

と SuperScript version III を用いた逆転写反応により合成した cDNA を用いて、第三世代プライマーセットを用いた RT-PCR, 1st step, 2nd step を行った。その結果、10⁴ copies/g stool 以上の RNA titer があれば、テストした全ての遺伝子型で約 4.5kb もしくは、1kb の増幅産物が得られることが明らかになった。第二世代プライマーセットに比べ、約 10%程度の検出率向上が認められた。第三世代プライマーセットは、2nd step PCR まで持ち込めば、SK シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。また、第三世代プライマーセットの PCR amplicon は、これまで構築された様々な PCR 検出系の増幅領域をカバーしており、SK シリーズ amplicon を用いた従来の Capsid N/S 領域の genotyping, RdRp 領域を用いた genotyping, キメラウイルスの解析、genome 全長において最も多様性に富む VP1/P2 domain を用いた分子疫学にも対応可能である。本システム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。来年度より試験的運用開始予定している。

3. 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構築

マイクロチップ電気泳動装置を用いて RNA-PAGE 条件の最適化を行い、ロタウイルス 11 本のゲノム 2 本鎖 RNA を再現性良くパターン化することが可能であった。マイクロチップ電気泳動装置は、ロタウイルスの異なる遺伝子型のパターンライブラリーを構築することで、パターン比較による全国規模のロタウイルスの分子疫学解析基盤となり得ると考えられた。しかし、装置の価格が高いことが導入に際して障害となることが予測された。現在、本装置が導入され

ている地研は、12 以上存在することも明らかになった。これらの地研をレファレンスブロック地研として活動を依頼し、本方法による分子疫学を推進する。

D. 結論

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。ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーが提唱した新規 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、基盤技術の構築を行った。

E. 健康危険情報

特記事項無し

F. 研究発表 (英文論文発表のみ記載)

論文発表

1. Murakami K., Kurihara C., Oka T., Shimoike T., Fujii Y., Takai-Todaka R., Park YB., Wakita T., Matsuda T., Hokari R., Miura S., and Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. 2013 PLoS One, 14: e66534
2. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.

G. 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

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

研究分担者 清水博之 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 吉田弘 国立感染症研究所ウイルス第二部
福島県衛生研究所（北海道・東北・新潟）
神奈川県衛生研究所（関東・甲信・静）
愛知県衛生研究所（東海・北陸）
神戸市環境保健研究所（近畿）
愛媛県立衛生環境研究所（中国・四国）
福岡県保健環境研究所（九州・沖縄）

研究要旨 エンテロウイルスレファレンスセンター(全国6ブロック)との協力のもと地方衛生研究所で実施している検査の現状把握を行った。その結果、①エンテロウイルス検査に関する基盤の技術研修コースの企画、関連するマニュアル整備、次いで、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して行くこととした。

A. 研究目的

各ブロックレファレンスセンター(九州沖縄：福岡県衛研、中国四国：愛媛衛研、近畿：神戸市衛研、北陸中部：愛知衛研、関東甲信静：神奈川衛研、北海道東北新潟：福島衛研)との協力の下、地方衛生研究所で実施しているエンテロウイルス検査の状況を把握し、検査の質の向上のため具体的な方法について検討を行う。

初年度はアンケートによる現状調査、次年度以降はアンケート結果を踏まえた、マニュアル作成、及び研修などを企画実施する。

B. 研究方法

1. エンテロウイルス検査に関するアンケート調査

エンテロウイルス検査に関する調査項目（人員、検体数、搬入法、検査材料、分離法、同定法、遺伝子解析による同定法、検査の品質管理）を整理し、6ブロックレファレンスセンターを通じて2013年12月2

日にアンケートを発出した。なお、回答期限は12月27日とした。

C. 結果

1. アンケート回答機関

九州沖縄(12)、中国四国(10)、近畿(14)、北陸中部(7)、関東甲信静(23)、北海道東北新潟(12)合計78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。

2. エンテロウイルス検査を担当する人員数(表1)

2-3名以上と回答を得たのは55機関を占めたが1-1.5名のみというは12機関あった。

3. エンテロウイルスに関連する年間検体数(表1)

年間の検体数(概数)が500以上は11機関であり、100-500が32機関、100以下が24機関であった。

4. 検体搬入について(表2)

搬入状況について毎週搬入があると回答のあったのは30機関であり、次いで随時と

回答があったのは18機関であった。

5. 臨床診断名による検査材料(表3, 4)

①無菌性髄膜炎、②ヘルパンギーナ/手足口病、③ポリオ、④その他エンテロウイルス感染が疑われる場合について、複数回答ありとして検査材料を集計したところ、ポリオを除き咽頭ぬぐい液を検査材料として用いる傾向が見られた。

6. ウイルス分離について

ア. ウイルス分離に用いる細胞(表5)

エンテロウイルスに対して感受性の異なる細胞を複数用いているが、多様である。WHO標準法である分離用細胞であるRD-A, L20BのうちRD-A細胞を使用しているのは20機関であった。

イ. 細胞の継代数(表6)

継代の頻度も多様であるが、適宜切り替えと回答のあった機関が多数を占めた。

ウ. ウイルス分離時の培養温度(表6)

33度から37度まで異なる温度で分離が行われている。

エ. 培地の種類(表7, 8)

培地には多くはイーグルMEMが用いられているが、細胞種によって培地を使い分けている機関も見られた。

オ. ポリオウイルス分離用L20B細胞利用状況(表9)

WHO標準法であるRD-A、L20B細胞のうちL20Bは13機関がポリオ分離のため使用しているが、使用していない、保有していないと回答しているのは52機関であった。

カ. 乳のみマウスの利用状況(表9)

乳のみマウスを用いた分離につきルーチン検査、時折実施していると回答のあったのは12機関であった。

7. ウイルス同定法(表10)

ウイルス同定には中和法と塩基配列による方法の併用が51機関と多数を占めた。

8. 塩基配列による同定法

ア. 血清型の同定に用いる方法(表11)

多くの機関が2種類以上の方法/領域を適宜組み合わせ塩基配列解析を行い、同定を行っている。

イ. 塩基配列解析法(表12.13)

エンテロウイルスの塩基配列解析に基づき同定を行う際にBLAST検索を用いるとした機関がほとんどを占め、標準株との相同性(RIVMタイピングサービス含む)に基づき判定していると回答した機関はエンテロウイルス検査を行っている機関の1/3程度であった。

9. 品質管理(表14.15.16)

ウイルス分離・同定検査は約1/4程度、PCR-シーケンスについては約1/3程度の機関が検査に関して何らかの品質管理を行っているという回答を得た。

10. 研修等レファレンスセンターに対する要望(表17, 18)

基盤的な技術(細胞培養、分離同定)への研修要望が多く、次いで遺伝子解析による同定検査に関する研修要望が多い傾向が見られた。

D. 考察

1. 人事異動により十分な技術継承が行な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。

2. 遺伝子診断法の研修に関する要望が多いが、技術の質管理(特にPCR、シーケンス)について多くの機関で実施できない状況から、研修を実施する場合は十分考慮する必要がある。

3. 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。

E. 結論

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、次いで、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して行く。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 児玉弘美 小菅裕也 山田香織
鈴木智之 小嶋美穂子 石川和彦
井上剛彦 谷口秀美 吉田弘 無
菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出状況 (2013 年) —
滋賀県 IASR Vol. 34 p. 309-310:
2013 年 10 月号

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

表1

1. 人員について

①貴研究所でウイルス検査に従事する職員数

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計	57	17	1		回答辞退(3)

②貴研究所でエンテロウイルス検査に従事する職員数について、お答えください。

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計(78)	33	22	9	11	1.5人が3機関

2. 検体数について

貴研究所で年間搬入される大まかな検体数(エンテロウイルスに関連する)について、お答えください。

	検体数					検査を行っていない
	2000以上	2000-1000	1000-500	500-100	100以下	
計(78)	1	3	7	32	24	11

表2

3. 検体搬入について

①検体搬入状況について伺います。

	毎週	隔週	毎月	随時	毎日	その他
計	30	5	5	18	3	

- ・概ね毎週2回
- ・主に6～11月の患者発生時に搬入
- ・4～9月は隔週、10～3月は毎週
- ・季節によって異なり、毎週のときと毎月のときがある
- ・発生動向調査の検体についてエンテロウイルス検査体制を整えており、検体は毎週受け付けていますが、現状無菌性髄膜炎や手足口病、ヘルパンギーナ等の疾患の検体搬入がほぼありません

②検体搬入までの検体保管方法について伺います(複数回答あり)

	冷蔵	冷凍	その他
計	46	31	

- ・搬入までの期間が、1週間以内は冷蔵、1週間以上の場合は冷凍。
- ・病院での保管状態を保つ状態で搬入
- ・使用培地と保存期間により異なる
- ・保健所、病院における保存状態による
- ・咽頭拭い液は冷凍、糞便は冷蔵

表3

4. 検査材料について

①無菌性髄膜炎の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計	66	43		54
				<ul style="list-style-type: none"> ・鼻腔ぬぐい液 ・鼻汁 ・鼻汁、尿 ・記載なし(1) ・この数年のあいだ経験がない ・上記3つを材料としているが、最近無菌性髄膜炎の検体は搬入されていない

②ヘルパンギーナ、手足口病の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	水疱	その他
計	8	24		66	12
					<ul style="list-style-type: none"> ・鼻腔ぬぐい液 ・鼻汁 ・皮膚病巣 ・具体的に依頼なし ・検体が搬入されたことはありません ・うがい液、鼻汁

表4

③ポリオの場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	当所では数年無し
計		8	26	17
				40

④その他エンテロウイルス感染が疑われる場合(発疹、上気道炎、下気道炎、脳炎/脳症など)

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計	44	41		65
				<ul style="list-style-type: none"> ・死亡例において剖検があった場合、関連臓器組織片 ・鼻腔ぬぐい液 ・うがい液、鼻汁、血清 ・血液(2か所) ・具体的に依頼なし ・検体が搬入されたことはありません 鼻汁 血清(2か所) 気管吸引液、血清、直腸ぬぐい液、尿、鼻汁

表5

5. ウイルス分離について

① 分離に用いている細胞について伺います(複数回答可)

	FL	Vero	RD-18s	RD-A	HEp-2	LLC-MK2	Caco-2	Vero E6	Hela	A549	RD	MRC-5	その他
計	12	44	46	20	45	9	18	19	10	6	4	2	
													HEF L20B, Hela229 Vero9013 (2か所) L20B PCRを実施し、ポリオウイルスや脳症からエンテロウイルスが検出された場合に実施 RD-Aについては検討中 HEA1 KB HEF, GMK, LLC-MK2, HMV-II

*検査に分離を行っていないところは無回答

表6

② 分離に用いる細胞の継代数(凍結保存している細胞との入れ替え頻度)について伺います。

	15代	15-30代	適宜切り替え	年に1度	その他
計	1	14	41	5	
					・100代程度 ・MRC-5→10代で切り替えている、その他の細胞→適宜切り替えている ・40代前後

③ 分離の際の培養温度について伺います

	33度	34度	35度	36度	37度	その他
計	8	20	13	11	13	
						・33度(HRVs)及び37度(その他) ・35.5度 ・FL→34度、その他の細胞→37度

表7

④分離に用いる培地について伺います

	イーグルMEM	ダルベッコMEM	種類で使い分け
計	44	11	11
			<ul style="list-style-type: none"> ・DMEM:RD-AとVeroE6, イーグルMEM:HEp-2とMRC-5 ・イーグルMEM:Vero,RD-18S, DMEM:VeroE6 ・イーグルMEM:FLとVero, DMEM:RD-18S ・イーグルMEM:FLとRD-18S, DMEM:VeroE6 ・イーグルMEM:Vero, DMEM:RD18s ・DMEM:VeroとRD-18s, イーグルMEM:HEp-2 ・イーグルMEM:HEp-2とHela, DMEM:RD-18S ・DMEM:RD-18S, イーグルMEM:その他の細胞(2か所) ・DMEM:RD-18s, VeroE6, A549, イーグルMEM:HEp-2 ・RD-A,HEp-2,RD,HeLa:イーグルMEM、VeroE6:DMEM

表8

⑤培地調製について伺います

	液体培地を 購入	粉末培地を 購入し、調 整している	その他
計	19	49	
			<ul style="list-style-type: none"> ・基本的に粉末培地だが、MRC-5のみ液体培地を購入 ・HEFのみ粉末 ・液体培地を使用していたが、現在は粉末培地を使用している ・Caco2細胞のみ市販の液体培地を使用

表9

⑥ウイルス分離に用いる資材(プレート、ガラスチューブなど)について伺います

	チューブ法 により分離	24穴プ レートを使用	48穴プ レートを使用	96穴プ レートを使用 その他
計	6	42	14	10

・6穴プレートを使用する場合もあり
・スクリーニングは96穴、分離ウイルスを増やす際は24穴使用

⑦ポリオウイルス分離に用いるL20B細胞について伺います

	ポリオウイルスの有無を調べるため 使用している	ストックしているが使 用していない	保有していない
計		13	24
			28

⑧乳のみマウスの使用について伺います

	ルーチン検査で使用	時折実施	乳のみマウスは用いていない
計	5	7	51

表10

6. ウイルス同定について(複数回答可)

分離株、臨床材料を用いた場合の同定法について伺います

	抗血清によ る中和法の み実施	塩基配列に よる同定の み	中和法と塩 基配列によ る同定の適 宜組み合わせ	乳のみマウス エンテロウイル ス特異的リア ルタイムPCR にてスクリーニ ングし、塩基配 列により同定	その他
計	1	16	51	6	5

・エンテロウイルスのコンベンショナルRT-PCR法にてスクリーニングのみ実施している(型別不明(NT)で報告)
・CF+中和+シーケンス

表11

7. 塩基配列による同定について

①塩基配列による同定法について伺います(複数回答可)

	CODEHOP- snPCR法	VP4-VP2部分領域をVP1領域を増幅するRT-PCR	VP1領域を増幅するRT-PCR	その他	②CODEHOP法以外にVP1領域を増幅するプライマーをお使いの場合、プライマーの名称(例040,012,011など)について以下列挙ください。
計	38	46	30	1*	<ul style="list-style-type: none"> *187,188,189,011(8か所) *011,012,187,188,040,222(1か所) *187,188,189,222(1か所) *012,040/011,187,188,189/222(3か所) *040,012,011(2か所) *490/492(1か所) 記載なし(4か所) *187,188,189,222,011(2か所) *187,188,189,012,040,011,490,492,222(1か所) *040,012,011(1か所) *040,012,187,188,189,011(2か所) *486,487,488,489,490,492,71/2757F,71/2780R,71/2349,71/3393,UG1,UG11,P1S-VP1S,P1S-VP1A,P2S-VP1S,P2S-VP1A,P3S-VP1S,P3S-VP1A(1か所) *011,012,040,187,188,189,222,490,491,492,493,494(1か所) *189,011(1か所) *012,040,011,187,188,189,222,292,488~497(1か所)

*シーケンサーを保有していないためPCRのみ

表12

8.塩基配列解析法について

①得られた塩基配列を用いてどのように血清型を同定するか伺います(複数回答可)

	BLAST検索でオランダRIV 標準株との相同性 上位に現れた Mのエンテロ (VP1領域の塩基 ものを血清型 ウイルスタイプ配列で75%以上— その他 として報告して(ゲサービス 致)に基づいて同定 いる を用いている している		
計	58	18	14
			<ul style="list-style-type: none"> ・VP4-VP2部分領域について標準株との相同性に基づき同定 ・FASTA検索で上位に現れたものを血清型として報告している。 The European Bioinformatics Instituteのサービスを利用 ・標準株を使用した系統樹解析による分類

表13

②塩基配列解析に用いるソフトウェアについて伺います(複数回答可)

	DNASIS	MEGA	BioEdit	Genetyx	その他
計	4	35	3	14	Clustal X, SeqConv 外注しているため不明 Finch Sequencher (2か所) DNA Dynamo CEQ8000(BECKMAN COULTER) BioNumerics チュートリアルVer6.5 イン フォコム株式会社 ChromasPro

表14

9. 品質管理について

③ウイルス分離・同定検査に関する品質管理

	特に実施していない	実施している (具体的な事項についてお答えください。細胞、試薬等)
計	57	10
具体例		<ul style="list-style-type: none"> ・コンタミネーションのチェック ・細胞、培地添加用牛胎児血清、対照ウイルス標準株 ・細胞台帳の作成 ・培養細胞は15代継代後、廃棄している ・ロット毎に非感染細胞(陰性対照)を置いている。 ・ウイルス分離の際に、同一プレート上に陰性コントロールをおき併せて観察する ・保存細胞を使用する際には必ずマイコプラズマのチェックを行っている。 ・温度・湿度・期間の管理 ・細胞の維持継代は定期的実施する。 ・GLPに基づき管理している。(例: 試薬及び試液管理簿による使用期限等の管理、ウイルス分離台帳による保管状況の確認)

表15

④PCR、シーケンスに関する品質管理

	特に実施していない	実施している(具体的な事項についてお答えください)(機器、コントロール等)
計	42	26

- ・機器については、シーケンサーは、業者との保守点検契約により、年1回の定期点検を実施。PCRについては、点検等は行っていない。また、コントロールや試薬に関する品質管理は特に行っていない。
- ・コンタミネーションのチェック
- ・機器、コントロール
- ・検査ごとに1点ずつ陽性・陰性コントロールを置いている。
- ・定期的な保守点検(シーケンサー)
- ・PCR時 陰性・陽性コントロールを置いている。
- ・機器は業者による保守点検を実施
- ・PCR実施時は陰性・陽性コントロールをおいている
- ・PCR検査等において使用する試薬等の使用期限の確認。リアルタイムPCRについて試薬キットによるキャリブレーションを年2回実施
- ・PCRに関して内在コントロールを置くようにしたところである。
- ・PCRでは、反応毎に陽性対照、陰性対照を設置している。
- ・陽性および陰性コントロールを併せて実施する
- ・サーマルサイクラーの定期点検、実施時の陽性、陰性コントロールの検出
- ・サーマルサイクラー、DNAシーケンサーについては年1回の保守点検を行っている
- ・PCRについては、ポジティブコントロールを使用
- ・機器の保守点検、検査毎にコントロールを同時測定
- ・検査毎にコントロールを置いている。機器については定期的に洗浄等をしている
- ・定期的な点検及びメンテナンス
- ・機器の保守点検
- ・機器類の定期点検、陽性及び陰性コントロールの同時検査
- ・シーケンサーのみ実施(年1回の業者による保守点検)
- ・GLPに基づき管理している。(例: 機器類の日常及び定期点検等)
- ・シーケンサーについては、年1回の定期点検を実施
- ・保守点検
- ・機器
- ・シーケンサーのみ行っている(年1回、メーカー標準品を用いたキャリブレーション)

表16

⑤SOP(標準作業手順書)の有無

	独自に作成している	特に作成していない
計	16	52

⑥検査手順を記載したものの有無(検査ごとの実験ノート等、方法・結果等記載したもの)

	独自に作成している	特に作成していない
計	60	3

表16

10.研修に関する要望(原文のまま)

<ul style="list-style-type: none"> ・PCR,シーケンス,ウイルス分離+中和法 ・細胞培養における基本的操作法と、当センターはシーケンサーを保有していませんが、その使用法や解析方法の研修があれば幸いです。また、エンテロウイルス検査法として、きちんと研修を受けた経験もないので、せめて検査法全般(基本的操作も含め)に対するスタンダードマニュアルがあれば、と常々感じております。現在はかなり以前の担当者が独自に作成したマニュアルをもとに検査を実施しているのが現状です。 ・抗血清による中和法による分離株同定やヒト血清中抗体検出法など、エンテロウイルスの血清学的検査法 ・塩基配列からのウイルス同定の際の注意点、解析方法等 ・細胞の継代方法、それぞれのウイルスに特徴的なCPEの形態と判定について ・ウイルス分離及び中和法による同定 ・いろいろな細胞を使用した、ウイルス分離・同定をしてほしい。 ・細胞培養法、中和血清による同定法 ・CODEHOP法 ・ウイルス分離株の中和による同定法 ・ポリオウイルスの野生株とワクチン株を識別するための手法の習得 ・検査法(細胞培養、PCR等)に関する技術的研修 ・ウイルス分離の技術研修を実施していただきたい。 ・古典的な中和試験による同定法 ・中和法と塩基配列による同定結果の解釈について ・細胞培養、CPEの確認、同定方法(中和試験、PCR、シーケンス、解析など) ・中和法の経験者がいないので、中和法の実習をして欲しい

- ・若い人が急増しているので分離、同定特に中和などの研修を実施していただくと大変ありがたいです。
- ・中和反応、遺伝子解析の手順
- ・ウイルス分離、同定方法などの研修を数年毎にでも行っていただくと、職員が代わりた際など非常に助かる。
- ・Rhinovirusの検査意義および重要性について
- ・新しい知見に関する研修の実施を希望します
- ・エンテロウイルスは型ごとに細胞感受性が異なるため、無菌操作、ウイルス分離同定作業を行うためには慣れが必要であると考えます。また、無菌性髄膜炎や脳炎、麻痺については、エンテロウイルス以外の病原体が原因となることもあるため、鑑別診断する必要のある病原体(ムンプスウイルスやヘルペスウイルス、日本脳炎ウイルスなど)の検査についても、研修が必要であると思います。
- ・現在、マンパワーを理由に検査を実施していませんが、どのような過程があるのか一通り研修できる機会があればありがたいです
- ・CODEHOP法がよくわからないので研修していただきたいです。
- ・マニュアルに基づいたスタンダードな分離培養及び遺伝子検出法と検出率を上げるための工夫等について
- ・CODEHOP-snpPCR法、系統樹解析の実習
- ・塩基配列による同定法について、どの部位を解析するのがよいか、血清型の同定についてなど研修の機会があればと思います
- ・細胞培養法、ウイルス分離法、及び中和・塩基配列による同定法に関する基礎研修
- ・分離試験、中和検査、PCR法、遺伝子解析
- ・エンテロウイルスに限らず、分離培養に関する基礎的手技、知識
- ・シークエンス及び系統樹作成に関すること

表16

11. エンテロレファレンスセンターへの要望、或いは日常の検査で困っていることを自由に記入願います(以下原文のまま)。

- ・当所に異動してくる職員のほとんどは、ウイルス検査等の知識や経験、技術を持たないこと、3~5年で異動をしてしまうことから、稀な事例(例えば、エンテロウイルスの場合のポリオ)については、全く経験者がいない状況に陥る可能性があります。また、通常ルーチンで行っている検査と比較して高度な内容が要求される場合、単独で解決困難なこともあると思われます。そのような状況があったとき、検査技術等で気軽にご相談させていただいたり、場合によっては職員の研修を受け入れていただく等が可能であれば、大変心強く思います。
- ・当センターはシークエンスを保有しておりませんので、ウイルス型別同定を中和試験に頼っており、細胞の維持と抗血清の入手がネックになっております。ですので、エンテロウイルス培養においてよく用いられる細胞の分与の機会、あるいはその案内があると、大変ありがたいです。また、中和試験用抗血清につきましても同様に思います。こちらも当センターの事情ということで大変申し訳ないのですが、人事異動が頻繁ということもあり、レファレンスセンターや感染研にどういった抗血清を分与していただけるのか分からないのが現状です。例えば、ヒトノロウイルス1-3の抗血清なども分与いただけるのでしょうか？基本的な質問になり、申し訳ありません。
- ・VP4領域とVP1領域の塩基配列による同定を行い、それぞれ異なるエンテロウイルスと同定された場合の評価。重複感染と考えるべきか、VP1領域の結果のみを採用するべきか。
- ・各地衛研では、どのようにエンテロウイルスの同定を行っているのか教えていただきたい。
- ・中和抗血清の将来にわたり持続的に供給されるかが不安である。
- ・分離培養と遺伝子検査の棲み分けについて
- ・エンテロウイルスの同定は、ほとんどを遺伝子検査で実施しており、一部を中和で実施している状況です。ウイルス分離同定はウイルスによっては難しいものもあり、苦勞しています。ウイルス分離に関する情報を迅速にいただけたらと思います。

- コクサッキーA群に感受性の高い細胞を分与して欲しい
- 当所は現在エンテロウイルス検査を実施しておりませんが、保健所が行政検査が必要と判断した場合にウイルスのPCR検査・シーケンス検査の依頼がありますので、もしエンテロウイルスを検査してなくても研修参加が可能であれば参加したいです。
- エンテロウイルスに限ったことではないのですが、この病原体は、〇〇先生、といった感染研の担当者の一覧表みたいなものがあるとよいのではと常日願っています。
- 抗ポリオウイルス抗体価の低い職員へのIPV接種要否に関する情報がほしい。
抗HPeV-3血清について、感染研で分与できるシステムを作ってほしい。
- 近隣県でどのようなウイルス種が分離・検出されているか相互に共有できると、同定がよりスムーズに行えるのではと思います。
- 手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等について、感染症発生動向調査病原体検査の検体がなかなか集まらず、地域におけるウイルスの流行状況の把握が難しいため、困っています。
- ここ数か月で、シーケンスで型別ができないエンテロウイルスが何検体分か出てきているので、的確な型別法をご教授願いたいです。
VP4-VP2領域の参照株配列を集めたものがあるようでしたらいただけませんか。
- 頻繁に人事異動があり、検査技術の引継ぎが100%できるか不安である
- CODEHOP-snpPCR法での感度が低い為、型別不明になってしまう事例が多い。
- 分離ができなかった検体について、PCRでもVP1領域の増幅が困難です
- 当所では、臨床検体から抽出した遺伝子についてCODEHOP法を用いています。本来、370bpを読めるところ、300bp程度しか読めていません。370bp読むには、テクニックが必要であると聞きましたので、是非、御指導ください。
- 臨床検体からVP1遺伝子全長を検出できる高感度PCR法が構築されるとありがたいです
- エンテロの血清型により、プライマーによって反応性の良いもの、悪いものがあるというが、分かる範囲でその情報提供して欲しい

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
麻疹・風疹

研究分担者	竹田 誠	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所	ウイルス第三部
	森 嘉生	国立感染症研究所	ウイルス第三部
	麻疹風疹レファレンスセンター		
	長野秀樹	北海道立衛生研究所	
	青木洋子	山形県衛生研究所	
	小川知子	千葉県衛生研究所	
	七種美和子	横浜市衛生研究所	
	児玉洋江	石川県保健環境センター	
	皆川洋子	愛知県衛生研究所	
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	
	村田祥子	山口県環境保健センター	
	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所	
	加藤峰史	沖縄県衛生環境研究所	

研究要旨 麻疹や風疹を確実に診断するためには、臨床症状、血液生化学検査、疫学情報などの他に、ウイルス学的実験室検査が重要である。麻疹・風疹に関しては、ウイルスに対する抗体を検出する血清学的検査、ならびにウイルスを検出する核酸増幅法が主に利用されている。これまで核酸増幅法では、主に逆転写（RT）反応とnested PCRを組み合わせた方法（コンベンショナルRT-nested PCR法）が用いられてきたが、クロスコンタミネーションの回避や、手技の簡素化のためにリアルタイムRT-PCR法の導入が求められてきた。そこで、本研究では、麻疹・風疹それぞれのリアルタイムRT-PCR法の開発と評価を行った。麻疹・風疹レファレンスセンター10施設の協力のもとで研究を実施し、麻疹用・風疹用リアルタイムRT-PCR法ともに概ね良好な結果を得た。従来の、コンベンショナルRT-nested PCR法との特性の違いを理解した上で、本法を今後、麻疹・風疹の検査診断に活用できると考えられる。

A. 研究目的

麻疹・風疹それぞれのリアルタイム RT-PCR 法の開発

B. 研究方法

リアルタイム RT-PCR 法の詳細については、資料 1 ならびに資料 2 に示した。

C. 研究結果

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR について

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。「slope が -3.1 から -3.8 の間であること」、「 R^2 値が 0.98 以上であること」および「 5×10^2 コピー/反応が $Ct=40$ 以内で検出されること」の 3 つの基準のうち、「 R^2 値が 0.98 以上であること」、「 5×10^2 コピー/反応が $Ct=40$ 以内で検出されること」は全ての試験で満たしていた。「slope が -3.1 から -3.8 の間であること」も、 $32/33 = 97.0\%$ で満たしていた。以上の結果より、ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であると判断できた。手順書と同様の機器・試薬で試験を行った 4 施設（12 回の検量線解析）とその他の 7 施設（21 回の検量線解析）を比較したところ、前者の方が感度および特異度が高い可能性が示唆された（表 1）。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR について

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（試験数 $n=33$ ）。 Ct 値 40 以下で検出された最大希釈液の濃度を検出限界コピー数として集計したところ、5～

500 コピー/反応の範囲であった（図 1）

（注：1 試験において、5 コピーと 0.5 コピー間で容量依存性が認められなかったため、0.5 コピーの結果を除外した）。そのうち、5 コピー/反応が 33 試験中 24 件と最多であった。検出限界コピー数の平均 Ct 値は 37.6 ± 1.8 であった。

レファレンスセンター C では ABI Taqman Fast Virus 1-step master mix と QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit を使用して感度の比較が行われたが、両者で感度の差は認めなかった。レファレンスセンター A でも 4 種類の試薬（上記 ABI と QIAGEN キットに加え、Invitrogen 社 SuperScript III platinum One-step Quantitative RT-PCR system および Roche 社 LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes）を使用して比較が行われたが、感度の差はなかった。全施設の集計結果においても使用試薬による明らかな感度の差は認められなかった（検討に使用された機器と試薬を表 2 に示した）。

参照 RNA の検出限界コピー数までの希釈段階の測定結果（試験数 $n=33$ ）から作成した検量線の slope は、平均 -3.431 ± 0.222 であり、理想的な PCR 反応で得られる slope -3.32 と同等であった。検量線の R^2 値の平均は 0.994 ± 0.005 であり、基準となる 0.98 を十分に満たしていた。

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 の希釈段階の一点を陽性コントロールとして設定して頂いた。設定された陽性コントロールの濃度は、5 コピー/反応（3 施設）、50 コピー/反応（5 施設）、500 コピー/反応（2 施設）であった。平

均 Ct 値は、5 コピー／反応で 38.1 ± 1.2 、50 コピー／反応で 34.6 ± 1.8 、500 コピー／反応で 35.2 ± 0.5 であった。

D. 考察

麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法において、陰性対照でも $Ct \leq 40$ で検出される場合が存在した。試験系を比較した結果、この問題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（表 3 および表 4）。

麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法による検出限界コピー数は、麻疹参照 RNA（遺伝子型 1a ウイルス由来）を用いた検討によって、概ね 5～50 コピー／反応であることが分かった。この値は、コンベンショナル RT-nested PCR 導入前にレファレンスセンターにおいて同一の麻疹参照 RNA を用いて検討して頂いた検出限界 2～20 コピー／反応（麻疹共通法の場合）と大きな差はなかった。今後、臨床検体を用いた検証が必要である。

E. 結論

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られる。今後、臨床検体を用いた解析を進めて行く。いずれにせよ、従来のコンベンショナル RT-nested PCR との特性の違いを理解しつつ、レファレンス活動の現場で積極的に活用していくことが望ましい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009-2011、病原体検出情報 34(2);36-7. (2013)
2. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠、2012 年の海外の麻疹情報、病原体検出情報 34(2);24-5. (2013)

学会発表

1. 駒瀬勝啓（シンポジウム）、麻疹、風疹ウイルスと検査診断について、第 26 回公衆衛生情報研究協議会、研究会 沖縄 2013 年 1 月 24 日～25 日
2. 竹田誠、栃木県小児科医会、小山地区医師会講演会 わが国の麻疹風疹対策-麻疹風疹検査診断と注意点 世界の麻疹風疹事情と日本の取り組み 2013 年 2 月 19 日
3. 竹田誠、第 33 回広島小児アレルギー研究会 麻疹の国内、世界最新事情-流行、ワクチン、研究 2013 年 2 月 21 日
4. 竹田誠、国立感染症研究所 FETP 講義 ウイルス感染症（麻しん風しんを中心に）2013 年 4 月 8 日
5. 竹田誠（監修）知ってほしい麻しん、風しん Q & A （改訂版）2013 年 3 月 25 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1：試験法の違いによる、試験の感度および特異度の比較（麻疹検出用リアルタイム RT-PCR）

	手順書と同じ 4 施設	その他の 7 施設
5 コピーが検出不可 (Ct>40)	0/12=0%	9/21=42.9%
水でも検出 (Ct<40)	0/12=0%	4/21=19%
0.5 コピー以下が検出可能 (Ct<40)	1/12=8.3%	9/21=42.9%

表 2：検討に使用された機器、試薬（風疹検出用リアルタイム RT-PCR）

使用機器

機器名	使用研究所数
ABI 7500 Fast Real-time PCR system	5
ABI 7500 Real-time PCR system	1
ABI Step One Plus	1
ABI Step One	1
Roche Light Cycler 480 system II	1
Roche Light Cycler 480	1

使用試薬

機器名	使用研究所数
ABI Taqman Fast Virus 1-step master mix	6*
QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit	4*
TakaraBio One Step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)	1

*1 施設では参照品を用いた感度解析には両キットが使用されたが、検体の解析にはABI Taqman Fast Virus 1-step master mix のみを用いている。