

BSL3真菌 取扱操作手順 (国立感染症研究所・真菌部)

★タイムテーブル

*Day -1	検体到着
Day 0	検体開封 釣菌 (*グローブボックス内アルコール消毒)
*Day 1	(*グローブボックス消毒 片付け)
Day 7	ストック作製
Day 14	DNA・鏡検サンプル採取

*大量の胞子が飛散する場合のオプション

Blastomyces dermatitidis
Coccidioides immitis (三種) (*C. posadasii*)
Histoplasma capsulatum
Histoplasma farciminosum
Paracoccidioides brasiliensis
Penicillium marneffe

1. 検体の開封

- Day -1 (Option) 到着した検体(二次容器)を24時間静置
安全キャビネット内で開梱 チェック
- Day 0 二次容器を安全キャビネット内で開封
- 一次容器の保安全性チェック
- 形態観察 デジカメ撮影記録
- グローブボックスへの器具持ち込み(図1参照)
 - ・PBS-T シャーレ等に注ぐ
 - ・消毒用アルコールスプレー
 - ・白金耳 袋の口を切っておく

2. 釣菌 (Day 0)

- ☑ 釣菌手順
 - ・検体を入れ側面テープをはがし、30分静置
 - ・白金耳 取り出し
 - ・斜面培地 開栓
 - ・白金耳先をPBS-Tで湿らせる
 - ・釣菌 (飛散させないためにごく少量にする)
 - ・ストリーク (鏡検、ストック、DNAの3本)

- ☑ グローブボックス・検体表面消毒、取り出し
 - ・Day0 ボックス内部の消毒
 - ・ボックス内を次亜塩素酸で消毒
 - ・ボックス内消毒用アルコールスプレーにて消毒
 - ・Day1 検体の消毒
 - ・ボックス内および検体表面の消毒 (次亜塩素酸)
 - ・検体をボックス外 (安全キャビネット内) に移動
 - 直ちに検体表面を消毒 (次亜塩素酸)
 - ・ボックス内壁、外表面の消毒

3. ストック作製、DNA抽出、鏡検 (Day 7*, Day 14*)

- ☑ Day7 菌の発育 形態観察 デジタルカメラ撮影記録
3本の斜面培地 BHI (0.01% Tween80)、70% EtOH、36% ホルマリン
シリンジでそれぞれ20ml注入する
不活化期間は穴が開いた部分をビニールテープでふさぐ

- ストック BHI (0.01% Tween80)
→培地に浸漬状態で7 cm注射針を用いて表面をこそげ取る
500 μ lを分取
500 μ l BHI (40% glycerol)と混合し、-80°C保存

- ☑ Day14 (図2参照)

- DNA 70% EtOH→液を持って、寒天を10cmシャーレ上に
菌体部分をカミソリで切り取り
5 mm角数個を500 μ l PBS (0.01% Tween80) に→100°C、10 min

- 鏡検 ホルマリン→液を持って、寒天を10 cmシャーレ上に
菌体部分をカミソリで切り取り
2mm角をスライドガラス上に
ラクトフェノールコットンブルー液1滴
カミソリでみじん切り
カバーガラスで圧迫

*発育の状況で前後する

4. 消毒時注意事項

実験操作中 消毒手順

1. ダブルグローブで操作する
2. 汚染が発生したら、ペーパータオル→次亜塩素酸タオルで消毒する
3. アウターグローブを廃棄して脱出する
4. 新たなアウターグローブをつけて操作に復帰する

実験操作終了後 消毒手順

0. 適宜アウターグローブを次亜塩素酸タオルで消毒する
1. 次亜塩素酸タオル、消毒エタノールタオル、廃棄物の入ったオートクレーブバッグ以外を消毒し、安全キャビネット外に出す
2. 次亜塩素酸タオルで作業台面を消毒する
3. 次亜塩素酸タオルでオートクレーブバッグ表面を消毒する
4. 消毒エタノールタオルで作業台面を消毒する
5. タオル2枚とアウターグローブをオートクレーブバッグに入れ、口を縛って外に出す
6. オートクレーブバッグを一回り大きいバッグに入れ、オートクレーブ処理する

図1 グローブボックス内見取り図

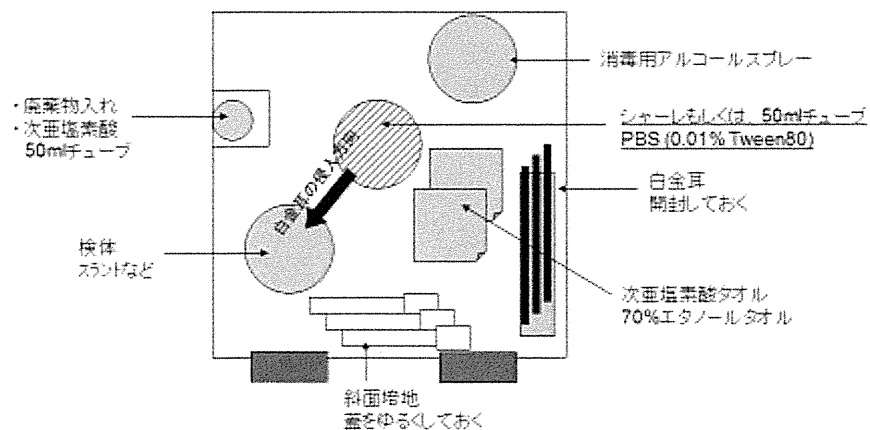
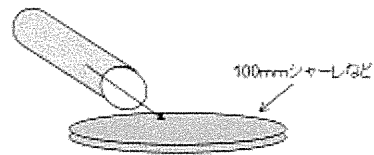
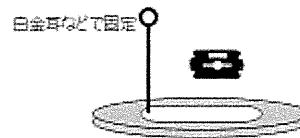


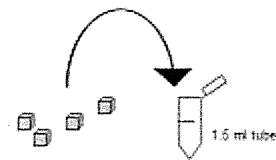
図2 斜面培地からの菌の切り出し



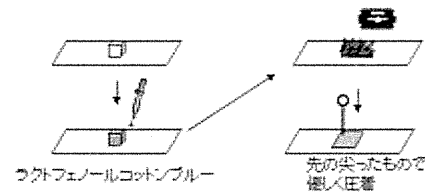
1. 白金耳や注射針でまるごと



2. カミソリで菌部分の切り取り



3. 500 μ l PBSに寒天片を数個
(DNA抽出用、エタノール浸漬)



3. スライドガラス上でみじん切り
(鏡検、ホルマリン浸漬)

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
前川 純子 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 категория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。2015年も3,500例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,200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*: EAggEC]）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*、*pileE*、*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

2015 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3,187 株であり、主な血清群として、O157 (53.9%)、O26 (25.5%)、O111 (4.8%)、O121 (3.1%)、O103 (3.0%)、O145 (2.4%)、O91 (0.9%)、O165 (0.5%)、その他 (5.8%) があげられる。

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サブタイプ検出用コントロール株の配布を次の各衛生研究所等：豊橋市保健所、和歌山県環境衛生研究センター、沖縄県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、岡山県環境保健センターへ

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。

1.3 *Escherichia albertii* コントロール株の設定と配布

新規下痢原性腸内細菌として同定されている *E. albertii* について、大分県衛生環境研究センターの協力でコントロール株および検出用 PCR 系を設定し、必要に応じてコントロール株を分与することが可能となった。

1.4 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 (2014-2015 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、67 株が追加された (表 1、2014 年以前の分離株 14 株を含む)。すべて *Legionella pneumophila* で、血清群 (SG) 1 が 61 株、SG3、4、6、8、9、13 が各 1 株だった。感染源が、浴槽水と推

定・確定されている例は 28 例 (42%) だった。推定感染源からの環境分離株と PFGE が一致した例は 6 例あった。4 例は浴槽水分離株で、1 例は冷却塔水、1 例は散水ホースによる 2011 年の事例である。今年度も昨年度と同数の 6 例の土壌による感染の可能性が推定されている。他に、シャワーが感染源の疑い事例などがあった。

2015 年 3 月末現在で、合計 383 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた (集団感染事例由来の重複している株を含めると 388 株)。図 2 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 375 株 (97.9%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 84% を占めた。

L. pneumophila については遺伝子型別を行っており、結果を随時返却している。375 株は、ST1 から ST1966 まで 175 種類の遺伝子型に分けられた。遺伝子型と菌が生息する環境に関連性が見られており、遺伝子型別は感染源を推測する手がかりになると考えられる。

2.2 レジオネラ免疫血清の委託作製

今年度は、*Legionella sainthelsi* 1 群および 2 群と、*Legionella jordanis* の免疫抗血清を試作した。これまでも、*Legionella anisa*、*Legionella longbeachae* 1 群、2 群、*Legionella londiniensis* 1 群、2 群、*Legionella feeleeii* 1 群、2 群など、わが国で分離されるレジオネラ属菌の免疫抗血清を試作してきた。市販されている 5 菌種の抗血清と、これまで試作してきた抗血清とを併せると、レジオネラ菌種同定キットである DDH レジオネラ ‘極東’ が 2015 年で販売中止となったため、それを補完するための抗血清として有効である。

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 群レンサ球菌の菌株総数は、947 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、TB3264 (257/947, 27.1%)、T12 (179/947, 18.9%)、T4 (136/947, 14.4%)、T1 (113/947, 11.9%) であった。TB3264 型の分離比率は、2010 年に急激に上昇し、2014 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%、2014 年, 27.1%)。T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。2010 年に分離頻度が減少した T4 型は、それ以降増加傾向にある (2010 年, 5.6%、2011 年, 9.8%、2012 年, 10.9%、2013 年, 11.7%、2014 年, 14.4%)。2011 年最も分離比率の高かった T1 型は、2014 年さらに減少した (2011 年, 31.1%、2012 年, 26.8%、2013 年, 12.1%、2014 年, 11.9%)。 (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

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 (STSS) の報告が 74 症例あった。70 例が *S. pyogenes*、4 例が *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による症例であった。

最も分離された型は、T1 型であり、2013 年と比較して分離比率が増加した (2013 年, 26.2%; 2014 年, 39.2%)。また、咽頭炎由来株の分離比率 (11.9%) に比べ、高い分離比率を示している。次いで、TB3264 型が多く、その分離比率は昨年と比較して減少した (2013 年, 31.1%; 2014 年, 16.2%)。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 74 例中、*emm1* 型が

29 例(39.2%)と最も多く、次いで *emm89* 型が 12 例(16.2%)、*emm3* 型が 4 例(5.4%)と多かった。

2013 年と比較し、*emm1* 型は、26.2% (16/61)から 39.2% (29/74)に増加し、*emm89* 型は 31.1% (19/61)から 16.2% (12/74)に減少した(図 5)。

3.4 *emm89* 型株を特異的に検出する PCR 法の開発

emm89 型株を特異的に検出する PCR 法の開発を試みた。その結果、検査した *emm89* 型において PCR 産物が見られたが、他の *emm* 型では増幅産物が見られなかった(図 6)。

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 2015-2016 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

L. pneumophila 血清群 1 株の臨床分離株と環境分離株について、遺伝子型別を行い、環境分離株の由来により遺伝子型に特徴があることが明らかとなり、臨床分離株がとられたレジオネラ症患者の感染源の種類とも関連があることが推測された。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。

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、30 価の M タンパクワクチンが開発中である。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)。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.

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 143 (4): 864-872 (2015).

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) 松田正法、重村久美子、徳島智子、吉田英弘、佐藤正雄、廣瀬みよ子、門司慶子、石津尚美、竹中 章、前川純子：病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市、病原微生物検出情報 2015. 36(1) : 13-14.

4) Tomizawa Y, Hoshino Y, Sasaki F, Kurita N, Kawajiri S, Noda K, Hattori N, Amemura-Maekawa J, Kura F, Okuma Y. Diagnostic utility of splenic lesions in a case of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med. 2015. 54:3079-3082.

5) Kaneko M, Maruta M, Shikata H, Hanayama M, Ikebe T. Acute abdomen due to group A streptococcus bacteremia caused by an isolate with a mutation in the *csrS* gene. J Infect Chemother. 21 (11): 816-819 (2015)

6) 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 143 (4): 864-872 (2015).

実用新案登録
特記事項内なし
その他
特記事項内なし

7) 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 21 (3): 207-211 (2015).

8) 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 21 (2): 144-147 (2015).

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

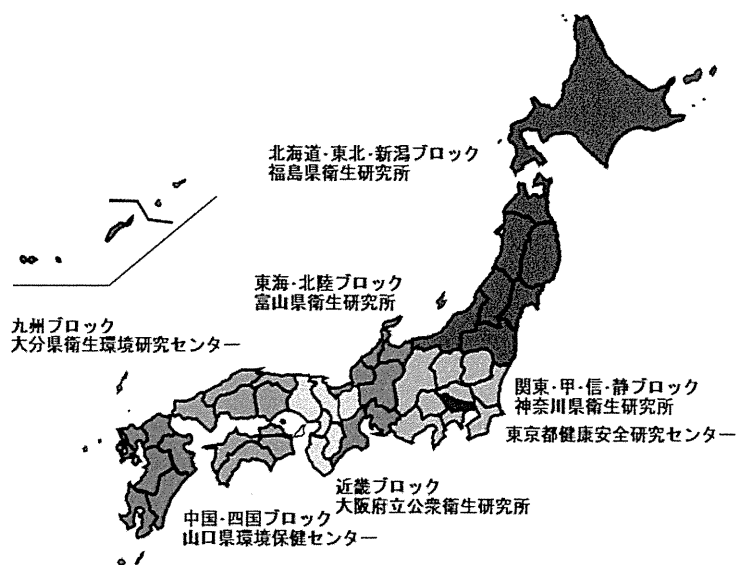


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

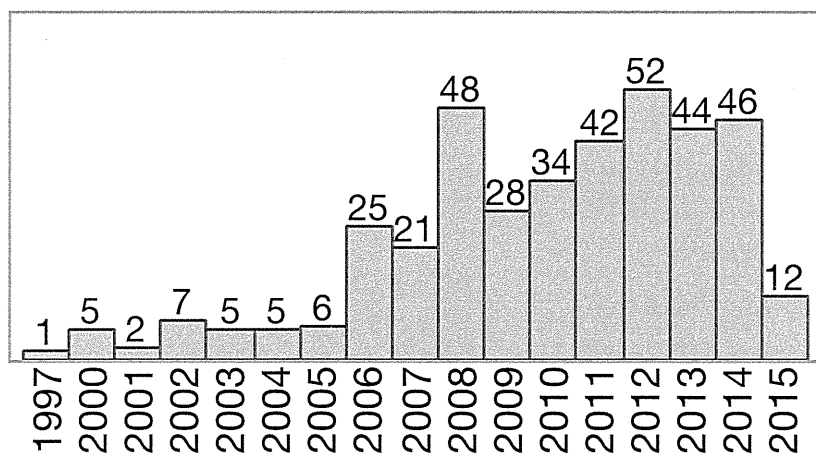


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2015年6月現在)

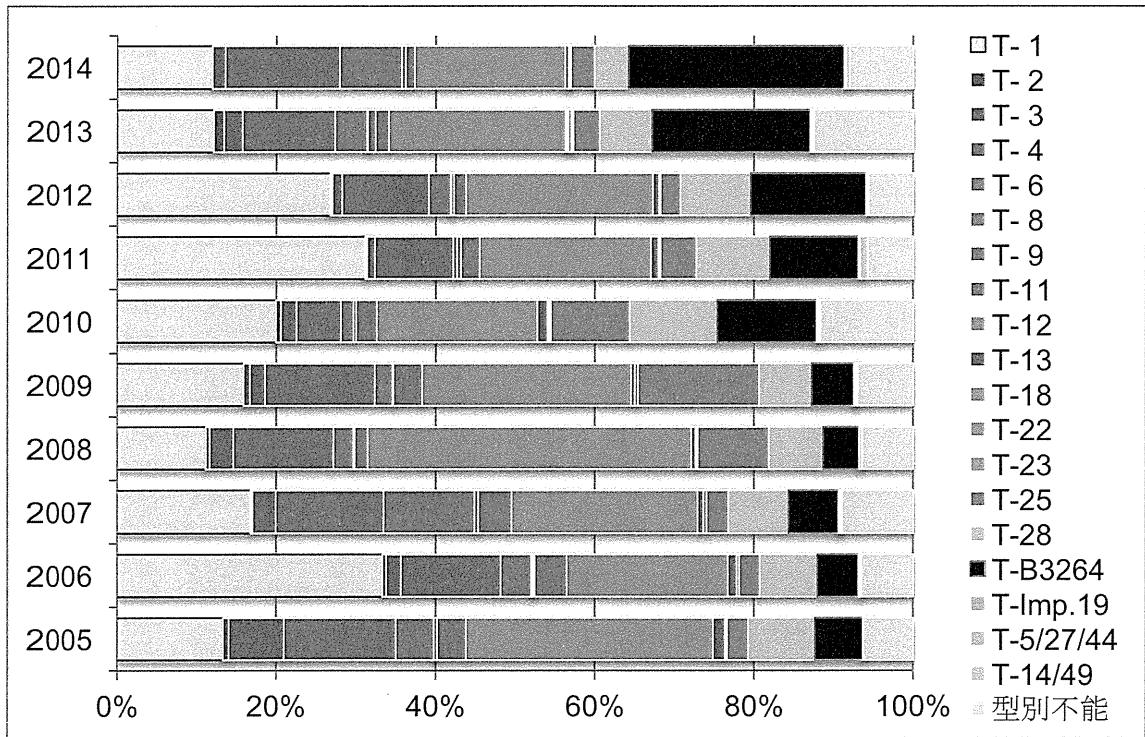


図3 咽頭炎由来株の T 型別 (2005-2014)

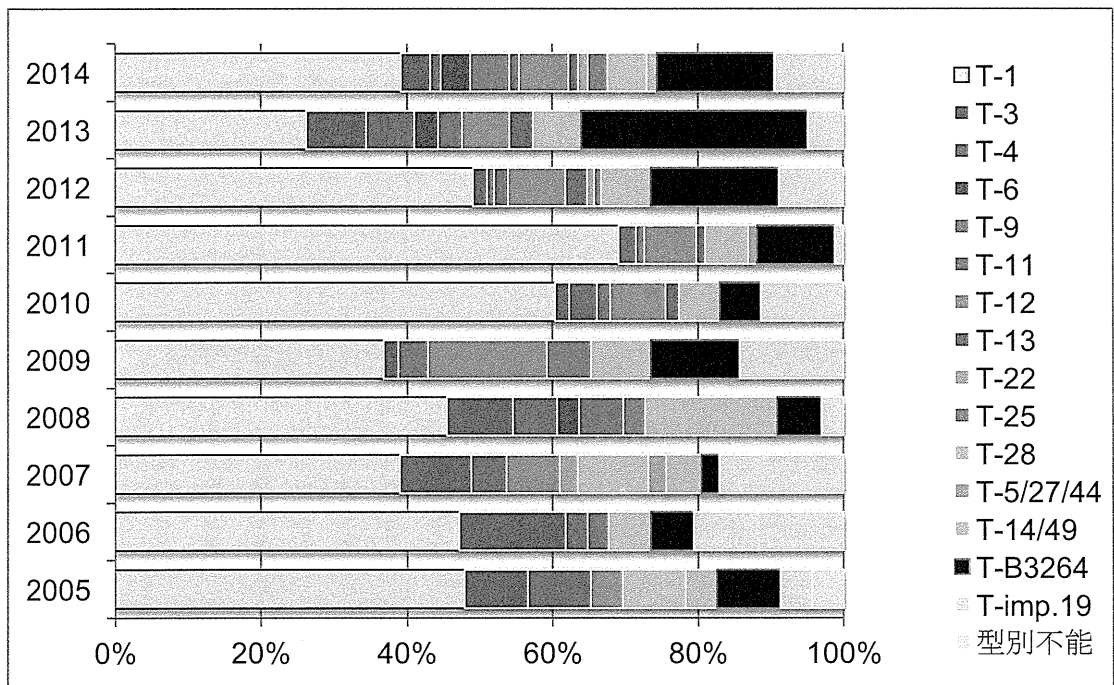


図4 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の T 型別 (2005-2014)

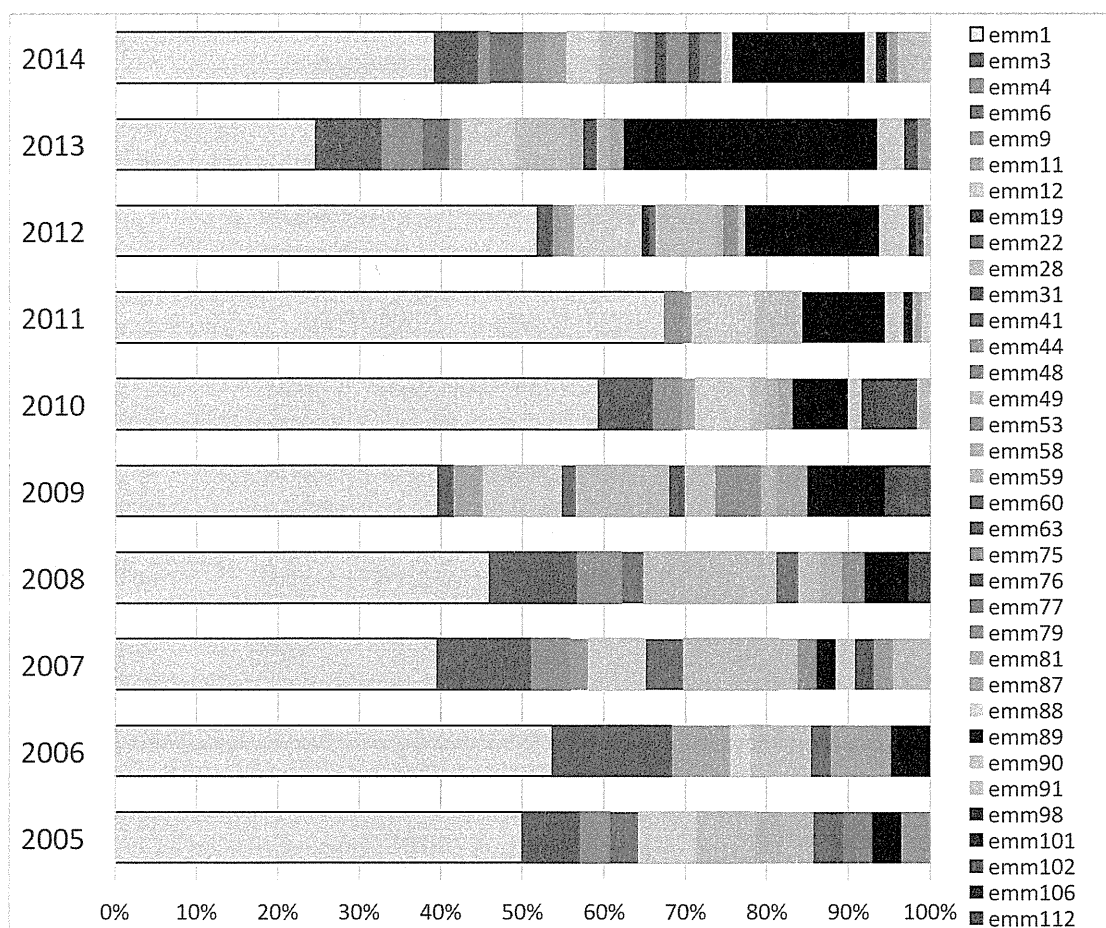


図5 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の emm 型別 (2005-2014)

emm89を特異的に検出するPCR

emm89遺伝子型の検出

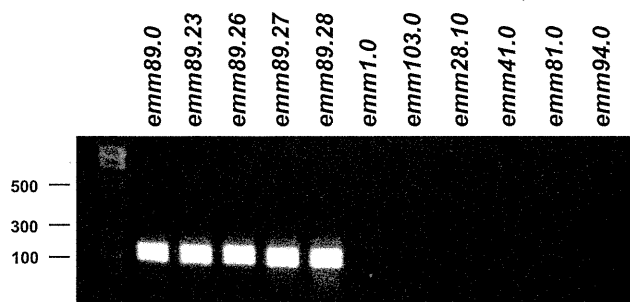
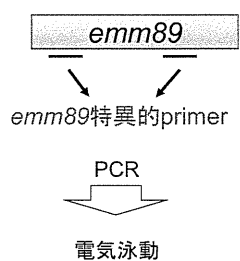


図6 emm89型株特異的PCR法の開発

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

「地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集」

研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	高橋雅輝 滝澤剛則 長島真美、秋葉哲哉 皆川洋子、安井善宏 加瀬哲男 山下育孝 濱崎光宏 川上千春 吉田弘	岩手県環境保健研究センター 富山県衛生研究所 東京都健康安全研究センター 愛知県衛生研究所 大阪府立公衆衛生研究所 愛媛県立衛生環境研究所 福岡県保健環境研究所 横浜市衛生研究所 国立感染症研究所

研究要旨 感染症法一部改正（H28年4月施行）にあわせ、季節性インフルエンザの検査に関するマニュアル、および検査体制について、改正された省令と整合性を確保し、統一したものとするため、地方衛生研究所の作業部会にて内容を検討した。検討したマニュアル等は厚生労働省に提出し、「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た。

A. 研究目的

平成28年4月1日施行予定の感染症法の一部改正にともない、1) 地方衛生研究所が準備すべき季節性インフルエンザの検査（ウイルス分離、realtime PCR）に関する標準作業書のひな形を作成するとともに、2) 季節性インフルエンザの検体について地方衛生研究所が実施すべき検査数、検査方法等について検討する。

B. 研究方法

1. 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（吉田分担研究者との共同開催）

感染症法改正（H26年11月21日公布、感染症の情報収集強化に関する事項はH28年4月施行）にあわせ、平成26年度厚生労働科学特別研究「科学的根拠に基づく病原体

サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」（研究代表者 調恒明 山口県環境保健センター）において作成した各種 SOP 案を、省令と整合性を取るよう内容を検討した。特別研究報告書では、2 類感染症等、入院勧告などの行政措置が伴う検査と、季節性インフルエンザ等、病原体の流行を全国的に把握する 5 類定点における病原体検査目的の違いを考慮して、検査の質を管理することを提言の一部内容としている。報告書に基づく提言は第10回感染症部会（平成27年5月）にて了承され、省令改正、通知が整備されることとなった。

このため 5 類定点把握疾患の代表として、地方衛生研究所で作成すべき標準作業書のひな形として利用するため、季節性インフルエンザ検査、2 類疾患の代表としてポリオウイルス検査に必要な SOP の記載項目、

内容を比較するため、作業部会にて検討することとした。

ア. 季節性インフルエンザ、ポリオ検査に関わる SOP 検討作業部会の開催（国立感染症研究所ウイルス第 2 部吉田弘研究員との共催）

1) 作業部会開催

2015 年 8 月 10-11 日

2) 参加者

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有志）

オブザーバー 5 名（感染研 4 名、厚生労働省 1 名）

3) グループディスカッションによる討議

ポリオウイルス検査、季節性インフルエンザ検査に関わる SOP 案は参加者に事前送付した。作業部会では 3 班に分かれ、下記の項目ごとに討議を行い、標準作業書に記載する内容について検討を行った。項目は 1. 検査項目、2. 検体の種類、3. 検査方法、4. 作業環境、5. 試薬等に関する事項、6. 検体等の取扱方法、7. 機械器具に関する事項、8. 検査操作上の注意点、9. 検査の手順、10. 検査に関する記録の作成要領及び保管方法、11. 検査を実施するために必要な資格に関する事項、12. 作成及び改定年月日、である。グループディスカッション後、各班が検討結果を発表し、参加者間で討議し、ポリオウイルス検査、季節性インフルエンザ検査に含める項目及び内容（記載の程度）について合意形成を図った。作業部会終了後、電子メールを用いて参加者間でさらに検討を重ね、ポリオウイルス検査 SOP、季節性インフルエンザ検査 SOP とともに、エンテロウイルスレファレンスセンター、インフルエンザコアサ

ポートセンターの意見を反映させることとした。

C. 研究結果

1. レファレンスセンター有志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。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。

2. 季節性インフルエンザ検査において、各地方衛生研究所において分離及び遺伝子検査を実施するが、全国調査を目的とする場合、検査方法を標準化した上で、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が望まれる。

3. 一定の検査体制を確保するためには、人、施設、予算の前提が必要であるが、病原体検査体制は自治体の裁量によるところが大きいため、本研究では、現行の人的、物的資源を活用しつつ、必要と思われる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。

D. 考察

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。

E. 結論

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 111

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。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

論文発表

1. 調恒明. 地域保健法制下の地方衛生研究所の現状、課題と将来像. 公衆衛生 80 (1): 37-43, 2016.
2. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. Sci Rep. 2015 Sep 4;5:13806.
3. Kawase J, Etoh Y, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. Improved multiplex real-time SYBR Green PCR assay for analysis of 24 target genes from 16 bacterial species in fecal DNA samples from patients with foodborne illnesses. Jpn J Infect Dis. 2015 Jul 10.
4. Kimura H, Saitoh M, Kobayashi M, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Tsukagoshi H, Shirabe K, Nishina A, Kozawa K,

Kuroda M, Takeuchi F, Sekizuka T, Minakami H, Ryo A, Takeda M.

Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus. Sci Rep. 2015 Jul 1;5:11648.

5. Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. J Infect Dis. 2015 Mar 11.
6. 調恒明. 地方衛生研究所の感染症危機管理機能の現状と強化に向けて. 公衆衛生 79 (1): 2-3, 2015.

学会発表

国際学会

該当無し

国内学会

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

平成 27 年 9 月 10 日

季節性インフルエンザ（五類感染症）の病原体定点サーベイランスについて

厚生労働省健康局結核感染症課

課長 井上 肇 様

地方衛生研究所全国協議会

会長 調 恒明（山口県環境保健センター）

副会長 田原なるみ（東京都健康安全研究センタ

ー）

副会長 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

副会長 皆川洋子（愛知県衛生研究所）

感染症対策部会長 四宮博人（愛媛県立衛生環境研究所）

感染症法の一部改正に基づく季節性インフルエンザの病原体検査について、第 10 回厚生科学審議会において報告し承認された平成 26 年度厚生労働科学研究「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」（研究代表者：調 恒明）に基づき、地方衛生研究所の検査体制について以下の通り集約した。法律改正によって、検査の質の確保が制度化されると同時に、季節性インフルエンザについては検体数及び検査方法が、平成 28 年 4 月 1 日改正法施行に向けて省令及び通知により定められる予定であると認識している。

なお、検体数の設定と結果の報告は、迅速なインフルエンザ亜型の決定と情報提供を基本としており、これと共に可能な限り速やかに薬剤耐性、抗原性の変化の解析を行うことを目的としている。

1. 季節性インフルエンザの検査検体数

検体採取に関して、流行期と非流行期に分けて対応するが、いずれの時期もインフルエンザ（臨床診断による Influenza-like Illness を含む）の検査は実施することとする。都道府県単位のインフルエンザ患者定点あたりの患者数が 1 以上となった場合に流行期に入ったと判断し、1 を下回った時を流行の終息とする。これまでのインフルエンザの発生状況を踏まえると 16 週程度と想定される。従って、それ以外の期間である非流行期は 36 週程度である。

	流行期（16 週程度を想定） 定義：各都道府県単位の患者定点あたり 1 以上を超えて開始し、1 を下回ったときに終了。	非流行期（36 週程度） 定義：流行期以外
検体提出頻度	週ごと	月ごと

頻度ごとの検体数	1 検体	1 検体
予想総検体数	16 週×530 病原体定点×1 検体 =8,480 検体	9 か月×530 病原体定点×1 検体 =4,770 検体

2. 季節性インフルエンザの検査方法

規定数の検体については、全例リアルタイム PCR を行う。リアルタイム PCR の結果、陽性となった検体のうち半数以上についてウイルス分離を行う。リアルタイム PCR 法とウイルス分離を同時に行ってもよい。すべての都道府県においてウイルス分離が行われる必要がある。分離されたウイルスのうち、H1N1 pdm については原則として全例について薬剤耐性マーカー検出のための検査を行う。また必要に応じて、HI, HA 試験による抗原性の解析、遺伝性配列決定による系統樹解析を行う。

3. 季節性インフルエンザの検査結果の報告

検査の結果を可能な限り迅速に報告し、感染対策、医療体制に資するため、結果の報告については以下の通りとする。

	隔週（2 週間以内）（流行期）	月報（非流行期）	年報
報告内容	-検査結果（陽性・陰性） -型・亜型 -薬剤耐性の有無（可能な限り）	-検査結果（陽性・陰性） -型・亜型 -薬剤耐性の有無	左記に加え -抗原性解析結果

4. 地方衛生研究所における季節性インフルエンザ検査の流れ

地方衛生研究所における季節性インフルエンザ検査の流れを図に示し（別添 1）、その標準作業書ひな形（案）を別添 2（ウイルス分離）及び別添 3（リアルタイム RT-PCR 検査）とする。