

検査記録書	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
			2015/3/19	1/10
作業名	検査開始日	検査終了日	検査責任者	確認者
ウイルス分離型別同定検査	..	..		

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
--------	----------------

1. 接種・ 型別記録	1. 接種記録・型別結果の総括					
	検体番号	接種日	接種・継代歴	分離の有無・判定日	備考	型別結果
	(例) t001/15	2015/3/19	①MDCK→3/26②MDCK	有・15/3/30	3/31 harvest	AH3
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			
			→			

作業名		文書番号		改訂番号		記録書発行日		頁		
ウイルス分離同定検査 (MDCK接種)						2015/3/19		2/10		
細胞播種日		検体接種日		培養終了日		文書作成者		検査責任者		確認者
.		.		.						
1		0.8 1.6 1.6		1.6		2.75 2.75 2.35		2		

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果							
2 ・ 分 離 用 接 種  ( 1 / )	2. 24wellプレート 接種観察記録 プレート番号( )							
	Well	1	2	3	4	5	6	
	A	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日
		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日
	B	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日
		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日
	C	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日
		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日
	D	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日
		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日
	2. 24wellプレート 接種観察記録 プレート番号( )							
	Well	1	2	3	4	5	6	
	A	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日
		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日
	B	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号
CPE出現日		CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	
上清回収日		上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	
C	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	
	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	
	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	
D	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	検体番号	
	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	CPE出現日	
	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	上清回収日	

作業名		文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
ウイルス分離同定検査 (HA, HI法)				2015/3/19	3/10
検査開始日	検査終了日	文書作成者・作業者		検査責任者	確認者
..	..				

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果				
2 ・ H A 試験 及び H I 試験 (第 1 P 2 実験 室)	<p>2-1. 赤血球浮遊液調整</p> <p>0.5%ニワトリ 採血日 _____</p> <p>0.5%ガチョウ 採血日 _____</p> <p>0.75%モルモット 採血日 _____</p> <p><input type="checkbox"/> 1.5mLエッペンドルフチューブに保存血を500 <math>\mu</math>L以内入れ、PBS(-)にて2倍希釈。</p> <p><input type="checkbox"/> 5,000rpm 2 min 遠心。</p> <p><input type="checkbox"/> 上清を捨て、5,000 rpm 2 min 遠心。</p> <p><input type="checkbox"/> 上清及び白血球（遠心後血餅上部に集まる）部分を捨てる。</p> <p><input type="checkbox"/> 15mL又は50mLチューブを用いて、PBS(-)にて上記濃度(v/v)となるよう赤血球を希釈。</p> <p>2-2. HA試験（ウイルス培養液を扱う操作はクリーンベンチ内で行う）</p> <p><input type="checkbox"/> PBS(-)25 <math>\mu</math>Lを96 wellプレート2~12列の全てのwellへ入れる。</p> <p><input type="checkbox"/> 1列のA~H wellへウイルス培養上清50 <math>\mu</math>Lを入れる。</p> <p><input type="checkbox"/> 8連ピペットを用いて2倍希釈系列を作成する。</p> <p><input type="checkbox"/> PBS(-)25 <math>\mu</math>Lを全てのwellへ入れる。</p> <p><input type="checkbox"/> 赤血球浮遊液50 <math>\mu</math>Lを全てのwellに入れる。 4℃にてニワトリ、ガチョウは45分、モルモットは90分反応させる。</p> <p><input type="checkbox"/> 各wellの赤血球凝集判定結果に基づき、HA価を決定する。</p> <p><input type="checkbox"/> HI試験の選択</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ニワトリ、ガチョウ、モルモット赤血球共HA価256程度の高値を示す場合：B型のHI試験をニワトリ赤血球を用いて実施。</li> <li>・ガチョウが比較的高く(HA価128程度)、ニワトリ、モルモットが比較的低い(HA価64程度)場合：H1pdmのHI試験をガチョウ赤血球を用いて実施。</li> <li>・モルモット赤血球のみでHA価が得られる場合：H3のHI試験をモルモット赤血球を用いて実施。</li> </ul> <p>・ニワトリ、ガチョウ、モルモット赤血球の何れにおいてもHA価8&lt;の場合：HI試験による型・亜型決定は不可能。他の手法を実施する。</p> <p>2-3. HI試験</p> <p><input type="checkbox"/> PBS(-)25 <math>\mu</math>Lを96 wellプレート2~12列のA~H wellへ入れる。</p> <p><input type="checkbox"/> 1列のA~H wellへ各抗血清50 <math>\mu</math>Lを入れる。</p> <p><input type="checkbox"/> 8連ピペットを用いて2倍希釈系列を作成する。</p> <p><input type="checkbox"/> 4HA/25 <math>\mu</math>Lに希釈したウイルス培養上清25 <math>\mu</math>Lを対応する行の1~12列のwellへ入れ、室温15分反応</p> <p><input type="checkbox"/> 赤血球50 <math>\mu</math>Lを全てのwellに入れる。 4℃にてニワトリ、ガチョウは45分、モルモットは90分反応させる。</p>				

作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
ウイルス分離同定検査 (HA, HI法)			2015/3/19	4-/10

1      0.8      1.6      1.6      1.6      2.75      2.75      2.35      2

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
--------	----------------

3 3. HAサンプルシート(#HA- )      赤血球:ニワトリ(U穴) ガチョウ(U穴) モルモット(V穴)

検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	判定
	希釈→												
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

HIサンプルシート(#HI- )

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
列												
希釈→												
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
ウイルス分離同定検査 (HA, HI法)			2015/3/19	4-1/10

1 0.8 1.6 1.6 1.6 2.75 2.75 2.35 2

区分・  
作業室

作業条件・方法および実施結果

3

・型別  
同定サ  
ンプル  
シート

(

1/1

)

3. HAサンプルシート(#HA-1)

赤血球:ニワトリ(U穴) ~~ガチョウ(U穴)~~ モルモット(V穴)

検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	判定
希釈→	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	
A t001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B t002	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C t100	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
D t101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
E 対照抗原	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

HIサンプルシート(#HI-1)

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
列	t001	t001	t001	t002	t002	t002	t100	t100	t100	t101	t101	t101
希釈→	10	20	40	10	20	40	10	20	40	10	20	40
A H1pdm	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B H3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C B山形	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D Bvic	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

ウイルス遺伝子同定検査-1		文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
				2015/3/19	5/10
検体調製実施日	検体調製作業	RNA抽出実施日	RNA抽出作業	確認者	
..		..			
区分・作業室	作業条件・方法および実施結果				
4 ・ 入 力	1. 記録書作成・入力				
	検体番号	継代歴	備考	使用量 (200 μ Lの場合■)	抽出RNA 保存場所
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	
				<input type="checkbox"/> μ L	

作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
ウイルス遺伝子同定検査-2			2015/3/19	6/10

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
5 ・ 検体調製 ( 第 一 P 2 実 験 室 )	<p>5-1. サンプルのラベリング</p> <p>5-2. Binding bufferと試料の混合</p> <p>Binding buffer : <u>Lot No. _____</u></p> <p><input type="checkbox"/> ① 検体を室温で溶解し、遠心する。</p> <p><input type="checkbox"/> ② Binding buffer 400 <math>\mu</math> Lに サンプル200 <math>\mu</math> L(臨床検体が200 <math>\mu</math> L 以下の場合は、DWで200 <math>\mu</math> Lに調整)を加える。</p> <p><input type="checkbox"/> ③ 15秒間 ボルテックスした後、10分間 静置し、軽くスピンドウンする</p>
6 ・ RNA抽出 ( 観 察 室 )	<p>6. RNA抽出(Roche High Pure Viral RNA Kit)</p> <p>Roche High Pure Viral RNA Kit: <u>Lot No. _____</u></p> <p><input type="checkbox"/> ① カラムにのせ、10,000rpm 1分間遠心</p> <p><input type="checkbox"/> ② Inhibitor Removal Buffer 500 <math>\mu</math> Lをカラムにのせ、10,000rpm 1分間遠心</p> <p><input type="checkbox"/> ③ Wash Buffer 450 <math>\mu</math> Lをカラムにのせ、10,000rpm 1分間遠心</p> <p><input type="checkbox"/> ④ Wash Buffer 450 <math>\mu</math> Lをカラムにのせ、10,000rpm 1分間遠心</p> <p><input type="checkbox"/> ⑤ 14,000rpm 10秒間遠心</p> <p><input type="checkbox"/> ⑥ カラムをRNA抽出用チューブに移し、50 <math>\mu</math> LのElution buffer をのせる</p> <p><input type="checkbox"/> ⑦ 1分間 静置し、10,000rpm 1分間遠心</p>

作業名		文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
Type A, swH1, H1, H3 遺伝子検査 (Conventional RT-PCR法)				2015/3/19	7/10
検体・試薬調製実施	検体作業・試薬作業	結果確認実施日	結果確認作業	結果判定責任者	
.		.		.	

1	1	0.8	1.6	1.6	1.6	2.75	2.75	2.35	2
区分・作業室	作業条件・方法および実施結果								
7 . コ ン ベン シ ヨ ナ ル R T   P C R  ( 試 薬 室 . ク リ ー ン ベン チ 、 観 察 室 、 第 二 P 2 実 験 室 )	7. Conventional RT-PCR (Type A, swH1, H1, H3) *操作はすべて氷上で行い、④までは試薬室・クリーンベンチ内で行う								
	Primer Sets (Type A, SwinH1, H1, H3):			Lot No. _____					
	陽性コントロール :			Lot No. _____					
	QIAGEN OneStep RT-PCR Kit:			Lot No. _____					
	① Primer(-)反応液の作製			x 1					
	<input type="checkbox"/> RNase-free water			9.5	$\mu$ L	$\mu$ L			
	<input type="checkbox"/> 5 x RT-PCR Buffer			5	$\mu$ L	$\mu$ L			
	<input type="checkbox"/> dNTP Mix (10 mM)			1	$\mu$ L	$\mu$ L			
	<input type="checkbox"/> RT Mix (5U/uL)			1	$\mu$ L	$\mu$ L			
	<input type="checkbox"/> RNase Inhibitor			0.5	$\mu$ L	$\mu$ L			
	② Type A, SwineH1, H1, H3反応液作製用チューブに分注し各Primer Mixと混合する								
	(A) Type A 検出用反応液								
	<input type="checkbox"/> Primer(-)反応液			17	$\mu$ L				
	<input type="checkbox"/> Type A Primer mix			3	$\mu$ L				
	(B) swH1検出用反応液								
<input type="checkbox"/> Primer(-)反応液			17	$\mu$ L					
<input type="checkbox"/> SwineH1 Primer mix			3	$\mu$ L					
(C) H1検出用反応液									
<input type="checkbox"/> Primer(-)反応液			17	$\mu$ L					
<input type="checkbox"/> H1 Primer mix			3	$\mu$ L					
(D) H3検出用反応液									
<input type="checkbox"/> Primer (-)反応液			17	$\mu$ L					
<input type="checkbox"/> H3Primer mix			3	$\mu$ L					
(各分注数計)									
③ 各反応液 20 $\mu$ Lを反応チューブに分注する									
検体数									
陰性コントロール数			1						
陽性コントロール数			1						
④ 5 $\mu$ Lの陰性コントロール(滅菌蒸留水)を各反応液に混合する									
⑤ 5 $\mu$ Lの抽出RNAを各反応液に混合する (観察室実験台で行う)									
⑥ 5 $\mu$ Lの陽性コントロールを各反応液に混合する (第二P2実験室、安全キャビネット内で行う)									



作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
Type A, swH1, H1, H3遺伝子検査 (Conventional RT-PCR法)			2015/3/20	8/10

区分・作業室	1	1	0.8	1.6	1.6	1.6	1.6	2.75	2.75	2.35	2
	作業条件・方法および実施結果										
7 . R T   P C R	(サーマルサイクラー : )					(サーマルサイクラー : )					
	Type A, swH1					H1, H3					
	50°C 30分間					50°C 30分間					
	↓					↓					
	95°C 15分間					95°C 15分間					
	↓					↓					
	94°C 30秒間					94°C 30秒間					x45
	50°C 30秒間					50°C 30秒間					cycles
	72°C 40秒間					72°C 80秒間					cycles
	↓					↓					(AH1H3)
	72°C 10分間					72°C 10分間					
	4°C ∞					4°C ∞					
	(A) A (244bp):										
	TypeA/M30F2/08					ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG					
	TypeA/M264R3/08					TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG					
	(B) swH1 (349bp):										
	NIID-swH1-F15'					TGCATTTGGGTAAATGTAACATTG					
	NIID-swH1-R15'					AATGTAGGATTTTRCTGAKCTTTGG					
	(C) H1 (729bp):										
	H1HA1-BEGIN					AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA					
	H1R10					GCTATTTCTGGGGTGAATCT					
	(D) H3 (1143bp):										
	H3HA1-BEGIN					AGCAAAAGCAGGGGATAATTC					
	H3HA1-END					TGCCTGAAACCGTACCAACC					
	* 1反応液中のPrimer setsの組成										
	Fowardプライマー(10 μ M)					1.5 μ L					
	Reverseプライマー(10 μ M)					1.5 μ L					
	** 反応液中のPrimer最終濃度:各0.6 μ M										



作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日	頁
Type A, swH1, H1, H3遺伝子検査 (Conventional RT-PCR法)			2015/3/19	10/10

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
	写真

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」班  
分担研究報告書

ウイルス病原体サーベイランスの現状に関する研究

研究分担者 皆川洋子 愛知県衛生研究所

研究協力者 山下照夫、安達啓一、伊藤雅、安井善宏、小林慎一  
愛知県衛生研究所

研究要旨 インフルエンザ以外のウイルス病原体サーベイランス検査体制の参考とするため、2009年から2014年における愛知県衛生研究所の感染症発生動向調査におけるウイルス病原体検索実績を解析した。新型インフルエンザが発生した2009年は、インフルエンザウイルス検査対象者数の顕著な増加が総患者数増に反映されたが、インフルエンザを除く年間患者総数の変動は小さかった。地方衛生研究所が検査を担当する現行のウイルス病原体サーベイランスは毎年多様なウイルス検出を報告しており、予防接種効果のモニター及び国内におけるピコルナ、アデノ、カリシ、レオウイルス侵淫状況に関する貴重な情報源である一方、麻疹を除く呼吸器系ウイルス情報は多くない。検査担当機関にとって、種々のウイルスの同定型別及び発展的調査研究は関連分野の進歩に敏感な職場環境につながり、結果として新型インフルエンザ等新興感染症や麻疹集団発生など健康危機発生時に病原体検査並びに分子疫学解析体制の最適化を可能にする原動力と考えられた。

A. 研究目的

感染症法改正に基づき平成28年4月に施行される病原体情報収集体制の強化への対応を考えるうえで、現在感染症発生動向調査実施要綱に基づき全国の地方衛生研究所（地衛研）で実施されている病原体検索のうち季節性インフルエンザ以外のウイルス病原体サーベイランス検査体制の参考とするため、新型インフルエンザが発生した2009年以降の愛知県衛生研究所における年別調査実績を解析する。

B. 研究方法

1. 感染症発生動向調査病原体検索データの出处

平成21～26年度に各年度1回開催された愛知県感染症発生動向調査企画委員会及び同委員会解析評価部会（年2回開催）に提出された暦年単位の検査成績資料（2009年～2014年分）を解析対象とした。同資料は公開していないが、年度（4月～翌年3月）単位で再集計した結果は各年度の愛知県衛生研究所年報ならびに感染症発生動向調査事業報告書（愛知県健康福祉部保健医療局健康対策課編）に記載されている（2014年4月～12月の成績は、平成27年度発行分年報及び報告書に記載予定）。

今回解析の対象とした検体は、名古屋市を除き中核市3市を含む県内15保健所管内（人口の合計：約510万）の31病原体定

点医療機関で採取され、主として所管保健所により愛知県衛生研究所に持ち込まれたもので、食中毒・集団かぜ・デングウイルス等輸入感染症対応等は含まない。

愛知県感染症発生動向調査実施要綱（平成 27 年 1 月 21 日施行）ならびに愛知県感染症発生動向調査事業（病原体情報）実施要領に記載されている対象疾患は、感染性胃腸炎、手足口病、ヘルパンギーナ、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、流行性出血性結膜炎、無菌性髄膜炎、インフルエンザのみであるが、保健所等が持ち込んだ検体は原則として全て受け入れており、急性脳炎・脳症、下気道炎、上気道炎、不明熱性疾患、不明発疹症等の診断がついた検体がみられる。さらに麻疹・風疹疑い検体が増加している。

## 2. ウイルス病原体検索の体制

今回解析対象とした検査成績は、全て生物学部ウイルス研究室から医療機関等に文書で報告済である。担当要員は室長以下 7 名（総務省統計局による平成 25 年現在の愛知県の人口（743 万）は、都道府県別では東京都、神奈川県、大阪府に次いで 4 位、指定都市分を除く 550 万は、東京都、大阪府に次いで 3 番目に多く、人口あたり研究職員数は全国平均を大きく下回る）。検体処理及びウイルス検出は、原則として研究室所定の手順で実施される。従来の方法で同定型別困難な株を分離した、等想定外の事例に対しては、担当職員の判断で従来法を改変したり新たな手法を試行する、等積極的対応を許容しており、過去には新しい血清型や遺伝子型のピコルナウイルス（HPeV-3）報告実績がある。

## 3. ウイルス病原体検索成績の解析

年別診断名別の患者数（複数の検体が同時に搬入された場合は 1 と算定）、陰性患者

数（全ての検体が陰性）、検出ウイルス名及び数（1 名の患者から複数のウイルスが検出されることがあるため、陽性患者数の和より大）データを用い、年別診断名別陽性患者割合等を算出・可視化した。

### （倫理面への配慮）

本研究では、個人に係る情報は除去済であるため、個人が特定されることはない。

研究計画の内容等は企業又は団体と直接の関係はなく、開示すべき利益相反はない。

## C. 研究結果

### 1. 感染症発生動向調査病原体検索数における年別変動の検討

2009～2014 年における年別臨床診断名別患者数を図 1 に、インフルエンザを除いたデータを図 2 に示す。年別総患者数の算術平均±標準偏差は 1,153±131.8、新型インフルエンザ発生等の影響を考慮し、インフルエンザ以外に限定すると 866±42.6 とさらに狭い範囲に収まっていた。

インフルエンザ以外の臨床診断名別年間患者数の平均±標準偏差のうち、標準偏差が平均の 20%を超えた項目は手足口病（74±44）、麻疹・風疹（35±22）、ヘルパンギーナ（55±15）、流行性角結膜炎（36±11）、無菌性髄膜炎（40±9）等であった。不明発疹症は漸減傾向にあるが、2010 年以降は一部が「麻疹・風疹疑い」として搬入されている。

### 2. ウイルス病原体検索成績の解析

図 3 に年別臨床診断名別検査陽性率（1 つ以上のウイルスが陽性であった患者数/全患者数）の推移を示す。6 年間の陽性率 55.6%、診断名別ではインフルエンザ（86.7%）、咽頭結膜熱（82.1%）、手足口病（70.5%）、ヘルパンギーナ（65.6%）が高い一方、急性脳炎・脳症（16.6%）、その他（20.5%）、流行性角結膜炎（25.7%）、下気道炎（26%）等

が低かった。年別陽性率の変動をみると、上昇がみられたのは、下気道炎及び麻疹・風疹であった。一方不明発疹症の陽性率は期間中に顕著に低下したが、発疹症である「麻疹・風疹疑い」と併せると低下は顕著ではなかった。

### 3. 分離・検出されたウイルスの多様性

表1には、年別に1件以上検出されたウイルスを列挙した。2012年まではポリオウイルス(PV)ワクチン株が主に感染性胃腸炎患者の糞便から年間10件前後分離されていたが、不活化ワクチン(IPV)移行後は検出されていない。ピコルナウイルス(PV, CV-A, CV-B, EV-71, E, HPeV, HAV)及びアデノウイルス(Ad)は、毎年異なる組合せで複数の血清型が検出され、分離株を得ている。

表2-1に感染性胃腸炎患者から検出された主なウイルスの推移を示した。ロタウイルスはワクチン導入後顕著な減少がみられ、ポリオウイルスとともに予防接種の効果検証に有用なデータとなっている。

表2-2には無菌性髄膜炎患者から検出された主なウイルスの推移を示した。患者検体は脳脊髄液、咽頭拭い液、糞便の3点セット提出を呼びかけており、脳脊髄液以外の検体のみ陽性であった患者のウイルスも計上している。ムンプス2例以外は全てピコルナウイルスであるが、年ごとに異なる型が検出され、手足口病やヘルパンギーナ由来ウイルスとの重なりも毎年注視している。

### D. 考察

病原体サーベイランスの一環としてのウイルス検出は、愛知県では1976年より実施されている。病原体検査手法は、直接鏡検(ウイルスの場合は電子顕微鏡を要するの

で限定的)・抗原若しくは遺伝子検出・分離の3種類に大別されるが、ウイルスサーベイランスに用いられる検査法は一貫してウイルス分離が中心であるが、乳のみマウスや発育鶏卵への接種は漸次中止され、種々の培養細胞に接種している。CV-Aは従来培養細胞接種では分離困難で乳のみマウスを必要としたが、感受性の高いRD-A細胞の導入によりCV-A分離株が得られている。分離株を得ることは、インフルエンザウイルス、ポリオをはじめとするピコルナウイルス、ムンプスウイルスにおいてはとくに、薬剤感受性やワクチン株・野外株の鑑別等を行うために必要である。

同定型別手法をみると、2009年新型インフルエンザ発生前は分離株の中和、赤血球凝集抑制、免疫蛍光抗体法など免疫血清学的手法が主体でサーベイランスにおける遺伝子検出は分離が困難なカリシ(ノロ、サポ)、アストロ、レオウイルス(ロタを含む)や一部のアデノウイルスに限定していた。新型インフルエンザ海外発生時には、連日インフルエンザウイルスの遺伝子検出がウイルス研究室に課せられたが、他のウイルスにおいて遺伝子検出・解析技術の蓄積があったため円滑に対応することができた。さらに五類小児科定点報告対象から2008年より五類全数報告対象に変更された麻疹・風しんについて、わが国における排除達成及び維持の科学的根拠として病原体診断及び遺伝子型情報収集が必要となったが、遺伝子検出・シーケンス並びに分子疫学解析の導入時に技術レベルの問題はなかった。さらにウイルス分離により得られたMeV, RUBV株は、国立感染症研究所とも共有の上活用されている。

図3右端に「合計」として示した年別検査陽性率(平均55.6%)の標準偏差は4.13と

小さく、インフルエンザを除く患者総数(図2)の変動も小さいことから、毎年総量ベースでは一定の病原体情報発信が期待できるものであった。診断名別にみると、毎年の流行を反映して一部の項目では陽性率及び陽性数に相当の変動が認められた。下気道炎の陽性率上昇の要因には、2010年以降RSV, HPIV, HMPV 検査体制の強化を図ったことがあげられる。一方不明発疹症の陽性率は期間中に顕著に低下したが、2010年以降は全身性ウイルス発疹症の一部が麻疹・風疹の要鑑別事例として提出されるようになったためと思われる。

感染性胃腸炎や手足口病等のサーベイランスより発展的に派生した成果として、ポリオウイルスワクチン株の検出や、不明発疹症及び麻疹・風疹疑い検体からの多様なエンテロウイルス・アデノウイルス検出があげられる。ポリオ生ワクチンはわが国では不活化ワクチンに取って代わられたが、中国はじめ人的交流の盛んな国の一部では未だ使用されているほか、野生株ポリオは未だ根絶されていない。後者の麻疹・風疹疑い検体から発疹症の原因ウイルスを検出することは、除外診断を補強し排除の前提となるサーベイランスの強化に直結する。さらに分離株の解析等、関連する調査研究は、新たなウイルス発見の可能性をはじめ職員のモチベーション維持に有用なばかりでなく、新興・再興感染症を含むウイルス検査対応能力の維持向上に不可欠と考える。

#### E. 結論

2009～2014年の間、インフルエンザを除く病原体サーベイランス対象となった患者は、各年の流行を反映して診断名別には変動がみられるが、年間総数及び陽性率の変

動は小さく、毎年一定の病原体情報確保が期待できるものであった。現行のウイルス病原体サーベイランスと派生する調査研究は、感染症の発生動向把握に重要な病原体情報を得る手段であるとともに予防接種モニタリング及び一部のウイルス侵淫状況に関する貴重な情報源となっている。さらに地衛研にとって当該調査で検出される種々のウイルスの同定型別及び発展的調査研究の実施は関連分野の進歩に敏感な職場環境につながり、結果として新型インフルエンザ等新興感染症や麻疹集団発生など健康危機対応時における病原体検査並びに分子疫学解析体制の速やかな立上げを可能にする原動力と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

論文発表 なし

学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)なし

図1 2009年から2014年における臨床診断名別病原体検索患者数（愛知県衛生研究所）

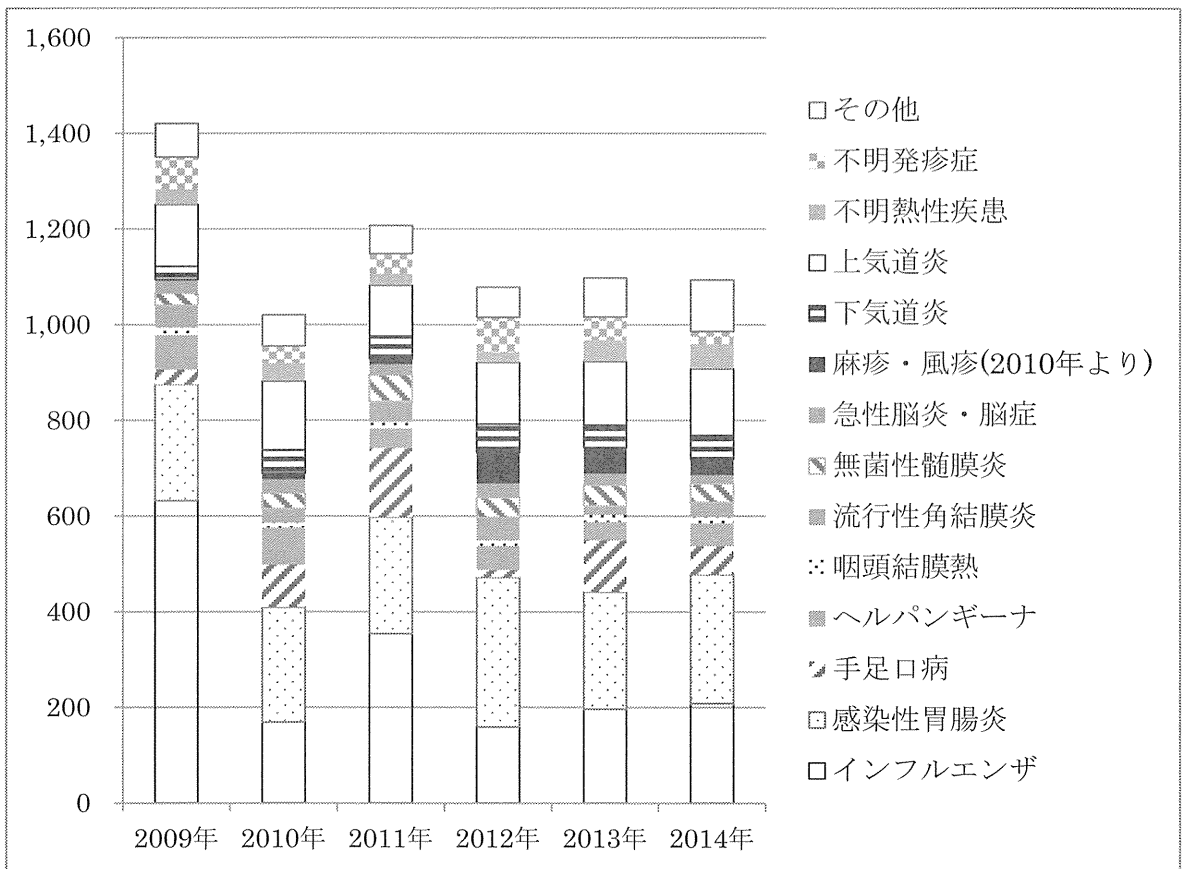


図2 2009年から2014年における臨床診断名別病原体検索患者数（インフルエンザ以外）

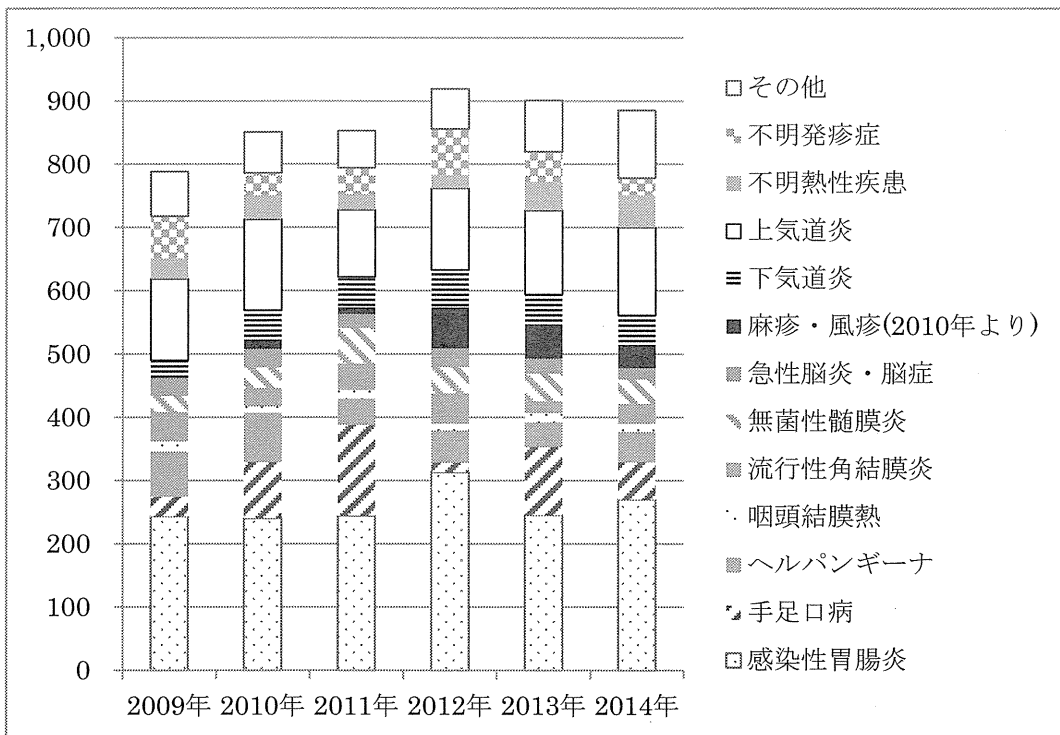




図3 2009年から2014年における臨床診断名別検査陽性率の推移

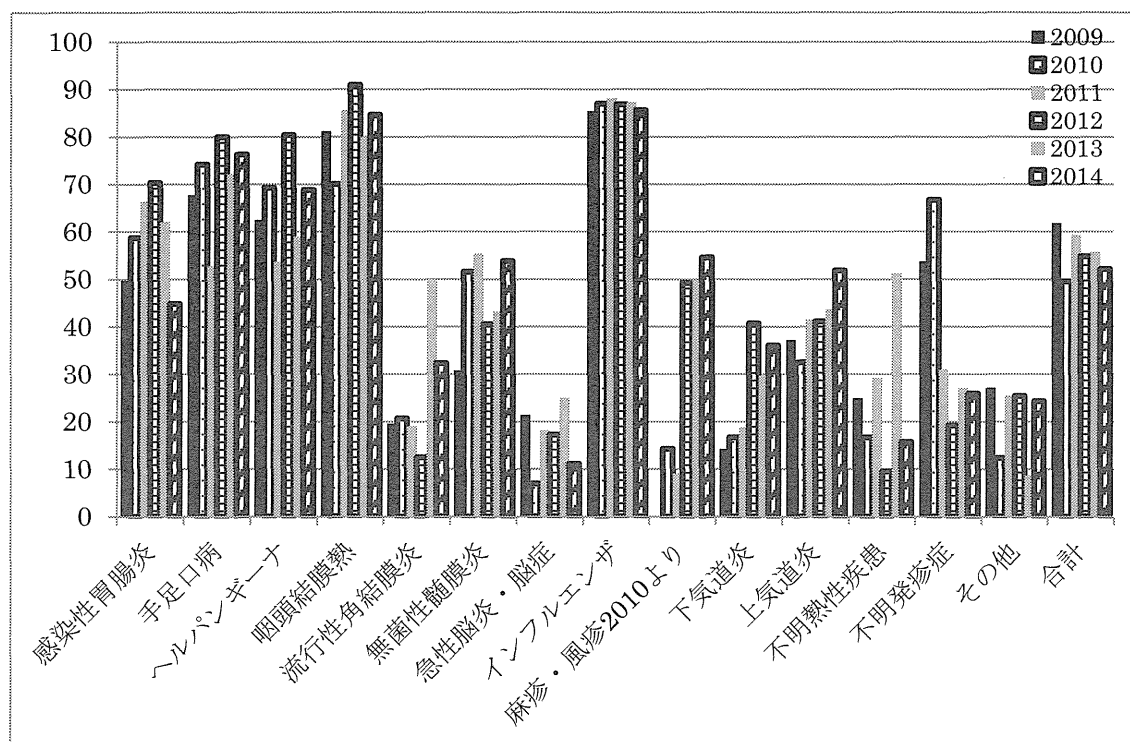


表1 年間に1件以上分離若しくは検出されたウイルス

年	ウイルス
2009	PV-1, PV-2, PV-3, CV-A2, CV-A6, CV-A10, CV-A16, EV-71, CV-A9, CV-B3, CV-B4, CV-B5, E-3, E-9, E-11, E-18, E-30, HPeV-1, HPeV-4, Flu AH1pdm09, Flu AH1, Flu AH3, Flu B, RV A-G1, RV A-G3, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-5, Ad-8, Ad-11, Ad-31, Ad-41, Ad-54
2010	PV-1, PV-2, PV-3, CV-A2, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A10, CV-A16, EV-71, CV-A9, CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, E-3, E-6, E-25, E-30, HPeV-1, HPeV-3, Flu AH1pdm09, Flu AH3, Flu B, HMPV, RSV, MeV, RV A-G1, RV A-G2, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-4, Ad-5, Ad-6, Ad-7, Ad-37, Ad-41, Ad-D, HSV-1, B19V
2011	PV-1, PV-2, PV-3, CV-A2, CV-A4, CV-A6, CV-A10, CV-A16, EV-71, CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, E-6, E-7, E-11, HPeV-3, FluAH1pdm09, FluAH3, FluB, MuV, MeV, RSV, HMPV, Reo-2, RV-A G1, RV-A G2, RV-A G3, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-5, Ad-41, Ad-53, Ad-54, HSV-1
2012	PV-1, PV-2, PV-3, CV-A2, CV-A4, CV-A6, CV-A8, CV-A10, CV-A16, EV-71, CV-A9, CV-B3, CV-B4, CV-B5, E-3, E-6, E-7, E-17, HRV, HPeV-1, HAV, FluAH1pdm09, FluAH3, FluB, MeV, RSV, HPIV-2, HPIV-3, HMPV, RUBV, Rota A UT, Rota A G1, Rota A G2, Rota A G3, Rota A G9, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-4, Ad-5, Ad-6, Ad-31, Ad-41, Ad-56, B19V
2013	CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A8, CV-A16, EV-71, CV-A9, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, E-3, E-6, E-9, E-11, E-12, E-17, E-18, E-25, E-30, HPeV-1, Flu AH1pdm09, Flu AH3, Flu B, MeV, RSV, HPIV-2, HPIV-3, HMPV, RUBV, Reo-2, RV-A UT, RV-A G1, RV-A G3, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-4, Ad-5, Ad-41, B19V, HSV-1
2014	CV-A2, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A10, CV-A16, EV-71, CV-A9, CV-B2, CV-B4, CV-B5, E-6, E-11, E-25, E-30, HRV, HPeV-1, HPeV-3, Flu AH1pdm09, Flu AH3, Flu B, MuV, MeV, RSV, HMPV, HPIV-2, RUBV, Reo-2, RV-A G1, RV-A G2, RV-A G9, NV-GI, NV-GII, SV, AstV, Ad-1, Ad-2, Ad-3, Ad-4, Ad-5, Ad-8, Ad-41, Ad-54, HSV-1

(アルファベット順ウイルスの略称) Ad : アデノウイルス, AstV : アストロウイルス, B19V : ヒトパルボウイルスB19, CV : コクサッキーウイルス, E : エコーウイルス, EV-71 : エンテロウイルス71型, Flu AH1 : Aソ連型インフルエンザウイルス, Flu AH1pdm09 : インフルエンザウイルスA(H1)2009年型, Flu AH3 : A香港型インフルエンザウイルス, Flu B : B型インフルエンザウイルス, HAV : A型肝炎ウイルス, HMPV : ヒトメタニューモウイルス, HPeV : ヒトパレコウイルス, HPIV-2 : ヒトパラインフルエンザウイルス2型, HRV : ヒトライノウイルス, HSV-1 : 単純ヘルペスウイルス1型, MeV : 麻疹ウイルス, MuV : ムンプスウイルス, NV : ノロウイルス, PV : ポリオウイルス(全てワクチン株), Reo-2 : レオウイルス2型, RSV : RSウイルス, RUBV : 風疹ウイルス, RV-A : ロタウイルスA, SV : サポウイルス

表2-1 感染性胃腸炎患者から検出された主なウイルスの推移

年	2009	2010	2011	2012	2013	2014
患者数	243	338	227	313	277	270
PV-1, 2, 3(合計)	10	6	11	9		
RV A	19	14	62	73	75	7
NV-GI	1	6	2	2	1	2
NV-GII	70	141	71	136	82	85
SV	1	2	9	10	9	4
AstV	1	13	9	6	3	1
Ad-41	11	20	4	10	13	13
HPeV-1	3	1		3		1

表2-2 無菌性髄膜炎患者から検出された主なウイルスの推移

年	2009	2010	2011	2012	2013	2014
患者数	26	38	59	42	47	39
CV-A4				1		
CV-A16		2				
EV-71		5			9	
CV-A9	2			1		
CV-B1			10			
CV-B2			2			1
CV-B3	2				2	
CV-B4	4	6		3	1	
CV-B5		1	15	3	1	1
E-3				1		
E-6		2	1	4	2	
E-7				3		
E-11			2			15
E-17				1	1	
E-18					2	
E-25		1				
E-30		1			1	2
HPeV-1		1		1		
MuV			1			1

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」  
分担研究報告書

## 病原体発生動向調査に関する疫学的検討

研究分担者 三崎貴子 川崎市健康安全研究所

研究協力者 丸山 絢 川崎市健康安全研究所

### 研究要旨

平成 26 年（2014 年）11 月 14 日に「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の一部を改正する法律」（以下、改正法）が成立し、新たな感染症の二類感染症への追加として、政令により暫定的に二類感染症として扱われている鳥インフルエンザ（H7N9）及び中東呼吸器症候群（MERS）が二類感染症に位置付けられたとともに、感染症に関する情報の収集体制の強化として、知事（緊急時は厚労大臣）は、全ての感染症の患者等に対し検体の採取等に応じること、また、医療機関等に対し保有する検体を提出すること等を要請できる旨の規定を整備することとなった。これに伴い、感染症発生動向調査事業実施要綱（以下、要綱）改正の必要が生じたため、研究班が開催する疫学小班会議及びウイルス・細菌小班会議に出席し、情報を収集するとともに地方衛生研究所としての意見の集約を行った。さらに、同改正法の内容を反映させた上で、全国的な感染症の発生・流行状況を正確に反映し、かつ信頼性の高い情報の収集が可能となり得る要綱の改正案に関する提言をまとめた。

情報収集及び意見交換を行った研究班会議は、全体会議 2 回、疫学小班会議 2 回及びウイルス小班会議 1 回であった。感染症発生動向調査事業に関して改訂が必要な事項としては、以下の 5 項目が挙げられた。

1. 趣旨及び目的の明確化
2. 現状に合わせた具体的な実施方法の見直し
3. 感染症情報センターの位置づけ
4. 感染症発生動向調査企画委員会の目的の明確化と現状に合わせた名称の変更
5. 精度管理を担うレファレンスセンター（もしくは精度管理センター）の新規設置

感染症発生動向調査事業の目的が、感染症に対する有効かつ確な診断・治療・予防に係る対策を図り、多様な感染症の発生及びまん延の防止であることを明記し、サーベイランスにおける本庁及び保健所の役割を明確化した。また、地方感染症情報センターは、原則として地方衛生研究所の中に設置することとし、サーベイランス事業の実施に関する具体的方法の記載と病原体検査指針に基づく検査の実施が必要である旨記載した。さらに、従来「感染症発生動向調査企画委員会」と記載されていた委員会については名称を「感染症発生動向調査委員会」に変更するとともに、その役割を明確にした。病原体検査に関する自治体ごとの格差を是正することは、検査の質を担保する上での喫緊の課題であり、精度管理を担う機関の設置が必要であると考え、新たに記載に加えた。

### A. 研究目的

我が国の感染症発生動向調査事業は昭和

56 年（1981 年）7 月から 18 疾病を対象に  
開始され、昭和 62 年（1987 年）1 月から

はコンピュータを用いたオンラインシステムにおいて 27 疾病を対象に拡大した。平成 10 年（1998 年）9 月に「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」が成立（平成 11 年（1999 年）4 月から施行）し、感染症発生動向調査は同法第三章（第 12 条～第 16 条）による施策として位置づけられた。さらに、平成 26 年（2014 年）11 月 14 日に「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の一部を改正する法律」（以下、改正法）が成立し、1. 新たな感染症の二類感染症への追加として、政令により暫定的に二類感染症として扱われている鳥インフルエンザ（H7N9）及び中東呼吸器症候群（MERS）について、二類感染症に位置付けた（1. は公布の日から起算して二月を経過した日（その他の規定は H28.4.1 等））。また、2. 感染症に関する情報の収集体制の強化として、知事（緊急時は厚労大臣）は、全ての感染症の患者等に対し検体の採取等に応じること、また、医療機関等に対し保有する検体を提出すること等を要請できる旨の規定を整備し、病原体検索を円滑に実施し、予防と対策に迅速に結びつけることができることとなった。これに伴い、感染症法施行規則（省令）や感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針の策定、感染症発生動向調査事業実施要綱（以下、要綱）の改正及び病原体検出指針の策定が必要となった。

## B. 研究方法

本分担研究においては、要綱の改正に向けて、研究班が開催する疫学小班会議及びウイルス・細菌小班会議に出席し、情報を収集するとともに地方衛生研究所としての意見の集約を行う。さらに、改正法の内容を反映させた上で、全国的な感染症の発生・流行状況を正確に反映し、かつ信頼性の高い情報の収集が可能となり得る要綱の

改正案に関する提言をまとめる。

なお、感染症発生動向調査と感染症サーベイランスは、同義的に使用することとする。

## （倫理面への配慮）

本研究では、個人に係る情報の収集及び個人が不利益を被る恐れのある介入は行わないため、個人が特定されることはない。

研究計画の内容等は企業又は団体と直接の関係はなく、開示すべき利益相反はない。

## C. 研究結果

情報収集及び意見交換を実施した研究班会議は以下の通りである。

- 平成 26 年 10 月 27 日 研究班全体会議
- 平成 26 年 11 月 6 日 疫学小班会議
- 平成 26 年 11 月 13 日 ウイルス・細菌小班会議
- 平成 26 年 12 月 16 日 疫学小班会議
- 平成 27 年 1 月 8 日 研究班全体会議

感染症発生動向調査事業実施要綱に関して改訂が必要な事項として、以下の 5 項目が挙げられた。

1. 趣旨及び目的の明確化
2. 現状に合わせた具体的な実施方法の見直し
3. 感染症情報センターの位置づけ
4. 感染症発生動向調査企画委員会の目的の明確化と現状に合わせた名称の変更
5. 精度管理を担うレファレンスセンター（もしくは精度管理センター）の新規設置

上記 5 項目に関して、情報収集及び意見交換の結果を反映させた上で、要綱の改正案に関する提言をまとめた。

自治体におけるインフルエンザ検査検体