

及び原因の調査のため、国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、平成19年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行なっている。レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型を調べたところ、冷却塔由来株、浴槽水由来株、土壌由来株でそれぞれ異なる結果が得られ（参考文献 1）、遺伝子型を調べることにより、感染源が推定できる可能性が示唆され、菌株型別の有用性が明らかになってきている。

A 群溶血レンサ球菌（Group A *Streptococcus*、*Streptococcus pyogenes*、以下 A 群溶レン菌）は、グラム陽性球菌であり、様々な疾患を引き起こす。A 群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、本菌を原因とする代表的な疾患は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、丹毒、蜂窩織炎、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等であり、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う重篤な症状を呈す劇症型溶血性レンサ球菌感染症も本菌による疾患として注目されている。A 群溶レン菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する。

「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（感染症法）」において、A 群溶レン菌が引き起こす疾患として、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎と劇症型溶血性レンサ球菌感染症が含まれる。これらの疾患は5類感染症に属し、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎は小児科定点把握疾患、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。

A 群レンサ球菌は、溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター（図1）を構築しており、各都道府県の衛生研究所と国

立感染症研究所協力の下、本感染症のサーベイランスや新たな検査法の開発に取り組んでいる。

3つの病原細菌に対して以下の目的で研究を実施した。

下痢原性大腸菌

A: EHEC を主とした血清型・病原性遺伝子型解析の結果に基づいた病原性遺伝子検出法、血清診断法、および菌分離法について検査マニュアル化すると共に、それらの検査に必要なコントロール株等の配布を行う。

レジオネラ

B1 遺伝子型別法により感染源を推定するための基盤情報の整備

B2 分離されたレジオネラ属菌の同定のために、市販されていない免疫血清を作製し配布することでより同定技術を改善すること。

A 群溶血レンサ球菌

C: A 群レンサ球菌感染症の流行株について、現状を把握するため、溶血レンサ球菌感染症のうち咽頭炎患者分離株と劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株を溶血性レンサ球菌レファレンスセンターを通じて収集し、菌株の解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 大腸菌血清型別

デンマーク血清学研究所（Staten Serum Institut: SSI）あるいはデンカ生研から購入した血清を用いて実施した。

2. レジオネラ SBT 法

L. pneumophila については、EWGLI (European Working Group of *Legionella* Infections)の提唱する SBT (sequence-based

typing)法に従い、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) (参考文献 1,2)。

レジオネラ特異的な免疫血清の作製は、デンカ生研で行い、その特異性は、感染研のレファレンスセンターで確認した。

3. 溶血性レンサ球菌の T 型別および M 型別

病原体検出マニュアルに準じて行なった。

C. 研究結果

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 3,084 株 (平成 26 年 1 月 16 日現在) であり、分離数の多い順に、O157 (55%)、O26 (24%)、O111 (5.4%)、O103 (4.2%)、O121 (3.3%)、O145 (2.9%)、O91 (0.97%)、O165 (0.32%)、その他 (3.9%) となっていた。

1.2 コントロール株、プライマーの配布および情報提供

下痢原性大腸菌の各カテゴリー (EHEC, EPEC, EAaggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [lenteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌]) コントロール株、EHEC のマーカーである志賀毒素遺伝子のバリエーション検出用コントロール株、およびこれらを検出する PCR プライマーの配布または情報提供を次の各衛生研究所へ行った：千葉市環境保健研究所、福岡県保健環境研究所、神奈川県衛生研究所、福岡市保健環境研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、

東京都健康安全研究センター、大阪府立公衆衛生研究所、石川県保健環境センター、大分県衛生環境研究センター、岡山県環境保健センター、愛知県衛生研究所、山口県環境保健センター、福島県衛生研究所、足立区衛生試験所。配布を行ったいくつかの地研からは、解析結果に関する問い合わせを受け付けた。

1.3 下痢原性大腸菌 EQA (External Quality Assurance) の実施

デンマーク血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) がヨーロッパ各国間で実施している下痢原性大腸菌の EQA 用菌株 (2012-2013 年用) 15 株を用いた。EHEC タイピング用自家抗血清の準備がある大阪府立公衆衛生研究所へ上記の菌株を送付し、EQA を行ったところ、すべての菌株において血清型 (O:H 型) および病原性遺伝子型 (*stx1a*, *stx1c*, *sxt1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *invE*, *eae*, *lt*, *st*, *aggR*, *ehx*) の解析結果が感染研と大阪府ですべて同じで、これらの結果は SSI から得られた解答と完全に一致した。

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

レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、収集した臨床分離株の遺伝子型型別の結果を、毎年、衛生微生物技術協議会研究会のレファレンスセンター関連会議で報告している。今年度の報告では、54 株が追加された (表 1)。すべて *Legionella pneumophila* で、血清群は 2、3、5、9、10 が各 1 株ずつあった以外は全て血清群 1 であった。感染源が、温泉・公衆浴場などの浴槽水と推定・確定されている例が 21 例 (39%)、田・畑作業と推定されている例が 1 例、使用している給水タンクの疑い例が 1

例、旅行後に発症している例が 2 例で、29 例 (54%) は感染源不明であった。同一の公衆浴場が感染源と推定された 2 例は、同じ ST で、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 (集団感染事例由来の重複している株を含めると 284 株)。図 2 にこれまでに収集した臨床分離株の分離年、表 2 に菌種および血清群の内訳を示した。*L. pneumophila* が 273 株 (97.5%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 85% を占めた。

2008-2012 年には 195 株のレジオネラ菌株 (集団感染に由来する異なる患者に由来する同一菌株の重複を除いた菌株数で、発生动向調査未報告 3 株を含む) が収集された (発表 1)。複合感染によりひとりの患者から異なる血清群あるいは遺伝子型の株が分離されることがあるため事例数は 187 である。そのうち環境調査で得られた菌株とパルスフィールドゲル電気泳動によるパターンが一致したのは 16 事例あった (すべて風呂関連)。欧米では空調の冷却塔が感染源となることが多く、その場合広域の感染源調査が必要なこともあり、散発事例で感染源が判明することはほとんどなく、感染源の違いが、欧米より感染源調査が進んでいる一因となっている。反面、入浴施設を利用していないおよそ半数の事例のほとんどは感染源不明であるが、一部は農作業などとの関連が推定されている。菌種の内訳は 191 株が *Legionella pneumophila* (SG1 が 165 株、SG2 が 4 株、SG3 が 8 株、SG5 が 2 株、SG6 が 5 株、SG9、10 が各 2 株、SG12、15、群別不能が各 1 株) で、それ以外の菌種は *Legionella feeleii*、*Legionella londiniensis*、*Legionella longbeachae*、*Legionella rubrilucens* 各 1 株だった。

L. pneumophila 191 株は 100 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。そのうち、66 種類の遺伝子型は日本独自の型であった。1 株しかない遺伝子型は 68 種類 (うち国外では報告のないものは 48 種類) で、SBT 法の疫学的有用性が確かめられた。一方、多数分離される ST もあり、ST23 及び ST138 は 13 株、ST120 は 10 株、ST1 及び ST93 は 8 株分離されている (表 3)。ST23 は国外でも多数の臨床分離例があり、病原性が高い ST と考えられている。ST138 は 13 例中 11 例について感染源は浴槽水と確定あるいは推定されており、日本固有の ST である。ST120 は感染源不明事例が多いが、意外な感染源の可能性が最近示唆された (発表 2)。ST1 は、世界各地で患者からも環境からもよく分離され、ST1 の臨床分離株の感染源は 1 事例のみ浴槽水と推定されているが、多くは浴槽水以外から感染していると推測される。ST93 (参考文献 3) については、岡山県で 2008 年から 8 株が分離され、PFGE 法を実施した 7 株は同一のパターンを示した。*L. pneumophila* SG1 環境分離株 (冷却塔水由来 50 株、浴槽水由来 50 株、土壌由来 34 株) について SBT を行ったところ、8 つの遺伝子型グループを形成した (浴槽水分離株が多いグループ B-1、B-2、B-3、冷却塔水分離株が多いグループ C-1、C-2、土壌由来株が多い S-1、S-2、S-3) (参考文献 1)。臨床分離株の ST は、環境分離株では見られない ST であっても、上述のグループのいずれかに属するものが多かった。調べた環境分離株との対応がつくと考えられる SG1 株についてみると、S グループに属したのが 63 株 (ST23、ST120 を含む)、B グループに属したのが 67 株 (ST138 を含む)、C グループに属したのが 10 株 (ST1 を含む) であった。また、15 株 (8 種類の ST) については

新たな遺伝子型グループを形成したので、環境での由来が不明ということでUグループと名付けた。残りの10株はいずれのグループにも属さなかった。すなわち、まだ未解明の感染源の存在が示唆された。Bグループに属する臨床分離株の75%が、実際に浴槽水が感染源と推定・確定されていて、他のグループの臨床分離株においては、浴槽水が感染源と推定・確定された割合は、Sグループでは30%、Uグループでは27%、Cグループでは10%となっており、臨床分離株のSTは、起因菌の生息環境を反映している可能性があり、感染源不明の事例において臨床分離株の遺伝子型別を行うことは、感染源推定の手がかりとなると考えられた。例数は少ないが、感染原因が土木作業、農作業と報告されている4菌株(3種類のST)はすべてSグループに属していた。一方、臨床分離株では見出されない環境分離株の遺伝子型も多く、一部特定の遺伝子型のものが感染すると考えられた。

レジオネラ症患者から菌分離が行われると、患者周辺環境からの分離菌との異同の確認により、感染源を明らかにすることができる。また、*L. pneumophila* SG1以外のレジオネラ症起因菌の場合は、ほとんど尿中抗原陰性となるので、菌分離による確定診断が必要となる。臨床検体から菌を分離することの重要性を改めて強調したい。

最後に、散発事例と思われていた事例が菌株のSBTにより集団感染疑いと判明した事例を紹介する。A都道府県とB都道府県の臨床分離株*L. pneumophila* SG1の遺伝子型がST1275と一致し、珍しい型であった。菌株送付票に、A都道府県の患者は管内のC入浴施設を利用したとあった。一方、B都道府県の患者の菌株送付票では潜伏期間内にA都道府県の入浴施設を利用したとあっ

た。聞き取りにより、2人の患者は、ほぼ同時期に、A都道府県と同じC入浴施設を利用していたと判明した。しかし、患者発生後の環境調査によっては、C入浴施設からは患者分離株と同じ血清群の株は分離されていなかったのが集団感染疑いとなった。

2.2 レジオネラ免疫血清により検査された事例

今年度は、混合血清4種を試作した。*L. pneumophila* SG2~SG15の全ての菌抗原を凝集させる免疫血清、これを3つに分けたグループ血清(1Gは2, 3, 6, 12, 14の各SGの菌を凝集; 2Gは4, 5, 9, 10, 15の各SGの菌を凝集; 3Gは7, 8, 11, 13の各SGの菌を凝集)。これらの利用状況については、来年度以降報告する。以下には、これまでレファレンスセンターで配布した免疫血清(およびその後市販されるようになった免疫血清を含む)による検査事例を紹介する。

事例1 *Legionella feeleii* SG1と特定された臨床分離株

参考資料2のように対応する菌抗原とともに試作した免疫血清を配布した。*L. feeleii*には血清群が2つあるが、感染研で検査した4株(1臨床分離株、3環境分離株)のいずれも血清群1であった。

事例2 *L. pneumophila* SG8, SG9, SG11, SG14が水溜まりから分離された

平成12年5月に、最初の市販されていないレジオネラ免疫血清の配布をレジオネラ・レファレンスセンターで行なった。*L. pneumophila* SG7, SG8を特異的に凝集するニューモフィラ7群と8群の2種であった。その翌年は同様にしてニューモフィラ9群と10群を配布した。幸いにして需要が多いことから、その後は、デンカ生研からSG7

～SG15 までが、研究用試薬として市販されるようになった。

これらの試薬を用いて、道路の水溜まりからの多数の環境水試料の検査により、*L. pneumophila* SG1, SG2, SG5, SG6 のみならず、*L. pneumophila* SG8, SG9, SG11, SG14 の菌株が分離されることが判明した。これまで感染源が不明であった臨床分離株のうち、SG1 で ST120 の遺伝子型の菌が道路の水溜まりから初めて環境分離株として見出された（発表 2）。

事例 3 *L. pneumophila* SG12 による感染事例の日本で最初の報告

尿中抗原陰性であったがレジオネラ肺炎を疑い、喀痰から菌が分離され、免疫血清で SG12 と同定された。マイクロプレート凝集反応による血清抗体価も、単一血清で 1:8,192 倍と高かった。（発表 3）

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 群レンサ球菌の菌株総数は、1240 株であり、すべての株に対して T 型別が行われた。分離頻度の高かった T 型は、T1 (332/1240, 26.8%)、T12 (291/1240, 23.5%)、TB3264 (180/1240, 14.5%) であった。T1、T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。2011 年増加した T1 型は、2012 年減少した (2010 年, 19.9%、2011 年, 31.1%、2012 年, 26.8%)。T12 型は、毎年 20%台を維持している (2009 年, 26.2%、2010 年, 20.2%、2011 年, 21.5%、2012 年, 23.5%)。TB3264 型の分離比率は、2010 年、急激に上昇し、2011、2012 年も 10%台を維持している (2009 年, 5.3%、2010 年, 12.6%、2011 年, 11.1%、2012 年, 14.5%) (図 3)。

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。94 例が *S. pyogenes*、1 例が *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による症例であった。

最も分離された型は、昨年同様 T1 型であったが、昨年と比較して分離比率が減少した (2011 年, 69.0%；2012 年, 51.6%)。また、咽頭炎由来株の分離比率 (26.8%) に比べ、依然高い分離比率を示している。次いで、昨年同様 TB3264 型が多く、その分離比率は昨年と比較して上昇した (2011 年, 10.7%；2012 年, 18.9%)。この 2 つの型で全体の 70%以上を占めている (図 4)。

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%) と最も多く、次いで *emm89* 型 (M 型別不能) が 17 例 (17.9%)、*emm12* 型 (M12) が 8 例 (8.4%)、*emm28* (M 型別不能) が 6 例 (6.3%) と多かった。

2011 年と比較し、*emm1* 型は、69.0% (58/84) から 51.6% (49/95) に減少し、*emm89* 型が 10.7% (9/84) から 17.9% (17/95) に増加した (図 5)。

D. 考察

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

EHEC の重症例として分離頻度の高い 7 血清群 (O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165) と *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類を検出可能なワンショット PCR を実際に使用した例からプロトコールを起こし、EHEC 検査マニュアルに追加する。

2) EQA の実施

SSI から 2013-2014 年用 EQA 株 (10 株)

が分与されている。大阪府を含めたいくつかの地研に参加を呼びかけ、感染研を含めた EQA を行う予定である。

3) ウシ由来 EHEC 株のサーベイランス

岡山県環境保健センター、大分県衛生環境研究センター、宮崎大学との共同研究でウシ由来株の血清型別および病原性遺伝子型別を行い、ヒト由来株との各種比較解析を行うことで、EHEC の感染源と考えられているウシにおける EHEC の分布解析を行う。

4) レジオネラサーベイランス

さらなる菌株収集と遺伝子型別を実施し、情報を蓄積していくことで感染源推定の精度をあげることが望まれる。

5) レジオネラ免疫血清の配布

免疫血清を利用した事例集をまとめて、レファレンス活動のより効率的な運営方法を検討する。

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（参考文献 4）。M タンパクは、*emm* 遺伝子によりコードされているため、*emm* 遺伝子型別をすることで型を決定することができる。STSS 患者分離株は *emm* 遺伝子型別を決定しているが、咽頭炎由来株は決定していない。理由として、コストがかかることや設備が整っていないことが挙げられる。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である。

参考文献

- 1) Amemura-Maekawa J, et al. Appl Environ Microbiol. 78(12):4263-4270, 2012.
- 2) Amemura-Maekawa J, et al. J Med Microbiol. 59(Pt6):653-659, 2010.
- 3) Nishiyama A, et al. Kansenshogaku Zasshi. 85(4):373-379, 2011. in Japanese.

4) Dale JB et al. Group A streptococcal vaccines: paving a path for accelerated development. Vaccine 31S (2013) B216-B222.

E. 結論

病原細菌の病原体サーベイランスのための機能的なラボネットワークの強化のためには、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。その基盤となるのは多施設において比較解析可能なデータ取得が可能なマニュアル／プロトコルの制定が必要となる。また、各施設において実施可能であること、技術的継承が用意であることも安定的なネットワーク形成には必要である。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欠かせない。

本研究を通じて各担当者間でのコミュニケーションが維持されること、問題点、ニーズを抽出することが重要である。これらの活動からラボネットワークの充実度を検証する必要がある。感染研が参加している EQA システムが、各地方衛生研究所で実施可能か、参加施設を増やして検討したい。また、レジオネラ感染症における SBT 解析の実際の事例解析への応用について情報を蓄積する。また、溶血性レンサ球菌感染症における *emm* 型別の普及の現実性について検討する。それらの項目についての問題点を整理し、必要なツールの開発とマニュアル化、現実的な EQA の整備戦略を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

- 1) 前川純子、倉 文明、大西 真、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司：レジオネラ臨床分離株の型別 - レファレンスセンター活動報告として、病原微生物検出情報2013年6月号
- 2) 坂本裕美子、廣地敬、大西麻実、伊藤はるみ、高橋広夫（札幌市衛生研究所）、宮北佳恵、細海伸仁、片岡郁夫（札幌市保健所）、久保亜希子、池田徹也、小川恵子、長瀬敏之、森本洋、清水俊一（北海道立衛生研究所）、伊豫田 淳、寺嶋淳（国立感染症研究所）：白菜浅漬による腸管出血性大腸菌O157食中毒事例について-札幌市 IASR Vol. 34 p. 126: 2013年5月号

学会発表

国際学会

特記事項無し

国内学会

特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特許取得

特記事項内なし

実用新案登録

特記事項内なし

その他

特記事項内なし

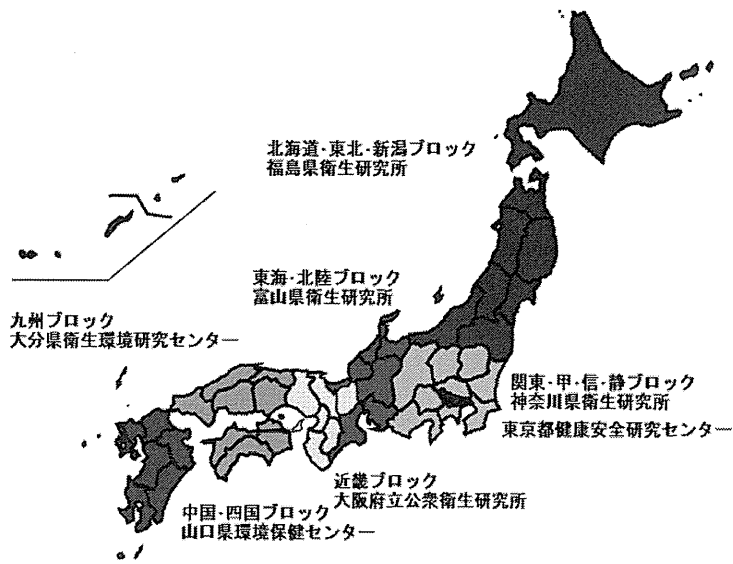


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

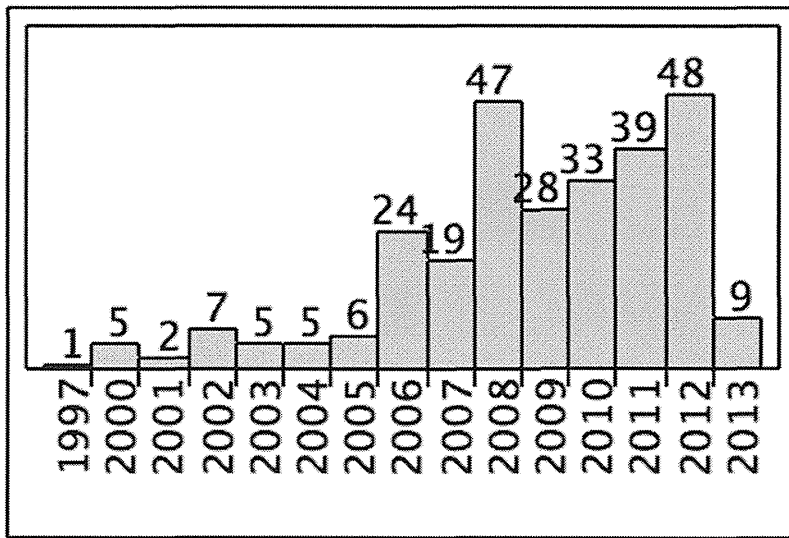


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2013年6月現在)

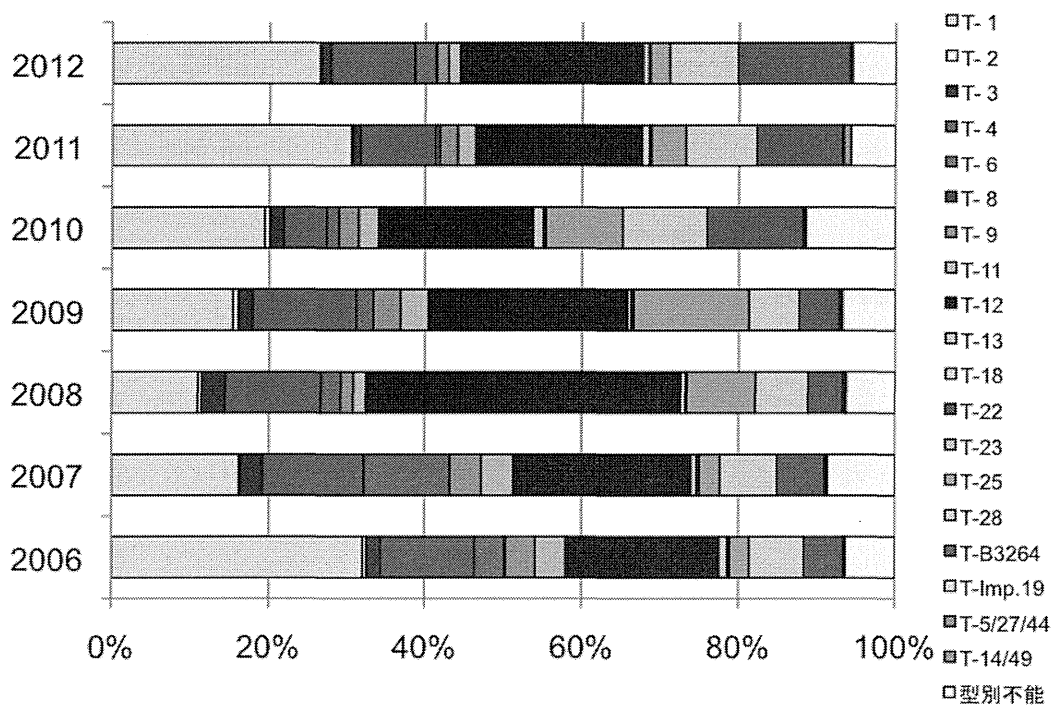


図3 咽頭炎由来株の T 型別 (2006-2012)

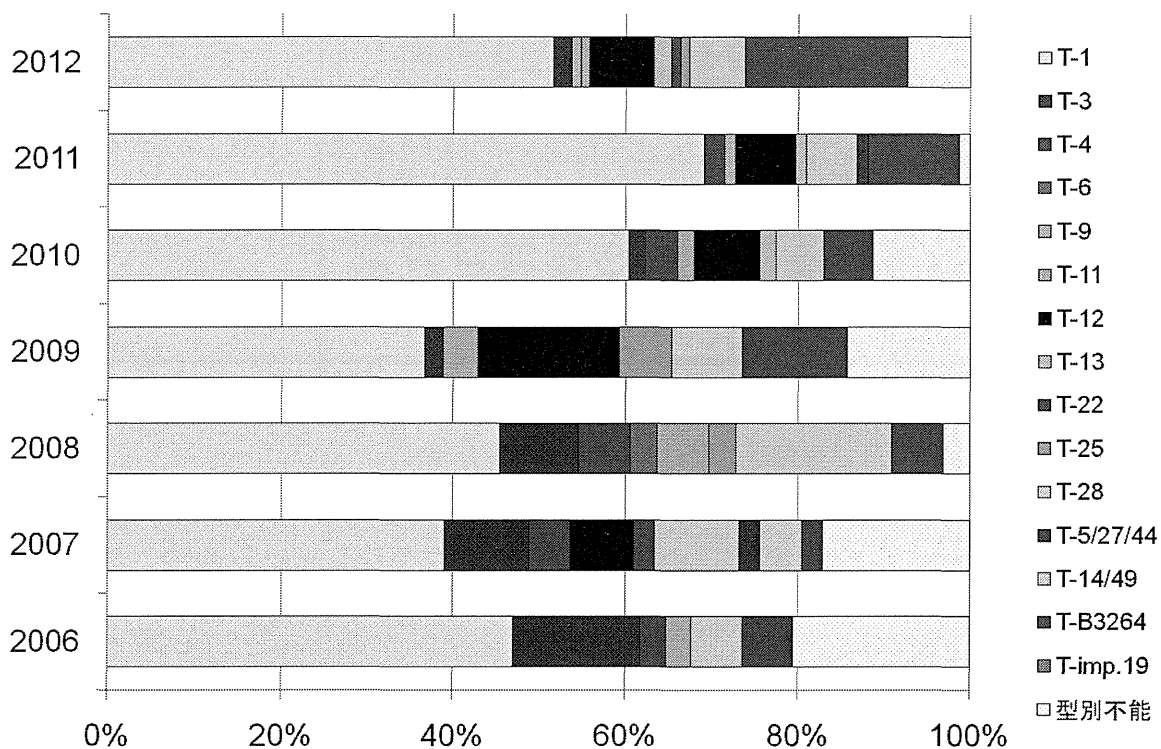


図4 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の T 型別

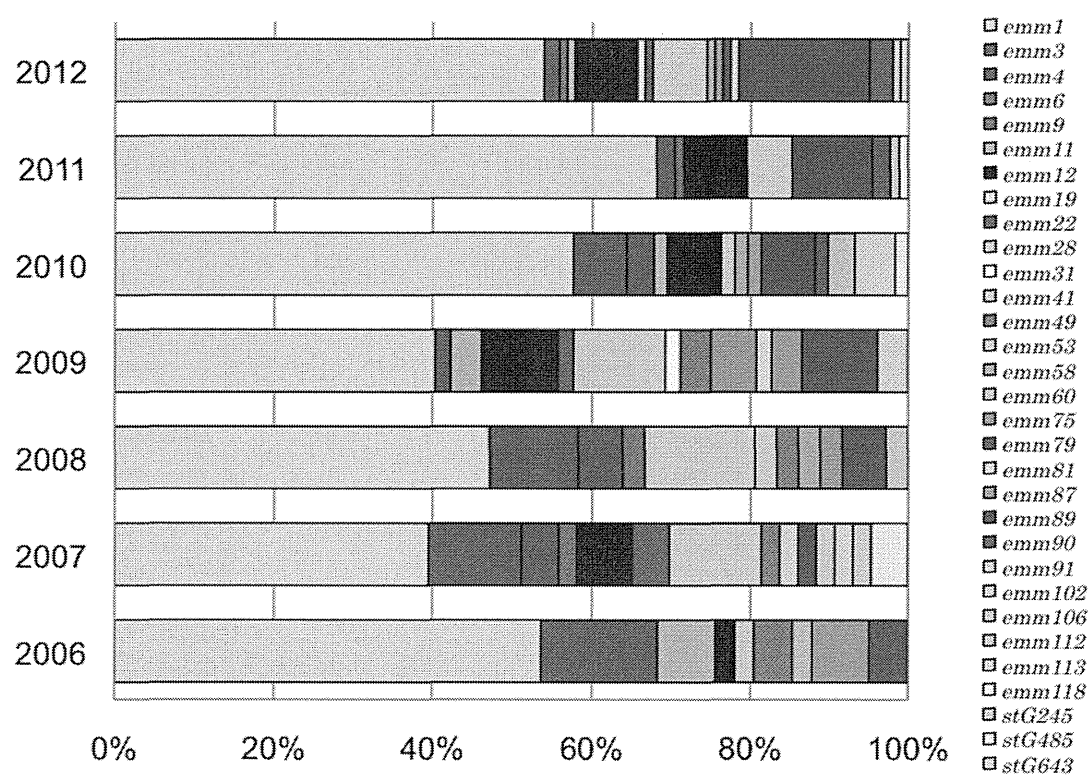


図5 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の emm 型別

No.	年齢	性別	分離 推定感染源	NIB (菌 株受付 番号)	種名	血 清 群	ST (Sequence Type)	遺伝子型										Group	同LSTの報告があるか
								flaA	pilE	asd	mip	mompS	praA	neuA					
230	2012	男	不明(発症12日前に循環式温泉に入浴)	2878	<i>L. pneumophila</i>	1	1251	6	10	15	13	21	7	6	(B1)	無			
231	2012	男	不明(調査したが不明、営業職)	2898	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内16例目、国外			
232	2012	男	公衆浴場(推定)	2902	<i>L. pneumophila</i>	1	1273	7	6	17	10	13	11	6	B2	無			
233	2012	男	公衆浴場(推定)	2903	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内3例目、国外			
234	2012	男	不明	2904	<i>L. pneumophila</i>	1	2	6	10	19	3	19	4	9	B1	国内3例目、国外2例			
235	2012	男	不明(発症5日前に2923と同一スーパー銭湯利用)	2911	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11	(B2)	無→国内			
236	2012	男	不明(製麺業、給水タンク疑い)	2912	<i>L. pneumophila</i>	1	850	2	3	9	50	2	1	6	S1	国内2例目			
237	2012	男	不明	2913	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内13例目、国外			
238	2012	女	不明	2914	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	-	国外多、県内8例目			
239	2012	男	浴槽水(温泉)	確定 2915	<i>L. pneumophila</i>	10	1427	3	12	1	6	14	9	220	-	国内			
240	2012	男	不明(配管工)	2920	<i>L. pneumophila</i>	1	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	無			
241	2012	男	温泉(推定、浴槽水からは検出されず、ろ材からの菌とPFGE一致)	2921	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内15例目			
242	2012	男	温泉(推定、毎週日曜利用、直近は発症3日前)	2922	<i>L. pneumophila</i>	1	18	2	10	9	13	2	5	6	S1	国外(欧州)9例			
243	2012	男	不明(発症5日前に2911と同一スーパー銭湯利用)	2923	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11	(B2)	国内2例目			
244	2012	男	不明	2924	<i>L. pneumophila</i>	1	609	3	13	1	1	14	9	1	U	国内5例目、国外1			
245	2012	男	不明(運転手)	2925	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内9例目			
246	2012	男	浴槽水(推定)	2926	<i>L. pneumophila</i>	2	39	3	5	1	7	14	9	8	-	国内3例目 国外10例 SG2			
247	2012	男	不明	2927	<i>L. pneumophila</i>	1	1347	12	1	2	5	3	17	15	N	無			
248	2012	男	不明	2930	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11	U	国内3例目、国外4例			
249	2012	男	浴槽水(推定)	2931	<i>L. pneumophila</i>	1	1389	4	7	11	3	11	9	9	N	無			
250	2012	男	温泉(推定)	2932	<i>L. pneumophila</i>	1	530	6	10	20	6	9	4	9	B1	国内3例目			
251	2012	男	田・畑作業(推定)	2933	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内3例目			
252	2012	男	不明	2943	<i>L. pneumophila</i>	1	644	6	10	20	10	9	14	11	B1	国内4例目			
253	2012	男	不明	2944	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内15例目、国外			
254	2012	男	不明(建設関係、清掃関係の仕事)	2945	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内16例目、国外			
255	2013	男	不明(運転手)	2946	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内4例目			
256	2012	男	不明(京都旅行後翌日から体調不良、15日後に診断)	2947	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内17例目、国外			
257	2013	男	不明	2948	<i>L. pneumophila</i>	9	1283	2	3	18	40	2	1	2	-	国外で1例			
258	2010	男	不明	2951	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内17例目、国外			
259	2010	男	温泉(推定)	2952	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11	B1	国内3例目			
260	2012	男	温泉(推定)	2953	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内16例目			
261	2012	男	浴槽水(推定、自宅の共同浴場)	2954	<i>L. pneumophila</i>	1	1447	6	10	20	13	9	4	11	B1	無			
262	2012	女	不明	2955	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内2例目			
263	2012	女	温泉(推定、自宅が温泉)	2956	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11	B1	国内4例目			
264	2012	男	不明(建設解体業)	2957	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内4例目、国外			
265	2012	男	不明	2958	<i>L. pneumophila</i>	1	1458	10	14	16	16	15	13	2	C2	無			
266	2012	女	自宅風呂(推定)	2959	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内15例目、国外			
267	2012	男	不明	2960	<i>L. pneumophila</i>	1	1448	2	3	6	10	51	1	9	S1	無			
268	2013	女	不明	2961	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	-	国内4例目(1例はSG10)			
269	2013	男	不明	2962	<i>L. pneumophila</i>	1	352	12	8	11	13	10	12	2	S3	国内3例目			
270	2011	男	不明(技術工)	2963	<i>L. pneumophila</i>	1	1449	2	3	6	3	51	1	6	S1	無			
271	2011	男	不明	2964	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内10例目			
272	2011	男	不明(運送業)	2965	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内5例目、国外			
273	2011	男	温泉(推定)	2967	<i>L. pneumophila</i>	1	1450	3	10	19	14	4	4	3	B1	無			
274	2012	男	不明(インドネシア出張、その後ゴルフ)	2969	<i>L. pneumophila</i>	1	1446	7	43	31	3	48	15	1	(B2)	無			
275	2012	男	不明	2971	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内14例目、国外			
276	2013	男	不明(週2回特定の浴用施設利用、施設検査結果は陰性)	2995	<i>L. pneumophila</i>	1	1480	3	13	1	14	14	9	6	-	無			
277	2012	男	不明	2996	<i>L. pneumophila</i>	1	224	4	8	11	16	42	12	2	S3	国内2例目、国外			
278	2012	男	温泉(集団感染、2998と同一事例)	確定 2997	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内17例目			
279	2012	男	温泉(集団感染、2997と同一事例)	確定 2998	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内17例目			
280	2012	男	不明	3003	<i>L. pneumophila</i>	1	306	6	10	15	13	9	14	11	B1	国内7例目			
281	2013	男	スポーツジム(推定、プールまたは温泉)	3004	<i>L. pneumophila</i>	1	129	6	6	15	28	4	14	11	B1	国内2例目、国外			
282	2013	男	不明	3012	<i>L. pneumophila</i>	1	114	3	6	1	6	14	11	9	U	国内3(SG1が1、SG6が1)、国外(SG6)			
283	2013	男	不明(旅行歴なし、公衆浴場の利用なし)	3013	<i>L. pneumophila</i>	1	1510	2	6	3	6	9	4	11	(B1)	無			
284	2013	男	不明(2箇所の公衆浴場を何度か利用していた)	3014	<i>L. pneumophila</i>	1	1511	2	23	17	3	11	4	2	N	無			

表1 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2012年6月～2013年6月)

表2 収集臨床分離株の内訳

2013年6月末日現在

<i>L. pneumophila</i>	273株 (97.5%)	<i>L. feeleii</i>	1株 (0.4%)
SG1	232株 (85.3%)	<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.4%)
SG2	6株 (2.2%)	<i>L. longbeachae</i>	4株 (1.4%)
SG3	11株 (4.0%)	<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.4%)
SG4	2株 (0.7%)		
SG5	7株 (2.6%)		
SG6	7株 (2.6%)		
SG9	3株 (1.1%)		
SG10	2株 (0.7%)		
SG12	1株 (0.4%)		
SG15	1株 (0.4%)		
Untypable	1株 (0.4%)		
		計	280株 (100%)

表3 *L. pneumophila* 国内臨床分離株の遺伝子型 (ST)、2008-2012

株数	ST (かっこ内はグループまたは SG)†
13	ST23 (S1), ST138* (B3)
10	ST120 (S1)
8	ST1 (C1), ST93 (SG3)
6	ST384* (S1)
5	ST609 (U)
4	ST42 (N), ST89 (S1), ST644* (B1)
3	ST131* (B1), ST132* (S1), ST353* (S1), ST1077* (U)
2	ST2 (B1), ST39 (SG2), ST59 (B2), ST68 (SG6, SG12), ST211 (U), ST224 (S3), ST256 (B1), ST354* (SG2), ST505* (B2), ST530* (B1), ST537* (SG6), ST550* (S1), ST566* (B1), ST679* (S1), ST687* (B2), ST850* (S1), ST876* (S1), ST1136* (SG9, UT)
1	68種類 (国内固有は48種類)

†S1, S3: 土壌分離株グループ、B1, B2, B3: 浴槽水分離株グループ、C1: 冷却塔水分離グループ、U: 感染源不明グループ、N: いずれのグループにも属さない。

*2013年4月現在、日本固有の遺伝子型

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

研究分担者 調 恒明 （山口県環境保健センター）

研究要旨 地方衛生研究所が準備すべき感染症の検査機能と検査の現状について考察を行い、今後の病原体サーベイランス及びレファレンスセンターのあり方を検討した。

A. 研究目的 地方衛生研究所は、地域における公衆衛生の技術的・科学的中核としての役割を担うため地方自治体（都道府県、政令市、特別区）に79機関が置かれている。その主な役割は、住民に健康被害をもたらす感染症や食中毒の原因となるウイルス、細菌などの病原体、あるいは化学物質を同定することにより、自治体の対策に必要な科学的根拠となるデータを提供し、感染症の拡大防止、食中毒の早期探知・解決を図ることにある。地方衛生研究所における検査は、感染症法、食品衛生法に基づいて行われる行政依頼検査（行政が主体となって行う検査）であり、新型インフルエンザ疑い患者のウイルス遺伝子検査では患者の入院の根拠となり、麻疹の検査では感染拡大防止のため学校閉鎖が検討され、食中毒事例の病原体検査では飲食店の営業停止の根拠となるなど地方自治体にとって重要なものである。患者検体から病原体を分離同定する病原体検査の現場は地方衛生研究所にあるため、地方衛生研究所の役割は、自治体だけでなく、我が国全体の感染症対策において極めて重要である。一方、地域

保健法などにおいて自治体における設置義務が規定されていないため自治体における予算削減などによりその実力が低下しつつある事が懸念されている。本研究では、今後病原体サーベイランスをどのように維持発展させるべきかを提言することを目的として考察を行った。

B. 研究方法 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。

C. 結果と考察 各類型の感染症に対する中国四国の地方衛生研究所の対応状況をみると、二類、三類の感染症であっても感染症の頻度や重要性に応じて検査の準備を行っていることがわかる（図1, 2, 3）。このことから、今後重要なことは、対応が出来ている検査の精度を確保することと、新たに対応が必要となる新興感染症の検査を迅速に確立できる体制を整えておくことであると考えられる。

1. 精度管理、GLP 対応が必要と思われる感染症

個別の検査結果が、その後の行政対応に反映される感染症については厳格な精度管理が必要となると思われる。それに対して発生动向調査における流行状態の把握を目的とした検査では個々の検査結果の正確性は厳密に求められない。従って、前者に含まれる感染症を認識し高度な体制を確立していくことが重要である。

インフルエンザ：特に新型インフルエンザでは、患者の入院措置のみならず、交通の制限などに及ぶ可能性もあることから高い診断の精度及び迅速性が求められる。インフルエンザでは、2008年8月に全国の地方衛生研究所及び検疫所の検査担当職員に対して研修が行われ検査の標準化がなされた。この研修が2009年の新型インフルエンザの検査対応を可能にした。今後も、H7N9など新たなパンデミックの発生が危惧されていることから引き続き研修、精度管理が必要である。

麻疹、風疹：麻疹、風疹は特定感染症予防指針により排除が目標づけられている感染症である。診断されると保健所による積極的疫学調査が行われ、学校の出席停止等の措置が必要となる場合もある。これらのことから麻疹、風疹の診断は迅速性、正確性が求められる。

ノロウイルス：ノロウイルスを原因とする食中毒では、調理者及び患者から検出されるノロウイルスの遺伝子型が一致することを示すことが求められている。食中毒事例

では、食品提供者は一時的に業務停止の行政処分を科せられることから検査の正確性は重要である。検査は厚生労働省の公定法に基づいて行われており、陽性と判定するウイルス量も決められていることから定量性も求められる。

新興感染症：H7N9, MERS, SFTS のような新興感染症の場合、検査対応は地方衛生研究所が担っており、結果がもたらす社会的影響が大きいことから厳密な正確性と迅速性が求められる。検査体制の確立には時間的制約があるが、日頃から柔軟な対応が出来る様に技術力を高めておく必要がある。

2. 検査の強化が必要と思われる感染症

薬剤耐性菌： VRE 感染症とバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 感染症は感染症発生动向調査事業実施要綱において5類全数把握疾患に定められていることから、地方衛生研究所においてはこれらの菌種の検査・解析技術を導入することが必須であり、検査技術の導入が最優先されるべきであると考えられる。その他の薬剤耐性菌についても、今後、検査が可能となるように研修、マニュアルの整備、陽性コントロールの配布等が必要である。

D. 結論

EQA (external quality assurance) と GLP (good laboratory practice) について

全ての感染症について EQA を行う事は不可能であり、またその必要もないと考えられる。しかし、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されるようにな

るであろう。EQAが必要な疾患は、インフルエンザ、麻疹、風疹、ノロウイルス、新興感染症があげられる。GLPへの対応としてプロトコルの作成、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と思われる。

E. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

なし

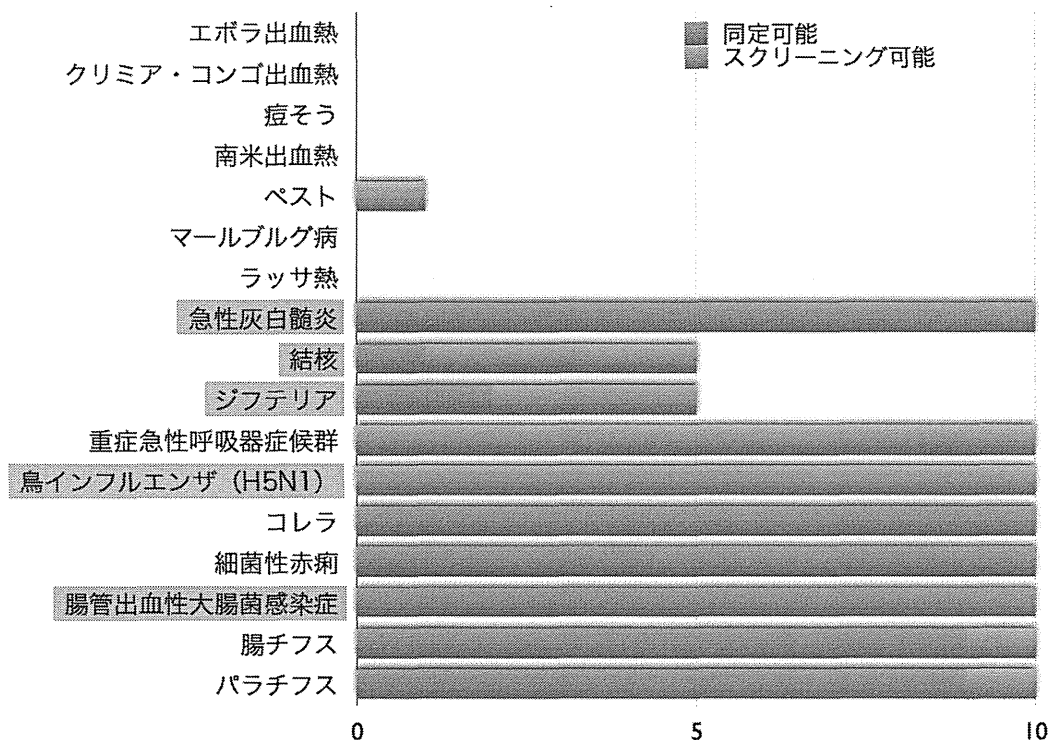
国内学会

なし

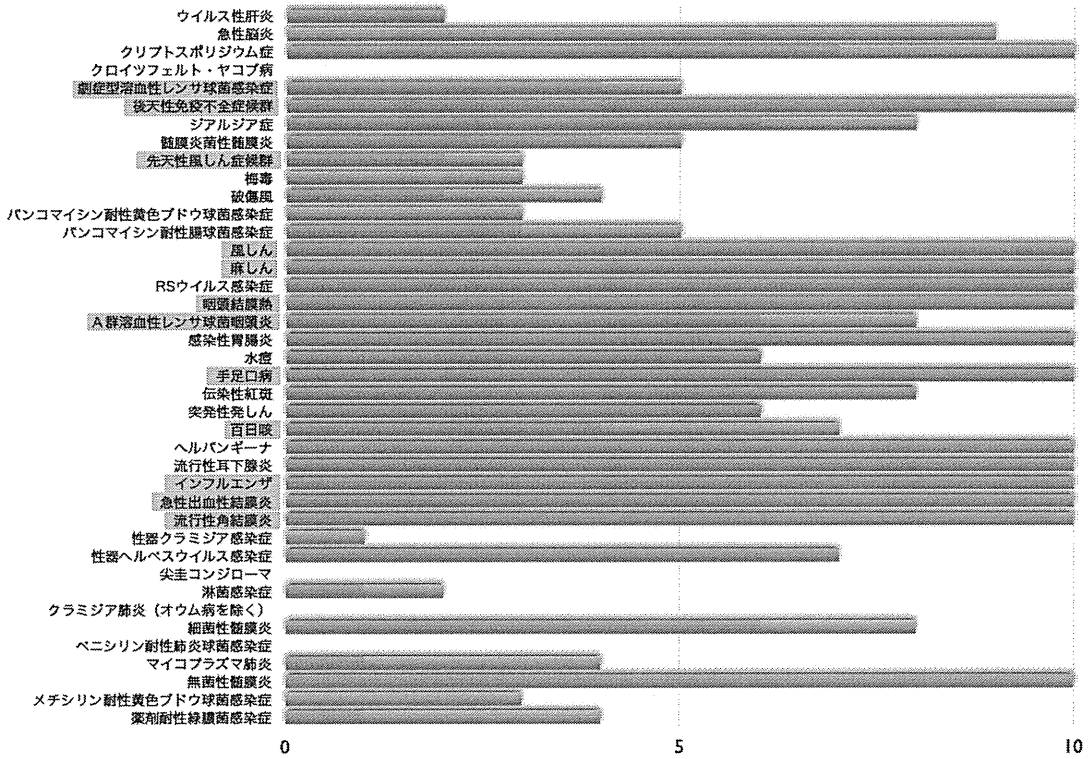
H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

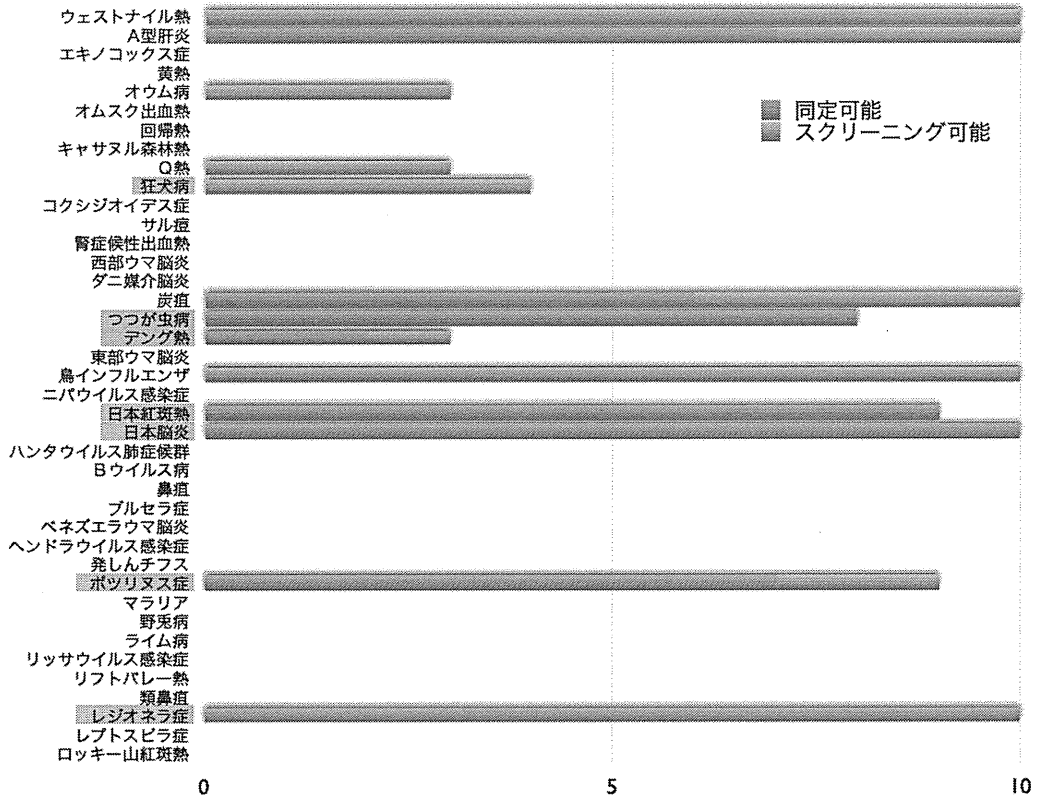
一類、二類、三類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



五類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



四類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



厚生労働科学研究費助成金（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 研究分担報告書

カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	福祉山 郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：7ヶ所のカンピロバクターレファレンス支部センターで、2012年にヒトから分離された *C. jejuni* 265株について Lior 法および Penner 法による血清型別を実施した。その結果、Lior 法では265株中213株(80.4%)、Penner 法では260株中130株(50%)が型別された。Penner 法による型別率が低い原因を検討したところ、B群血清の抗体価の低い可能性が示唆された。2012年分離のキノロン耐性率は、*C. jejuni* では47.7%、*C. coli* では60%であった。EM耐性率は *C. jejuni* では1.1%、*C. coli* では20%であった。

A. 研究目的

カンピロバクターは、食中毒起因菌として非常に重要であり、地方衛生研究所では、本菌による胃腸炎集団発生時に原因食の推定や汚染経路調査などのために分離菌株の血清型別が実施できることが望ましい。この検査サービスを全国地方衛生研究所の協力によって普及し、同菌による胃腸炎予防に資することを目的としてカンピロバクター血清型別レファレンス・サービスが1989年に開始された。これまで、Lior 法による型別用血清は、研究協力者が協働して作製してきたが、その作業には限りがある。一

方、Penner 法による型別用血清は市販品（デンカ生研）がある。そこで、本研究は、① Lior 法による診断血清を用いた分離菌株の型別状況調査、②市販血清を用いた Penner 法による型別の検討、また、③薬剤耐性菌の出現状況の把握を目的として実施した。

B. 研究方法

1. カンピロバクター血清型別レファレンス・サービス支部センター
支部センター及びその所管地区は以下のとおりである。

北海道・東北・新潟地区：秋田県健康環境センター，関東・甲・信・静地区：東京都健康安全研究センター，東海・北陸地区：愛知県衛生研究所，近畿地区：大阪府立公衆衛生研究所，中国・四国地区：山口県環境保健センター（広島県を除く中国地方）広島市衛生研究所（広島県及び四国地方），九州地区：熊本県保健環境科学研究所

2. Lior 法及び Penner 法による血清型別
各支部センターで分離された *Campylobacter jejuni* を対象に，自家調製血清を用いた Lior 法による型別，及び市販血清（デンカ生研）を用いた Penner 法による型別を行った。各方法の概要は表 1 に示した。

3. Penner 法による型別不能 (UT) 株の検討

Penner 法による UT 株について，Lior 法による型別結果と比較検討した。また，Penner 法による UT 株について，自家免疫血清を用いて解析を行った。

4. 薬剤耐性菌の出現状況の把握

エリスロマイシン(EM)，ナリジクス酸(NA)，ノフロキサシン(NFLX)，オフロキサシン(OFLX)，シプロフロキサシン(CPFX)の5薬剤を供試し，米国臨床検査標準化委員会(CLSI)の方法に従い，センシディスク(BD)を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。

C. 研究結果

1. Lior 法及び Penner 法による血清型別

2012 年に全国 7 地域で散発下痢症患者

から分離された *C. jejuni* 265 株の Lior 法による型別成績を表 2 にまとめた。最も多く検出された血清型は LIO 4 (33.6%)，続いて，LIO 1 (8.7%)，TCK 1 (6.8%)，LIO 11 (4.9%) であった。UT 株は 52 株(19.6%)であった。

次に，2012 年に分離された 260 株について，Penner 法で型別を行った。最も多く検出されたのは，B 群 44 株(16.9%)，D 群 19 株(7.3%)，C 群 10 株(3.8%)であった。UT 株が 130 株(50.0%)と非常に多い結果であった(表 3)。UT 株の割合は，過去 4 年間(2009 年：45.1%，2010 年：38.1%，2011 年 39.0%)で最も高い状況であった。

3. Penner 法による型別不能株の検討

東京都で検討した散発下痢症由来 *C. jejuni* について，Penner 法による UT 株の割合を分離年別にまとめた(表 4)。2000 年に比較して，UT 株の割合が年々上昇している。次に，これらの Penner の UT 株を Lior 法で型別してみると，LIO 11 や LIO 4 に多く型別された。LIO 11 に型別される株は，以前より Penner 法では UT と型別されており，対応する血清群が市販血清に含まれていない可能性が考えられた。

一方，LIO 4 は，Penner B 群の株が多い。そこで，B 群の免疫株(HS：2)，また，東京都で分離された HS：2 遺伝子の保有の確認されている分離株 12 株(HP11336 株など)を用いて，市販の B 群血清，HS：2 を用いて作製した自家免疫血清，また HP11336 株の自家免疫血清を用いて反応性を比較検討した。その結果，市販の B 群血清の抗体価が低いのではないかという結果が得られた(表 5)。

4. 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, CPMX)の割合は、47.7%で、2010年以降45%以上という傾向が続いている(図1)。*C. coli* では、10株中6株(60%)がキノロン耐性株であった。

一方、カンピロバクター下痢症の治療のための第一選択薬として推奨されている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。

D. 考察

国際的に認められているカンピロバクター一型別法の1つであるLior法は、易熱性抗原を標識抗原としてスライド凝集反応により型別する方法である。私共は、自家免疫によって作製した30種類の血清群をセットとして利用している。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法も国際的に認められている型別法であり、耐熱性抗原を標識抗原として受身血球凝集反応により型別する。市販血清があり、25種類の血清群をセットとして利用している。操作は煩雑であるが、判定は容易である。しかし、価格が高い(1検体2000円)という問題もある。

1989年以来、カンピロバクターの型別用血清の作製を地方衛生研究所の協働で行って来た。しかし、最近の地方衛生研究所のマンパワー不足のため、診断用血清を自家調製することは非常に困難になってきている。そこで、可能であれば市販血清の使用に切り替えたいと検討しているが、型別率の低さが最大の課題である。今回、その原

因について、一部検討した結果、B群血清の力価の問題が推定された。現在、この結果に基づき、さらに型別率を上昇させるための検討を行っている。

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。

E. 結論

2012年にヒトから分離された *C. jejuni* 265株について血清型別を実施したところ、Lior法に比べPenner法による型別率が低いことがわかった。原因の検討を行ったところ、市販血清の力価に問題があることが示唆された。

次に、薬剤耐性株の出現状況を調査した結果、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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

衛生微生物技術協議会第34回研究会(名古屋)レファレンスセンター等報告：カンピロバクター
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H25_Campylobacter.pdf

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1. カンピロバクターの血清型別法

	Lior 法 自家調製	Penner 法 市販品(デンカ生研)
方法	スライド凝集反応	受身血球凝集反応
標的抗原	易熱性抗原 (H, K様抗原?)	耐熱性菌体抗原 (LOS)
血清群数	30(原法:118)	25(原法:57)
操作性	容易	煩雑
判定	やや困難	容易
価格	安価	高価(1検体 2000円)

表2. *C. jejuni* 散発事例由来株のLior血清型別成績(全国・2012年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
LIO 4	12	26	6	7	31	7	-	89	33.6
LIO 1	2	1	-	-	14	6	-	23	8.7
TCK 1	-	6	1	1	10	-	-	18	6.8
LIO 11	2	6	1	-	3	1	-	13	4.9
LIO 7	-	3	1	-	1	1	-	6	2.3
LIO 10	-	1	-	-	1	4	-	6	2.3
LIO 6	1	-	1	-	2	1	-	5	1.9
LIO36	-	5	-	-	-	-	-	5	1.9
その他*	2	12	3	0	3	3	-	23	8.7
小計	19	60	13	8	65	23	0	188	71.0
(%)	63.3	72.3	48.1	57.1	73.9	100.0	0.0	71.0	
複数血清	4	1	10	-	10	-	-	25	9.4
型別不能	7	22	4	6	13	-	-	52	19.6
合計	30	83	27	14	88	23	0	265	100

* 13種類