

201318056A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎義継

(国立感染症研究所)

平成 26 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎義継

(国立感染症研究所)

平成 26 年 3 月

平成 25 年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究」

班員名簿

氏 名	所 属	職 名
宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部	部長
大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部	部長
調 恒明	山口県環境保健センター	所長
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター 微生物部	部長
野崎 智義	国立感染症研究所 寄生動物部	部長
加藤 はる	国立感染症研究所 細菌第二部	室長
高崎 智彦	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
清水 博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部	室長
竹田 誠	国立感染症研究所 ウイルス第三部	部長
蒲地 一成	国立感染症研究所 細菌第二部	室長
御手洗 聡	公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部	部長
森川 茂	国立感染症研究所 獣医科学部	部長
俣野 哲朗	国立感染症研究所 エイズ研究センター	部長
藤本 嗣人	国立感染症研究所 感染症疫学センター	室長

目 次

- I. 総括研究報告書（平成 25 年度）
国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
研究代表者：宮崎義継（国立感染症研究所）

- II. 分担研究報告書
 1. 地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動・・・ 1 1
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）

 2. 大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 5
研究分担者：大西 真（国立感染症研究所 細菌第一部）

 3. 地方衛生研究所における検査機能について・・・・・・・・・・ 2 9
研究分担者：調 恒明（山口県環境保健センター ）

 4. カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴・・・・・・・・ 3 3
研究分担者：甲斐 明美（東京都健康安全研究センター 微生物部）

 5. 寄生虫症に関するサーベイランス強化に関する研究・・・・・・・・ 3 9
研究分担者：野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）

 6. ジフテリア、ボツリヌス症、および、ボツリヌス症以外の
クロストリジウム属菌による感染症に関するラボネットワーク構築・ 4 3
研究分担者：加藤 はる（国立感染症研究所 細菌第二部）

 7. 日脳および新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断体制の拡充・・・・ 4 7
研究分担者：高崎 智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

 8. リケッチア・レファレンスセンターの活動について・・・・・・・・ 5 3
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

9. 下痢症ウイルスのレファレンスにかかる研究・・・・・・・・・・ 57
 研究分担者：清水 博之（国立感染症研究所 ウイルス第二部）
10. 腸管ウイルス感染症（下痢症ウイルス、エンテロウイルス等）
 のレファレンス・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
 研究分担者：清水 博之（国立感染症研究所 ウイルス第二部）
11. 麻疹・風疹・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75
 研究分担者：竹田 誠（国立感染症研究所 ウイルス第三部）
12. 百日咳レファレンスセンターにおける病原体サーベイランス活動・・ 97
 研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所 細菌第二部）
13. 結核菌型別分析における精度保証・・・・・・・・・・・・・・・・ 101
 研究分担者：御手洗 聡（公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部）
14. 動物由来感染症レファレンスセンター 平成 25 年度活動報告
 炭疽菌 DNA の PCR 検査における検出限界の算定・・・・・・・・ 105
 研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）
15. HIV 関連感染症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 109
 研究分担者：俣野 哲朗（国立感染症研究所 エイズ研究センター）
16. 新しい 48 型関連組換え型アデノウイルスの
 結膜炎患者からの検出・同定・・・・・・・・・・・・・・・・ 111
 研究分担者：藤本 嗣人（国立感染症研究所 感染症疫学センター）
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 117

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究

研究代表者：宮崎義継	（国立感染症研究所 真菌部）
研究分担者：大西 真	（国立感染症研究所細菌第一部）
調 恒明	（山口県環境保健センター）
甲斐 明美	（東京都健康安全研究センター）
野崎 智義	（国立感染症研究所寄生動物部）
加藤 はる	（国立感染症研究所細菌第二部）
高崎 智彦	（国立感染症研究所ウイルス一部）
安藤 秀二	（国立感染症研究所ウイルス一部）
清水 博之	（国立感染症研究所ウイルス二部）
竹田 誠	（国立感染症研究所ウイルス三部）
蒲地 一成	（国立感染症研究所細菌第二部）
御手洗 聡	（結核予防会結核研究所）
森川 茂	（国立感染症研究所獣医学部）
俣野 哲朗	（国立感染症研究所エイズ研究センター）
藤本 嗣人	（国立感染症研究所疫学センター）

研究要旨 国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所は病原体検査に関して、各種の病原体情報を共同で発信しているが、両者は行政上、所属の違う組織であり連携の明確な法的根拠は無く、共同作業の障壁になっている。危機的感染症発症の迅速な察知、正確な疫学情報の把握を目的として、検査方法の標準化、および疫学調査を通じて感染研と地衛研の連携体制を構築する研究を実施した。

A. 研究目的

新型インフルエンザ等の感染症アウトブレイク、バイオテロや広域に及ぶ致死的食物中毒など国民生活に脅威となる感染症のリスクは常に存在し、時に現実となっている。

これら危機的感染症の発生に対する初動スキームは、①まず病原体を特定する、②判明した病原体のサーベイランスにより感染拡大を把握する、ことである。しかし、現行では国全体として統一的に初動スキームを可能とするような、法的に整備された

システムが存在しない。

そこで、危機発生時に直ちに何らかの手段により全国規模で病原体診断を実施できるラボネットワークを構築・維持することは危機管理上必須である。

本研究班では、感染研と各地方自治体の検査室（地方衛生研究所等）が相互に補完協力することを前提として、危機的な感染症の発生に際して上記の初動が可能となるように、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などあらゆる病原体の危機的感染症発生に備

える研究を実施する。研究の性格上、公衆衛生学的に重要性が高まった感染症の病原体を優先して対象としていく。

具体的には、以下のような共同作業を通じてラボネットワーク機能を強化し、危機的感染症発生に際して、感染研と協力し全国で病原体検査が実施可能な体制を構築・維持する。①公衆衛生上問題となりうる病原体に関する診断・検査法の研究、②診断・検査法共有のための相互研修やマニュアル作成、③病原体診断用器機や試薬等の整備、④診断・検査法の精度管理、など。

病原診断により感染症の診断はなされるため、正確な病原診断を実施できることが感染症サーベイランスの基本となる。本研究の成果は、全国の行政機関における病原診断能力の向上と維持につながり、わが国における精度の高い感染症発生動向調査結果として報告され、施策に直接反映される。

また、インフルエンザ等のパンデミックにおいて流行状況を把握する必要が生じた場合、緊急に検査法を構築し共有する必要があるが、本研究成果の活用により、全国での病原体検査実施が迅速、且つ、円滑に行われ、また流行状況の正確な把握が可能になり、パンデミック対策に資する。

B. 研究方法

研究は研究代表者（宮崎）、研究分担者14名の計15名によって行われた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が総括する形で遂行された。研究は、1）各病原体レファレンスセンター活動、2）病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立を中心に行った。具体的には、以下の方法で研究を遂行した。

1) 各病原体レファレンスセンター活動

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：国立感染症研究所長をはじめとする感染研のスタッフと、地方衛生協議会全国協議会会長、および、感染症対策部会の委員が協議を行った。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：これまでに行ったレファレンスセンターに関する調査結果、地域保健総合推進事業において調査されている自治体における検査項目などを利用して考察を行った。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：大腸菌血清型別、レジオネラ SBT 法による遺伝子型別、溶血性レンサ球菌の T 型別および M 型別分類を行った。

■カンピロバクター：全国で分離されたカンピロバクター菌株について、Lior 法および Penner 法で型別して、その動向を把握。また、薬剤耐性株の出現状況調査を実施。

■寄生虫：輸入寄生虫症について、成田・羽田・中部・関西の主要4国際空港検疫所との相互研修を利用して、マラリア以外の寄生虫症に関する検疫のニーズと可能性に関して情報交換をし検討した。ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は5例あり、ウエスタンプロットによる検査キットを用いて抗体検出を行った。

■ジフテリア・ボツリヌス：ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会、および *Clostridium difficile* 感染症の細菌学的検査に関する研修会を行った。

■フラビウイルス・トガウイルス：ロスリバーウイルス病原体検出法の地方衛生研究所アルボウイルスセンターおよび希望施設に技術移転を開始した。

■リケッチア：マニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価、全国情報の共有の機会とレファレンスセンター担当者のスキルア

ップを行った。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：エンテロウイルス検査に関するアンケート調査を行った。

■百日咳:Prn 欠損株の流行調査を行った。

■動物由来感染症：炭疽菌に関して、参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめを行った。

■HIV 関連感染症：衛生微生物技術協議会第 34 回研究会（名古屋）における HIV 関連感染症に関する会議で、地方衛生研究所等との協議・議論を進め、その後も適宜、情報交換を行った。地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力した。

2) 病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立および評価

■カンピロバクター：型別率の低下が認められる Penner 法について、その原因の解析を行った。

■寄生虫：医療施設から検査依頼があった有症のマラリア患者の検体で、検査結果が食い違った 2 例について検討を加えた。イムノクロマト法による迅速診断キットについて比較検討した。

■フラビウイルス・トガウイルス：リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) および RT-PCR 従来法を評価した。チクングニアウイルスとの交差反応性について検討した。日本脳炎ウイルスに関して、リアルタイム PCR 系を再構築し、ウイルスを含む細胞培養上清、ヒト血清、ブタ血清を用いて非特異反応の有無を検討した。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)：ノロウイルスの GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清を作製した。ノロウイルスの新規 genotyping 法と、それに対応した RT-PCR

法を開発した。全ゲノムセグメントを対象としたロタウイルス分子疫学法の基盤を構築した。

■麻疹・風疹：リアルタイム RT-PCR 法を評価した。

■百日咳：*B. holmesii* の遺伝子検査として、LAMP 法を用いたキットを作製した。

■抗酸菌：結核菌株を選択し、VNTR 分析によるコピー数の確認を行った。

■動物由来感染症：炭疽菌芽胞液から DNA 調整を調製し、低濃度 DNA 溶液の安定性の検証を行った。

■アデノウイルス：眼科定点医療機関を受診した結膜炎患者から分離された新型アデノウイルスの塩基配列解析を行った。

C. 研究結果

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：感染研と地衛研の間で常時連携して特定の疾病に対応する機能的な枠組みとしてレファレンスセンターをおくこととし、その概要につき設置、対象疾患、設置期間、実施項目、危機対応、研究利用につき明文化した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：地方衛生研究所において①精度管理、GLP 対応が必要と思われる感染症（インフルエンザ・麻疹・風疹・ノロウイルス・新興感染症）、②検査の強化が必要と思われる感染症（薬剤耐性菌）、③病原体検出マニュアル整備等が必要と考えられる疾患を明確にした。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHEC のサーベイランス：2013 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3084 株（平成 26 年 1 月 16 日現在）であった。

1.2 コントロール株、プライマーの配布お

よび情報提供を実施した。

1.3 下痢原性大腸菌 EQA の実施：菌株 (2012-2013 年用) 15 株を用い精度管理を実施したところ、すべての菌株において血清型および病原性遺伝子型の解析結果が感染研と大阪府で完全に一致した。

2.1 レジオネラ・レファレンスセンターにおける臨床分離株の収集状況：今年度 54 株が収集され、そのうち 2 症例は集団感染事例の可能性が示唆された。2013 年 6 月末現在で、合計 280 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。

2.2 レジオネラ免疫血清検査法について混合血清 4 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2012 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 1240 株で実施した。

3.2 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の T 型別：2012 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の報告が 95 症例あった。最も多く分離された型は T1 型で全体の 51.6%であった。

3.3 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の emm 型別、M 型別：STSS の確定診断例 95 例中、emm1 型(M1 型)が 49 例 (51.6%)で最も多かった。

■カンピロバクター

1. Lior 法及び Penner 法による血清型別：2012 年に分離された *C. jejuni* 265 株を Lior 法によって、260 株について、Penner 法で型別を行い、それぞれの検査法の特徴が判明した。

2. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2012 年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株(NA、NFLX、OFLX、CPFx)の割合は、47.7%、*C. coli* では、10 株中 6 株(60%)であった。一方、エリスロマイシン (EM) に対する耐性率は、*C. jejuni*では 1.1%、*C. coli*では

20%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. マラリア：2 例のマラリア検査のうち、1 例目は迅速診断キットでは陰性であったが、形態検査および遺伝子検査で熱帯熱マラリアと確定診断された。2 例目は顕微鏡検査・迅速診断キットおよび遺伝子検査で 4 種のマラリア原虫による混合感染と判明した。

2. エキノコックス症：ヒトの 5 疑診例〔北海道への渡航歴のある 3 例(多包虫症疑い)、ネパール人 2 名(単包虫症疑い)] およびイヌの 1 疑診例(多包条虫症疑い)について検査を行った。

■ジフテリア・ボツリヌス

1. 講習会および研修会：ボツリヌス症および *C. difficile* 感染症の細菌学的検査に関して講習会と研修会を行った。参加研究所へは、ボツリヌス診断用抗毒素、および毒素遺伝子検出 PCR 用陽性コントロールを配布した。

2. 症例報告(論文作成)の支援：創部から分離された破傷風菌の解析について、論文報告した。

■フラビウイルス・トガウイルス

1. ロスリバー熱：ロスリバーウイルスの遺伝子検出系で 4 株すべてが検出できた。また、初めてオーストラリアからの輸入ロスリバー熱患者血清により、抗ロスリバーウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築し、交差反応性・偽陽性を検討した。

2. 日本脳炎ウイルス：遺伝子検出法としてリアルタイム逆転写 PCR による遺伝子 1-3 型型別検出系を確立し、十分な感度と特異性を有していた。

■リケッチア

1. マニュアル改訂：つつが虫病および日本紅斑熱のマニュアルの改訂作業を実施し

た。

2. 全国共通となる検査法の評価：改訂マニュアルに新規に追加された日本紅斑熱のリアルタイム PCR について、標準化のための準備を行った。

3. 全国情報の共有の機会と担当者のスキルアップ：研究協力者である衛研担当者間の情報共有を可能とする機会をそれぞれ積極的に行い、相互の連携を可能とする調整を行った。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)

1. ノロウイルス：ノロウイルスの GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製に成功した。ノロウイルスの第三世代プライマーセットを用いたノロウイルス新規 genotyping 法を各ブロックレファレンスセンターと準備中で来年度より試験的運用開始予定している。

2. ロタウイルス：全ゲノムセグメントを対象としたロタウイルス分子疫学法として、マイクロチップ電気泳動装置を用いて RNA-PAGE 条件の最適化を行った。本装置が導入されている衛研にレファレンスブロック拠点として活動を依頼し、本法による分子疫学を推進する。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：アンケート調査を行い、合計 79 衛生研究所のうちエンテロウイルス検査を行っている 67 機関から回答を得た。検査を担当する人員数、年間検体数、検体搬入、検査材料、ウイルス分離方法、ウイルス同定法、塩基配列による同定法、品質管理について回答を得た。基盤的な技術(細胞培養、分離同定)や遺伝子解析による同定検査に関する研修要望が多かった。

■麻疹・風疹

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR：10 カ所の麻疹・風疹レファレンスセンターで実

施した計 33 回の検量線解析の結果を分析した。ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であった。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR：段階希釈した参照 RNA を各麻疹風疹レファレンスセンターにおいて 3 回の測定を実施した。各レファレンスセンターにおいて、安定して Ct 値 40 未満で検出可能な風疹参照 RNA の希釈段階の一点が陽性コントロールとして設定された。

■百日咳

1. レファレンス関係：レファレンスセンターおよび他の地衛研へ *B. holmesii* LAMP キット、4Plex リアルタイム PCR キット、陽性コントロール DNA を配布した。4Plex リアルタイム PCR と LAMP 法との検査不一致や偽陽性の問題が指摘された。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株(184 株)における Prn 欠損株の出現状況について疫学的解析を行った。

■抗酸菌:

1. 結核菌 VNTR 分析普及のための活動：VNTR 分析を各地域の衛生研究所に普及するために、VNTR 分析用の 18 座位のプライマーセット、4 種類のゲノム DNA、陽性コントロール DNA を希望する施設に送付した。

2. 結核菌遺伝子解析に関するアンケート調査：結核菌型別の実施状況を調査したところ、79 施設の内、41 施設では結核菌を扱っており遺伝子型別等が可能との回答が得られた。

3. 精度保証用ゲノム DNA パネルの準備：30 座位のコピー数を調べるための本精度保証のパネルテストを準備した。

■動物由来感染症：炭疽菌芽胞液からの DNA 調整を行い、低濃度 DNA 溶液の安定性を検証した。参加衛生研究所へ検体を送

付したところ、検出限界の濃度は施設間で差異がみられた。

■HIV 関連感染症：ネットワーク体制を推進し、HIV 感染者・エイズ患者の報告件数、地域・年齢・感染経路等の分布、疫学的解析結果、薬剤耐性変異株動向、保健所等における検査状況・体制、献血における HIV 陽性者数、検査技術等に関する情報を共有した。地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力し、検査技術の維持・向上に努めた。

■アデノウイルス：得られた新型アデノウイルス分離株は、A549 での増殖性が良くウイルス分離は比較的容易であった。全ゲノム塩基配列の決定および系統樹解析・組換え解析を行った。

D. 考察

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：レファレンスセンターの概要について明文化したことにより、わが国の病原体検査が円滑に実施できることが期待される。実際に運用し修正が必要な事項等が明らかになれば、協議の上変更が必要と考える。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：今後の以下の項目を検討することが必要である。

1. EHEC 検査マニュアルの改訂

2. EQA の実施

3. ウシ由来 EHEC 株の分布解析

4. レジオネラサーベイランス：感染源推定の精度を高める。より効率的なレファレンスセンター運営方法の検討。

5. A 群レンサ球菌のワクチンとして、26 価、または 30 価の M タンパクワクチンが開発中であるが今後、どこの施設でも型別が可能な emm 遺伝子型別の普及が課題。

■カンピロバクター：国際的に認められて

いるカンピロバクター型別法の 1 つである Lior 法は、操作は容易であるが、判定はやや困難であるという欠点がある。一方、Penner 法の操作は煩雑であるが、判定は容易である。2012 年の *C.jejuni* キノロン耐性菌の出現率は 47.7% で、昨年(47.6%)とほぼ同等であるが、高い値を示していることから、十分な監視が必要である。

■寄生虫：マラリアの検査にあたっては、顕微鏡による形態検査、PCR などの遺伝子検査、イムノクロマト法による迅速診断キットでの検査結果が一致しないことがある。また、マラリア以外の寄生虫症も含めた検疫に関する相互研修では、ヨーロッパ諸国では大きな問題とされる消化器系の寄生蠕虫症は、日本の検疫では殆ど注意が払われていないことがわかった。輸入寄生蠕虫症についても、国内で感染が拡大することはないが、今後は注意を払っていく必要性が認識された。

■ジフテリア・ボツリヌス

1. ボツリヌス症：稀少感染症であるが、食中毒事例が起きた場合には、地方衛生研究所には迅速・適切な対応が求められる。今年度の講習会では、動物実験に大きくフォーカスを絞った点が評価できると考えられた。

2. *C. difficile* 感染症：希少な疾患ではないが、医療関連感染症として重要であり、ひとたびアウトブレイクが発生すると対応に困難を極める。今年度は、*C. difficile* 細菌学的検査の研修をしながら、保健所・地方衛生研究所として何が必要とされているのか協議したことは非常に有意義であった。

3. ジフテリア：レファレンスセンターではない地方衛生研究所より、菌株などの配布希望があった。

■フラビウイルス・トガウイルス

1. ロスリバーウイルス：ロスリバー熱の流行は、オーストラリアおよびその周辺で発生している。輸入症例に備えて実験室診断系を構築したところ、本年5月に初輸入症例を確認することができた。また、より安全な遺伝子検出用合成陽性コントロールの構築を開始した。

2. 日本脳炎ウイルス：赤血球凝集阻止抗体、補体結合反応抗体検査は必ずしも感度は高くないので、より高感度で特異性の高い遺伝子型 1-3 共通の遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を構築、確立した。

■リケッチア：レファレンスセンターの全国共通基盤を構築することを目指し、つつが虫病と日本紅斑熱のマニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価の準備、全国情報の共有の機会と担当者のスキルアップを行った。地衛研を中心としたリケッチアレファレンスセンターを強化し、地域ごとに適切な実験室診断が行われ、地域に即した情報発信を行えるようにすることが、患者発生に対応する医療と地域公衆衛生に大きな貢献になると考えられる。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：人事異動により十分な技術継承が行われていない現状を踏まえ、習得に時間を要するエンテロウイルス検査に関する基盤的な研修(細胞の維持管理、ウイルス分離・同定検査)の実施、及び当該マニュアル整備の必要性が認められた。VP4・VP2 部分領域に基づく遺伝子検査法を実施している機関が多いことから、VP1 配列データと統合した情報を整備して行く必要性が認められた。

■麻疹・風疹

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法：擬陽性の問題では、試薬と機器の組み合わせにより起こった可能性が高いと推測できた。今後、本評価の際に各施設で用いられた試

薬や機器、反応条件等の情報を共有することで、この問題は解決しうると考えられる。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR 法：検出限界コピー数は、概ね 5~50 コピー/反応であることが分かった。今後、臨床検体を用いた検証が必要である。

■百日咳：平成 25 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キットを配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。これまでの評価により、本法に非特異的反応が確認されることが指摘された。現在、非特異的反応を解消する条件について検討を進めている。Prn 欠損株の流行調査により、わが国でも欧米と同様に欠損株の流行が継続していることが確認された。Prn 欠損株については継続した監視が必要であり、平成 26 年度も引き続き調査を行う予定である。

■抗酸菌：79 箇所の衛生研究所の中で 41 か所の施設で扱うことが可能で型別も行われていることが明らかになった。また、VNTR 法についての精度保証パネルを作成して配布すべきということが確認できた。今後、新規登録患者数が低下することで結核菌の全数型別も可能となれば、これらの手法で感染経路の推定もできるようになると考えられる。

■動物由来感染症：遺伝子間の検出感度の差はコピー数に由来することが考えられる。しかしながら、conventional PCR 検査系では低濃度 DNA での増幅に影響する他の要因も考えられる。過去に生物テロで使われた芽胞粉末(いわゆる白い粉)の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、First screening としての PCR 検査系としては十分な検出限界を有していると考えられる。

■HIV 関連感染症：HIV の多様性は大きく、ウイルスゲノム変化に持続的に対応した検

査技術の更新は重要である。本ネットワーク体制に基づく情報共有ならびに技術研修等による検査体制の維持・強化は、検査技術の維持・向上に極めて重要な役割を担っていると考えられる。

■アデノウイルス：新型アデノウイルス分離株はこれまで日本において検出されたことがなく、本研究は日本における HAdV-48 関連ウイルスの最初の報告である。このような株は、今後に流行する可能性がある。また、その全塩基配列からユニークな株であり、新しい **genotype** とされるべきものと考ええる。

E. 結論

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：レファレンスセンターの概要について明文化した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：特定の感染症について定期的に **EQA** を課すことにより地方衛生研究所のレベルはある程度保障する必要がある。**GLP** への対応としてプロトコールの作成、機器の保守管理、職員の資格の規定などが今後求められる。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：病原体検出マニュアルの記載事項の整備、改訂等を定期的に行なう必要がある。そのためにも、共同作業に当たっている各地方衛生研究所のスタッフ間、感染研の担当者との間の日頃の情報交換が必須である。また、ラボネットワークの充実度を検証する必要がある。外部精度評価システムが構築されるべきである。

■カンピロバクター：2012年にヒトから分離された *C. jejuni* 265 株について血清型分類を実施したところ、検査法の特性が判明した。また市販血清の力価に問題があるこ

とが示唆された。薬剤耐性株の出現状況は、キノロン系薬剤、**EM** 共に例年とほぼ同様の耐性率であった。

■寄生虫：エキノコックス症に関する監視体制は十分とは言えないので、今後も地研、保健所、医療研究機関との監視体制強化が求められる。また、検疫感染症に指定されているマラリアのみならず、他の寄生原虫症や寄生蠕虫症についても、輸入感染症の視点で注意を払っていくことが望まれる。

■ジフテリア・ボツリヌス：ボツリヌス症の検査技術の継承のためには継続して講習会を行うことが必要と考えられた。地方衛生研究所において、*C. difficile* 感染症に関する知識・技術を必要としていることが明らかとなった。

■フラビウイルス・トガウイルス：オーストラリアで流行しているロスリバー熱の実験室診断系を確立し、アルボウイルスレファレンスセンターに技術供与した。また、本邦初の輸入症例を確定診断した。遺伝子型 1-3 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム **RT-PCR** 系を構築、確立した。

■リケッチア：遺伝子検出系・血清診断・**BSL3** での取り扱いなどの検査体制を維持できる施設は限られている。地域特性が強い感染症であることも踏まえ、全国のラボネットワークの構築方法の検討、各ブロックのレファレンスセンターを中心とした地衛研の検査体制を維持するために、その専門性を考慮した人員配置と組織作りに取り組むことが、臨床に即した迅速対応と情報発信が可能となり、患者のみならず住民の **QOL** に資する。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)：ノロウイルスの便検体パネルを充実させ、抗原・抗体パネルの整備を継続した。**GII.4** 2012 変異株の **VLP** と抗血清の作製を実施

した。新規 genotyping 法に対応可能な long distance RT-PCR 法を開発した。ロタウイルスの全長ゲノムを対象とした分子疫学基盤構築のためのマイクロチップ電気泳動法導入に向け、基盤技術の構築となった。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス): アンケート結果に基づき、①エンテロウイルス検査に関する基盤的技術研修コースの企画、関連するマニュアル整備、②遺伝子解析法支援のためのデータ整備につき、次年度実施可能性について検討する。

■麻疹・風疹: 本麻疹風疹リアルタイム RT-PCR 法はコンベンショナル RT-nested PCR と比較して感度が低い可能性があるものの、簡便性、迅速性、実験室コンタミネーションの危険性回避の観点から考えるとその導入は必要且つ有益であると考え。今後、臨床検体を用いた解析を進める。

■百日咳: 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、遺伝子検査キットを始めとするレファレンス関係の配布・整備を行った。さらに、百日咳流行株における Prn 欠損状況を調査し、わが国でも欧米と同様に流行していることを確認した。

■抗酸菌: 結核菌 VNTR 分析用の精度保証用パネルを作成して実際に分析を行っている衛生研究所に配布することで、これまで独自に行われている VNTR 分析に関する精度保証を進める。異なる施設間で型別結果を直接比較することができるようになり、結核感染動態の把握等、結核対策に利用できる。

■動物由来感染症: 今回参加した各地方衛生研究所の PCR 検査系で示された検出限界は、現在想定される炭疽菌検体の検出に有効な範囲であることが示された。

■HIV 関連感染症: 地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を推進し、国

内 HIV 感染動向・検査状況・技術についての情報共有および HIV 検査技術強化に貢献した。

■アデノウイルス: 本研究で分離したウイルス株は、日本における初の 48 型関連ウイルスであり、これまで報告された中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。今後も継続的な監視が必要であり、レファレンス活動をさらに強化する。

F. 健康危険情報

■ジフテリア・ボツリヌス: 米国 CDC からは urgent threat 「緊急なる脅威」として報道されている *C. difficile* 感染症が、日本の臨床現場でも問題となっており、保健所・地方衛生研究所で知識・技術を必要としていることが再認識された。

■リケッチア: 特定の疾患に固執した対応を行うと、有効な治療法がありながら、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡、重症化に至る危険性がある。

■抗酸菌: 本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌(生菌)の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従って BSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

G. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書を参照。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動

研究分担者	宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部
研究協力者	小澤 邦壽	群馬県衛生研究所
	調 恒明	山口県環境保健研究センター
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	平田 輝昭	福岡県保健環境研究所
	皆川 洋子	愛知県衛生研究所
	倉根 一郎	国立感染症研究所
	渡邊 治雄	国立感染症研究所

研究要旨

国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所は病原体検査に関して連携し、各種の病原体情報を共同で発信している。しかし、互いに独立した組織であり連携の明確な根拠は無いため、国内の危機的感染症の察知、正確な感染症状況の把握に向けて、感染研と地衛研の連携が必要と相互に認識する事項について協議し、レファレンスセンターの設置等につき明文化した。レファレンスセンターの設置、対象疾患の選定法、設置期間、活動内容、その他の事項について記載した。

A. 研究目的

危機管理等の目的で厚生労働省・日本政府が正確な感染症情報を入手するためには、信頼に足る病原体検査体制の構築と維持が必要である。国立感染症研究所（感染研）と全国の地方衛生研究所（地衛研）は病原体検査に関して連携し、各種の病原体情報を共同で発信している。しかしながら、感染研は国の機関であり、地衛研は自治体等に所属する機関であるため、互いに独立した組織であり連携の明確な根拠は無い。

このような状況の中、国内の危機的感染症の察知、正確な感染症状況の把握に向けて、感染研と地衛研の連携が必要と相互に

認識する事項について協議した。

B. 研究方法

国立感染症研究所長をはじめとする感染研のスタッフと、地方衛生協議会全国協議会会長、および、感染症対策部会の委員が協議を行った。

C. 研究結果

感染研と地衛研の間で常時連携して特定の疾病に対応する機能的な枠組みとしてレファレンスセンターをおくこととし、その概要につき以下のように明文化した。

1. 設置

感染症法で指定される疾病を主な対象として、地衛研と感染研の双方が必要と認める疾病（群）の病原体等の診断のために必要なより効率的な活動（レファレンス活動）を目的としたレファレンスセンターを設置する。感染研に中央レファレンスセンターを、地衛研全国協議会会長が指定する地衛研に支部レファレンスセンターを置く。その活動のとりまとめは衛生微生物協議会レファレンス委員会が中心になり行い、年次総会で活動状況を報告する。

2. 対象疾患の決定

各々の疾病に対応するレファレンスセンターの設置は、地衛研全国協議会感染症対策部会と感染研レファレンス委員会と協議し、地衛研全国協議会会長と感染研所長両者の合意により決定する。決定事項は衛生微生物協議会総会で報告する。

3. 設置期間

継続、統合、休止等に付いて、3年毎に地衛研全国協議会感染症対策部会と感染研レファレンス委員会と協議を行う。

4. レファレンスセンターで実施することが適切と考えられる項目

- 1) 病原体検査の標準的マニュアルの作成
- 2) 検査実施に必要な標準品の整備；例：対照株、診断血清や抗原、プライマー等
- 3) 検査方法の開発（研究を含む）
- 4) 検査能力と検査体制の維持（研修等）
- 5) 病原体株の収集と保管および分与
- 6) 検査の精度管理

5. 危機対応

パンデミックやテロなどに際し危機対応が必要とされる場合には、病原体検査の実施に係る連携全般について、厚生労働省、感染研所長と地衛研全国協議会会長の間で必要事項について直ちに協議する。

6. 研究利用

レファレンスセンター活動から派生する①保存株や検体の研究利用、②附属情報の研究利用や公共への発信、については主体となる研究者が、全国協議会感染症対策部会あるいは感染研レファレンス委員会と協議し、適切に対応を行う。窓口は、全国協議会感染症対策部会長と感染研レファレンス委員長とする。その結果については、各組織に報告する。

D. 考察と結論

レファレンスセンターの概要について明文化したことにより、わが国の病原体検査が円滑に実施できることが期待される。実際に運用し修正が必要な事項等が明らかになれば、協議の上変更が可能と考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect*

- Dis. 2013, 66(1):51-5.
2. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis. 66:216-221, 2013.
 3. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278, 2013.
 4. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.

石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 安藝恭子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得
なし
実用新案登録
なし
その他
なし

学会発表

国際学会

1. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

国内学会

1. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
2. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文,

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部
池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 下痢原性大腸菌、レジオネラ属菌、溶血性レンサ球菌の機能的なラボネットワークを構築するために、病原性遺伝子検出法、血清診断法、各種型別法および菌分離法等について必要な検査マニュアルを作成することを目的としている。これらのマニュアルは、国立感染症研究所ならびに地方衛生研究所において、多施設間で比較可能な情報を菌株に付けることで、精度の高いサーベイランスを全国的に実施するために不可欠であり、また技術的基盤の継承に補助的な役割を果たすことになる。平成25年度においては、現在実施されている3菌種の病原体サーベイランスの状況を検証した。機能的なラボネットワークの構築とその維持のためには、**External Quality Assurance**のシステムの構築が重要である。しかしながら、多施設における検査の品質保証を的確に行なうことは必ずしも用意ではない。問題点の把握とそれを解決するための実施可能な検査法・ツールの開発が不可欠である。

A. 研究の背景と目的

下痢原性大腸菌

ヒトに下痢を発症させる下痢原性大腸菌は保有する病原性遺伝子ごとにいくつかの категорияに分類される。このうち、日本国内で死亡者を含む重症例の原因となっているのが腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC）である。2013年も4,000例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,400以上の重症例（血便または溶血性尿毒症症候群[hemolytic uremic syndrome: HUS]発症例）が報告されている（IDWR）。原因菌として半数以上を占めるのがO157で、O26, O111, O103, O145, O121, O165で重症例由来株のほとんどを占める（細菌第一部の

集計による）。EHEC 以外の下痢原性大腸菌カテゴリーについては、2012年以降各カテゴリーのマーカーとなる病原性遺伝子の検出が同定の必須条件となった（IASR 2012年1月号）。EHECと比較して重症例は少ないが、EHECとのハイブリッドタイプとして検出されるいくつかのカテゴリー（腸管病原性大腸菌[enteropathogenic *E. coli*: EPEC]、腸管凝集接着性大腸菌[enteroaggregative *E. coli*: EAaggEC])を含む、各病原性遺伝子の検出が重要である。

レジオネラ

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第15条第1項の規定の実施のための法律施行規則第8条第2項に基づき、レジオネラ感染症の発生状況、動向