

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコード No :
 版 No :
 承認者氏名 :

署名又は捺印

Standard Operating Procedure

標 題	臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査		
SOPN		版 No	0.01Gb
発効日	2015 年	月	日
作成者	真菌部	主任研究官 (署名)	2015 年 月 日
	真菌部	第1室 室長 (署名)	年 月 日
室 長	真菌部	第3室 室長 (署名)	年 月 日
	真菌部	部長 (署名)	年 月 日
承認者	真菌部	宮崎義継 (署名)	年 月 日

1. 目的

臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査の手順を記載する。

2. 適用範囲 (手順の対象)

保健所・地方衛生研究所から感染研に依頼される行政検査、および、医療機関や大学等から当部に依頼される依頼検査がある。適用範囲は以下の通りとする。

- 培養菌 (すでに培養された真菌) の同定・感受性検査
- 臨床検体 (未培養) からの真菌の分離および同定・感受性検査、および/または遺伝子検査
- 臨床検体の血清検査
- 固定された検体等からの遺伝子検査
- その他真菌および真菌症に関連した検査

なお、環境菌からの真菌分離については別途考慮する。

3. 実施場所

真菌部
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-042
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-043

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコード No :
 版 No :
 承認者氏名 :

署名又は捺印

Standard Operating Procedure

感染症研究所戸山庁舎 3階 03-045
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-046
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-049
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-051
 感染症研究所戸山庁舎 地下3階 BSL3 実験室第6室

4. 材料、機材・機器

4.1 作業環境

BSL1 および 2: 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-043 および 03-049 (共通部屋), 03-042 および 03-045 (RI)、03-046 (小部屋)、03-051 (糸状菌専用小部屋): 見取り図

BSL3 (またはその疑い): 感染症研究所戸山庁舎 地下3階 BSL3 実験室第6室

4.2 設備

安全キャビネット: 臨床検体処理用 1台 (03-043)、糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 6台 (03-043)

クリーンベンチ: PCR 反応液調製用 1台 (03-045)、DNA 添加用 1台 (03-043)

4.3 機器

サーマルサイクラー: 3台 (03-043)

培養器: 臨床検体専用 2台 (03-043)、糸状菌専用 3台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 2台 (03-046)

振盪培養器: 糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 3台 (03-043)

オートクレーブ: 培地作製用 1台 (03-043)、廃棄用 2台 (03-051, 03-046)

遠心器: 臨床検体処理用 1台 (03-043)、糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 1台 (03-046)

顕微鏡: 蛍光位相差微分干涉倒立型顕微鏡 1台 (03-051)、正立型顕微鏡 1台 (03-051)

実体顕微鏡: 1台 (03-051)

分光光度計 (single, plate 用)

スキャナー (03-051)

シクエンサー (03-043)

DNA 濃度測定器

4.4 材料

① 試薬類

滅菌蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水

PCR 試薬 (別紙)

培地用試薬 (別紙)

② ディスホ製品

a) チューブ類

DNA、RNA および病原体フリーの、0.2 ml PCR チューブ、1.5mL のエッペンチューブ

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコードNo :
 版No :
 承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

(10・50 本/袋)、15mL および 50mL (10・20 本/袋) の遠心管を用いる。常に、包装されたものを新規に開封し用いる。

b) ピベットチップ類

DNA、RNA および病原体フリーのピベットチップおよびピベットを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し用いる。

c) ホモジナイザー

1.5 ml および 15 ml のディスポーザブルホモジナイザーを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し、用いる。

d) 寒天培地塗布用コンラージ棒

検体の寒天培地への塗布用に L 字型ディスポーザブルスプレッダーを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し、用いる。

e) 個人防護具 (PPE)

グローブ、マスク、前掛け、キャップ

③ その他

ハサミ、ピンセット、カミソリ刃
 ピベットマン、ピベットコントローラー
 アルミホイル、サランラップ
 白衣、青衣、黄衣
 感受性検査用プレート、ディスポーザブルキュベット、ディスポーザブルリザーバー、
 ストレーナー

5. 実施手順

5.1 概要・原理

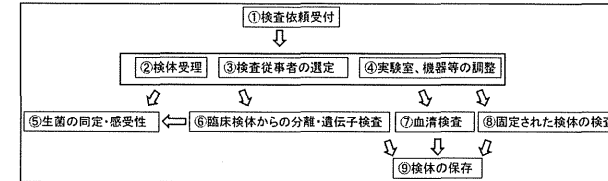
- 培養菌の同定は、生化学的性状、生理的・形態学的性状（培養条件、コロニー形態、顕微鏡下の形態）と遺伝子検査を組み合わせて行う。また、感受性検査は、国際的に推奨されている真菌感受性検査の標準法に準拠して行う。
- 臨床検体からの真菌の分離は、臨床背景を考慮し、適切な培養条件等を用いて行う。また、分離後の同定・感受性は、上記に準ずる。遺伝子検査は、必要に応じて考慮し、適切な方法を選択して行う。
- 臨床検体の血清検査は、各血清診断の定法に準じて行う。
- 固定材料からの遺伝子検査
- その他真菌および真菌症に関連した検査は、定法が定められないため、状況に応じて検討する。

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコードNo :
 版No :
 承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

5.2 手順



① 検査依頼受付

- 1) 電話、メール等で連絡。依頼の窓口は、真菌部長、担当室長とする（ただし、不在等の場合は、担当室主任研究官等が代行する）。また、部長以外に直接依頼があったものについては、部長へ報告、承認を経て正式な受諾とする。
- 2) 所定の依頼書（別紙 真菌検査依頼書、輸入真菌検査依頼書）への記載（依頼者）
- 3) 依頼書の受付（Fax、e-mail または郵送）
- 4) 必要に応じて、検体の梱包・送付法（持参、ゆうパック、他の宅配業者等の選択）について指示する。

② 検体受理

- 1) 検体の種類、数を確認し、依頼書と照合する。検査開始チェックシートに記入する。検体に検査固有の番号（真菌部 ID）を振り当てる。
- 2) また、検体受理を依頼者へ報告し、依頼書にチェックを入れる。

③ 検査従事者（検査担当者および検査実施者）の選定

- 1) 検査担当資格者（別途定める）の中から、真菌部長または担当室長（ただし、不在時は、担当室主任研究官等が代行）が検査担当者（以下担当者）の選定を行う。通常は 1 名を選定するが、2 名以上を選定した場合には、1 名を主担当者とし、その他を副担当者とする。
- 2) 検査実施資格者（別途定める）の中から、検査実施者（以下実施者）を選定する。実施者は、担当室長および担当者の依頼により、検査実務とその記録を行う。なお、担当者が実施者を兼ねてもよく、必要に応じて複数の実施者を選定することが出来る。

④ 実験室、機器等の調整

担当室長または担当者は、臨床診断、患者渡航歴等の情報から推定される真菌の BSL を確認し、実験室使用等の調整を行う。

⑤ 培養菌の同定・感受性検査

a) 糸状菌（疑い含む）

培養菌の取り扱いは、03-051 内にある安全キャビネット内で行う。

検体を、ディスポプラスティックループ（1 もしくは 10 μl サイズ）を用いて、平板培地（形態観察および継代）、斜面培地（感受性用）、液体培養（遺伝子検査および保存用）で培

		(検定等 SOP 様式 1)
標題	:	
SOP コード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- 養する。必要に応じてスライドカルチャーを行う。
- 遺伝子検査（別紙）を定法により行う。
- 感受性検査（別紙）を定法により行う。
- b) 酵母（疑い含む）
- 培養菌の取り扱いは、安全キャビネット 2 で行う。
- 検体を、平板培地（形態観察および継代、感受性）、液体培養（遺伝子検査および保存用）で培養する。
- 生化学的同定検査は必要に応じて考慮する。
- 遺伝子検査（別紙）を定法により行う。
- 感受性検査（別紙）を定法により行う。
- c) BSL3 真菌（疑い含む）
- 培養菌の取扱いは、B3Fにある BSL3 区域実験室細胞 6 内の安全キャビネット内で行う。*Coccidioides* 属が疑われる検体については、適宜アクリル性のキャビネットを安全キャビネット内に設置して取り扱う。
- 検体をスクリーキャップ付き斜面培地（ファルコンチューブなど）で継代培養する（遺伝子検査、保存用、形態観察（必要時））。培養は蓋付きプラスチック容器に収納のうえ培養器に入れる。培地等を一時保管する場合は、密封可能な容器、袋に入れ適切な場所に保管する。
- 形態観察（別紙）
- 遺伝子検査（別紙）
- d) 培養菌の保存
- 基本的には 20%グリセロール含有の液体培地（YPD、BHI など）の形態で、セラムチューブ 3-5 本分を保存する。表示は真菌部 ID もしくは菌株につけられた識別可能な固有の番号とし、保存の際にはリスト記入を行う（保管箱番号も）。保管庫として、03-051 実験室前の超低温フリーザー、地下 3 階フリーザー室の超低温フリーザーとし、常時施錠する。BSL3 真菌についてはリスト記入、ならびに細胞 6 室に備えてある台帳両方に記入し、細胞 6 室内の超低温フリーザーに保管し、常時施錠する。
- ⑥ 臨床検体からの分離・遺伝子検査
- a) 真菌の分離
- 未培養の臨床材料は、真菌の分離、遺伝子学的検査、血清検査のいずれか、または複数ないし全てを行うかどうかを考慮し、検体を分割する。
- 全検体（小さな組織片など分割できない場合）または検体の一部を、寒天培地または液体培地（無菌の液性検体など）に塗布・添加し、所定の培養器で、適切な温度下（25℃と 37℃など）で培養する。糸状菌が培養された場合には、ただちに糸状菌用の培養器に移して培養を継続する。2~8 週間培養して真菌の生育が認められない場合は、培養陰性と判定する（培養期間は、検体毎に考慮する）。
- 分離された後は、① 培養菌の同定・感受性検査に従って検査を行う。
- i. 組織検体
- 無菌検体は、無菌的（遺伝子検査を行う場合には DNA 等の汚染がないよう）に操作する。必要に応じて、細断・すりつぶし等の処理を行う。細断に際しては、滅菌したビ

		(検定等 SOP 様式 1)
標題	:	
SOP コード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- ンセット、ハサミあるいは使い捨てのメス等を用いる。
- 検体そのもの、あるいは細断・すりつぶした検体の全量または一部を寒天培地に塗布し、培養する。
- また、必要に応じて、DNA 抽出等を行う。
- ii. 血液検体
- 全血は、全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、血清分離等の調整を行い、血清検査や血清からの DNA 抽出等を行う。
 - 血清は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。DNA 抽出には、proteinase K による lysis 処理を行った後、westase 処理を行ったものを PCR の鋳型とする。
 - 血漿は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。DNA 抽出には、血清と同様の処理を行う。
- iii. 液性検体（血液以外の無菌検体）
- 必要に応じて、遠心分離し、沈み部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈みまたは上清からの DNA 抽出を行う。
- iv. 液性検体（上記以外の液性検体）
- 必要に応じて、遠心分離し、沈み部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地に塗布し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈みまたは上清からの DNA 抽出を行う。
- v. その他の検体
- 上記以外の検体については、用途に応じその都度考慮する。
- b) 遺伝子検査
- 上記の処理で得られた DNA 溶液に対し、定法により PCR を行う。必要に応じて、シークエンスを行い、BLAST 等を用いた塩基配列の相同性検索によって、菌種の同定を行う。遺伝子検査の詳細は、別途定める。
- ⑦ 血清検査
- 全血の場合は、血清を分離する。血清はそのまま用い、髄液は遠心後その上清を使用する。その他の体液は、必要に応じて考慮する。ELISA 法では必ず duplicate で測定する。
- i. クリプトコックス抗原
 - ii. ヒストプラズマ抗原および抗体
 - iii. コクシジオイデス抗原および抗体
 - iv. アスペルギルスガラクトマンナン抗原
 - v. アスペルギルス沈降抗体
- 検査陰性時の取り扱い
- 陽性対照、陰性対照が確実に指示書の範囲であることを確認できれば陰性と取り扱う。判定ボーダーライン上の場合は再検査とする。

(検定等 SOP 様式 1)

Standard Operating Procedure

標題	:	
SOP コード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

c) 臨床検体の保存

基本的に検査後に残った臨床検体は全て（遠心後の上清も）について適切な容器に収納の上、キャップをシールし保管する。検体にはすべて真菌部 ID もしくは検体 ID を表示する。複数個の容器がある場合は、ビニール袋などにひとまとめにし、袋にも ID を表示する。チューブ検体のみの場合は臨床検体箱へ収納し、その他は保存用フリーザーの収納棚（-30℃）に保管する。

⑧ 固定された検体の検査

ホルマリン固定された検体、パラフィン包埋された検体からの遺伝子検査等は、QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue kit もしくは Takarabio Extraction buffer for MightyAmp® FFPE などを用いて DNA を抽出し、遺伝子検査を行う。以降、⑥b) 遺伝子検査の項参照。

⑨ 検体の保存

送付されてきた検体は全量を検査に供する必要がある場合は、少なくとも検査結果が確定するまで適切に保管する（血清等の臨床検体で長期保管に耐えられる場合は専用の保管場所に保管する）。

6. 判定、報告および決裁

6.1 判定

検査結果は担当者がまず確認を行う。渡航歴など臨床情報がある場合は、その情報との大きな矛盾がないか（米国渡航歴のない患者からコクシジオイデス真菌が分離されるなど）などを総合的に判断する。部内の検査会議において、担当者、担当室長、部長および関係者が、検査結果の妥当性を吟味し、結果に疑問が挟まれる場合は、再試験等を考慮する。

矛盾がない場合や、再検査でも同じ結果が得られた場合には、検査を終了する。

6.2 報告

仮報告・中間報告は部長から検査依頼者宛に E メール等で行う（この際関係者にも転送する）。なお、部長からの指示があれば、仮報告・中間報告を担当室長または担当者等が代行できる。

最終検査結果が出次第、検査報告者（通常は担当者または主担当者を当てる）が送付検体解析報告書（以下報告書）をまとめる。

報告書の内容を、検査責任者（通常は部長とし、部長の指示により、担当室長等が代行できる）が確認する。報告書は、添付文書等の必要な書式とともに、部長が依頼者に送付する。

6.3 決裁

報告書を送付した後、担当室長が検査データベースに終了の入力を行う（担当室長の

(検定等 SOP 様式 1)

Standard Operating Procedure

標題	:	
SOP コード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

指示により担当者等が代行できる）。担当者が、検査終了チェックリストで、最終確認を行い、真菌検査結果記録書の作成を行う。全ての関連文書をファイルし、真菌検査結果記録書を表紙にして、検査実施者の確認を得た後、担当以外の職員、部長に提出し、それぞれの署名を得る。

7. 記録の保存・保管

検査リストの記録は別途行うこととし、個別の検査の記録について記載する。

1) 記録の様式

デジタル記録およびハード記録（紙媒体）とする。

2) 保存方法

デジタル記録は、保存用の共通コンピューター内のストレージに個別のフォルダーを作成し、保存する。共通コンピューターは、通常のリ線からは隔離する。共通コンピューターの不具合等に備え、外付けのストレージ装置でもバックアップをとっておく。また、必要に応じて、CD や DVD 等のメディアにも保存する。

3) ハード記録

記録書の生データと、一部の添付ファイルは印刷して、一つのファイルとして保存する。一つのファイルに、複数の検査記録を保存できる。ファイルは、施錠可能な棚に保管する。

4) 保存期間

最短 5 年保存するが、保存スペースが可能な限り長期に保存する。

8. 関連文書

教育訓練 SOP

9. その他

9.1 本検査にかかるミーティング

個別案件の協議、検査技術の向上、情報共有および収集、および教育訓練を目的として、真菌検査に関するミーティング（検査ミーティング）を週一回程度行う。

9.2 教育訓練

教育訓練の SOP は別途定めるが、概要は以下の通りである。

● 新規従事者教育訓練

新規従事者（検査担当者および検査実施者に従事するものを指す）の資格認定を目的として、実地訓練を行う。実地での見学および実技研修を行う。実技研修は、熟練した従事者と同伴で、SOP に準じた方法により、臨床検体の処理を行う。

● 継続者教育訓練

上記ミーティングおよび実地訓練を持って教育訓練とする。

9.3 機器点検、消耗品類の管理

定期的に機器および消耗品等の点検・管理を行う

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- 機器点検
- 消耗品等の在庫状況の確認、ロット管理

PCR 酵素消費期限およびロット、premix の調製年月日、RAPID の消費期限およびロット、血清診断試薬の消費期限およびロット)

9.4 代替手段、代替機器

検査が感染研内で不可能な状態となった場合には、その検査の必要性を判断した上で、依頼先はその旨を説明し、検査を延期または中止するか、他の代替施設を紹介し、再依頼する。

設備または機器が、故障またはメンテナンス等により使用不可能になった場合には、部内の代替設備または機器を用いて検査を行う。

試薬等が入手できない場合には、代替試薬を入手し、試行後に問題がなければ、変更後の試薬を用いる。継続的に元の試薬が入手できない場合には、SOP を変更する。

9.5 届け出関係

感染症法における報告義務、所内の届け出義務等に準じて行う。

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

付属文書

当該 SOP の手順の実施にあたって使用する

- 真菌検査依頼書
- 輸入真菌検査依頼書
- 真菌同定等検査依頼に関するお願い
- 真菌症関連の検体に関する運搬方法
- 検査記録書
- 解析結果報告書
- 見取り図
- 別紙および別表

別紙 1 遺伝子検査

別紙 2 感受性検査

別表 1 検査従事資格者リスト

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

改訂履歴一覧

検定等 SOP No	
検定等 SOP 標題	臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査

0.01D 版 β版として 2013 年 9 月 4 日作成、2013 年 10 月 1 日より仮実施

0.01E 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

0.01F 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

版	第 1 版		
作成者	部 第 室	年 月 日	
室 長	部 第 室	年 月 日	
承認者	部	年 月 日	
改訂内容理由			

版	第 2 版		
作成者	部 第 室	年 月 日	
室 長	部 第 室	年 月 日	
承認者	部	年 月 日	
改訂内容理由			

別紙 1

遺伝子検査

原理および概要

病原真菌の rRNA 遺伝子は、18S、5.8S、26S、5S の 4 つのサブユニットから構成され、これらのサブユニットの長さは菌種によらず、ほぼ同じである。18S と 26S の間にある internal transcribed spacer (ITS) および 26S と 18S の間にある intergenic spacer (IGS) 領域は、菌種により長さが著しく異なることが知られている。また、26S サブユニットの部分塩基配列 (Domain1/Domain2:D1/D2) は、同種間で 99% 以上の類似度を示すことが分かっている。

杉田らの検討によると、同一種内の ITS 領域の類似度は 99% 以上であり、変種以上の関係では 99% 未満であることが示されている¹⁾。

これらの理由から、現時点では 26S および ITS 領域の塩基配列類似度に基づく同定基準は、おおむね妥当であると考えられている。

また、*Cryptococcus neoformans* および *C. gattii* の区別は、ITS 領域でも可能であるが、その DNA 塩基配列の差異は 1% 程度であり、IGS 領域の塩基配列を比較することによって、より容易に区別が可能となる。

引用文献

- 杉田隆, 西川朱貴: DNA 塩基配列解析による病原真菌の分離・同定, 真菌誌 45 (2): 55-58, 2004.

実際の手順

<培養菌の場合>

遺伝学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう。標準株の遺伝子を対照として、rRNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS) 領域、または rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit) を増幅するプ

ライマーにて PCR を行い、増幅産物が得られた場合には、この産物についてシーケンスを行ったのち、国際的に公表されているデータベースを参照して菌種を同定する。

1) DNA の抽出

培養した菌を集菌し、DNA 抽出キットのマニュアルに従い DNA を抽出する。

2) PCR

1) で抽出した DNA を template にして、panfungal primer (D1/D2 LSU および ITS 領域: プライマーは原則 ITS5-NL4 を使用) または特異的な primer を用いて増幅する。

<未培養臨床検体の場合>

SOP に従って DNA を抽出する。非固定検体の場合は、ITS5-NL4 プライマーを使用する。ホルマリン固定検体では、ITS1-ITS2, ITS3-ITS4, NL1-NL4 プライマーの組合せで行う。糸状菌症疑いの検体では、アスペルギルス β-tubulin PCR プライマーおよびムコル属特異的プライマーを使用する (必要に応じて semi-nested PCR を行う)。

<PCR reaction の組成>

03-045 (RI 室) のクリーンベンチで premix 化したものを用いる。

03-043 のクリーンベンチで陰性対照を添加する。その後、抽出 DNA (臨床検体由来のみ) を添加する。

所定の実験台で、培養菌からの抽出 DNA および、最後に陽性対照を添加する。

DNA ポリメラーゼの添付文書に従い、アニール温度 55℃ もしくは 60℃、伸長時間 1 分で行う。

03-043 に設置してある TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice もしくは Bio-rad T100 サーマルサイクラーを用いて PCR を行う。

1) 生菌より抽出した DNA からの PCR
DNA xμl

100 μM primer 5'	0.5 μl
100 μM primer 3'	0.5 μl
2xPrimeSTARMax	25 μl
PCR用純水	24×μl
計	50 μl

2)臨床検体より抽出した DNA からの PCR

DNA	x μl
100 μM primer 5'	0.5 μl
100 μM primer 3'	0.5 μl
2xMightyAmp buffer	25 μl
MightyAmp DNA polymerase	1 μl
PCR用純水	23×μl
計	50 μl

3) PCR 産物の確認・コンタミの予防

1.5% agarose gel で泳動し、増幅産物の有無、大きさを確認する。キャリアオーバーによる汚染を判別可能とするマーカー入り陽性対照を複製し、常に使用する。また、試薬の調製、検体処理、泳動などは物理的に隔絶された場所で実施する(見取り図; 別添〇)。試薬調製・DNA の添加に用いるチップおよび 1.5 ml チューブは、毎回新しい包装を開封する。専用のピペットマン・チューブブラックを用いる。

陽性対照で増幅が確認され、陰性対照で増幅が認められない上で、抽出 DNA からの増幅産物が確認できない場合、遺伝子検査陰性と判定する。

陽性対照:

panfungal PCR	pCR4-ITS-NL-Hph-PC
ヒストプラスマ/コクシジオイデス特異的 PCR	pUC19-Coi-Hc-Hph-PC
ムーコル属特異的 PCR	pUC19-ZM-Hph-PC
β チューブリン PCR	pUC19-bTub-nest-Hph-PC

陰性対照: PCR グレードの水、抽出に用いた生理食塩水、抽出バッファーを、用途に応じて用いる。臨床検体由来の PCR では、抽出・精製の際に検体を入れない陰性対照を設定し、検体と同様の抽

出・精製過程を経た溶出液を、PCR の陰性対照とする。

4) シークエンス

PCR 増幅産物が確認できれば、増幅産物を精製後、それぞれ、PCR に用いたプライマーで、シークエンスを行う。BigDye(R) Terminator v3.1Cycle を用い、マニュアルに従い試薬を混和する。03-043 に設置してある TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice もしくは Bio-rad T100 サーマルサイクラーを用いて 35 サイクルのシークエンス反応を行う。

5) ホモロジー検索

国際的に公表されているデータベースである BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および Mycobank (<http://www.mycobank.org>) を参照して、99%以上の相同性を基準として、菌種を同定する。比較対象となる菌株は CBS もしくは ATCC の標準株とする。99%以上の相同性が得られない場合、再度同定を試み検索する。再同定でも同定できない場合は可能性の高い上位菌種を列挙し、参考結果とする。また、アスペルギルス属に関しては上記以外に β-tubulin 遺伝子、クリプトコックス属に関しては IGS 領域の塩基配列まで決定し、同定する。

表 1 Panfungal primer

● D1/D2 primer	
NL1	5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA-3'
NL4	5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'
● ITS primer	
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS2	5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'
ITS3	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
ITS4	5'-TCC TCC GGT TAT TGA TAT GC-3'
ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

表 2 特異的 primer

● β-tubulin primer	
bTub1	5-AATTGGTGCCGCTTCTGG-3'
bTub2	5-AGTTGTCCGGGACGGAATAG-3'
bTub4	5-AGCGTCCATGTTACCAGG-3'
※通常は bTub1-bTub2 で PCR を行う。semi-nested PCR の際には、1 回目の PCR に bTub1-bTub2、2 回目の PCR に bTub1-bTub4 を用いる。	
● クリプトコックス IGS primer	
IGS1F	5-atc ctt tgc aga cga ctt ga-3'
IGS1R	5-gtg atc agt gca ttg cat ga-3'
IGS2F	5-cag gaa gtt aag ctg aag ag-3'
IGS2R	5-agt gtt tga gcc tac cac gta-3'
※同時に IGS1F-IGS1R および IGS2F-IGS2R の組み合わせで PCR を行う。	

● Cryptococcus mating type PCR primer

STE20AaF	5'-cca aaa gct gat gct gtg ga-3'
STE20AaR	5'-agg acn tct ata gca gat-3'
STE20AaF	5'-tec act ggc aac cct gcg ag-3'
STE20AaR	5'-atc aga gac aga gga gca aga c-3'
STE20DaF	5'-gat tta tct cag cag cca cg-3'
STE20DaR	5'-aaa tgg gat acg gca cgt c-3'
STE20DaF	5'-gat etg tet cag eng cca c-3'
STE20DaR	5'-aat ate agc tgc cca ggt ga-3'

※各プライマーのセットで増幅される DNA 断片の大きさは、STE20AaF・STE20AaR: 588 bp、STE20AaF・STE20AaR: 865 bp、STE20DaF・STE20DaR: 443 bp、STE20DaR・STE20DaR: 440 bp である。

● ムーコル属特異的 primer

ZM1	5'-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3'
ZM2	5'-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3'
ZM3	5'-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3'

※通常は ZM1-ZM2 で PCR を行う。semi-nested PCR の際には、1 回目の PCR に ZM1-ZM2、2 回目の PCR に ZM1-ZM3 を用いる。

● ヒストプラスマ M 抗原 primer	
Msp1F	5-ACAAGAGACGACGGTAGCTTCACG-3'
Msp2R	5-ACCAGCGGCCATAAGGACGTC-3'
Msp2F	5-CGGGCCCGTTTAACAGCGCC-3'
Msp3R	5-ATAAGGACGTCACGAAGGGC-3'
※nested PCR 用プライマー。1 回目の PCR に Msp1F-Msp2R、2 回目の PCR に Msp2F-Msp3R を用いる。	

● コクシジオイデス特異的 primer	
Coi9-1F	5-TACGGTGAATCCCGATACA-3'
Coi9-1R	5-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'

改訂履歴一覧

0.01 版 2014 年 9 月 1 日改定・実施

別紙 2

感受性検査

感受性検査の実施及び判定に際し、精度管理された感受性プレートを実験にてカスタム作製し、国際的に推奨されている真菌感受性検査の標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) および CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して検査を行う。

また、酵母様真菌については、臨床効果と相關する感受性、耐性等の基準であるブレイクポイントが設定されているが、糸状菌については設定されていない。

I. 準備

1. 作業スペースとキャビネット

P2 スペースのセーフティキャビネットを使用する。
糸状菌の取り扱いには P2-051 室を使用する。

2. 使用機材と薬剤プレート

2-1 機材
分光光度計 (Erma Inc.) P2-049 室
三菱クーリングキューベータ P2-051 室 35°C
ミキサー (タイテック S-100)
マルチウエル対応ピペット (BIOHIT 8 チャンネル)
ピペットエイド
マイクロプレートリーディングミラー (特極東製薬工業)
ディスプレイザブルキューベット (アズワン BRA759116)
ピペットマン
ディスプレイザブルピペット (COSTAR)
チップ (QSP)
リザーバ (住友ベークライト) オートクレーブして使用する。
セルストレーナー (ファルコン) 糸状菌で使用する。

2-2 薬剤プレート

96-well plate NQD9 (案研特注品)
-80 C deep freezer でストックし、検査日に解凍して使用する。

2-3 菌希釈液

大塚生食注、Aspergillus 属の場合、生食水に Tween 20 を加えて使用する。

使用薬剤

なお、本施設において試験に供する薬剤は、現地点において以下の通りである。

Micafungin (MCFG)、Amphotericin B (AMPH)、5-FC、Fluconazole (FLCZ)、Itraconazole (ITCZ)、Voriconazole (VRCZ)、Posaconazole (PSCZ)。なお、PSCZ は日本未発売である。

精度管理

国際的に推奨されている品質管理株 (*C. parapsilosis* ATCC 22019) を用いて、精度管理を行う。

実施手順

II. 酵母の感受性テスト
真菌感受性検査標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) に準拠して施行する。

1. 菌の分離

到着検体の状態に応じ、必要であれば PDA プレートに播き、purity、viability を確かめる。35C で培養し、single colony growth を確認する。

2. 菌液の調整と薬剤プレートへの添加

Quality control 株として *C. parapsilosis* (ATCC 22019)、*C. krusei* (ATCC 6258) を使用する。

1) *candida* 種は約 24 h、*C. neoformans* は約 48h 培養コロニー (~1mm 径) をピックアップして植菌する。コロニーは生食水に suspend する。

2) 1) を 15 秒 vortex mix し、A530 を 0.08-0.1 に合わせる (McFarland 0.5 に相当)。

3) 2) を生食水で 10 倍に希釈する。

4) 3) を予めオートクレーブ滅菌したリザーバに移し、マルチチャンネルピペットを使用して plate に 0.5 ul ずつ分注するする。

3. 培養

35°C の静置培養で 24h (MCFG)、48 h (MCFG 以外の薬剤) 培養する。

但し、Trailing growth を示す株については 24h 培養する。
C. neoformans は 70-74 h 培養する。

4. 結果判定と保存

マイクロプレートリーディングミラーを使用して目視し、positive control と比較して判定する。判定結果を別表に記入する。また、プレートをスキャナーに画像としてとりこみ、レファレンス用 PC およびレファレンス用 USB メモリーに保存する。
Rem: 必要に応じて A595 の測定をして IC50 を計算することも可能。

4-1 AMPH

Complete inhibition (24 hr or 48 hr)

4-2 5-FC と FLCZ 以外の azole

IC50 (48 hr)

4-3 Fluconazole

IC50 (24 hr or 48 hr)

4-4 Echinocandin

IC50 (24h)

Rem: azole で trailing growth を示す株については 24 hr での評価

酵母

真菌感受性検査標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) に準拠して施行する。

III. 糸状菌の感受性テスト

真菌感受性検査標準法 CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して施行する。

1. 菌の分離

PDA スラントに播き、growth を確認する。
たいの真菌は PDA/35°C/1 week で growth する。
接合菌、*Aspergillus* spp.; 35°C、48 hr、*Fusarium*; 35°C、48-72 hr、さらに 7 日目まで 25-28°C の培養が必要。

2. 菌液の調整と薬剤プレートへの添加

Quality control 株として *C. parapsilosis* (ATCC 22019)、*C. krusei* (ATCC 6258) を使用する。
生理食塩水 (*Aspergillus* spp. では 1% tween20/生理食塩水) に suspend する。
セルストレーナー (4 um) を通して大きな分子をトラップして除去する。
15 秒 vortex mix し、菌種によって以下の OD に調整する。

Fusarium spp. *S. apiospermum*, *Ochroconis gallopava*, *Cladophialophora bantiana*, *R. oryzae* and other zygomycetous species A530 0.15-0.17

Aspergillus, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, *Exophiala dermatitidis*, *S. Sschenckii* A530 0.09-0.13

Bipolaris spp. and *Alternaria* spp. A530 0.25-0.3

2. を予めオートクレーブしたりザーバーに移し、マルチチャンネルピペットを使用して薬剤プレートに1 ulずつ添加する (x101)

S. apiospermum, *Bipolaris* spp. *Alternaria* spp. では2x concentratedが必要

* *T. rubrum* ではオートミールアガーを使用。それ以外の皮膚糸状菌はPDAで30℃、4-5 daysあるいは良好な生育が確認されるまで培養し、生理食塩水で調整、セルストレーナーを通しhemacytometerでカウントする。必要な濃度に調製する。検査に必要な1x10³ から3x10³ CFU/mLの密度の2倍濃いものを調整する。

3. 培養

3-1 温度

静置培養 35℃

Alternaria spp 30℃

3-2 時間

EchinocandinのMEC評価:

21-26 hr: *Aspergillus* spp, *Paecilomyces variotti*.

46-72hr: *Scedosporium* spp

Control wellで十分なgrowthを確認する。

Echinocandin以外の薬剤の評価:

21-26 hr: *Rhizopus* spp.

70-74 hr: *Scedosporium* spp

46-50 hr.: その他の糸状菌 (*Fusarium* spp,

Aspergillus spp, *S. schenclai*)

4. 結果判定と保存

マイクロプレートリーディングミラーを使用して目視し、positive controlと比較して判定する。判定結果を別表に記入する。また、プレートをスキャナーに画像としてとりこみ、レファレンス用PCおよびレファレンス用USBメモリーに保存する。

4-1 AMPH-B complete inhibition

4-2 FLCZ, FC, KTCZ IC50 (皮膚糸状菌はIC80)

4-3 ITCZ, PSCZ, Ravuconazole, VRCZ

complete inhibition

* 皮膚糸状菌では80%あるいは80%以上阻害とする場合あり (ITCZ, PSCZ, VRCZ)

4-4 Echinocandin (anidulafungin, CSFG, MCFG) MEC

4-5 Ciclopir ox はっきりと規定されていない。

80%あるいは80%以上阻害

4-6 Griseofulvin はっきりと規定されていない。

80%あるいは80%以上阻害

糸状菌

真菌感受性検査標準法 CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して施行する。

まず、斜面培地 (PDA) に継代したのち、生理食塩水を加え、40 μm メッシュサイズのナイロンメッシュ (セルストレーナー、BD) を通して、孢子懸濁液を調整する。吸光度 (OD530) が0.15~0.17になるように生理食塩水で調整したものを、接種菌液とする。

この菌液を、感受性プレート (図2) の各ウェルに、マルチピペットを用いて、1.0 μLずつ接種する。35℃で培養し、24時間後、48時間後に目視で観察する。記録のため、スキャナーで取り込む。48時間後の結果を最終判定とする。

判定基準

MCFGは最小有効濃度 (MEC)、5-FCとFLCZは50%発育阻止濃度 (IC50) を、その他は、完全に発育を抑制した濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とする。

2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved

standard, 2nd ed. CLSI document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA.

図2 感受性プレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
AMPH	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

感受性プレート。栄研化学にてカスタムメイドした (NQD9 プレート)。RPMI-1640 + 0.165 M MOPS pH7.0 100µL ずつに各薬剤が各濃度 (µg/mL) で含まれている。NGC: negative growth control, PGC: positive growth control

5. Break point

Echinocandin	≤2ug/ml は感受性
AMPH	> 1 ug/ml (likely resistant)
FLCZ	≥64
Flucytosine	≥32
ITCZ	≥1
KTCZ	-
VRCZ	≥4
New triazoles	-

6. チェック

	チェック
検体の吟味	
PDA 植え継ぎ (必要に応じて)	
35℃ 確認、培養開始	
コロニー確認	
生食水 suspension 調整	
A530 (1)	
希釈	
A530 (2)	
10 倍希釈	
Plating	

35℃ 確認、培養開始	
培養開始日時	
24 hr (評価チェック/別紙)○つける	
48 hr(評価チェック/別紙)○つける	
マイクロプレートリーディングミラーを使用してウエルを目視し判定	
Plate をスキャナーに取り込む	
結果保存	
結果報告	

【付表】

判定時間と評価の要約

	Candida 属	C. neoformans
Echinocandin	24 hr IC ₅₀	△ (-)
AMPH	24 or 48 hr complete inhibition	complete inhibition
FLCZ	24 or 48 hr △	△
Flucytosine	△	72 hr
ITCZ	48 hr IC ₅₀	IC ₅₀
VRCZ		
RVCZ		
PSCZ		

5. Break point

かびの break point は確立していない。

Working break point 設定 (large number isolate から得られた vitro data に基づく)

≤ 1 ug/ml	Susceptible
2 ug/ml	Intermediate
≥4 ug/ml	Resistant

6. チェック

	チェック
検体の吟味	
PDA 斜面培地植え継ぎ	

35℃確認、培養開始	
生育確認	
生食水(+ Tween 20) suspension 調整	
A530 (1)	
希釈	
A530 (2)	
Plating	
35℃確認、培養開始	
培養開始日時	
24 hr (評価チェック/別紙)○つける	
48 hr(評価チェック/別紙)○つける	
マイクロプレートリーディングミラーを使用してウェルを目視し判定	
Plate をスキャナーにとりこむ	
結果保存	
結果報告	

【付記】

播菌量の確認、CFU

基礎 data として、必要に応じて行う。

1 非皮膚糸状菌

調製菌 x11 の希釈液を SDA に 10 ul まで CFU/mL をカウントする。28-30℃で培養し、colony が検出されたら (24 hr あるいは 5 days 以内) ただちにカウントする (特に *R.oryzae*)。

2 皮膚糸状菌

調製した菌液 10 ul を SDA にまき、CFU/ml をカウントする。28-30℃で培養して連日観察し、colony が検出されたらただちにカウントする。

別紙

d candida A530 0.08*0.1 x10 して plating

【評価】

AMPH-B: MIC, others IC₅₀

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G FSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

MCFG: 24 hr.
others 48 h
TG growth
strain 12 24
hr で判定

^d糸状菌

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

【菌の調整と植菌】

アスペルギルス（1% Tween 入り生理食塩水） 0.09-0.13 1 ul ずつ plating

接合菌&フサリウム（生理食塩水） 0.15-0.17 1 ul ずつ plating

Paecilomyces lilacinus, *P. variotii*, *Exophiala dermatitidis*, *S. schenckii*（生理食塩水） 0.09-0.13

1ul ずつ plating

【培養】

・温度

静置培養 35℃

Alternaria spp 30℃

・時間

【判定】

Echinocandin の MEC 評価:

21-26 hr: *Aspergillus spp*, *Paecilomyces variotii*.

46-72hr: *Scedosporium spp*

Control well で十分な growth

Echinocandin 以外の評価:

21-26 hr: *Rhizopus spp*.

70-74 hr: *Scedosporium spp*

46-50 hr: その他の糸状菌 (*Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *S. schenckii*)

^dクリプトコックス

A530 0.08-1.0 x10 を 0.5 ul ずつ plating

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

【評価】

AMPH-B: MIC, others IC₅₀

72 hr

改訂履歴一覧

0.01 版 2014年9月1日改定・実施

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
野田 万希子 岐阜県保健環境研究所 保健科学部
亀山 芳彦 岐阜県保健環境研究所 保健科学部
北川 恵美子 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
加藤 真美 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
川上 慶子 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
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 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の構築・改善点を抽出することを目的とした。精度の高いサーベイランスを全国的に実施するためにも、技術的基盤の継承が重要である。平成26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。コントロールDNAの配布とそれを使った試験のトラブルシューティング等を通して試験法の改善等につなげていくことが重要であった。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容易ではない。市販されていない型別用血清を感染研で用意、配布することで、今後の課題も明らかにされつつある。今後も、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

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カテゴリーに分類される。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。2014年も4,100例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,500例以上の重症例(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(NESIDの集計による)。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。さらに、新規下痢原性腸内細菌として同定されている*Escherichia albertii*についてもPCRによる検出を行っている。

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。

A: EHEC を中心とした下痢原性大腸菌の血清型解析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・精度管理を行う。

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、溶血性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・遺伝子型別

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。PCR法は定法に従って実施した。

2. レジオネラ SBT 法と血清群別

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)

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

2014 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 2,767 株であり、分離数の多い順に、O157 (61.8%)、O26 (21%)、O111 (3.9%)、O145 (3.8%)、O111 (2.7%)、O121 (2.4%)、O91 (0.8%)、O165 (0.3%)、その他 (3.3%) となっていることが判明した。

1.2 コントロール株の配布およびそれらを用いた解析

下痢原性大腸菌の各カテゴリー (EHEC, EPEC, EAggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [enteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌]) のコントロール株、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、新規下痢原性腸内細菌である *E. albertii* コントロール株 (大分県衛生環境研究センターからの分与株をコントロール株として整備した) の配布を次の

各衛生研究所：藤沢市保健所、浜松市保健環境研究所、香川県環境保健研究センター、石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、茨城県衛生研究所へ行った。配布を行ったいくつかの地研からは、解析に関するトラブルシューティング、および解析結果に関する問い合わせを受け付けた。石川県では、送付したコントロール菌株を用いて、H19-H25 年度に石川県で分離された O157 分離株 (204 株) について *stx1* および *stx2* バリエーションの解析を実施した。

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 (2013-2014 年用) 10 株を用いた。感染研以外で 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生化学的性状 (ソルビトール発酵性、 β グルクロニダーゼ活性、ヘモリシン活性) 血清型 (O:H 型) および病原性遺伝子型 (*stx1a*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2f*, *eae*, *lt*, *aggR*, *saa*, *subA*, *ehx*) の解析結果が感染研と大阪府ですべて一致し、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、37 株が追加された (表 1)。 *Legionella dumoffii* が 1 株あった以外は *Legionella pneumophila* で、

血清群 (SG) 1 が 31 株、SG2 が 1 株、SG3 が 2 株、SG12、14 が各 1 株だった。混合感染が 2 例あり (いずれも浴槽での溺水で、*L. dumoffii* と *L. pneumophila* SG1 の事例と *L. pneumophila* SG3、SG14 の事例)、事例数は 35 例である。感染源が、浴槽水と推定・確定されている例は 9 例 (26%) だった。PFGE による感染源確定例は浴槽水 (公衆浴場) と冷却塔水 (院内感染) による各 1 例だった。農作業・庭仕事による疑い事例が 6 例あり、これは土壌による感染の可能性が周知されてきたためと思われる。他には、高圧洗浄水 2 例、水道関係 1 例、海外旅行 1 例、空調疑いが 1 例などとなっている。

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された (集団感染事例由来の重複している株を含めると 321 株)。図 1 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 308 株 (97.5%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 83% を占めた。

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 3 種を試作した。*L. pneumophila* SG2~SG15 の菌抗原グループ 3 種に対応したグループ血清 (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) である。これらは昨年度も配布している。

昨年度配布した 4 種の混合血清の利用状況については、関東・甲・信・静地区で (20 施設中) 配付血清を利用したのは 35% で、「凝集が見やすかった。スクリーニングとして有用であった。検査の効率化が図れた。」とあった。一方、利用しなかった理由

として、「検体がなかった。市販血清で同定可能であった。スポイト付きでないため扱いにくい。」とあった (スポイトについては、元の容器はスポイト付きだが小分けした容器がそうでなかったという意味)。9 割の施設が市販を希望した。

近畿地区では「血清型別を効率よく行うことができた。混合血清の配布を今後も継続してほしい。1 回につき 10 μ l の使用で十分の凝集が確認できた。混合血清で凝集するも単味で凝集ができない UT の場合があった。」のコメントがあった。

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 群レンサ球菌の菌株総数は、951 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、T12 (211/951, 22.2%)、TB3264 (189/951, 19.9%) であった。T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。TB3264 型の分離比率は、2010 年、急激に上昇し、2013 年さらに増加した (2009 年、5.3%、2010 年、12.6%、2011 年、11.1%、2012 年、14.5%、2013 年、19.9%)。2011 年最も分離比率の高かった T1 型は、2013 年さらに減少した (2011 年、31.1%、2012 年、26.8%、2013 年、12.1%)。 (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

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 (STSS) の報告が 50 症例あった。49 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、TB3264 型であり、分離比率が上昇している (2011 年、10.7%; 2012 年、18.9%; 2013 年、30.0%)。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、昨年最も分離された T1 が多く、その分離比率は昨年と比較して減少した(2011年, 69.0%; 2012年, 51.6%; 2013年, 28.0%)。この2つの型で全体の50%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 50 例中、*emm89* 型(M 型別不能)が 15 例(30.0%)と最も多く、次いで *emm1* 型(M1)が 14 例(28.0%)、*emm3* 型(M3)が 4 例(8.0%)と多かった。

2012 年と比較し、*emm1* 型は、51.6% (49/95)から 28.0% (14/50)に減少し、*emm89* 型は 17.9% (17/95)から 30.0% (15/50)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 (0157, 026, 0111, 0103, 0145, 0121, 0165) と *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類を検出可能なワンショット PCR のプロトコルを EHEC 検査マニュアルに追加した。現在、その他の変更項目と共に共著者に確認中であり、確認後感染研ホームページにアップロードする予定である。

2) 大腸菌 EQA の実施

SSI から 2014-2015 年用 EQA 株 (10 株) が分与される予定である。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) EHEC に関して、主たる保菌動物と考えられている畜牛において、EHEC の分布解析を行う。地方衛生研究所や宮崎大学との共同研究から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

種比較解析を行う予定である。

4) レジオネラサーベイランス

昨年度、レジオネラ症の主要起因菌である *L. pneumophila* 血清群 1 株は遺伝子型により、浴槽水グループ (B1, B2, B3)、冷却塔水グループ (C1, C2)、土壌グループ (S1, S2, S3)、および U グループの大きく 9 つのグループに分けられることを報告した。この遺伝子型グループは環境分離株の由来に基づくものである。今回の農作業・庭仕事による疑い事例 6 例のうち、血清群 1 によるものが 5 例で、そのうち 4 例の遺伝子型が、実際に土壌 (S1) グループであった。したがって、臨床分離株の遺伝子型を調べることにより、感染源の種類の推定が可能になると考えられた。その一方で、入浴施設が感染源と推定される患者分離株で、S グループに属する菌株も見られた。これは土などに混じって *L. pneumophila* が浴槽水に混入している可能性を示唆する。

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。

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。2010年以降、TB3264型が咽頭炎由来株で増加傾向あり、それに引き続き2011年からTB3264型株によるSTSS増加している。この増加は近年のSTSSの増加と関連性がある(参考文献5)。TB3264型は様々なemm型と関連性がある。TB3264型であったSTSS分離株のemm型はすべてemm89型であり、TB3264型株の中でも特定のものだけが引き起こしていることが推測される。TB3264型の咽頭炎分離株は様々なemm型株により引き起こされることから、咽頭炎由来株のTB3264/emm89型の流行を追うことは重要である。

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) Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, Chiba K, Katsukawa C, Ohya H, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Ogawa M, Ohnishi M, Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010-2012. Epidemiol Infect, in press

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。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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
- 2) 笠原ひとみ、関口真紀、中沢春幸、藤田暁、畔上由佳、高山 久、千秋智重、関 年雅、池田元彦、前川純子、倉 文明:L. pneumophila 血清群9の症例について、病原微生物検出情報 36(1):14-5, 2015.
- 3) Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, Chiba K, Katsukawa C, Ohya H, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Ogawa M, Ohnishi M, Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010-2012. Epidemiol Infect, in press

- 4) Ikebe T, Chiba K, Shima T, Masuda C, Okuno R, Ohya H, Ogata K, Katsukawa C, Kawahara R, Tominaga K, Yabata J, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Chang B, Ogawa M, Ohnishi M, the Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013. J Infect Chemother, in press
- 5) Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T, Sera N. A Foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 67 (4): 321-322 (2014).
- 6) Morimoto M, Tamura S, Hayakawa T, Yamanishi H, Nakamoto C, Nakamoto H, Ikebe T, Nakano Y, Fujimoto T. Phlegmonous gastritis associated with group A streptococcal toxic shock syndrome. Intern Med 53 (22): 2639-2642 (2014).
- 7) Kohayagawa Y, Ishitobi N, Yamamori Y, Wakuri M, Sano C, Tominaga K, Ikebe T. Streptococcal toxic shock syndrome from necrotizing soft-tissue infection of the breast caused by a mucoid type strain. J Infect Chemother, in press
- 8) Sanderson-Smith M, Oliveira D, Guglielmini J, McMillan D, Vu T, Holien J, Henningham A, Steer A, Bessen D, Dale J, Curtis N, Beall B, Walker M, Parker M, Carapetis J, Melderen L, Sriprakash K, Smeesters P, the M Protein Study Group. A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. J Infect Dis 210 (8): 1325-1338 (2014)
- 9)
- 学会発表
- 1) 前川純子、倉 文明、渡辺祐子、金谷潤一、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真：新しい *neuA* プライマーによる *Legionella pneumophila* 臨床分離株の sequence-based typing (SBT). 第 88 回日本感染症学会学術講演会、2014 年 6 月、福岡。
- 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

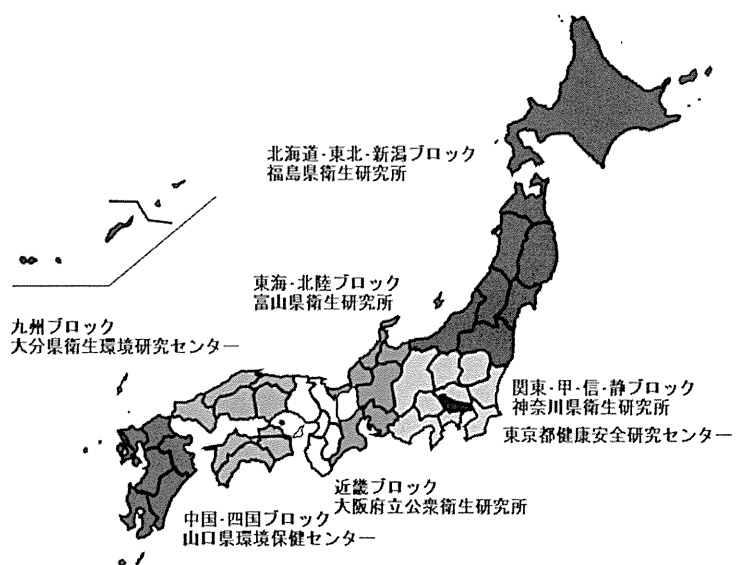


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

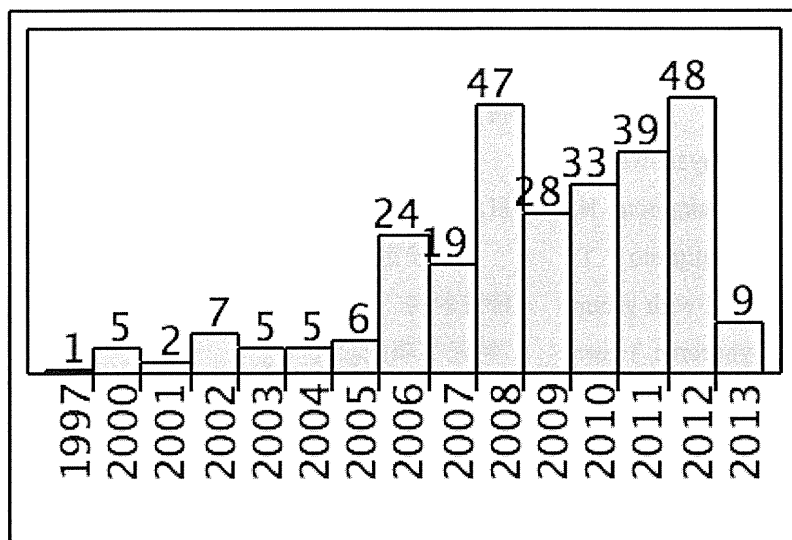


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2013年6月現在)