小児科領域で重要なRSウイルス、アデノウイルスに関しても同様に迅速診断キットが用いられている。さらに、ヒトメタニューモウイルスに関するキットも入手可能になった²⁾。これらキットの検出感度は向上しつつあるが、PCR法等の分子生物学的な手法に対して60~90%程度である。

どのようなモノクローナル抗体を使用するかによって検出感度が変わる。また、銀増幅イムノクロマト法などが取り入れられ、感度の向上が図られている³⁾。

◆2 分子生物学的検査

●ウイルス性か細菌性か

呼吸器感染症においては、そもそも当該疾患がウイルス性か細菌性か自体が不明なことも多い。肺炎球菌が検出された場合などでは、それが常在性なのか起因菌なのか不明に終わることも多い。これは、抗生剤の適切な使用にも影響する問題であり、早期の分子生物学的な検査法の進歩と医療現場への浸透が将来的に医療を変えていくものと思われる。

●PCR-シーケンシング

PCRによる検査は高速かつ高感度であり、さらにその後の遺伝子配列の決定により型別や系統樹解析ができるので、有用である。麻疹ウイルスは撲滅計画の最終段階にあり、その検出同定をPCRで行っている。それにより、検出された麻疹ウイルスが国内症例なのか輸入症例なのかがわかる段階にまで達している。

●ゲノム情報の活用

ウイルスにおいて、ゲノム情報は、①ウイルスの同定、②ウイルスの分子疫学(前述の麻疹の例など)、③ウイルスの病原性の判定(ポリオウイルスにおける野生株とワクチン株など)、④ウイルスの薬剤耐性の判定(インフルエンザウイルスのタミフル耐性など)に有用である。

◆3 消化器感染症の検査診断

●消化器感染症の起因ウイルス

ノロウイルスによる冬季の下痢症感染症の多発はよく知られている。また、小児におけるロタウイルスは重症化しやすく、そのワクチンが2011年に承認され、生後6~24週までを対象に接種可能となった。アデノウイルスも乳幼児を中心に下痢症を引き起こしている。その他、アストロイ

ルス、サポウイルス等のウイルスも下痢症を引き起こす。A型肝炎およびE型肝炎ウイルスも経口感染するが、これらは肝炎の起因ウイルスである。

●臨床現場における消化器ウイルスの検出

ノロウイルス、ロタウイルスおよびアデノウイルスについて、迅速診断キットが市販されている。それぞれを単独で検出するキットに加えて、ロタウイルスとアデノウイルスを同時に検査できるキットも市販されている。

●呼吸器感染症と消化器感染症のいずれも引き起こすウイルス

アデノウイルスは、呼吸器感染症および消化器感染症のいずれも引き起こす。エンテロウイルス、パレコウイルスもいずれの疾患も引き起こす。パレコウイルスは、エンテロウイルス属に分類されていたエコーウイルス22型およびエコーウイルス23型がウイルス学的特徴から、1999年にパレコウイルス属とされたもので、それぞれパレコウイルス1型および2型とされた。現在少なくとも6型まで報告されている⁴⁾。

●分子生物学的検査

分子生物学的な検査として、PCR検査が中心に行われている。呼吸器ウイルスよりも起因ウイルスの種類が少ない。

糞便中や食品中のウイルスを検出する必要があるが、一般的にPCR法に使用されているDNAポリメラーゼは、サンプルに含まれる夾雑物によって強く反応が阻害される。糞便をPBSバッファーで10%になるよう攪拌して乳剤とした後、低速遠心した上清を10,000~12,000rpmで20分間冷却遠心した後の上清から、RNAを抽出している。

阻害物質の影響を受けにくいPCRキットも発売されていて、検体からのゲノム抽出を不要とするPCRキットもある⁵⁾。

●遺伝子増幅検査法

臨床検体中の病原体遺伝子は、耐熱性DNAポリメラーゼを使用した方法が用いられており、温度を上下させる必要があるか、恒温で反応させるかによって分類することもできる。温度変化(高温、低温)を要するのはPCR法などであり、恒温(65℃など)で反応するのはloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法などである。

ウイルスは、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのDNAを遺伝子として持つDNAウイルスより、RNAを遺伝子として持つインフルエンザウイルス、エンテロウイルスなどのRNAウイルスの方が種類が多い。

RNAウイルスの検出には逆転写反応(reverse transcription: RT)後にPCRを実施するRT-PCRが実施されている。LAMP反応においても逆転写反応を加えることによりRNAウイルスの増幅・検出が可能である。

その他、様々な遺伝子増幅検査法が開発されている(蛍光マイクロビーズアレイ法、網羅的遺伝子検査法、次世代シーケンサー⁶⁾による検査など)。

4 DNAポリメラーゼの改良と反応阻害物質の克服

●ポリメラーゼの改良(一般論として)

ポリメラーゼの種類によって、これらの反応は大きく影響を受けている。現在までに6種類のDNA依存性ポリメラーゼ(family A, B, C, D, XおよびY)が知られている。このうち、ファミリーAおよびBが分子生物学的に重要なツールになっている。

ファミリーA(Pol I型)には、*Taq* DNA polymerase(以下、*Taq*)に代表される好熱細菌から分離されたポリメラーゼのグループであり、ファミリーB(α 型)はvent DNA polymeraseに代表される正確性が高い酵素である。

ファミリーB(α 型)は、DNA伸張反応の正確性が高い。これは3'→5'エキソヌクレアーゼ活

性を有するため間違っ取り込んだ塩基を除去・修復することができるためである。ところが、この活性が強いことはDNAの伸張効率（速度）を落とす要因となる。

両者の欠点を補うため、適切な比率でブレンドした酵素が市販され、多用されている。しかし、近年はファミリーB（ α 型）であるにもかかわらず、伸張反応の速い酵素が入手可能である〔例えば、PrimeSTAR® GXL DNAポリメラーゼ（タカラバイオ）など〕。

●臨床検体中の阻害物質克服

臨床検体中には阻害物質が含まれ、PCR反応が阻害される場合がある。特に糞便検体および全血検体の場合にその傾向が強い。このため阻害物質に強いPCR反応系が、前述のとおり開発され市販されている。Ampdirect®（島津製作所）やMightyAMP® DNA polymerase（タカラバイオ）が、検体の精製なしにPCRができる酵素系として市販されている。

5 検体の採取と輸送

●検体採取時期

一般的に、発症後、速やかに採取することで検出率が上がる。インフルエンザの迅速診断キットで発症後の早期に結果が陰性になることが知られている。しかし、インフルエンザにおいてみられるこの現象より、ウイルス検査用の検体採取時期が遅すぎたために適切な検査ができない場合の方がはるかに多い。特に実験室診断用の検体においては、検体採取の時期が早すぎる問題より遅すぎる問題の方が多い⁷⁾。

消化器感染症の場合などで、糞便中に長期間にわたり排泄されるという表現がなされることがあるが、それは病原体の感染リスクを示すもので、長期間にわたり検体が採取できることを示すものではない。

●採取検体の種類

呼吸器感染症の場合は、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液などを専用の綿棒（swab）を用いて、専用のウイルス保存液〔UTM（Copan）〕等を用いて採取・保存する。

消化器感染症の場合は糞便を、そのまま密封できる容器に入れて漏れないようにする。細菌用のCary-Blair等のアガロースが入った採取容器は、PCRおよびウイルス分離を阻害するので使用できない。

●病原体検査にかかわる検体管理・搬送・輸送

近年まで、臨床検体の輸送は病原体の輸送と比較すると容易であった。しかし、近年は臨床検体の輸送が厳しくなりつつある。このような状況は米国における炭疽菌テロ事件以後に発生した。この数年に病原体を含む可能性がある検体輸送はさらに厳しくなりつつあるので、輸送に関しては受け取り側とよく確認しておく必要がある。

6 感染症発生動向調査における流行の把握

国立感染症研究所では、全国の定点医療機関および地方衛生研究所等の協力のもと、感染症の流行を把握している。図2は2012年の風疹の流行を示す。呼吸器感染症といっても、妊婦が妊娠初期に風疹に罹患して、新生児に先天性風疹症候群（congenital rubella syndrome：CRS）がみられることがある。

CRSは、母子感染後の出生者に主な障害として眼疾患（白内障、緑内障、網膜症、小眼球）、耳疾患（高度難聴）、心臓疾患（動脈管開存症、心房中隔欠損、心室中隔欠損など）の3大障害がみられるものである。

風疹のようにワクチンで予防できる疾患は、積極的にワクチンを受けて、周りに感染させないことも重要である。本人は軽症であっても、周りに重篤な影響を及ぼすことがある。

感染症発生動向調査（国立感染症研究所感染症

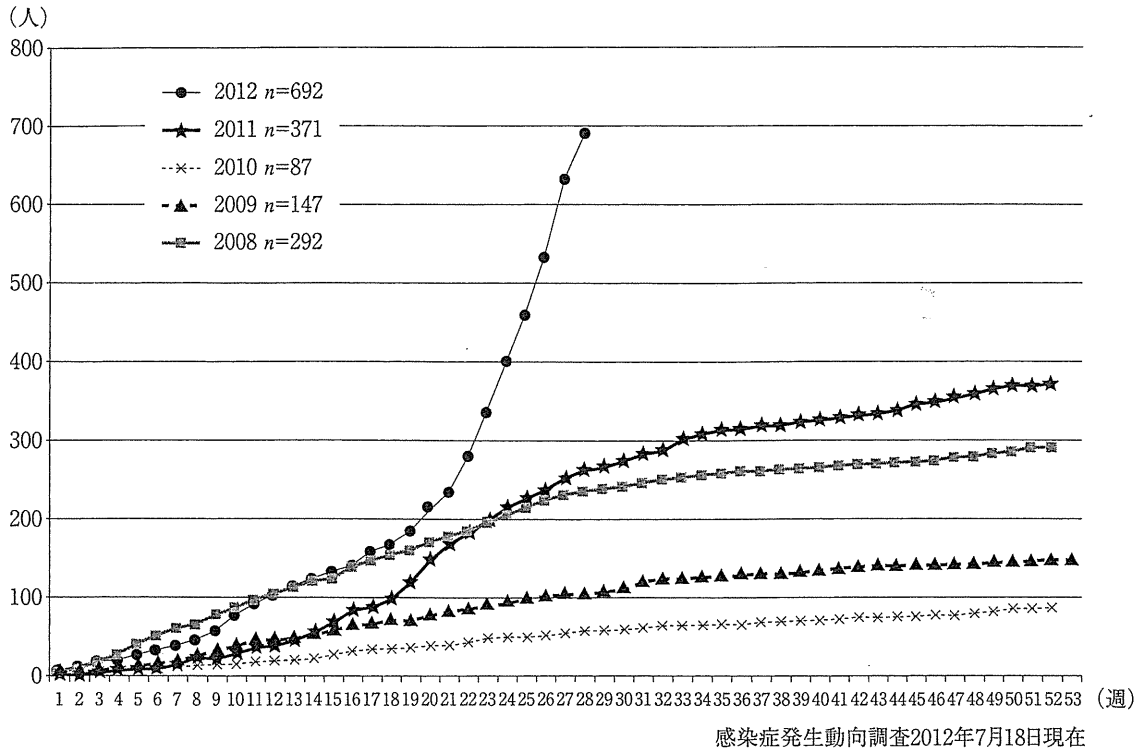


図2 風疹累積報告数の推移 (2008~2012年28週)
2012年に風疹の全国的な流行がみられている (第17週から急増している)

情報センターのホームページで公開)は、どのような疾患が流行しているのかを知るうえで役立つ(図2)ので参照していただければ幸いです。

風疹の検査においても、PCRによる確認検査が最も信頼できる手法として使用されており、類似の疾患との鑑別に役立っている。分子生物学的検査法は、強力な公衆衛生のためのツールとしてこれからも発展し続けるであろう。

文 献

- 1) 堤 裕幸：風邪の全体像。臨床とウイルス 34：391-395, 2006.
- 2) 高尾信一：RSウイルス、ヒト・メタニューモウイルス。臨床とウイルス 40：124-133, 2012.

- 3) 清水英明：高感度免疫クロマト法によるウイルス検査。臨床とウイルス 40：2012 (印刷中).
- 4) 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子：ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus: HPeV) 感染症。モダンメディア 53：329-336, 2007.
- 5) Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S *et al.* : Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J Virol Methods* 163：282-286, 2010.
- 6) Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B *et al.* : Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242：84-89, 1996.
- 7) 藤本嗣人, 花岡 希, 谷口清州ほか：ウイルス感染症のための検体採取10原則。小児科 52：471-475, 2011.

* * *

日常の実験手法となった Polymerase chain reaction (PCR) と電気泳動の進展：超高速 PCR (Hyper-PCR) および Microcapillary Electrophoresis (MultiNA)

藤本 嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未 国立感染症研究所 感染症情報センター

〔論文要旨〕

PCRは実験室において日常的なありふれた検査法となっている。しかし、PCRの一連の反応過程において未だ改良すべき点がある。PCRの一連の過程を概説するとともに、その改良の流れを、我々が研究（および検査）で使用している超高速PCR法（Hyper-PCR）およびマイクロチップ電気泳動法（MultiNA）について概説した。PCRの過程は臨床検体からのウイルスゲノムの抽出からはじまり、その検出およびゲノム解析までの一連の流れの中でとらえられるべきである。そして、各過程において様々な工夫がなされその技術が進展している。機器および試薬の進歩がPCRの改良につながり、その所要時間短縮および高精度化に役立つものと考えられる。

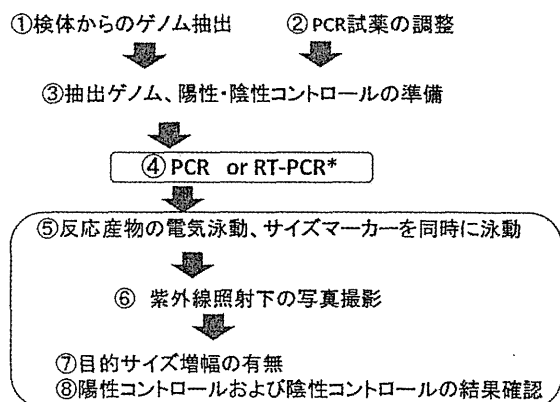
1. はじめに

ウイルス検査法として、様々な遺伝子増幅検査法が使用されている。その中で Polymerase chain reaction (PCR) は古典的かつ中心的な手法となり、その後の塩基配列の決定により多くの情報を得ることが出来る。

汎用性および迅速性の点から PCR は大変優れたツールである。PCR の増幅を確認する手法として電気泳動は重要な手法であり、アガロースやアクリルアミドなどを使用した手法が広く実施されている。

PCR およびそれに続く電気泳動は実験室検査法として汎用されているものの、それを臨床検体からの病原体の検出に適用するためには図1のとおり多くの過程を要する。

本稿では、それぞれの過程について改良され続けている現状を著者の知りうる範囲でまとめた。



* Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

図1 病原体検査における古典的な PCR 法

本稿は、図1の④のPCR(系によって異なるが通常2時間以上を要する)の所要時間を15分程度に短縮したHyper-PCRについて記述する。

一概に、PCRと言っても使用する酵素、プライマー、温度条件、機器などによって感度や

Progress in polymerase chain reaction and electrophoresis : Ultra-high speed PCR (Hyper-PCR) and Microcapillary Electrophoresis (MultiNA)

Tsuguto FUJIMOTO, Nozomu HANAOKA, Masami KONAGAYA, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640

別刷請求先：藤本嗣人 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

Tel : 03-5285-1111 Fax : 03-5285-1129 E-mail : fujimo-t@nih.go.jp

特異度が異なる。本稿では超高速 PCR である Hyper-PCR 以外の様々な polymerase chain reaction を PCR と呼称する。Hyper-PCR はリアルタイム PCR としても使用できるが、高速の PCR と位置づけた。機器の進歩は検査技術の進歩に大きく貢献する。

ヘルペスウイルス, アデノウイルス, パピローマウイルスなどの DNA ウイルス以外, 多くのウイルスは RNA をゲノムとして持つため PCR の前に RNA を DNA に翻訳する Reverse Transcription (逆転写, RT) を行った後に PCR を実施する。この反応 (RT-PCR) についても様々な酵素や反応条件が使用されている。

RT と Hyper-PCR を連続的に実施する RT-Hyper-PCR (所要時間 20 分程度) についても概説する。

また, 図 1 の⑤~⑧の過程を自動化したマイクロキャピラリー電気泳動法 (本稿ではマイクロチップ電気泳動, MultiNA) についても概説する。

2. 臨床検体の採取・保存

図 1 に示した一連の PCR の前段階として検体が適切に採取されるべきである¹⁾。本稿では病原診断法の進歩について述べるため, 臨床検体の採取の詳細については述べない。しかし, 病原体診断のために適切な時期に, 適切な部位から, 適切な手技で検体が採取され, その検体が検査されるまで, 適切に保存および輸送されることは重要である。

3. PCR の前段階

3-1. ゲノム抽出

図 1 の①の検体からのゲノム抽出について, RNA ウイルス用, DNA ウイルス用あるいはいずれのウイルスにも対応したキットが発売されている。キットにより PCR の結果に差が見られる場合もある²⁾。検体からゲノム抽出をしないで PCR 反応ができる系も市販されている。例として, Ampdirect (島津製作所)^{3,4)} や Mighty AMP DNA polymerase (TaKaRa) が検体の精製なしに PCR が出来る酵素系として市販されている。

検体からのゲノム抽出過程を, 微量ウイルス

の濃縮に用いる方法もある。たとえば, PureLink viral RNA/DNA mini kit (ライフテクノロジーズ ジャパン) は, ゲノム抽出の過程を用いて, 髄液, 血清, 尿など (細胞が無い状態) に含まれる微量ウイルスの DNA や RNA を最大で 50 倍濃縮できるキットとして市販されている (ウイルスそのものを濃縮するものでない)。

ゲノム抽出には①出来るだけ簡易化する手法の開発, ②微量ゲノムの濃縮, ③保存性の向上: 例えば抽出ゲノムの室温保存ができることなど様々な方向性で検討されている。

3-2. 試薬の調整

試薬調整の過程は, できるだけ必要な操作が少ないことが望ましい。そのためプライマー, 抽出されたゲノム (テンプレート), および水を加えるだけで PCR を行うことが出来る凍結乾燥された製品も市販されている。乾燥品を開封した場合, 吸湿して失活することを避けるため, デシケーター内に保存して出来るだけ早く使い切るべきである。

PCR 用試薬やプライマーおよび水が過去の PCR 産物や陽性コントロールに汚染された場合に誤った結果が得られる。そのようなコンタミネーションを防ぐため, 試薬調整の部屋や器具器材と PCR 後の電気泳動等 (反応容器をあける行為を行う) の場所とを完全に分けるべきである。コンタミネーションによる誤った結果は検査の信頼性を大きく低下させるので陽性コントロールは検体中の陽性と区別が出来ることなどの工夫が必要と思われる。

4. Hyper-PCR

4-1. 機器

Hyper-PCR は超高速 PCR としての概念でトラストメディカル (加西市) と国立感染症研究所の共同研究で開発・改良され続けている技術である。Hyper-PCR はサーマルサイクラー (MK-III および MK-IV, トラストメディカル) の名前にも冠された。

Hyper-PCR MK-IV は, 単純にいうと等速で回転する CD 様の円盤中の穴 (シールで封入する) の中で PCR 反応が進む。CD が等速で 1 回転する間に, 高温, 低温, 中温の熱源に接触するので, 1 回転で 1 反応が終わる (図 2)。

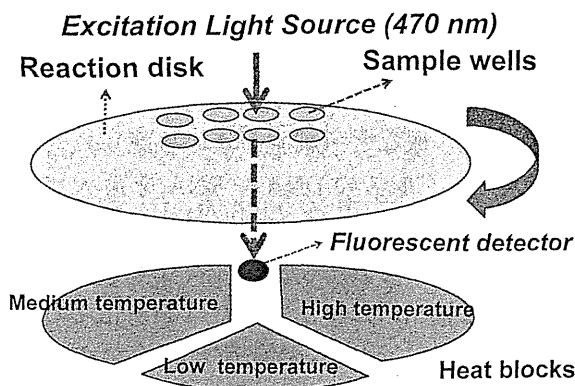


図2 Hyper-PCRの模式図

MK-Ⅲは、等速回転でなく高温、低温、中温の熱源のうえで反応時間を指定して止まる仕組みとなっている。

反応ディスク（MK-Ⅲでは8ウェル，MK-Ⅳでは12ウェル）がディスクを上下から挟みこむ3種類の温度の熱盤の間を回転する。

4-2. 温度条件および所要時間

1回転（各温度で6秒）に18秒要する場合、反応の所要時間は35サイクル（35回転）で $18 \times 35 = 630$ 秒（10分30秒），45サイクルで810秒（13分30秒）である。

各温度サイクル，特に伸張反応（中温）を6秒間で完了するため，通常のDNAポリメラーゼでは伸張反応には正確かつ高速な酵素を用いる必要がある。そのため，PrimeSTAR GXL DNA polymerase，SpeedSTAR HS DNA polymerase（いずれもTaKaRa）を使用している。

我々は，2009年の新型インフルエンザ・パンデミック時に研究班（主任研究者：渡邊治雄）の課題として新型インフルエンザ用PCRの高速化に取り組んだ。その結果，H1N1（pandemic 2009）を20分程度で検出同定できる系を構築することが出来た。

通常Reverse Transcription（逆転写，RT）には30分以上の時間がかかる。我々はRT反応を5分程度で終了し，そのままHyper-PCRを実施することが出来るワンステップRT-Hyper-PCRを開発している。

4-3. RT-Hyper-PCRキット

この系はTaKaRaからOne Step SYBR[®] High Speed RT-PCR Kit（Hyper-PCR[™]）として製品化

され市販された。キットの説明には、「本製品は，SYBR Green Iを用いたインターカレーター法専用の1ステップリアルタイムRT-PCRキットである。卓越した伸長性を示す逆転写酵素PrimeScript II RTaseと超高速PCR用酵素を組み合わせて，超高速RT-PCR用に最適化している。超高速反応条件での使用により，逆転写反応とPCRおよび融解曲線分析を30分以内に完了することが可能である。」と記載されている。また注意事項として「本キットによる逆転写反応には，PCR用のSpecific Primer（Reverse）を用いる。Random PrimerやOligo dT Primerは使用できない。」ことも記載されている。

4-4. 反応系

インフルエンザH1N1 2009 pdmの検出系について我々は，パンデミックの際に，Hyper-PCRを使用して20分程度でH1N1（pandemic 2009）を検出同定できる系を開発した。2009年の時点で考えていたHyper-PCRは，①Hyper-PCRの機器を使用し，②Hyper-PCRに対応出来る高速PCR用試薬を用い，③リアルタイムモニタリングができる，ことの3点を満たすことを想定していた。

15～20分程度でT_m解析を含めた結果が得られる系が開発でき，③の必要はなくなった。

現在；アデノウイルス，エンテロウイルス，ライノウイルスなど様々な呼吸器ウイルスやその他の病原体についてHyper-PCRの検出系を作製している。現在は，①高速のサーマルサイクラー（Hyper-PCR MK-Ⅳ等）を用い，②Hyper-PCR試薬キットを用いる系をHyper-PCRと呼んでいる。

4-5. Hyper-PCRの利点と欠点

（利点）

- ① 結果が迅速に得られる。
- ② PCR産物も迅速に得ることが出来る，その後の塩基配列解析に用いることが出来る。
- ③ 設計したプライマーが使用できるか否かの判定がすぐに出来る。
- ④ 反応系に使用する試薬は少量で済む。
- ⑤ RT-Hyper-PCRキットが確立され市販されている。

（欠点）

- ① Random Primer[™]やOligo dT Primerを使用

きない（出来る場合もあるが、反応効率が悪い）。

- ② 900bp以上の長い配列は増幅が難しい場合が多い。
- ③ 通常の反応チューブでなく、専用の反応容器を用いる。Hyper-PCR(トラストメディカル)では前述のとおりディスク状の容器およびフッ素加工したシールで封入する操作に慣れを要する。
- ④ ミックスプライマーやイノシンの入ったプライマーでの反応が難しいことが多い。

Hyper-PCRは基本的にPCRである。しかし、通常2時間以上かかる反応を15~20分程度に短縮することは実験時間の節約に大変役だつ。我々の研究室においては、有用な反応として日常的に用いている。

4-6. RT-Hyper-PCR

通常 Reverse Transcription(逆転写, RT)には30分以上の時間がかかる。RT-Hyper-PCRはRT反応を5分程度で終了し、そのままHyper-PCRを実施することが出来る(ワンステップRT-PCR)。ゲノムを3分程度で抽出することが出来る技術(島津製作所と共同で検討中)を用いることで、30分以内に臨床検体からPCR反応を終わることが出来る。機器としてHyper-PCR MK-IV(トラストメディカル)を用いればT_m解析までその時間内に終えることが出来る。

4-7. 2009年のインフルエンザ・パンデミック時におけるHyper-PCR活用

Influenza virus H1N1(pandemic 2009)流行時の適応事例を示す。

[目的] 通常のリアルタイムPCRは3時間程度の時間を要するので、所要時間を20分程度に短縮して迅速に検査出来る系を作る。

[方法]

検 体：

採取場所：兵庫県S病院

検体と採取期間：2009年9月26日~2009年12月24日に鼻腔ぬぐい液を採取

対象：臨床症状または疫学的背景から新型インフルエンザ感染が疑われ、かつインフォームドコンセントが得られた129名。

検 査：Hyper-PCR MK-IV(トラストメ

ディカル)を用いた。

ゲノムの抽出は通常のカラムキットを用いた。RT-PCRの試薬は、その後にタカラバイオからOne Step SYBR High Speed RT-PCR Kit(Hyper-PCR™)として発売された組成のものを開発し、用いた。プライマーは、フォワードプライマーとして5'-TCATGCGAACAATTCAACA, リバースプライマーは5'-TGGGGCTACCCCTCTTAGTTTGを用いた。温度条件は、RT反応に45℃1分, 95℃1分, [95℃6秒, 55℃6秒, 72℃6秒]×43サイクルである。

増幅サイズは127bpであった。2種類のリアルタイムPCR法を対象として用いた。検査の全体の流れは次のとおりである。

■検査の流れ

①ゲノム抽出 → ② RT-HyperPCR

↓

③ cDNA 合成 → ④ real-time PCR

- ・ A 亜型共通用 (SYBR Green)
- ・ 新型インフルエンザ用 (TaqMan)

[結果] 国立感染症研究所が標準法として示した手法⁵⁾をゴールドスタンダードとして、感度100% (90/90), 特異度97.4% (38/39)であった。検出感度は10コピー/反応程度で高感度であった。

[考察] 検査にかかる所要時間は20分程度で2時間程度かかるリアルタイムPCRとほぼ同じ感度でInfluenza virus H1N1(pandemic 2009)を検出することが可能であった。本研究は、新型インフルエンザの流行の開始直後になされ、Hyper-PCRによる高速なウイルス遺伝子検出が可能であることを証明する結果が得られた。

4-8. PCRの課題

Hyper-PCRは、PCRの高速性を最大限に引き出すことを目的とした技術である。そのためPCRが内在的に持っている欠点をそのまま持つ。非特異的な増幅の可能性を完全に否定する

ためにはシーケンシングをする必要がある。ただし Hyper-PCR MK-IV 等の T_m 解析ができる機器を用いれば、多くの非特異反応は目的産物の増幅と鑑別可能である (図 4 A)。

5. 電気泳動と MultiNA

5-1. 通常の電気泳動

Hyper-PCR は、PCR を超高速で実施する反応系である。PCR による増幅産物の検出・同定において電気泳動を用いた増幅の確認は確実に一般的な手法である。

一般的なゲル電気泳動は、①泳動用バッファの準備、②泳動用ゲルの準備、③泳動槽の準備、④ PCR 産物、¹サイズマーカー等のゲルへの注入、⑤電気泳動、⑥ゲルの写真撮影またはデジタル画像 (デジタルデータ) としての保管、などの過程を要する。

5-2. 通常の電気泳動の種類

現在、使用されている電気泳動は、担体としてアクリルアミド (1959年) およびアガロースゲル (1961年) を用いる方法が多用されている。核酸の電気泳動にはアガロースゲル電気泳動が多く用いられる。

5-3. マイクロチップ電気泳動

マイクロチップ電気泳動 (microchip electrophoresis ; MCE) は、1993年に Manz⁶⁾ らによって報告された。ガラス (本稿の MultiNA では石英) の基板上の微細な流路の中でキャピラリー電気泳動 (Capillary electrophoresis (CE)) を行う手法である。以下、我々が使用している MultiNA (島津製作所) を例に述べる。

MCE の利点は、微量分析が可能なこと、分離能が高いこと、高速であること、ハイスループット化が可能なことである。

MultiNA の利点は次のようにまとめられる。

- 1) 微量分析ができる：キャピラリーは非常に細い流路なので微量の試料を分離するのに適している。DNA の検出下限は $0.2\text{ng}/\mu\text{L}$ である。
- 2) 分離能が高い：MultiNA の仕様書によると 5 bp (25~100bp), 5% (100~500bp), 10% (500~1,000bp), 20% (1,000~12,000bp) である。(サイズが大きくなればなるほど、ピーク面積が大きくなるため分離能は下がるもの

と思われた。試料中のゲノム濃度が高すぎる場合も同様に分離能が下がる。)

- 3) 高速である：1 検体あたりの処理時間は最短で 80 秒周期である。
- 4) ハイスループット化が可能：3) の高速性の点は分析前後の洗浄時間がかかるため、少数検体を分析する場合は MultiNA の利点を十分に生かすことは出来ない。

多検体 108 件 (最大 120 検体) を一度にセットでき、その間に手作業の必要が無い。

- 5) データ管理が行える：従来のアガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色法では検出結果を写真として保存するため結果毎の統一性が保てなかったが、MultiNA ではシグナルとしてすべてデータを取り込むため、データの統一性が維持でき、管理が出来る。

欠点としては、分析過程の前後にチップの洗浄過程が入り、少数の検体では通常のアガロースゲル電気泳動の方が速いこと、自動表示されるベースサイズが予想されるサイズとずれることがあること、および高濃度のゲノムを流すなどした場合にチップの劣化が速いことなどと思われる。我々は、これらの克服のための研究も進めている。

動画で見ると分かりやすい (<http://www.youtube.com/watch?v=SoO5viJyoNA>)。

5-4. MultiNA に用いるチップと試薬

マイクロチップ：石英製である。繰り返して使用できることが利点である。原理とともに図 3 に示した。

試薬：次のものが必要である。

マーカー：内部標準である。泳動毎の移動度のズレを補正するためにすべての分析対象 (ラダーとサンプル) に添加し、低分子マーカー (蛍光色素) と高分子マーカー (キットの分析範囲より大きな DNA) を含む。

ラダー：サイズ検量線を作成するための試料。アガロースゲル電気泳動の分子量マーカーに相当する。

6. Hyper-PCR と MultiNA

我々は、通常の PCR 法を迅速化する手法としての Hyper-PCR に加えて、PCR 後の電気泳

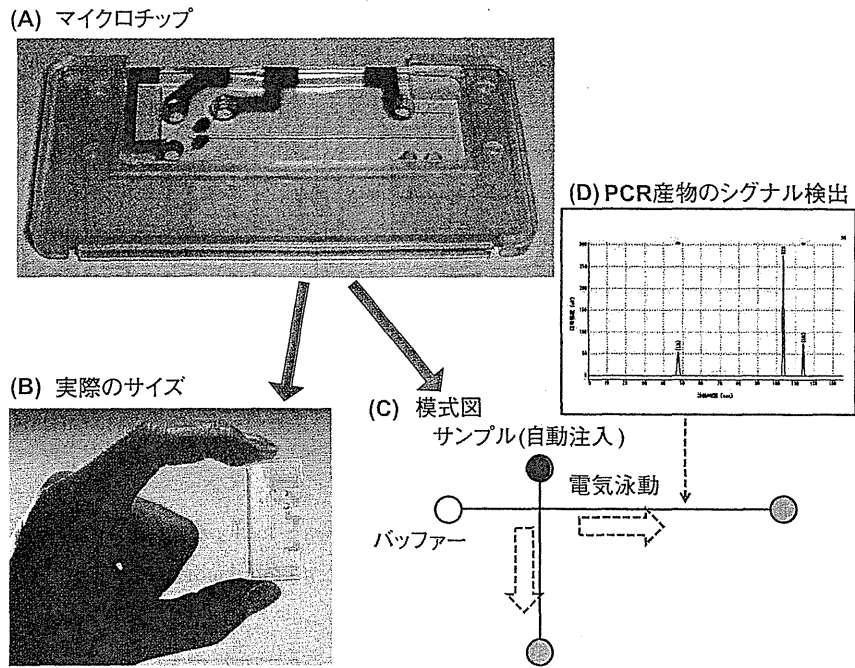


図3 MultiNAに用いるマイクロチップ (A) のサイズは (B) のとおり小型であり、(C) のとおり、自動注入されたサンプルは細密な流路内で電気泳動により分離され、(D) のとおりシグナルとして検出される。

動を自動化する目的で MCE を検査および研究に導入している。これらは、それぞれに利点と欠点を合わせ持つ技術である。その利点を十分に発揮させることにより研究等の進展に役立っている。通常の PCR やリアルタイム PCR と Hyper-PCR を併用していて、MultiNA もまた、通常のアガロース電気泳動と併用している。

検査および研究において時間とコストはいずれも重要であり、その短縮および節約のためにこれらの機器を使用している。

Hyper-PCR は、融解曲線解析により陽性か陰性かの判定が出来るが、非特異的なバンドが多い場合に判定が出来ないことがある。そのような場合に MultiNA で増幅産物を解析することで陽性か否かを判定することが出来る。

Hyper-PCR と MultiNA を使用して血清中のエンテロウイルスを確認した例を図 4A および B で示す。

上記の実験においてバンドサイズから陽性と判定した検体は nested PCR およびシーケンシングによりエンテロウイルスであることが確認された。

7. おわりに

Hyper-PCR をはじめて見たときに筆者は衝撃を受けた。これまで2時間程度が当たりまえの反応時間が10倍程度短縮されていたからである。それから5年ほど Hyper-PCR の共同研究を進め、現在も続けている。当初はすべての PCR 反応を Hyper-PCR で実施することを考えた。しかし、高速 PCR はミックスプライマー等に向かないことが分かり通常の PCR と併用している。また、当初は高速リアルタイム PCR として捉えていたが⁸⁾、長くても30分で反応過程が終わるので現在では融解曲線解析も出来る超高速 PCR と考えている。

ふつうの PCR で失敗するとやり直しに数時間を要していた。ポジティブコントロールで増幅が見られていないなど再検査を要すると PCR は一日仕事になる。その高速化は我々、病原体検査を実施しているものにとって夢の一つであった。Hyper-PCR はその夢の一部をかなえてくれた。

PCR 後の電気泳動もまた、反応件数が多い場合に大変煩雑な作業であり、その自動化を望んでいた。MultiNA は、分析操作にかけてしま

図 4 A

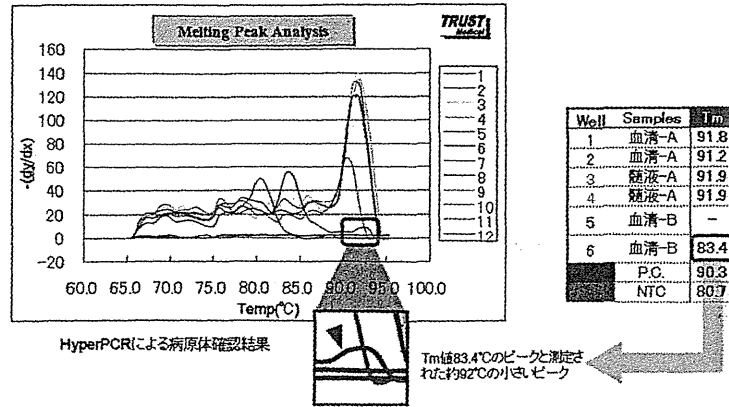


図 4 B

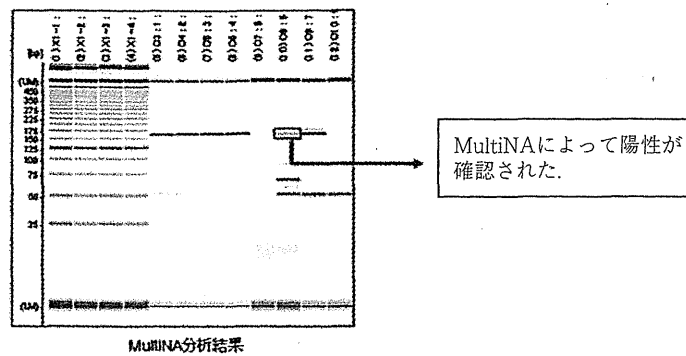


図 4 髄液および血清について Hyper-PCR の融解曲線解析で非特異増幅 (Tm83.4度) の方が多く判定に迷った血清検体 (図 4 A のウェル 6) について増幅産物を MultiNA で解析すると目的サイズの増幅が確認された (図 4 B) 。

いさえすれば、その後の操作は自動であり、また微量の増幅も検出することができ、得られたデータは自動的に保存され、異なった施設間でも比較がしやすい。

現在、MultiNA を多用して、その有効性を検討しているところである。これらの国産の機械および試薬を筆者は共同研究をトラストメディカルならびに島津製作所等と実施して評価・改良している。

PCR は成熟した技術のように思われるが、臨床への導入は道半ばであり、その導入を阻む要因を解決する手立てとして我々の研究が少しでも役立つことを願っている。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、大変お世話になりましたトラストメディカル、島津製作所、タカラバイオ、関係病院の先生方、川崎市衛生研究所ならびに渡邊

治雄所長はじめ国立感染症研究所の関係者の皆様に深謝申し上げます。また、執筆の機会を与えていただきました堺春美先生ほか、臨床とウイルス編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 藤本嗣人, 花岡 希, 谷口清州, 岡部信彦: ウイルス感染症のための検体採取10原則. 小児科 52: 471-475, 2011
- 2) 宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一, 西尾 治, 吉田 弘, 岡部信彦, 辻 勉: エンテロウイルス遺伝子診断法における市販 RNA 抽出キット選択の影響. 感染症誌 82(1): 55-57, 2008
- 3) Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Tonoike H, Shirasaki Y, Kojima K, Ishida S: Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. J Virol Methods

- 163, 282-286, 2010
- 4) Kerdsin A, Uchida R, Verathamjamrus C, Puangpatra P, Kawakami K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K : Development of triplex SYBR green real-time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella* spp. without extraction of DNA. *Jpn J Infect Dis* 63, 173-180, 2010
 - 5) WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1)2009 virus in humans — update 18 August, 2009
 - 6) Harrison DJ, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauer CS, Manz A : Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science* 13 : 261, 895-897, 1993
 - 7) 藤本嗣人, 曾我部有司 : 微量な病原体遺伝子の検出・同定ウイルス検出におけるリアルタイムPCRの落とし穴と電気泳動による確認の重要性—MultiNAの活用—. *アプリケーションノート* 1-4, 2011
 - 8) Fujimoto T, Konagaya M, Enomoto M, Tsuboi K, Hashimoto K, Taniguchi K, Kodama T, Okabe N. Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR) : results from its application to adenovirus diagnosis. *Jpn J Infect Dis* 63, 31-35, 2010

島根県における学校欠席者情報収集システムの活用について

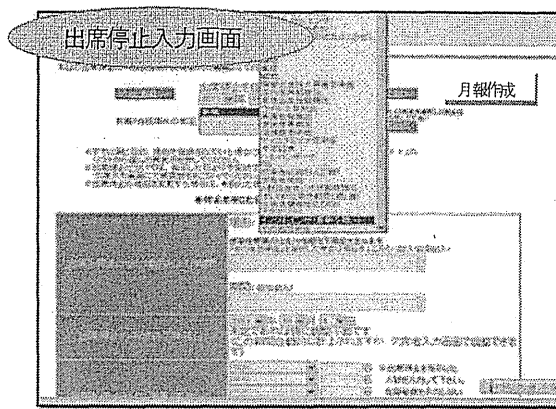
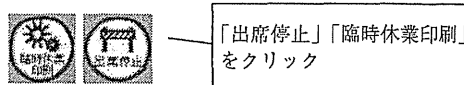
～学校危機管理の一環として～

島根県教育庁保健体育課 健康づくり推進室 松井 浩美

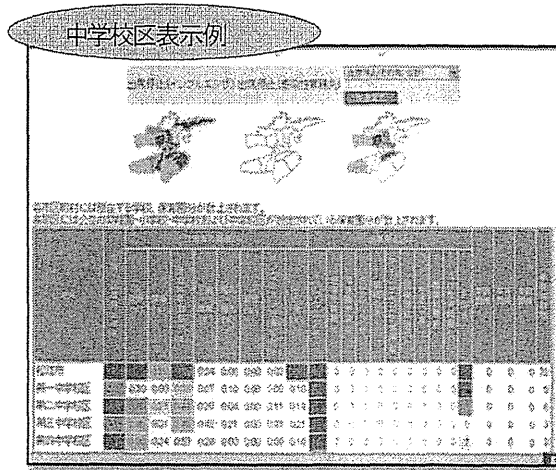
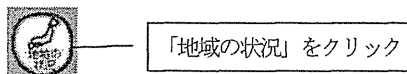
島根県では、平成21年8月より全県体制で本システムの運用を開始しました。その年、新型インフルエンザ大流行の懸念があったことや島根県出雲市が本システムの先行実施をしていたこともあり、導入のタイミングに恵まれていたと考えます。

その後も、国立感染症研究所に学校現場の希望等をシステムに反映してもらいながら、各学校の協力により継続しています。そして、日々の危機管理の一環として、入力した学校現場にとっても「有効で活用しやすいシステム」を目指していますので、その活用的一端を紹介します。

○閉鎖時の臨時休業等報告書や出席停止報告書の月報の作成、印刷が即時にでき省力化につながる。



○県全体や隣県はもとより、県内各市町村別、各中学校区別、症状別の状況がリアルタイムで分かるため、早期対応につなげることができる。



運用開始の経緯

- 平成20年10月より出雲市が先行実施
- 平成21年6月：クラスターサーベイランスにあわせ、全県での実施を決定
 - ・県内全域学校（国公立小中、県立学校、私立学校、出雲市のみ幼稚園、保育所）
 - ・行政機関（県薬事衛生課、各保健所、県教委、各市町村教委）
- 同7月：実施にあたっては、県教委が各県立学校担当者および各市町村教育委員会保健担当者にシステムの活用説明 → 各市町村で各校に周知、説明、県立学校養護教諭研修会で活用についての指導、希望市町村へは国立感染症研究所による訪問指導等
- 同8月：運用開始
- 同9月：県医師会からの閲覧を開始

学校での入力にかかる時間は5分程度で、入力の負担以上に以下のようなメリットがあります。

活用によるメリット（学校）

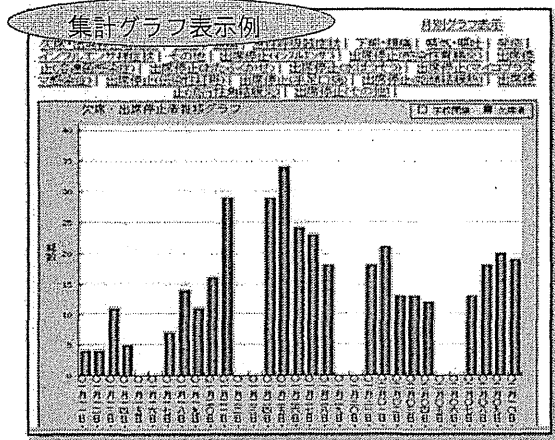
- 個人の出席停止報告を入力に代えることで、「ペーパーレス」につながる。
- ※県立学校は完全実施、市町村立学校は各市町村立学校管理規則による。

- 各学校で登録したパスワードを入力することにより、教職員は誰でも閲覧が可能。また、校医もパスワード入力により、担当校の各学級の状況も把握することができる。
- 学級および学校全体の欠席者総数のみならず、

疾患別の集計結果（週報、月報）がグラフになるので、職員会、学年会、学校保健委員会等での数値的根拠に基づいた情報提供や、保健だよりを通した保護者への指導にも活用できる。また、指定した期間を検索し、前年度の流行傾向および閉鎖措置の時期との比較や各種統計作成が可能。



「参照」をクリック



活用によるメリット（行政）

○県からのコメントを掲載することができるので、入力内容のフィードバックや県内流行情報等を随時提供することにより、情報の共有化をはかることができる。

トップページお知らせ



- 県立学校（高校）において、学校保健安全法第9条で明記された「健康観察」が着実に実施されるようになった。
- 県内全域から各校の詳細に至る情報が随時わかり、情報の早期確認とともに、県全体（市町村教委においては域内の詳細）の動向を把握し、指導や評価に生かすことができる。
- 全件報告の感染症（結核、麻しん、腸管出血性大腸菌感染症、風しん）が入力されると、県教委、県保健部局、該当市町村教委、該当保健所へメール通知があり、早期対応が可能。

まとめ

島根県では、2年前から本システムの運用を開始し、現在は県全体の8～9割の学校が毎日入力をしている状態です。

今後、臨時休業措置の県への報告についてもシステム入力に替えることが可能になれば、学校現場にとっては今以上の省力化とペーパーレス化が期待できます。しかし、そのためには、定時までの入力と県内全校が入力することを徹底する必要があります。

行政としては、県医師会、県保健部局（保健所）、各市町村教育委員会と協議をしながら、感染症の早期発見および蔓延予防、さらには、情報提供や情報共有の場としての機能を強化したいと考えています。

児童生徒の心身の安全を確保するために、学校危機管理のさらなる充実が求められています。本システムは、感染症発生時の危機管理のみならず、未然防止に向けた取組（事前の危機管理）や発生時対応の評価と再発防止に向けた取組（事後の危機管理）にもつながるものです。

そして、日々の入力という日常の積み重ねが、危機管理を進めていく上で、学校にとっても行政にとっても重要な意味をもっていると考えます。

学校保健の最新情報を満載

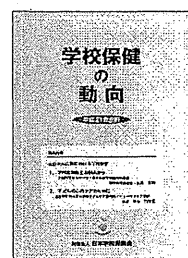
平成23年度版 学校保健の動向

特集 東日本大震災における学校保健

- 第1章 健康管理の動向 感染症、児童生徒の発育・発達、眼科等科目別ほか
- 第2章 学校環境衛生の動向 学校環境、学校給食
- 第3章 健康教育の動向 保健教育、安全教育、食育・栄養教育ほか
- 第4章 学校保健に関する組織・団体の最近の動向

一般書店等でも
購入できます！

- 養護教諭、大学関係者必携
- 養護教諭養成課程の学生の採用試験対策としても最適



発行/財団法人日本学校保健会
2,800円（税別）