

201420045A

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
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

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26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27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

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26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27(2015)年3月

平成 26 年度新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

「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 26 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 真菌部）

- II. 分担研究報告書
 - 1. 真菌検査標準作業手順書（SOP）の作成・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 1
研究代表者：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・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 7
研究分担者：大西 真（国立感染症研究所 細菌第一部）

 - 3. 地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集・・・・・・・・ 3 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・・・・・・・・ 4 1
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・・・・・・・・ 4 7
研究分担者：野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）

 - 6. クロストリジウム属菌およびコリネバクテリウム属菌による
感染症のラボネットワークについて・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 1
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・・・・・・・・ 5 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 2014 年活動について
リケッチア Multiplex Realtime PCR の多施設間相互検証・・・・・・・・ 6 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	69
	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	75
	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.	麻疹検査診断法（RT-PCR 法）の外部精度管理（EQA）法の検討	85
	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	89
	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	93
	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 26 年度活動報告 狂犬病の検査ネットワーク構築と検査系の検証および標準化	97
	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	105
	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.	アデノウイルスレファレンス活動改善のためのアンケート	107
	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	113

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科学部）
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先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、基盤となる全国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性が生じた場合、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

■病原体検査標準作業手順書（SOP）の作成：真菌検査についてのSOPを作成した。作成したSOPに基づき検査を行い、SOPの内容について検証を行い、必要に応じて改訂を行った。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：薬剤耐性レファレンスセンター（仮称）の設置に向けた活動を行った。

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

■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：ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は2例あり、ウエスタンプロットによる血清検査を行った。クドア感染症について地研・国研・厚労省の担当者間で情報交換を行った。肺吸虫症を対象とするイノシシ肉の検査に鹿児島県環境保健センターと取り組んだ。

■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（CDI）の細菌学的検査に関する研修会を行った。*Corynebacterium*属菌感染症およびCDIによるアウトブレイク事例について調査した。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：ジカウイルスリアルタイムRT-PCR法を評価し、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：全国共通となるmultiplex realtime PCR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(下痢症ウイルス)：ロ

タウイルス検出マニュアルを改訂した。

■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ワークショップを実施した。

■百日咳:Prn 欠損株の流行調査およびマクロライド耐性菌の調査を行った。

■抗酸菌:外部精度評価への参加施設を募集し、参加施設への検体送付および検査成績のまとめを行った。

■動物由来感染症:狂犬病の検査手法の検証と標準化を行った。17 地衛研にて RT-PCR ブラインドテストを行い、直接蛍光抗体法の陽性対照スライドを配布した。

■HIV 関連感染症:衛生微生物技術協議会第 35 回研究会(東京)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。

■アデノウイルス:アデノウイルス検査に関するアンケート調査を行った。

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:PCR 法による型別法を検討した。

■ジフテリア・ボツリヌス:診断用ボツリヌス抗毒素の標準化作業を開始した。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス:IgM 抗体捕捉 ELISA 法を構築し、ジカウイルスとの交差反応性について検討した。日本脳炎ウイルスリアルタイム PCR 系の設定を見直した。デング熱患者血清を用いて非特異反応の有無を検討した。

■リケッチア:オリエンチアおよびリケッチアの multiplex realtime PCR の特異性、汎用性、反応性を検討した。

■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 バリアントの VLP 特異的モノクローナル抗体を作製した。ノロウイルスの新規 genotyping 法の普及活動を行った。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:麻疹ウイルスの RNA 検体の安定な保存法および送付法について検討した。

■百日咳:*B. holmesii* の LAMP 法をキット化した。百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii*、*M. pneumoniae* を標的とする 4Plex リアルタイム PCR は一部改良を加え、プライマーとプローブ濃度を至適化した。

C. 研究結果

■病原体検査 SOP の作成:遺伝子検査を中心とした真菌検査を実施する上での統一ルールを記載した SOP を作成した。国立感染症研究所真菌部内での意見を集約し、改訂を重ねた。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集:6 カ所の地方衛生研究所を各支部の薬剤耐性レファレンスセンター(仮称)とした。CRE の検査のための研修を 19 カ所の地方衛生研究所に対して行った。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHEC のサーベイランス:2014 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 2767 株であった。

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(2013-2014 年用)10 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

における臨床分離株の収集状況：今年度 37 株が追加された。2014 年 3 月末現在で、合計 316 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 3 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2013 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 951 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：2013 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 50 症例あった。最も多く分離された型は TB3264 型で全体の 30%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 50 例中、emm89 型(M 型別不能)が 15 例(30%)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：2013 年に分離された *C. jejuni* 337 株を Lior 法によって、336 株について、Penner 法で型別を行い、それぞれの検査法の特性が判明した。

2. PCR 法による型別法の検討：4 回の PCR を行うことで 10 種血清群の型別が可能となった。

2. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2013 年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株(NA、NFLX、OFLX、CPFX)の割合は、43.6%、*C. coli* では、62.5%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 1.2%、*C. coli* では 18.8%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. エキノコックス症：ヒトの疑診例 2 例は抗体検査陽性で、多包性エキノコックス症と診断され、いずれも北海道との関連が認

められた

2. クドア感染症：厚労省担当者との情報交換により、届出は従来通り、患者の喫食残品におけるクドアの存在を顕微鏡下に確認することに基づく確認された。

3. 肺吸虫症：検査したイノシシ 7 頭のうち、3 頭から肺吸虫の幼若虫が検出された。

■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。それぞれ、4 および 16 件の参加があった。

2. *Corynebacterium* 属菌感染症および CDI によるアウトブレイク事例の調査：検査室に対して指導を行った。

3. 診断用ボツリヌス抗毒素の標準化：D 型および G 型の抗毒素の標準化は終了し、C 型については検討中である。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱患者をウイルス学的に確定し、抗ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築した。デング熱患者血清との交差反応をわずかに示す患者血清が存在した。検出用リアルタイム PCR 法のプロトコールを作成し、希望する地方衛生研究所には遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

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 (rtRT-PCR) は遺伝子 1 型、3 型に対する型別検出系は確立され、十分な感度と特異性を有していた。しかし、E 領域に設定された 1-3 型共通検出系は非特異反応を来すことが多かった。そのため NS5 領域に設定し、日脳疑い患者血清を用いて評価を継続した。

■リケッチア

1. multiplex realtime PCR：特異性と汎用性、臨床検体に対する有効性を検証した結

果、標準血清型のオリエンチアおよび全ての紅斑熱群リケッチアが検出可能であった。

2. 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。研究会等に参加、発表を行うことにより、担当者自身のレベルアップを志すとともに、衛研関係者以外のリケッチア症関連の研究者や医師との連携を積極的にすすめ、より深い情報の蓄積を継続している。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)

1. ノロウイルス：GII.4 2004 (Narita104)、2006a (Saga-1), 2006b (Aomori), 2008a(Sakai), 2012 変異株(NI, LM)のリコンビナントバキュロウイルスから、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作出およびモノクローナル抗体の作出に成功した。新規 genotyping 法の普及活動として IASR8 月号にノロウイルスの遺伝子型 2014 年度版を掲載した。

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、RNA-PAGE パターンフィッティング法と命名した手法を開発した。ロタウイルス検出マニュアルを作成し、IASR にロタウイルス特集を組み、出版した。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：8名の参加者と3名の講師でワークショップを開催した。内部精度管理試験として、細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験を行い、グループ討論により SOP ひな形を作成した。SOP の項目には基準がないため、今後検討が必要である。

■麻疹・風疹

1.EQA のデザインの検討：感度、特異度、ならびに遺伝子解析技術に対する EQA の方

法を検討した。

2. RNA 検体の送付法の検討：分解されやすい RNA 検体を劣化なく、手間、コストを最小にして送付する方法として、FTA カードを採用した。濃度管理が求められる標準 RNA (合成 RNA) の送付には RNastable (Biomatrix) を採用した。

■百日咳

1. レファレンス関係：レファレンスセンター以外の地衛研 6 施設へ *B. holmesii*-LAMP キット 1 件、4Plex リアルタイム PCR キット 8 件、陽性コントロール DNA 1 件を配布した。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株 (260 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。

3. マクロライド耐性菌の調査：2013-14 年の国内臨床分離株 (26 株) の EM に対する MIC を <10 µg/mL と判定した。

■抗酸菌：

1. 外部精度評価への参加希望施設の調査：54 施設が参加を希望した。3 種類の EQA 用 DNA を送付し、約 2 ヶ月半で型別結果の報告を受け取った。

2. VNTR 分析に利用しているローカセット・PCR 産物のサイズ測定方法：各施設の分析対象ローサイおよび分析方法に関する回答が得られ、分析法としてはアガロースゲル電気泳動が 37 施設と最も多かった。

3. 外部精度管理の正答率の比較：ほとんどの分析法で 95%以上の正答率であり、分析ローカセットでも 94-100%の正答率であった。

■動物由来感染症：狂犬病ウイルス RT-PCR ブラインドテストの結果、数サンプルを除いて、感染研と同じ結果が得られた。

■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。特に、年齢構成について、新規報告数では 30 歳代後半が最多で、年齢人口 10 万人あたりの HIV 患者数では 20 歳代後半が最も高かった。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、検査技術の維持・向上に努めた。

■アデノウイルス：77 箇所の地方衛生研究所に対してアンケート調査を行い、100%の回収率を得ることができ、84%がアデノウイルスの分離が行われていた。PCR 型別検査は 75%で実施されていた。情報発信の強化に関する意見が多かった。

D. 考察

■病原体検査 SOP の作成：作成した真菌検査用 SOP は検査関係者全員が閲覧可能で、各自の理解が前提とされており、定期的に見直して改訂する必要がある。病原体検査における品質・精度の向上のためにも SOP の作成は基本である。さらに、詳細な検査項目については、現行では付表として作成している。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され検査の精度管理基盤となることを期待する。

■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。臨床検体からの菌の分離の重要性。
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：近年、カンピロバクターの血清型別率が低下しているため、PCR による血清型別の検討を行った。標準株での型別は一部で可能になり、今後、実用性に対する評価を行う予定である。遺伝子および抗原成分の両側面から検討を行い、型別率を上げていくことが重要である。

■寄生虫：エキノコックス症流行地の拡大が懸念されることから、新たな監視体制の構築が必要となっている。食品寄生虫に関する地研とのラボネットワークの強化も、感染症・食中毒の枠を超えて、継続的に取り組むべき課題である。そのために情報交換と相互研修がまず重要であると考えられた。

■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、地方衛生研究所がその重要性を認識しているため、検査の技術移転をすることにより、地方自治体における検査体制は整備されると考えられる。

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。実際、自治体によって対応は多様である。

3. *Corynebacterium* 属菌：今回アウトブレイク事例を報告したが、地方衛生研究所においても、提出された菌株や検体の検査を行うだけでなく、細菌学的検査に関して医療機関に指導する能力が求められると考えられた。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱はデング熱やチクングニア熱ほどの世界的流行拡大傾向はみられていない。しかし、臨床症状がデング

熱に似ている上に、抗原性もデングウイルスと近似である。したがってデング熱流行地域では流行があっても見過ごされている可能性がある。デング熱同様感染者により日本国内に持ち込まれ、国内流行が発生する可能性があり、デング熱と鑑別できる体制を整えておく必要がある。

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。急性脳炎患者の髄液を用いて評価した結果、非特異的な反応を認めず、日本脳炎ウイルス遺伝子検出検査として有用であると考えられる。

■リケッチア：新規診断法等の相互評価（標準化）を目的に、つつが虫病と日本紅斑熱を同時に検討する multiplex real time PCR について多施設間での評価検討を行った。昨今、多様な感染症検査に対応を求められる衛研においては、単発症例として検査依頼が多いリケッチア症の検査をできるだけ負担を少なくかつ確実に診断していく上で、有効な検査系である。レファレンスセンターを中心とした地域内、レファレンスセンター同士を結び付けた地域間の全国的なネットワークを維持する事が、決して少なくない、また対応の遅れによりいまだ死者をだすリケッチア症対策の基盤となる事が期待できる。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：初年度行ったアンケート調査の結果を踏まえて、検査に関するワークショップを開催した。ウイルス分離における細胞の維持管理の重要性を認識する機会となっている。参加者が問題を発見し、グループディスカッションで討議をおこなう参加型研修コースは今後も実施につき検討する必要がある。

ある。

■麻疹・風疹：EQA の効果的な方法について今回のデザインに従って試行し、実施施設に過度に負担のかからない、効果的な方法を検討していく。

■百日咳：平成 26 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キット ver3.2 を配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。レファレンスセンター内における遺伝子検査の整備が完了したと言える。今後は検査キットの更新・補充への対応が必要課題となる。Prn 欠損株の流行調査により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少していることが新たに判明した。継続した監視が必要である。マクロライド耐性菌は検出されなかったが、今後は他国から流入する可能性があるため、臨床分離株の収集と薬剤耐性の定期的なモニタリングは重要な検討課題となる。

■抗酸菌：全国 54 の施設で行われている VNTR 型別法に関する初めての外部精度評価を行った。正確に分析できる分析システムやコピー数を算出するため、方法及び正答率が低いローカスのプライマーの変更等が必要と考えられる。

■動物由来感染症：狂犬病の遺伝子検査系を地衛研で簡便かつ容易に行うために、地衛研が RT-PCR 用に通常使用している機器と試薬でブラインドテストを行ったところ、参加した地衛研の全てで RT-PCR が可能であることが明らかとなった。各地衛研の異なる機器等条件下での検査成績や検出限界等の知見を共有することは、より機能的なラボネットワークの強化につながるものと考えられた。

■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。なお、年齢構成について得られた情報から、若年層の HIV 罹患率の高さには、留意が必要と考えられた。

■アデノウイルス：現在、理論的には完全長の配列決定が簡単に出来る時代である。しかし、現実的には通常のルーチン検査でアデノウイルスに適用するのは、経済的に実施困難である。引き続き、簡易・安価かつ正確でコンタミリスクの少ない検査法を開発する必要がある。

E. 結論

■病原体検査 SOP の作成：真菌検査のための標準作業手順書 (SOP) を作成した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：今回、新たな薬剤耐性菌に対する検査対応が求められるようになったことから、レファレンスセンターを設置し研修をおこない、全国における検査体制の強化が図られた。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：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、改訂等をすすめることが重要である。また、安定的なネットワーク形成には、各施設において実施可能であり、技術的継承が用意であることも必要である。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もとめられ、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 システムが応用可能か更なる検討が必要である。

■カンピロバクター：2013 年にヒトから分

離された *C. jejuni* 337 株について血清型分類を実施したところ、検査法の特徴が判明した。PCR による型別法は引き続き検討が必要である。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言えず、地研や保健所、医療機関等への情報提供を行って体制整備を図る必要がある。また本症伝播に重要な役割を果たすと考えられるイヌなどの終宿主動物に関しては、これを対象とした簡易な検査方法の開発と普及が必要である。さらに食品寄生虫に関する地研とのラボネットワークの強化も、感染症・食中毒の枠を超えて、継続的に取り組むべき課題である。情報交換と相互研修がまず重要である。

■ジフテリア・ボツリヌス：地方衛生研究所において、提出された病原体や臨床検体において検査を行うだけではなく、その感染症を疾患として理解し、保健所、医療機関とともに対応にあたっていく姿勢が求められていると考えられた。また医療関連感染、特にアウトブレイク対応では、医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所、さらに、(特に検査を外部委託している場合は) 民間検査センターがネットワークを結び、対処することが重要と考えられた。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：ポリネシアなど太平洋島嶼国で流行しているジカ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と情報共有した。3 例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 系を改良した。

■リケッチア：多施設間で検討した multiplex real timePCR は、つつが虫病、

日本紅斑熱を含む輸入症例としても注すべき紅斑熱群リケッチアを効果的に検出可能であり、臨床検体を用いた従来法との比較評価でも良好な結果を示した。多様な感染症検査を行う地方研究所においては、負担の少ないスクリーニング系として有効な検査系である。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス): ノロウイルス・サポウイルスの糞便パネルを充実させ、バリエーションに対するモノクローナル抗体を作製した。マイクロチップ RNA-PAGE を用いたロタウイルス分子疫学手法にパターンフィッティングの手法を導入した。ロタウイルス検査マニュアルを完成させた。ノロウイルス・ロタウイルスの IASR 特集号を出版し、啓発活動を行った。

■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内部精度管理を制度として普及するために、①SOP の項目の検討、②教材、SOP 案の作成、③持続可能な実施スケジュールの検討、④標準参照品の供給体制の確立(含む保管)、⑤意義を理解する目的の精度管理導入研修、など検討してゆく必要性が認められた。

■麻疹・風疹: 麻疹検査診断法である nested RT-PCR 法の EQA 法を検討した。また、RNA 検体を送付方法について検討した。20 施設程度で EQA 法を試行し、問題点を検討していく。

■百日咳: 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。また、百日咳流行株の解析により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少傾向にあること、近年の臨床分離株はすべてマクロライド感性菌であることを確認した。

■抗酸菌: VNTR 型別法に関する外部精度評価を 54 施設に対して行い、全ローサイ完

全一致だったのは 36 施設だった。アガロースゲルを用いた電気泳動による分析が使用頻度・正答率ともに最も高かった。幾つかのローカスで正答率が低く、増幅効率が悪いことから使用プライマーの変更を含めて再検討する必要がある。

■動物由来感染症: 狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、狂犬病検査について遺伝子検査法の検証を RT-PCR ブラインドテストによって行い、抗原検査の標準化を行うために必要となる陽性対照スライドの作製と配布を行った。本ネットワークの構築によって感染研と地衛研の間でレファレンス機能向上に必要な検査手技と関連情報の共有および検討すべき課題等が明らかとなり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が期待された。

■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: アデノウイルスの地方衛生研究所を対象としたアンケートによりウイルス分離が多く実施されていることが明らかになった。レファレンス活動への要望として、精度管理や、マニュアルを分かりやすくしてほしいという意見が見られた。

F. 健康危険情報

■カンピロバクター: *C. jejuni* のキノロン系薬剤に対する耐性株の割合は 43.6%, *C. coli* では 62.5%で、非常に高い状態が続いている。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 1.2%, *C. coli* で 18.8%である。薬剤耐性菌の出現状況について注視する必要がある。

■ ジフテリア・ボツリヌス：
Corynebacterium 属菌は、無菌的検査材料から分離されても検体採取時あるいは培地への接種時のコンタミネーションと考えられがちであるため、今回経験した *Corynebacterium striatum* によるアウトブレイクは貴重な事例である。また、今回発生した *Clostridium difficile* 感染症事例は非常に大きなアウトブレイクであるにもかかわらず、医療機関や自治体（地方衛生研究所）における危機感が低かったことは大きな問題と考えられた。

■ 抗酸菌：結核菌株の取扱については、感染症法の基準に適合した実験室内で実施した。

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（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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

真菌検査標準作業手順書（SOP）の作成

研究代表者	宮崎義継	国立感染症研究所	真菌部
研究協力者	梅山 隆	国立感染症研究所	真菌部
	金子幸弘	大阪市立大学大学院	医学研究科
	大野秀明	埼玉医科大学	総合医療センター
	星野泰隆	国立感染症研究所	真菌部
	田辺公一	国立感染症研究所	真菌部
	山越 智	国立感染症研究所	真菌部
	名木 稔	国立感染症研究所	真菌部
	壇辻百合香	国立感染症研究所	真菌部
	中山靖子	国立感染症研究所	真菌部
	浦井 誠	国立感染症研究所	真菌部
	金城雄樹	国立感染症研究所	真菌部
	上野圭吾	国立感染症研究所	真菌部

研究要旨 病原体検査において、品質・精度を維持・向上させるため標準作業手順書（Standard Operating Procedure, SOP）の作成とSOPに基づいた検査の施行が求められる。本研究では、国立感染症研究所真菌部における真菌検査のためのSOPを作成しSOPに準じて検査を試行した。定期的に改訂は必要ではあるが、他の病原体に関する検査のSOPを作成する際に本報告書のSOPが参考になると考える。

A. 研究目的

感染症法に基づく病原体の行政検査は、ほとんどの自治体において地方衛生研究所（以下、地衛研）が行っている。対象となる病原体の種類は、ウイルス・細菌・真菌・原虫・寄生虫と多種に及び、それぞれの病原体に対応して、高度な検査技術によって同定される必要がある。近年、様々な事情により、地衛研の検査基盤の継承が困難になってきており、検査品質・精度の維持・向上のためにも標準作業手順書（Standard Operating Procedure, SOP）の作成が必須となってきている。しかしながら、多くの地衛研においては感染症検査のSOPが作成されていないのが現状である。

本研究では、SOP作成の際に参考となるようなひな形として、真菌検査における

SOPを作成することを目的とする。

B. 研究方法

国立感染症研究所真菌部において、真菌検査についての標準作業手順書（SOP）を作成した。作成したSOPに基づき検査を行い、SOPの内容について検証を行い、必要に応じて改訂を行った。

C. 研究結果

遺伝子検査を中心とした真菌検査を実施する上での統一ルールを記載したSOPを作成した。国立感染症研究所真菌部内での意見を集約し、改訂を重ね、2015年1月現在試験運用中の標準作業手順書（SOP）の概要を附1に示す。

D. 考察

真菌症検査のための SOP および検証を行った。本研究で作成した SOP は検査の関係者全員が閲覧可能で、各自の理解が前提とされており、定期的に見直して改訂する必要がある。病原体検査における品質・精度の向上のためにも SOP の作成は基本である。さらに、詳細な検査項目については、現行では付表として作成している。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され検査の精度管理基盤となることを期待する。

E. 結論

真菌検査のための標準作業手順書 (SOP) を作成した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から. 小児科. 55(4):403-6, 2014 年.

学会発表

国際学会

該当なし

国内学会

1. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公徳, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 澁谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第 58 回日本医真

菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.

2. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 澁谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
3. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
4. 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
5. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10 月 29-31 日, 2014 年, 東京.
6. 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7 月 9-11 日, 2014 年, 仙台.

7. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会. 6月18-20日, 2014年, 博多.

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