

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

「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」

分担研究者 高崎智彦（ウイルス第一部・室長）  
協力研究者 中山絵里（ウイルス第一部・研究官）  
モイ メンリン（ウイルス第一部・研究官）  
田島茂（ウイルス第一部・主任研究官）  
小滝徹（ウイルス第一部・非常勤職員）

**研究要旨** 海外からの昆虫媒介性ウイルス感染症のなかで、2013年から2014年にポリネシアなど太平洋の島嶼国で流行していたジカ熱（Zika fever）は、デング熱とよく似た病状を呈するが、死に至ることは稀であるため、それ程注目されていない感染症であった。しかし、近年デング熱に紛れていた症例が見出されるようになった結果、時に大きな流行が報告されるようになってきた。その結果、フランス領ポリネシア・ボラボラ諸島から帰国した Zika 熱患者 2 例を確定診断した。また、8月にタイからの輸入症例も確定診断した。日本脳炎に関して、現在国内で検出される日本脳炎ウイルスは遺伝子 1 型であるが、1980年代以前は遺伝子 3 型であった。現在も遺伝子 3 型が国内で活動している可能性は存在する。2015年には 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系の非特異反応を抑える改良を行った。

A. 研究目的

近年、デング熱やチクングニア熱など世界的に蚊が媒介するウイルス感染症の流行が拡大している。デング熱とよく似た病状を呈するが、死に至ることは稀であるため、それ程注目されていない感染症としてジカ熱がある。しかし、デング熱流行地域では、デング熱に紛れている可能性もある。2013年から太平洋島嶼国でこのジカ熱（Zika fever）の流行が始まった。そのため、Zika ウイルスの実験室診断法を確立し、地方衛生研究所に提供することを目的とした。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の

感染が原因の中枢神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は 20~40%に達する重篤な感染症である。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は 1990 年以降 10 例以下で推移しているが、日本国内で JEV は現在もブタから毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは 90 年代の初頭に 3 型から 1 型へと変化した。同様の変化は日

本だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の現象（遺伝子型変化）が認められている。しかし、遺伝子 3 型日本脳炎ウイルスが日本から完全に消えてしまったという確証はない。そのため 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系を構築していたが、共通検出用セットが偽陽性をきたす傾向があったためこれを改良し、さらにデング熱患者検体を用いて評価し診断マニュアルに掲載した。

## B. 研究方法

ジカウイルス (Zika virus) 表 1 のリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) を評価した。その結果を踏まえて、ジカウイルス病原体検出法の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。また、フランス領ポリネシアから帰国の輸入ジカ熱患者血清を用いて、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。

日本脳炎ウイルスに関しては、Genbank に登録された遺伝子配列データに基づいて 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系を E 領域に設定して構築していたが、さまざまな評価の結果 1 型-3 型共通検出系が、非特異反応を来しやすいことが判明したため、あらたに NS5 領域に 1 型-3 型共通検出系を設定しなおした。本年度は、ヒト血清 (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。

## C. 研究結果

ジカ熱患者をウイルス学的に確定し、その血清を用いて、抗ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築した。デング熱患者血清を用いて交差反応性を検証した結果、交差反応はわずかに示す患者血清が存在した。ジカウイルス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 Zika ウイルス遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

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 領域に設定した 1-3 型共通検出系を日脳疑い患者血清 (非日脳急性脳炎患者) を用いて評価を継続した。

## D. 考察

ジカウイルス (Zika virus) は世界的に流行しているデングウイルスと同じフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで近縁なウイルスである。ジカ熱 (Zika fever) の流行は、2007 年にミクロネシアで発生した後、2013 年にフランス領ポリネシアで流行が始まり、ニューカレドニア、イースター島など太平洋島嶼国に波及した。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。ジカウイルスも日本に生息するヒトスジシマカが媒

介可能とされている。したがって、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。そのため、希望する地方衛生研究所には Zika ウイルス遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

一方、我が国に常在する日本脳炎ウイルスの検査は、近年でも検査会社では赤血球凝集阻止 (HI) 抗体、補体結合反応 (CF) 抗体検査で実施されており必ずしも感度は高くない。そこで、より高感度で特異性の高い遺伝子型 1 - 3 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を構築、確立し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。

#### E. 結語

- 1) 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。
- 2) 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。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

朽谷健太郎、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、モイ メンリン、高崎智彦. オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス

感染症の本邦発報告. 感染症学雑誌. 88(2):155-159 (2014)

##### 学会発表

##### 国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

##### 国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26 年 6 月 30 日 (東京)
3. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第 46 回日本

- 小児感染症学会. 平成 26 年 10 月 18-19 日 (東京)
6. 高崎智彦. 緊急企画: 70 年を経ての再来～デング熱国内流行 2014. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成 26 年 10 月 23-25 日 (岡山市)
  7. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
  8. MoiMeng Ling, 白井颯治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
  9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
  10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. Fc $\gamma$ R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに  
なし
  3. その他  
なし
- 対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
  11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るために～忍び寄る地球温暖化～」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
  12. 高崎智彦. ー市民公開講座ーデング熱これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
  13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー. 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
  14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ～70 年の時を経て～ (特別講演). 第 21 回リケッチア研究会. 平成 26 年 12 月 20-21 日 (東京 国立感染症研究所)
  15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし.
  2. 実用新案登録

表1 Zika virus リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) プライマー、プローブ

	sequence (5' to 3')	genome position
ZIKV 835F	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857
ZIKV 860-FAM	FAM-CGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAG- TAMRA	860-886
ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102
ZIKV 1107-FA M	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA -TAMRA	1107-1137
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139

表2 日本脳炎ウイルス リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) プライマー、プローブ

Primer & Probe	Sequence (5' to 3')	Region
● 1&3 型遺伝子検出共通セット		
JENS5s269AF092550	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	NS5
JENS5r330AF092550	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GGA A	
JENS5p294AF092550	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	
● 1 型遺伝子検出セット		
JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	E
JE1en1119c-1082	GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA	
JEen1082pb	FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB	
● 3 型遺伝子検出セット		
JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	E
JE3en1119c-1082	AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA	
JE3en1082pb	FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB	

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

リケッチア・レファレンスセンターの2014年度活動について

リケッチアMultiplex Realtime PCRの多施設間相互検証

研究分担者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
研究協力者	川森文彦 千葉一樹 木村政明 山本徳栄 新開敬行 赤地重宏 滝澤剛則 寺杣文男 近平 雅嗣 濱野雅子、岸本寿男 島津幸枝 松本道明 御供田睦代 野町太朗 大橋典男 佐藤寛子	静岡県環境衛生科学研究所 福島県衛生研究所 青森県環境保健センター 埼玉県衛生研究所 東京都健康安全研究センター 三重県保健環境研究所 富山県衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター 兵庫県健康生活科学研究所健康科学研究センター 岡山県環境保健センター 広島県立総合技術研究所保健環境センター 高知県衛生研究所 鹿児島県環境保健センター 宮崎県衛生環境研究所 静岡県立大学(研究分担者) 秋田県健康環境センター

研究要旨 リケッチア症は、国内発生を考慮した場合、ベクターの種類、リケッチアの種類によって、発生時期や患者発生地域の集中など地域特性が強く表れる疾患であるため、本研究では、全国ブロックの横糸となるリケッチア・レファレンスセンターの地方衛生研究所を中心とした全国共通基盤の構築を目指している。発生するリケッチア症は、地域によって、つつが虫病、日本紅斑熱、その両方、また発生時期等に差があるものの、現在のリケッチア症の国内での広がりを考慮すると、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましい。このことから、本年度は日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病オリエンチアを同時に検出できるmultiplex realtime PCRについてその特異性、汎用性、また様々な血清型等が混在する各地の臨床検体を用いてその有効性と、各施設での再現性について検討した。その結果、検討したmultiplex realtime PCRは、国内のリケッチア症の遺伝子検出スクリーニングに有効である事が示された。

A. 研究目的

リケッチア症(つつが虫病と日本紅斑熱など)においては、現在も国内感染の患者が多数報告され、抗菌薬があるにもかかわらず

ず、死亡例、重症化例もいまだ報告されている。その発生状況は、発生時期やつつが虫病リケッチアの血清型が地域によって異なり、診断用抗原の選択など地域の状況に

即した対応が必要となる。また、リケッチアの培養には BSL3 を要し、特定病原体に指定されるものが多く、検査担当者の異動に伴う変更を行い難い。

地王衛生研究所(以下、衛研)を中心とした地域、全国のラボネットワークの構築方法の検討により、臨床に即した迅速対応と情報発信が可能となり、患者の QOL に資することになる。

本研究では、リケッチア・レファレンスセンターの活動を通じ、リケッチア症の病原体サーベイランスに必要となる実験室診断系の質的標準化、疫学情報の発信、相互信頼と連携、機能強化を目的とし、臨床現場に対応する迅速な診断、情報発信、地域性への柔軟な対応が期待される。発生するリケッチア症は、地域によって、つつが虫病、日本紅斑熱、その両方、また発生時期等に差があるものの、現在のリケッチア症の国内での広がりを見れば、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましいことから、研究班 2 年目は日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病オリエンチアを同時に検出できる multiplex realtime PCR の有効性について、各施設間で検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. 全国共通となる検査法の評価 multiplex real time PCR

静岡県環境衛生科学研究所において検討していた multiplex realtime PCR はつつが虫病 *Orientia tsutsugamushi* と日本紅斑熱リケッチア *Rickettsia japonica* の 16S rRNA の 120bp の領域を標的とし、二つのプライマーにオリエンチアとリケッチアそれぞれに対するプローブ (FAM 標識と VIC 標識) を用いたものである (現在、投稿準備

中のため、本報告書ではデザインを記載しない。)。感染研においては、*O. tsutsugamushi* の各種血清型標準株 (Karp, Gilliam, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) 他国内に分布する各種血清型、輸入感染症も考慮した各種リケッチア種 (*R. japonica*, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. prowazekii*, *R. typhi* 他) との特異性、汎用性、反応性を検討し、衛研のリケッチア・レファレンスセンターを中心に各地で発生した様々な血清型のつつが虫病や日本紅斑熱患者材料について、定法となっているコンベンショナル PCR と血清診断を並行して検査を実施し、臨床現場での有効性、再現性について検討した。

### 2. 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

全国ならびにブロック毎に地域情報に関する情報交換を行い、疫学情報、診断情報の収集・分析と共有を行った。また、衛研担当者が自身のスキルアップを行うための機会として学会・研究会等への積極的な参加と発表を推し進めた。

(倫理面からの配慮について)

臨床検体の取り扱いについては、各施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱いによって行った。

## C. 研究結果

### 1. multiplex realtime PCR の特異性と汎用性

表 1 に示す通り、標準血清型の各 *O. tsutsugamushi* は全て検出可能であった。また、発疹チフス群で日本を含め世界中で今なお発生する *R. typhi*、リケッチア目に含まれる *Anaplasma phagocytophilum*、*Ehrlichia chafensis* は検出できなかったも

の、非病原性、マダニの共生体とも考えられている LON type を含めた検討した全ての紅斑熱群リケッチアが検出可能であった。

## 2. 臨床検体に対する有効性

表 2 に一部示す通り、つつが虫病、日本紅斑熱のそれぞれの患者検体に対し、血清診断やコンベンショナル PCR と同等以上の検出率、適性を示した。

## 3. 全国情報の共有と担当者スキルアップ

前年度と同様、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うとともに、相互の連携を可能とする調整を行った。また、衛研のレファレンスセンター担当者は、「ダニと疾患のインターフェース」「リケッチア研究会」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。

## D. 考察

リケッチア・レファレンスセンターの存在目的として、各地域の中心となり、各地域を横に繋ぐために、さまざまな機能が期待されている。研究班 2 年目においては、その中の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。

近年の国内におけるつつが虫病における Shimokoshi 型の発生地域の拡大、紅斑熱群リケッチア症の多様化から、従来のコンベンショナル PCR 系ではシーケンス解析まで行わないと、型別ならびに種別の鑑別ができず、迅速に対応できないケースが想定されている。つつが虫病も日本紅斑熱も

治療においてはテトラサイクリン系抗菌薬により可能であることから、まずスクリーニング的にリケッチア症であるかを確定することが発生時の実験室診断に負担とならない。今回、多施設間で検討した multiplex real time PCR は、型間、種間の鑑別はできないものの、標準株等を用いた検討ではすべての型が検出可能であった。また、*R. japonica* の全ゲノム解析情報から設計したプローブは、検討した紅斑熱群リケッチア種の全てが検出可能であった。紅斑熱群リケッチアでは多種を検出することになるが、患者が多い日本紅斑熱 *R. japonica* のみならず、一例報告のみであるが、国内での患者発生が今後もありうる *R. tamurae*、*R. heilongjiangensis* も検出可能であることから、臨床現場に近い衛研の一次スクリーニング検査法として迅速対応に適用できるものと考えられる。さらに、臨床検体を用いた検討でも、コンベンショナル PCR、血清診断での結果とも一致、検体によっては同等以上の検出結果を示した。今回の多施設間での評価においては用いたプローブ標識を測定可能であれば特に測定機器を選ばなかったことから、応用範囲は広いと考えられる。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。

地域常在が想定されながら届出疾患になっていないため発生状況が不明な発疹熱対応体制、民間検査所ではできない血清診断への対応などまだまだ課題は多いが、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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 安藤秀二，リケッチア，平松啓一監修、中込治、神谷茂編集，標準微生物学，第12版，p307-315，2015年2月

##### 学会発表

##### 国内学会

1. 山本徳栄、近真理奈、伊佐拓也、杉山 郁、根岸 努、新井陽子、小山雅也、三田和正、岸本寿男、安藤秀二：埼玉県内のイヌ、ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価—第3報—、第21回リケッチア研究会、平成26年12月20-21日、東京
2. 御供田睦代、岩元由佳、中堂園文子、岩切忠文、福盛順子、藤田博己、山本正悟、角坂照貴、高橋 守、川端寛樹、本田俊郎、坂元修治、蔵元 強、北野智一、矢野浩二、藤田信子、島崎裕子、門馬直太、安藤匡子、高野 愛、矢野泰

弘、糸川健太郎、田原研司、及川陽三郎、川森文彦、大橋典男、高田伸弘、安藤秀二：薩南諸島のリケッチア症について、第21回リケッチア研究会、平成26年12月20-21日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

表1. 各種リケッチアとの反応性の検討

Species	Strain	Isolation source	Multiplex realtime PCR
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Gilliam	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Karp	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kato	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kawasaki	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kuroki	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Shimokoshi	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	JP-2-Sato	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	JG-Kasei	Human	+(Ot-FAM)
<i>Rickettsia asiatica</i>	IO-1	<i>Ixodes ovatus</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia conorii</i>	Malish 7	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	CH8-1	<i>Haemaphysalis concinna</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia helvetica</i>	IP-1	<i>Ixodes persulcatus</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia honei</i>	TT-118	<i>Ixodes</i> sp.	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia japonica</i>	YH	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia japonica</i>	FT	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Sheila Smith	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia sibirica</i>	246	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia tamurae</i>	AT-1	<i>Amblyomma testudinarium</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia typhi</i>	Wilmington	Human	-
<i>Rickettsia</i> sp. LON	LON-2	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	+(Rj-VIC)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			-
<i>Ehrlichia chaffensis</i>			-
<i>Ehrlichia muris</i>			-

表2. 血清学的にリケッチア症と確定した臨床検体を用いた検証

Patient no.	Serodiagnosis by the indirect immunofluorescent test	Specimen	Multiplex real-time PCR		<i>O. tsutsugamushi</i> nested PCR	
			Ot-PAM	Rj-VIC		
1	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	37.2 <sup>a</sup>	Negative	Positive	
		Escher	30.0	Negative	Positive	
2	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	41.0	Negative	Negative	
		Escher	25.6	Negative	Positive	
3	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	34.4	Negative	Positive	
		Escher	28.8	Negative	Positive	
4	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	33.8	Negative	Positive	
		Blood	28.6	Negative	Positive	
5	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	28.0	Negative	Positive	
		Blood clot	33.8	Negative	Positive	
6	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	31.5	Negative	Positive	
		Blood	32.0	Negative	Positive	
7	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	25.5	Negative	Positive	
		Escher	23.5	Negative	Positive	
8	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	35.8	Negative	Positive	
		Escher	27.0	Negative	Positive	
9	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	36.1	Negative	Positive	
		Escher	24.4	Negative	Positive	
10	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	Negative	
		Escher	22.6	Negative	Positive	
11	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	31.9	Negative	Positive	
		Blood	37.0	Negative	Positive	
12	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	36.0	Negative	Positive	
		Blood	37.9	Negative	Positive	
13	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	33.5	Negative	Positive	
		Blood	35.6	Negative	Positive	
14	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	25.8	Negative	Positive	
		Blood	39.0	Negative	Negative	
15	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	30.8	Negative	Positive	
		Blood	38.8	Negative	Positive	
16	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	27.9	Negative	Positive	
		Blood	29.5	Negative	Positive	
17	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	Negative	Negative	Negative	
		Escher	33.0	Negative	Positive	
21	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	29.5	NT	
		Blood clot	Negative	30.1	NT	
		Escher	Negative	31.3	NT	
22	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	37.1	NT	
		Blood clot	Negative	32.7	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
23	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	38.8	NT	
		Escher	Negative	26.5	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
24	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	36.5	NT	
		Blood clot	Negative	34.5	NT	
25	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	28.5	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	24.7	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	31.9	NT
26	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT
27	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	37.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	36.3	NT
28	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	31.0	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	40.1	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	38.9	NT
29	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	35.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	35.9	NT
30	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	26.3	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	30.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	29.8	NT
31	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
32	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
33	Negative	Escher	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
34	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood clot	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
35	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
36	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
37	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
38	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
39	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
40	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
41	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
42	Negative	Escher	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
43	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
44	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
45	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
46	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
47	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
48	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
49	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
50	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
51	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
52	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
53	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
54	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
55	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	

<sup>a</sup> Spotted fever group rickettsia.

<sup>b</sup> Threshold cycle (Ct).

<sup>c</sup> Not tested.

## 下痢症ウイルスのレファレンスにかかる研究

研究分担者	清水博之	国立感染症研究所	ウイルス第二部第二室
研究協力者	片山和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	藤井克樹	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	朴 英斌	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	戸高玲子	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	三木元博	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室

研究要旨 ヒトに感染するノーウォークウイルス（ノロウイルス、HuNoV）は、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。ロタウイルスは乳幼児の重症下痢症のウイルスとして知られている。本研究では、ノロウイルス・ロタウイルス検査におけるウイルス分離、遺伝子検査手法のマニュアル作成、及びウイルスゲノムの情報共有化を行っている。

### A. 研究目的

各ブロックレファレンスセンター（九州：沖縄：佐賀県衛生薬業センター、長崎市保健環境試験所 中国四国：愛媛衛研、広島県衛生研究所 近畿：堺市衛生研究所、大阪市立環境科学研究所 北陸中部：愛知衛研、名古屋市衛生研究所 関東甲信静：千葉市環境保健研究所、埼玉県衛生研究所医学課、北海道東北新潟：宮城県保健環境センター）との連携の下、地方衛生研究所で実施しているノロウイルス・ロタウイルス検査の状況を把握し、検査の質を向上させることが本分担研究の主な目的である。具体的には、ノロウイルス・ロタウイルス検査におけるウイルス分離、遺伝子検査手法のマニュアル作成、及びウイルスゲノムの情報共有化を目的とする。

本年度は、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すると共に、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 法の普及活動を行った。また、ロタウイルス検出マニュアルの作成、全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学ツールとして、マイクロチップ電気泳動法導入へ向けた基礎検討を行った。

### B. 研究方法

1. ノロウイルスの抗原・抗体パネルの整備を継続（GII.4 バリエントの VLP 特異的モノクローナル抗体の作製）

ノロウイルス GII.4 には、2000 年以降 2005 年までに流行したバリエント、2006/7 年に史上最大の流行を起こした 2006b バリエント、2012/13 シーズンの史上 2 番目の大流行を引き起こした GII.4 のバリエント株がある。それぞれのバリエントは、ウイルス粒子表面の突起部分（P ドメイン）に 2-3 アミノ酸の変異を有し、その抗原性をわずかに変化させ、流行を引き起こしたと考えられている。

GII.4 2004 (Narita104)、2006a (Saga-1),

2006b (Aomori), 2008a(Sakai), 2012 変異株(NI, LM)の塩基配列を人工合成して、バキュロウイルスベクターに組み込み、リコンビナントバキュロウイルスを作製した。それぞれのバリエーションのウイルス様中空粒子 (VLP) の作出を行った後、これらを用いてモノクローナル抗体を作製した。

2. 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 法の普及活動

1) IASRS 月号にノロウイルスの遺伝子型 2014 年度版を執筆した。

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

ロタウイルスは、11本の二重鎖RNAをゲノムとして持つ。11本のゲノムセグメントは、インフルエンザウイルスのようにセグメントリアソートを起こし、高頻度にリアソータントウイルスが出現する。ロタウイルスの分子疫学は、リアソータントの動向を把握することが重要である。このうち、粒子最外殻蛋白質をコードするVP7 遺伝子がG typingに、最外殻の突起物をコードするVP4 遺伝子がPタイピングに、それぞれ用いられている。ヒトに感染するロタウイルスのうち、最も典型的な株はWa型と呼ばれる G1P[8]の遺伝子型を示す株である。Waの全遺伝子セグメントを G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1と表す。ヒトノロウイルスのもう一つの主要株は、Wa型よりもマイナーなDS-1型が存在する。DS-1の全遺伝子セグメントを G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2と表す。各種セグメントのリアソータントは、便検体に大量に含まれるロタウイルスのゲノムRNAを抽出し、RNA-PAGEを行い、PAGEパターンを比較検討することで検出可能である。ラボ間差、アッセイ間差をコントロ

ールし、異なる地域、異なる実験室間でのデータ比較できれば、全ゲノム塩基配列を決定すること無く、RNA-PAGEパターン解析のみで、ロタウイルスの分子疫学が実施可能となる可能性がある。そこで、マイクロチップ型RNA-PAGEの導入の可能性についての検討を昨年につき、検討した。

4. ロタウイルス検出マニュアルを執筆した。

C. 研究結果・考察

1. ノロウイルスの抗原・抗体パネルの整備を継続 (GII.4 バリエーションの VLP 特異的モノクローナル抗体の作製)

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) の作出に成功した。これらを用いてモノクローナル抗体を作製したところ、全てのバリエーションに反応するモノクローナル抗体とバリエーション特異的なモノクローナル抗体の作出に成功した。バリエーション特異的モノクローナル抗体は、便検体のバリエーションを判定するために有用であると思われた。

これらのシードウイルスとモノクローナル抗体は、パネルとして保管した。

2. 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 法の普及活動

従来の genotyping 法は、ウイルスキャプシド蛋白質をコードする ORF2 領域の上流約 300 塩基を標的としており、ウイルスの抗原性の違いを反映する方法として広く用いられてきた。一方、新規 genotyping 法は従来の領域に加え、非構造蛋白質コード領域での genotyping も可能とした。ORF1/ORF2 ジャンクション領域で多発する

ノロウイルスゲノムの組換えにより生ずるキメラウイルス(ゲノム組換えにより、ORF1とORF2より下流では異なる genotype となるウイルスのこと)を考慮した方法として開発された。この genotyping は、Web に (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) に公開されているツールを用いて簡単に、誰でも実施することができる。

そこで、IASR に従来の genotyping 法と、新規 genotyping 法の genotype 番号対応表を作り、同時に genotyping tool の解説を加えたノロウイルス特集号を発行し、どちらの typing を行っても、互換性のあるデータが得られるようにした。さらに、レファレンス活動報告を通じて、これらの解説と互換表を配布し、国内における genotype 法規方法に関する啓発活動を展開した。

現在、次年度に向け RdRp 領域の genotyping 法の意義づけを行うため、各種 genotype の RdRp 活性の比較測定を計画している。

### 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

昨年の検討では、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た。しかし、アッセイ間変動の値を詳細に取り直したところ、移動度の近似している 3 本のバンドの移動度が誤差の中に吸収されてしまい、型判別が困難になる場合があることが分かった。この原因は、移動度測定に用いる泳動先端のマーカーと泳動後端のマーカーが

DNA であり、二重鎖 RNA の移動度を計算するための指標に成り得ないことが一因であった。そこで、x 軸方向に泳動で得られた波形を伸び縮みさせ、ピークのパターンを一致させるパターンフィッティングの手法を用いて RNA-PAGE のグループ化を実行したところ、同一配列は、ほぼ 100% 同じパターンを示すことが示された。つまり、従来のように 11 本のバンドの相対移動度を泳動先端と泳動後端マーカーから算出して数値化する方法よりも、X 軸方向に伸び縮みさせパターンのフィットを図り、一致したパターンを示した検体を、同一配列の検体として分別する方法(数値では無く、画像をベースにする)によるタイピングが優れていることが明らかになった。この方法を RNA-PAGE パターンフィッティング法と命名した。現在、国内外の標準株、臨床分離株を入手し、パターンの蓄積、自動判定ソフトウェアの開発を行っている。

### 4. ロタウイルス検出マニュアルを執筆した。

本年度までに構築した各種ロタウイルス試験法については、ロタウイルス検出マニュアルとして配布すると共に、感染研ホームページに記載した。また、啓発・普及活動としてレファレンス活動報告、稀少感染症技術研修での報告活動を実施すると共に、IASR にロタウイルス特集を組み、出版した。

### D. 結論

以上をまとめると

- (1) 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。
- (2) 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。

(3) ロタウイルス検査マニュアルを完成させた。

(4) 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。

#### E. 健康危険情報

特記事項無し

#### F. 研究発表（論文発表のみ記載）

##### 論文発表

1. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y. H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.
2. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* doi: 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.
3. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One.* 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.
4. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol.* 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.
5. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* 174, 577-583, 2014.
6. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.
7. 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014 年版 IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.
8. ロタウイルス検出マニュアル 2014 年版 国立感染症研究所・病原体検出

マニュアル

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



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

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

研究実施者： 吉田弘 国立感染症研究所ウイルス第二部  
エンテロウイルスレファレンスセンター：

福島衛研（北海道・東北・新潟）、神奈川衛研（関東・甲信・静岡）、愛知衛研（東海・北陸）、神戸市環保研（近畿）、愛媛衛環研（中国・四国）、福岡保環研（九州）

WS講師：濱崎光宏（福岡保環研）、山下育孝（愛媛衛環研）

WS参加者（8名）：荒畑沙織（静岡県）、水村綾乃（千葉市）、清水耕平（横浜市）、杉本大地（奈良県）、高橋剣一（名古屋市）、村田達海（北九州市）、辰己智香（島根県）、古舘大樹（札幌市）

研究要旨 初年度実施したエンテロウイルス検査に関するアンケート調査に基づき、内部精度管理技術ワークショップ（WS）を実施した。WSの狙いは①細胞感受性試験、②マイコプラズマ否定試験、の標準作業手順書のひな形を参加者とともに作成することとした。WSは11名が参加（うち8名は公募）し、2泊3日で実施。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。

#### A. 研究目的

感染症発生動向調査事業における5類病原体定点把握疾患としてエンテロウイルス感染症とインフルエンザは、地方衛生研究所で実施するルーチン検査の上で多くの比重を占めている。

初年度は各ブロックレファレンスセンターとの協力の下、79地方衛生研究所に対し検査体制に関するアンケート調査を行った。

うち67衛研からの回答では、エンテロウイルス検査に関する基盤的技術の研修要望が多かった。このため2年目は、検査の信頼性確保のため、地衛研職員との共同作業によりエンテロウイルス検査に関する内部精度管理に関する研修、マニュアル作成のためのワークショップを企画し実施することとした。

#### B. 研究方法

##### 1. エンテロウイルス検査に関するワークショップの企画

2014年6月26-27日に開催された衛生微生物技術協議会にて、ワークショップの開催について周知

8月WS企画調整

9月8-15日レファレンスセンターとの調整期間。

9月16-25日レファレンス委員会内の調整

9月25日地全協感染症部会より全衛研へ发出

10月10日募集締め切り（各ブロック）

10月30日結果通知

12月2-5日WS開催

##### 2. 教材準備

1) 細胞感受性試験には 1 型ポリオワクチン株 (Sabin1) を使用。WHO ポリオラポネットワークで用いる標準法にて SOP 案を作成し、WS 期間中 2 種類の細胞の感受性を比較。

2) 細胞は感染研で用意した RD-A, L20 B 細胞と、参加者が持参した細胞を比較できるようにアレンジした。(WS 終了後は研究実施者が観察を継続し、参加者に結果返付)

3) マイコプラズマ否定試験は感染研で実施するプロトコールをもとに SOP 案を作成した。細胞感受性試験用に感染研で準備した検体と、参加者が持参した検体から 2 種類のキットを用いて検出するようデザインした。

4) 細胞培養浮遊液 50ul を 95 度 10 分処理後、従来用いている①タカラマイコプラズマ PCR キットと②e-Myco Plus Mycoplasma PCR 検出キット (コスモ扱い) を用いてマイコプラズマ感染の有無を比較した。なお①は主に 11 種、②は 209 種類検出できるとされている。

5) 細胞の品質管理 (QC) に関する教材は別途準備した。

6) 感受性試験、マイコプラズマ否定試験とも、感染研で用いている細胞との比較のため、任意で持参することを事前に周知している。

## C. 結果

### 1) WS 応募結果

定員 6 名の募集に対し。九州 (7)、中国四国 (3)、近畿 (1)、北陸中部 (1)、関東甲信静 (5)、北海道東北新潟 (3) 計 20 人の応募があった

予算上(旅費)の制約から 6 名としたが、研修実施を行う村山庁舎への通勤可能な応募者にも協力いただくこととした。結果 8 名の参加者と 3 名の講師で WS を開催した。

2) 内部精度管理試験と SOP ひな形作成  
エンテロウイルス検査に必要な細胞の QA に関する資料説明後、WS 前に準備した SOP 案に基づき実習。

実習後、グループディスカッションにより改定した SOP を成果品とした。

### 3) 細胞感受性試験

同一力価の Sabin1 を使用し、現在感染研で使用する RD-A と過去分与した細胞 (持参した RD-A) をすることで、明確に感受性の違い、と形態の変化につき比較可能であった。また力価試験であるため、細胞の状況を定量的な指標として示すことが可能である。

### 4) マイコプラズマ否定試験

タカラマイコプラズマ PCR キットと② e-Myco Plus Mycoplasma PCR 検出キット (コスモ) を用いて、使い勝手の良さ、につき評価するため参加者が持参した細胞浮遊液など用いて、比較試験を行った。RD-A, L20B ではいずれもマイコプラズマ汚染は見られなかったが、一施設が提供していただいた、RD-A, L20B 以外の 2 種類の細胞では、タカラのキットは陰性、コスモのキットは陽性という結果になった。これは検出対象とする種類が大きく異なるためと考えられる。

5) 細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験の SOP について、実習終了後グループディスカッションを行い、ひな形を作成した (別添資料)。しかし SOP の項目について現状基準がないため、今後検討が必要である。なお追加すべき SOP は、細胞継代法、細胞数カウント法、培地作成法、細胞保存・リカバリー法、であり、分担して今後 SOP 案を作成する予定としている。

## D. 考察

(1) 初年度実施したアンケート調査では、ウイルス分離に用いる細胞の種類、維持、

継代法が施設間で大きくことなっていることを示した。このことはウイルス分離率に影響が想定される。WS 期間中、複数の機関で維持されている同じ系統の細胞が、異なる感受性、形態を示すことを参加者が認識。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。

(2) マイコプラズマ否定試験も細胞維持管理において重要なファクターである。今般二つのキットを比較することで、ひとつの施設が提供した細胞 2 種類でマイコプラズマ汚染が確認されている。マイコプラズマ否定試験を制度として位置付けるためには、汚染が見つかった時の措置の検討、特に細胞保管、新たなシード細胞の供給体制を確立する必要がある

(3) 細胞感受性試験におけるウイルス力価に与える影響は細胞のみならず、参照ウイルスの保管温度条件、FBS ロット、他様々な要因が存在するため、制度として位置付けるためには、各種標準品の保管、供給体制の確立も必要である。

(4) 内部精度管理は、意義を理解しないと、ワークロードが増えるだけで形式的になる恐れがある。初年度のアンケート調査により、細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験とも導入している施設はごく一部であったため、制度として普及するために、① SOP 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がある。

なおエンテロ・ポリオウイルスに関しては WHO が提供する RD-A, L20B 細胞が利用できるため感染研ウイルス二部ですでに実施している品質管理試験後、供給可能である。

(5) WS には 20 名の応募があり 8 名のみ参

加いただいた。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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

論文発表

1) 北川和寛 千葉一樹 鈴木理恵 五十嵐郁美 柏木佳子 金成篤子, 吉田学, 笹原賢司, 門馬直太, 吉田 弘 無菌性髄膜炎患者から検出されたエコーウイルス 9 型、2002～2013 年—福島県, IASR Vol. 35 p. 249-250: 2014 年 10 月号

2) 伊藤雅, 岩切章, 内野清子, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 板持雅恵, 筒井理華, 濱崎光宏, 山崎謙治 中田恵子, 吉田弘 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4～12 月) に検出されたエンテロウイルスについて. IASR Vol. 35 p. 275-276: 2014 年 11 月号”

3) 筒井理華 古川紗耶香 木村政明 工藤真哉 笹けい子, 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—青森県, IASR Vol. 35 p. 242-243: 2014 年 10 月号

4) 島津幸枝、久常有里、池田周平、東久保靖、谷澤由枝、重本直樹、高尾信一、米倉圭二、白石泰尚、谷博雄、原三千丸、吉田弘 エンテロウイルス D-68 型が検出された小児・乳児の 4 症例ー広島県 IASR Vol. 35 p. 295- 296: 2014 年 12 月号

学会発表

なし

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