

2015/7005A

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27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 28 (2016) 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27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 28 (2016) 年 3 月

平成 27 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	主任研究員
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
吉田 弘	国立感染症研究所 ウイルス第二部	主任研究官
駒瀬 勝啓	国立感染症研究所 ウイルス第三部	室長
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 27 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. BSL3 真菌取扱マニュアルの作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
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・・・・・・・・・・ 31
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株の特徴・・・・・・・・・・ 51
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・・・・・・・・・・ 57
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
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・・・・・・・・ 67
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 2015 年度活動について・・・・ 71
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.	エンテロウイルスのレファレンス・・・・・・・・・・・・・・・・	75
	研究分担者：吉田 弘（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
10.	real-time PCR 法 の利用促進に関する検討・・・・・・・・	79
	研究分担者：駒瀬 勝啓（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
11.	百日咳レファレンスセンター・・・・・・・・・・・・・・・・	85
	研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所 細菌第二部）	
12.	結核菌型別分析における精度保証・・・・・・・・・・・・・・・・	89
	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）	
13.	動物由来感染症レファレンスセンター 平成 27 年度活動報告・・・	97
	研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）	
14.	HIV 関連感染症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	103
	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）	
15.	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・・・・・・・・	105
	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）
吉田 弘	（国立感染症研究所ウイルス二部）
駒瀬 勝啓	（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、講習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性食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ま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

研究は研究代表者と研究分担者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

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成:国立感染症研究所真菌部において、BSL3 真菌の取扱マニュアルを作成した。作成したマニュアルに基づきコクシジオイデス属真菌の検査を行い、マニュアル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:季節性インフルエンザ SOP とポリオ/エンテロウイルス検査 SOP に含む項目の検討を行った。

■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:マラリアに関しては、厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会に参加した検疫所職員を対象に、検査診断法に関する技術研修と情報提供に努めた。ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は7例あり、ウエスタンプロットによる免疫学的検査および遺伝子検査を行った。クドア感染症について地研・国研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とシカ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に

陽性コントロールと共に配布し、各ブロック内に普及を図った。

■リケッチア：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。担当者のスキルアップの機会として学会・研究会等への積極的な参加と発表を推し進めた。

■エンテロウイルス：感染症法改正(H28年4月施行)にあわせ、標準作業手順書等の作製のための作業部会を開催した。

■麻疹・風疹：病原体検出マニュアルを改訂し、realtime PCR法を記載した。本法に用いるプライマー、プローブ、標準RNAを地衛研に配布した。導入状況、検査実績のアンケートを実施した。

■百日咳：*B. holmesii*のLAMP法キットおよび百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii*、*M. pneumoniae*を標的とする4PlexリアルタイムPCRキットを配布した。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：EQAの希望対象のアンケート調査を実施した。SFTSの各種動物の血清疫学を行うためのELISA系の配布とEQAを実施した。

■HIV関連感染症：衛生微生物技術協議会第36回研究会(仙台)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。特に国内の地域別発生動向に関する情報交換を進めた。

■アデノウイルス：流行性角結膜炎の検出状況に関するアンケート調査を行った。患者発生動向を調べた。

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行った。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：日本脳炎ウイルスリアルタイムPCR系を開発した。

■リケッチア：つつが虫病のPCR利便性に関して検討を行った。

C. 研究結果

■BSL3真菌取扱マニュアルの作成：コクシジオイデス属真菌等のBSL3に分類される真菌の検査を実施する上での実践的なマニュアルを作成した。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：季節性インフルエンザとポリオウイルス検査の各種技術管理文書の内容を検討した。グループディスカッションによる比較検討作業により、地衛研間の検査体制の違いを共有する機会となった。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHECのサーベイランス：2015年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全3187株であった。

1.2 コントロール株を配布し、問合せを受け付けた。

1.3 新規下痢原性腸内細菌 *Escherichia albertii* についてコントロール株を設定し、配布した。

1.4 下痢原性大腸菌EQAの実施：菌株(2014-2015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おける臨床分離株の収集状況：今年度 67 株が追加された。2015 年 3 月末現在で、合計 388 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免疫抗血清 3 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2014 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 947 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：2014 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 74 症例あった。最も多く分離された型は T1 型で全体の 39.2%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 74 例中、*emm1* 型が 29 例(39.2%)で最も多かった。

3.4 *emm89* 型株を特異的に検出する PCR 法の開発を試みた。

■カンピロバクター

1. Lior 法及び Penner 法による血清型別：2014 年に分離された *C. jejuni* 388 株を Lior 法および Penner 法で型別を行った。

2. PCR 法による型別法の検討：Penner 血清型別を遺伝子レベルで型別するマルチプレックス PCR を行うことで 10 種血清群の型別が可能となった。

3. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2014 年分離の *C. jejuni* 380 株のキノロン耐性株 (NA、NFLX、OFLX、CPFY) の割合は、57.1%、*C. coli* 17 株では、82.4%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 1.3%、*C. coli* では 24.7%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. マラリア：厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会では、全国 13 検疫所本所及び 3 空港検疫所支所 (東京空港、中部空港、福岡空港) から、検疫所職員が合計 21 名参加した。

2. エキノコックス症：ヒトの疑診例 7 例中 1 例が遺伝子検査・抗体検査ともに陽性で、多包性エキノコックス症と診断され、北海道との関連が認められた

3. クドア感染症：有症苦情事例の情報に関しては、全国の地研に積極的に提供することになった。

4. 肺吸虫症：検査したイノシシ 30 頭のうち、9 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 20 件の参加があった。

2. *Corynebacterium striatum* 感染症によるアウトブレイク事例の調査：分離菌の同定を行い、PFGE によるパターン解析・質量分析を行い、両者の解析結果は必ずしも一致しなかった。

3. *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) によるアウトブレイク事例の調査：79 患者から採取された 99 検体において分離培養を行い、84 検体において *Clostridium difficile* が分離培養された。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱患者をウイルス学的に確定するためのリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) のプライマー&プローブは、2016 年 2 月 1 日、WHO 緊急事態宣言を受けて、多くの全国の地方研究所に普及が計られた。

2. 日本脳炎ウイルス：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 I 型、III 型および V 型に対する共通検出系が確立され、十分な感度と特異性を有していた。

■リケッチア

1. 全国情報の共有：レファレンスセンター会議等を利用し、日本紅斑熱患者の増加傾向の再確認、患者発生地拡大、死亡例の増加に加え、輸入感染症に関する情報共有を行った。各施設の準備状況に合わせた体制構築を進めるとともに、各ブロック内の衛研等にも必要に応じ抗原分与・技術供与等を行い、全国の診断体制維持の継続的活動を試みた。

2. 担当者のスキルアップとブロック毎の活動：感染源対策ならびに発生の指標になる各地域に特有のベクター分布、保有リケッチア種、血清型を調査検討するための技術共有、指導、普及を各ブロックで行った。西日本では SFTS を、東日本・北日本では新興回帰熱なども考慮し、マダニ媒介感染症全体を俯瞰できるような活動が行われた。

3. つつが虫病の PCR 利便性に関する検討：56 kDa の *Orientia tsutsugamushi* type-specific antigen に対する one-tube nested PCR について検討を行ったところ、これまで検査現場レベルで有効とのデータが上がりつつあり、継続検討を行っている。

■エンテロウイルス：13 名（エンテロウイルスレファレンスセンター及びインフルエンザコアサポートセンター）の参加者とオブザーバー4 名で作業部会を開催した。検討した技術文書は最終的に「検査施設における病原体検査の業務管理要領」のひな形として反映されることとなった。

■麻疹・風疹

1. real-time PCR 用プローブ、プライマー、標準 RNA を合成し、73 地衛研に配布した。標準 RNA の送付には RNA stable

(Bio-matrica, Inc) を採用した。

2. 導入状況アンケート結果：試薬配布の約 5 ヶ月後に real-time PCR の導入状況のアンケートを実施した。55 カ所で real-time PCR をすでに実施しているか、実施を検討していた。マニュアルに従って実施した 54 カ所のうち、49 カ所で「標準 RNA を用いた系の最適化」を実施していた。うち、39 カ所において、最適化条件を満たす試験系を確立していた。

3. 平成 27 年の麻疹検査状況の調査：各地衛研で実施した麻疹検査診断の状況を調査した。アンケートで集計された、地衛研が検査した症例数は 1045 症例、そのうち 42 症例から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。

■百日咳

1. レファレンス関係：地衛研 11 施設へ *B. holmesii*-LAMP キット 2 件、4Plex リアルタイム PCR キット 10 件を配布した。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株における Prn 欠損株の出現状況は減少傾向にある。

3. マクロライド耐性菌の調査：2010 年以降の国内臨床分離株の EM に対する耐性菌は不検出であった。

■抗酸菌：

1. 内部精度管理用検体の提供と外部精度評価の実施：内部精度管理用結核菌 DNA を希望施設すべての 53 施設、アガロースゲル電気泳動用 VNTR マーカーを 45 施設、QIAxcel 用 VNTR マーカーを 6 施設に配布した。外部精度評価は 53 施設が参加した。

2. VNTR 分析に利用しているローカセット：各施設の分析対象ローカセットを調査し、JATA (15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 34、28、15 であり 2014 年度とほぼ同様の傾向であった。

3. 外部精度管理の正答施設数：各施設で 3

株の外部精度評価用検体を JATA(12)で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは 46 施設 (92%) であった。各分析法におけるローカセットの正答率、各ローカスの正答率を評価した。

4.PCR 産物のサイズ測定方法:2014 年同様にアガロースゲル電気泳動による分析を行っている施設が最も多かった (66%)。

■動物由来感染症: SFTV 抗体検査 ELISA 系を 19 地衛研に配布し、EQA を行った結果、14 地衛研で感染研とほぼ同等の成績が得られた。

■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。HIV・AIDS 報告件数は関東・甲信越、近畿に多い状況であったが、九州の件数が初めて東海を上回り、近畿に次ぐ報告数となった。特に沖縄県では、人口 10 万対での HIV 感染者件数が 47 都道府県中 3 位、AIDS 患者件数が 1 位であった。

■アデノウイルス: 80 箇所の地方衛生研究所に対してアンケート調査を行い、68 施設から回答を得ることができ、12 施設で 54 型の検出がみられた。流行性角結膜炎の発生動向を調べた結果、2015 年の患者数が最も多かった。

D. 考察

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成: 真菌症検査の中でも通常の施設では困難な BSL3 に分類される真菌を取り扱うためのマニュアルの作成および検証を行った。空気中に飛散しやすく、病原性の高い BSL3 真菌本研究で作成した取扱マニュアルは検査の関

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。BSL3 の病原体検査における安全性の確保および品質・精度の向上のためにも病原体取扱マニュアルの作成は基本である。他の飛散しやすく検査室汚染に繋がりがやすい病原体でも作成され、病原体検査の安全性確保のための基盤となることが期待される。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集: これまで、検査体制について担当者レベルで協議する機会はあまりなく、本研究班による作業部会による検討を行ったことは実務者間で協議する機会となった。分担研究班で扱った疾患はポリオと季節性インフルエンザであり、今後も、他の疾患の検査体制を施設横断的に討議することは必要と考えられる。

■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. 大腸菌 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: 長年の菌株の収集・解析により、データが蓄積したので、有意義な情報が地方自治体や、医療機関に還元できるようになった。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、30 価の M タンパクワクチンが開発中である。咽頭炎由来株の TB3264/*emm89* 型の流行を追うことは重要である。

■カンピロバクター: 食中毒事例等の原因究明に、血清型別成績を活用することを考えると、現在の型別率では不十分であり、型別率の向上が急務である。特に、血清群 B 群の型別率の低下が著しいことから、B 群血清の力価の低さが問題視された。さらに

検討が必要であると考えられた。

■ 寄生虫：各検疫所におけるマラリアの検査方法に関しては、今後、検査診断法に関する技術研修を定期的実施することで、状況の改善を試みる。エキノコックス症流行地の拡大が懸念されることから、従来の発想とは異なる監視体制の構築が急務である。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：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。今回のアウトブレイク事例では、管轄保健所が公衆衛生学的重要性を認識し、緊密な連絡を取りながら対応した。

3. *Corynebacterium* 属菌：本菌による医療関連感染事例については、どの機関においても経験が無かったが、前例や経験が無くても、ネットワーク内で情報共有し協力して対応していくことが必要であると考えられた。

■ ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱 (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。ブラジルでは4000人に及ぶ小頭症児が報告され、妊婦のジカウイルス感染との関連が強く疑わ

れるに至り、2016年2月1日にWHOが緊急事態宣言を出すに至った。ジカウイルス遺伝子検出系の配備について、アルボウイルスレファレンスセンターの機能が発揮できた。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である。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さらに整えておく必要がある。そのため、今後感染研が保有するジカウイルスをアルボウイルスセンターに配備する必要があると思われる。

2. 日本脳炎ウイルス：より高感度で特異性の高い遺伝子型 I・III・V型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。

■ リケッチア：つつが虫病も日本紅斑熱も、リケッチア症は、有効な抗菌薬により治療可能であるにも関わらず、いまだ死に至る感染症である。レファレンスセンター等でも情報共有したように、現に今年度はこれまでにない数の日本紅斑熱の死亡例が報告された。治療可能な疾患の死亡例をなくすためにも、地域特性を考慮しながらも全国情報も随時更新共有でき、適切な情報発信ができるレファレンスセンターの存在意義は高く、その維持・活動は、地域の医療と公衆衛生に大きな貢献になると考えられる。

■ エンテロウイルス：レファレンスセンターの協力を得て季節性インフルエンザとポリオウイルス検査の各種技術管理文書の内容を検討した。全国調査を目的とする場合、一定の質の確保が求められることから、施設内における技術管理は望ましい。このため人、物、予算の投入を行う必要があるが、

病原体検査体制は自治体の裁量によるところが大きい。本研究では、現行の資源を有効活用しつつ、実務的に最小限の信頼性確保を行うための、検査体制構築を考慮した。

■麻疹・風疹：麻疹の症例数が減少した現在の日本では、抗体検査と遺伝子検査が確実に実施される体制が望まれている。本年度は real-time PCR 法を地衛研に広く周知する事に主眼をおき検討した。試薬の配布、アンケートの実施が多く、地衛研で導入を検討するきっかけになったと考えられた。

■百日咳：遺伝子検査キットを地衛研に配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。今後も検査キットの配布を続ける必要がある。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、中国では北東部で高頻度に分離され、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：昨年度、本年度の外部精度評価により、本邦において VNTR 分析系が適切に導入されつつあることが確認された。結核分子疫学調査では、VNTR 情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのためには VNTR 分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられる。

■動物由来感染症：最終的に参加した 19 地衛研のうち、14 地衛研に関しては EQA により動物からの SFTSV 抗体検出が問題なく出来ることが確認された。各地衛研で有害動物として駆除されたり、狩猟期に捕獲

された動物の血清を収集できれば、経年的に SFTSV 抗体陽性率の推移を調査して SFTS 患者発生リスクを把握することが出来ると考えられる。

■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、地域別にみると、近年、九州における HIV/AIDS 報告件数の増加が認められ、人口 10 万対での報告件数では、特に沖縄が極めて高い件数となっていることに留意が必要と考えられた。

■アデノウイルス：一部の地域では全く眼科の病原体サーベイランスが動いていない状況と推察され今後の改善が必要と考えられる。54 型は日本でのみ流行しており、流行性角結膜炎の症状が 8 型と同様に重篤であることが推察されるので、さらなる研究が必要である。

E. 結論

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成：BSL3 真菌検査のための病原体取扱マニュアルを作成した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：本研究班で検討した技術文書（添付文書）は、平成 27 年 11 月 17 日付けの厚生労働省健康局結核感染症課課長通知（健感発 1 1 1 7 第 2 号）「検査施設における病原体検査の業務管理要領」の別添資料として発出された。

■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求められ、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：従来から実施している Lior 法（自家血清）と Penner 法（市販血清）法の型別率を比較したところ、Penner 法による型別率が低いことが確認された。原因については、現在も検討を行っている。PCR 法による型別を検討し、その有用性が確認された。しかし、日常業務に用いるためには、今後、型別可能な血清群を増やすこと、多数検体について検査を実施するために、その操作性を簡便にすること等が課題である。

■寄生虫：エキノコックス症に関する監視体制は改築の必要もあり、地研をはじめ、医療機関等への情報提供を行いつつ、積極的に発生情報を収集する必要がある。また、監視体制をより効率的に運用するためには、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の簡易な検査方法の開発と普及に加え、既知流行地で利用されている歩哨動物（ブタなど）が利用可能であるかどうか評価を進める必要がある。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：過去に「ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会」に参加した施設において、実際の事例で検

査が成功し、講習会の成果と考えられた。

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んで対処すること、さらに、地域での感染実態の調査へ繋げていくこと、が重要と思われた。

■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、南米に侵入したジカウイルス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にプライマー、プローブセットおよび陽性コントロールを提供した。日本脳炎ウイルス遺伝子型 I・III・V 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を開発し、地方衛生研究所に情報提供した。

■リケッチア：国内での多様性ととともに、地域特性の強いリケッチア症の対応においては、レファレンスセンターの維持とともに、マニュアル等の既存のものから発展させられる知識・技能の蓄積をもつ経験のある衛研職員の維持と確実な技術継承が必須である。このことは、さまざまな感染症を含め、コンタミネーション等の対策やラボの信頼性を高めることにもつながる。

■エンテロウイルス：感染症法改正(H28年4月施行)にあわせ、H26年度作成した各種標準作業書類を、省令と整合性を取るべく内容を再検討した。実務者レベルで検査体制の違いを認識、共有しつつ、検査標準作業書の内容についてグループディスカッション形式で討議した。検討した技術文書は最終的に「検査施設における病原体検査の業務管理要領」のひな形として反映されることとなった。

■麻疹・風疹：麻疹遺伝子検査法として real-time PCR 法の周知や導入を促す方法

を検討した。プライマーやプローブの配布やアンケートの実施は real-time PCR 法の導入を促す効果があったと考えられた。一方、「系の最適化」が不十分である地衛研もあった。精度管理を通じて、技術の向上や検査の普及を諮り、ネットワークの機能を強化、維持し、質の高いサーベイランス体制を維持していく事が、麻疹、風疹の排除の達成、維持に必要なと考えられた。

■百日咳：地方衛生研究所を対象に百日咳遺伝子検査キット（12 件）の配布を行った。また、百日咳菌の国内臨床分離株を解析し、わが国では 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：国内結核菌型別に用いられている JATA（12）のローカセットによる 3 株の分析では、2014 年度と比べて 2015 年度は多くの施設から正答と完全一致する結果が報告された。また、2014 年度の外部精度評価で精度不良を認めた 5 つのローサイにおいても高い正答率（99–100%）が示された。VNTR 情報の蓄積と他施設との情報共有を推進するためには精度保証が重要であり、分析精度の維持と向上を支援する継続的な活動が必要と考えられた。

■動物由来感染症：血清診断として ELISA をほとんど実施していない地衛研があり、幾つかの問題点が明らかになったが、今回参加した 19 地衛研のうち 14 地衛研では、動物からの SFTSV 抗体検出が可能であることが EQA により確認できた。

■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。このネットワーク体制は、病原微生物検出情報（IASR）2015 年 9 月号の特集

HIV/AIDS 2014 および特集関連情報作成にも貢献した。

■アデノウイルス：2015 年に流行性角結膜炎の大規模な国内流行がみられた。地方衛生研究所に対するアンケートを 5 類定点疾患である流行性角結膜炎について実施した。検出数が最も多かったのは 54 型で九州・関東を中心に全国的に見られた。54 検出地域の関東、九州等において流行性角結膜炎が過去 5 年のうち最大規模で観察された。眼科定点からの検体提出があつて検査がなされていない自治体があり、感染症発生動向調査の改善が望まれた。

F. 健康危険情報

■ジフテリア・ボツリヌス：*Corynebacterium* 属菌は、血液などの無菌材料から分離されても検体採取時のコンタミネーションと考えられがちである。しかし、*Corynebacterium* 属菌のなかでも、特に *Corynebacterium striatum* は重篤な感染症を引き起こし、さらには医療関連感染の原因となりうることを、情報発信していく必要がある。*Clostridium difficile* 感染症は、欧米では社会的に注目され、国として自治体として感染管理施策が進められているが、日本では、自治体はもちろん医療機関においても関心・理解が低い。行政として、本感染症の認識度を上げ、感染実態を調査し、感染管理を行っていく必要がある。

■リケッチア：日本紅斑熱患者発生地が徐々に広がっているため、常に情報のアップデートと発信、現場対応体制の見直しが必要である。

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

■動物由来感染症：感染症発生動向調査で

は、本年 1 月 27 日時点で 170 人の SFTS 患者が報告されていて年齢中央値は 74 歳である。 5～8 月の患者発生が多く、西日本を中心に 20 府県で患者が発生している (<http://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html>)。

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

BSL3真菌取扱マニュアルの作成

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
	名木 稔	国立感染症研究所	真菌部
	星野泰隆	国立感染症研究所	真菌部

研究要旨 バイオセーフティーレベル3 (BSL3) に分類される3種病原体
コクシジオイデス病原体検査において、安全性を確保し、品質・精度を
維持・向上させるため実践的な取扱操作マニュアルの作成とそのマニ
ュアル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
所におけるBSL3に分類される真菌の検査のための取扱マニュアルを作
成し、これ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、
他の飛散しやすく検査室汚染に繋がりがやすい病原体に関する検査を行
う際に本報告書の取扱マニュアル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・向上のためにも病原体検査マニュアルの作成およびアップデートが必須となってきている。

BSL3 に分類されているコクシジオイデス属真菌は、分生子となって空气中に飛散しやすく、検査室汚染事故を引き起こしかねないため、特段の注意が必要となる。現状では、真菌を取り扱う地衛研は限られているが、BSL3 病原体を取り扱う施設も少なくない。将来的には、BSL3 真菌を取り扱う可能性も否定できない。

本研究では、飛散しやすい病原真菌の取扱マニュアル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、BSL3 真菌の取扱マニュアルを作成した。作成したマニュアルに基づきコクシジオイデス属真菌の検査を行い、マニュアル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

コクシジオイデス属真菌等の BSL3 に分類される真菌の検査を実施する上での実践的なマニュアルを作成した。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、2016年1月現在試験運用中のマニュアルの概要を附1に示す。

D. 考察

真菌症検査の中でも一般の施設では困難

な BSL3 に分類される真菌を取り扱うためのマニュアルの作成および検証を行った。空気中に飛散しやすい特性を有する、病原性の高い BSL3 真菌について、本研究で作成した取扱マニュアル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。BSL3 の病原体検査における安全性の確保および品質・精度の向上のためにも病原体取扱マニュアルの作成は基本である。本報告書で示すような検査マニュアルが飛散しやすく検査室汚染に繋がりがやすい他の病原体でも作成され、病原体検査の安全性確保のための基盤となることが期待される。

E. 結論

BSL3真菌検査のための病原体取扱マニュアルを作成した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 梅山隆、宮崎義継. 播種性クリプトコックス症の感染症法に基づく届け出について. モダンメディア. 61(7):10-15., 2015 年.
2. 堀内一宏、掛屋 弘、金子幸弘、宮崎義継. 健常人に生じ、治療に難渋した肺クリプトコックス症を合併した脳クリプトコックス症. 感染症学雑誌. 第 89 巻第 3 号付録. 15-20., 2015 年.
3. Asano M, Mizutani M, Nagahara Y, Inagaki K, Kariya T, Masamoto D, Urai M, Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y, Mizuno M, Ito Y. Successful Treatment of *Cryptococcus laurentii* Peritonitis in a Patient on Peritoneal Dialysis. Internal Medicine. 54(8):941-4, 2015.
4. Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang D, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K,

Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. Infection and Immunity. 83(4):1577-1586, 2015.

5. Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages.. J Infect Chemother. 21(12):831-6., 2015.

学会発表
国際学会
該当なし

国内学会

1. 上野 圭吾・金城 雄樹・金子 幸弘・大野 秀明・亀井 克彦・二木 芳人・宮崎 義継. *Cryptococcus gattii* を制御する樹状細胞療法はサイトカイン産生 CD4 細胞を誘導する. 第 63 回日本化学療法学会総会. 6 月 4-6 日, 2015 年, 東京.
2. 上野 圭吾・浦井 誠・水口 裕紀・大河内 香代・宮崎 義継・金城 雄樹. 病原性真菌 *Cryptococcus gattii* に対する樹状細胞ワクチンとその感染制御作用 -ワクチンで誘導される Th1/Th17 応答と多核巨細胞の形成について-. 第 26 回日本生体防御学会総会. 7 月 10-12 日, 2015 年, 東京.
3. 上野 圭吾・金城 雄樹・浦井 誠・大久保 陽一郎・清水 公德・金子 幸弘・亀井 克彦・大野 秀明・二木 芳人・澁谷 和俊・宮崎 義継. 樹状細胞ワクチンを用いた高病原性 *Cryptococcus gattii* に対する感染制御機構の解析. 第 59 回 日本医真菌学会総会. 10 月 9 日-10 日, 2015 年, 札幌.

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