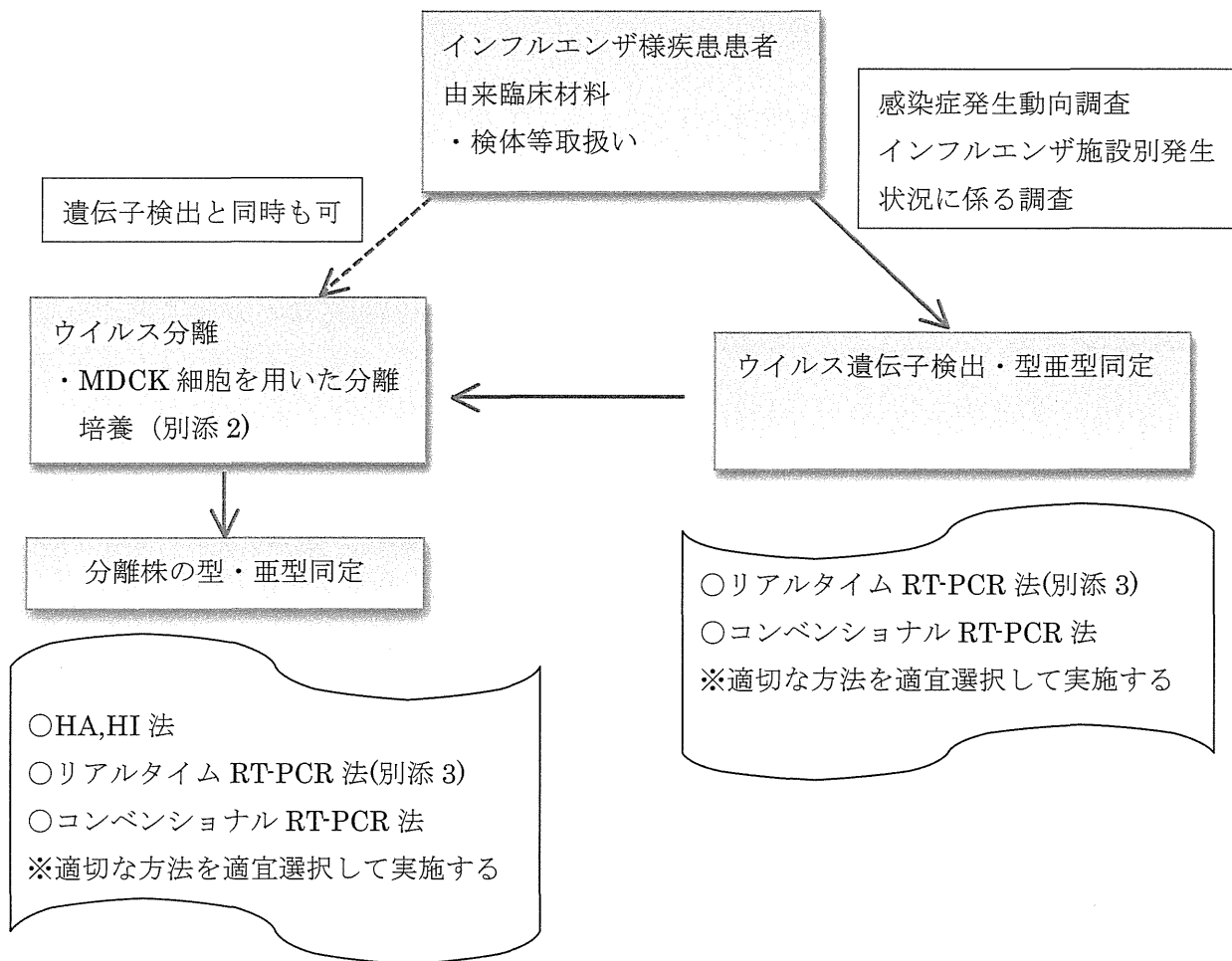
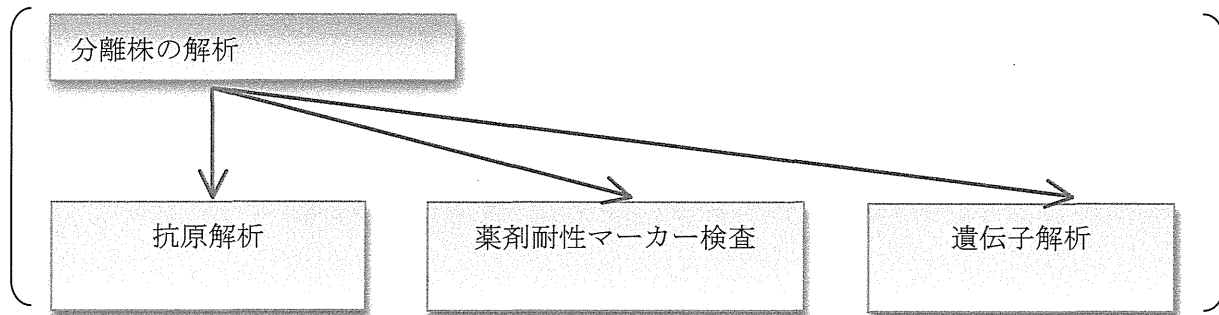


地方衛生研究所における季節性インフルエンザ（五類感染症）検査の流れ



以下の [ ] 内の項目は、一部の亜型等に対して必要に応じて実施する



注 1：図示した項目に加えて、試薬の調製・管理、機器の管理・保守点検、検査結果報告（検査成績書発行、NESID 入力を含む）、検査に関する記録の作成、従事者の研修等に関する手順書・記録簿・マニュアル等を準備することが望ましい。但しこれらの手順書・記録簿等が他のウイルス等の検査手順において既に整備されている場合は、共用若しくは省略することができる。

注 2：手順に従って検査を実施中に、インフルエンザ以外のウイルスや、使用中の試薬に反応を示さない変異株の分離・検出等が疑われ、積極的疫学調査・感染症発生動向調査、若しくは調査研究が必要と考えられる場合は、追加検査若しくは解析等を実施する。

## 検査実施標準作業書

SOP No.            B-1

試験品の種類        咽頭ぬぐい液等

検査項目            インフルエンザウイルス分離

試験法              インフルエンザ診断マニュアル第 3 版  
                          (平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日         平成 27 年        月        日

改訂年月日         平成     年        月        日

作 成 者            ウイルス課 ○○○○

承 認 者            □□□□□  
(検査部門責任者)

失効日              平成     年        月        日

〇〇県保健環境研究所  
保健科学部 ウイルス課

## 検査実施標準作業書

[インフルエンザウイルス分離]

	年 月 日	作成・改訂者署名	承認者署名	改訂理由
作 成	平成 27 年 8 月 19 日	〇〇〇〇	□□□□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 1 0 回改訂				

〇〇県保健環境研究所

保健科学部 ウイルス課

# 「季節性インフルエンザウイルス分離」標準作業書

## 1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス分離

## 2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

## 3 検査法

### 出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版（平成26年9月 国立感染症研究所監修）

### 原理

MDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離

## 4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

検体接種：第〇無菌室（BSL2）の安全キャビネット内

## 5 検査に使用する試薬

### 1) 試薬

① MDCK細胞の単層培養（組織培養用12.5cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコ）

② DMEM液体培地（SIGMA）同等品

③ ペニシリン/ストレプトマイシン（GIBCO）同等品

④ ファンギゾン溶液（250 µg/ml）（GIBCO）同等品

⑤ アセチルトリプシン（10 mg/ml）（SIGMA）同等品

⑥ リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）（GIBCO）同等品

### 2) 分離用培地の調整

試薬	最終濃度	使用量
DMEM	—	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン G 100 µg/ml ストレプトマイシン	5 ml
アムホテリシン B	0.5µg/ml	1 ml

## 6 検査に使用する機械器具

### 1) 器具

- ① 天秤（クボタ）同等品
- ② ボルテックスミキサー（デルタミキサー Se-08）同等品
- ③ 炭酸ガス培養装置（パナソニックヘルスケア MCO-170AICUVH）同等品
- ④ 冷却遠心器（KUBOTA 6000）同等品
- ⑤ 超低温槽（パナソニックヘルスケア MDF-594AT）同等品
- ⑥ マイクロ冷却遠心器（KUBOTA 1920）同等品
- ⑦ マイクロピペット（ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000  $\mu$ l）同等品
- ⑧ 倒立顕微鏡
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 冷蔵庫
- ⑪ 高圧蒸気滅菌器（平山製作所 HV-50）同等品
- ⑫ 安全キャビネット

### 2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管（15 ml）
- ④ マルチプレート
- ⑤ フィルター付き滅菌チップ（P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P-200 用、P-1000 用）
- ⑥ ピンセット

## 7 検体等の取扱

### 1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

### 2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

### 3) 検体の保存

処理済みの検体は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で保存することが望ましい。

## 8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- ② 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心する。
- ③ 分離、同定の作業の際はクラス 2 以上の安全キャビネットを使用する。
- ④ 観察記録を記入する。(必須項目：接種日、CPE 確認日、観察終了日)

## 9 検査の手順

接種に供する細胞は、「清浄区域」で準備することが望ましい。

### 1) MDCK 細胞シート法<sup>\*1</sup>

24 well プレート<sup>\*2</sup>を使用する方法

- ① 単層培養したプレートから培養液を除去し、PBS+, Medium, Hanks 液等 1 ml で洗う。
- ② 接種試料を 0.1 ml 接種する。
- ③ 30～60 分 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）でウイルスを吸着させる。
- ④ 0.5～5 µg/ml アセチルトリプシン添加 - 分離用培地を 1 ml 加えて 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）で培養する。
- ⑤ 7 日後までに CPE が認められない場合は回収し、その 0.1 ml を新たな well に継代(blind passage)接種する。(標準検査は CPE を認めない場合 2 継代目<sup>\*3</sup>で終了する)
- ⑥ CPE が全体に広がったら培地を全量回収する。

注意

\*1: 24 穴プレート以外のプレート及びチューブ若しくは培養フラスコを使用しても差し支えない。

\*2: インフルエンザ診断マニュアル第 3 版に記載されている MDCK 細胞浮遊培養法で行っても差し支えない。

\*3: 状況に応じて 3 継代目以上も行う。

### 2) 分離株の保存

分離されたウイルス株は-80℃以下で保存する。

### 3) 分離株の取扱い

分離株は、HI 試験、リアルタイム PCR 等による同定・型別を行い、抗原性解析等に供する。

## 10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取日、検体搬入日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検査台帳に記載する。
- ② 検査記録（細胞名、検体接種日、検体番号、観察記録、観察終了日）を記録用紙に記載する。
- ③ 検査結果を成績書に記載する。

### 2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

## 11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。(案)

## 検査実施標準作業書

SOP No.            B-2

試験品の種類      咽頭ぬぐい液等

検査項目           季節性インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査

試験法             インフルエンザ診断マニュアル第 3 版  
(平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日        平成 27 年        月        日

改訂年月日        平成    年        月        日

作 成 者           ウイルス課 ○○○○

承 認 者           □□□□□  
(検査部門責任者)

失効日             平成    年        月        日

〇〇県保健環境研究所  
保健科学部 ウイルス課



## 検査実施標準作業書

[インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査]

	年 月 日	作成・改訂者署名	承認者署名	改訂理由
作 成	平成 27 年 8 月 19 日	〇〇〇〇	□□□□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

〇〇県保健環境研究所

保健科学部 ウイルス課

## 「季節性インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査」標準作業書

### 1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス（五類感染症）のリアルタイム RT-PCR 検査

### 2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

### 3 検査法

出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版(平成26年9月 国立感染症研究所監修)

原理

リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe) を用いたインフルエンザウイルスの検出

### 4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2 かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

RNA 抽出：第〇無菌室

試薬の調製：準備室内の安全キャビネット

陽性コントロールの調製：準備室内のクリーンベンチまたは安全キャビネット（試薬の調製とは別の場所）

リアルタイム RT-PCR 反応：第〇検査室

### 5 検査に使用する試薬

#### 1) 試薬

- ① QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 同等品
- ② Ethanol(99.5%) (和光純薬) 同等品
- ③ QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 同等品
- ④ RNase Inhibitor (20 nits/ µl ABI) 同等品
- ⑤ Distilled water DNase・RNase free (和光純薬) 同等品
- ⑥ リアルタイム RT-PCR 用プライマー及びプローブ  
(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

MP-39-67For 5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC

MP-183-153Rev 5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA

MP-96-75ProbeAs 5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ : 146bp

(AH1pdm09\*1 亜型同定用)

AH1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-swH1 TaqMan Primer-F1 5'

AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT

NIID-swH1 TaqMan Primer-R1 5'- TGT'TTCACAATGTARGACCAT

NIID-swH1 Probe2 5'-(FAM)CAGCCAGCAATR'TTRCATT'TACC(MGB)

PCR 産物の長さ : 187bp

\*1:AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない。

(H3 亜型同定用)

H3HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H3 TaqMan Primer-F1 5'- CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA

NIID-H3 TaqMan Primer-R1 5'- GTCATTGGGRATGCTTCCATT'TGG

NIID-H3 Probe1 5'-(FAM)AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG(MGB)

PCR 産物の長さ : 178bp

(H1\*2 亜型同定用)

H1HA 遺伝子 (A ソ連型) 検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H1 TaqMan Primer-F1 5'- CCCAGGGYATTTTCGCYACTATGAG

NIID-H1 TaqMan Primer-R1 5'- CATGATGCTGAYACTCCGGTTACG

NIID-H1 Probe1 5'-(FAM)TCTCAAAYGAAGATACTGAACT(MGB)

PCR 産物の長さ : 133 bp

\*2: H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない

(B 型同定用)

TypeB NS 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-B TaqMan Primer-F1 5'- GGAGCAACCAATGCCAC

NIID-B TaqMan Primer-R1 5'- GTKTAGGCGGTCTTGACCAG

NIID-B Probe1 5'-(FAM)ATAAACTTTGAAGCAGGAAT(MGB)

PCR 産物の長さ : 105 bp

(B 型ビクトリア系統同定用)

Type B ビクトリア系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

TypeB HA F3vic v2 5'-CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATG

TypeB HA R3vic v2 5'-GTTGATARCCTGATATGTTCGTATCCTCKG

FAM-Type B HA Victoria 5'-(FAM)TTAGACAGCTGCCTAACC(MGB)

PCR 産物の長さ： 98 bp

(B 型山形系統同定用)

Type B 山形系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

TypeB HA F3yam v2 5'-CCTGTTACATCCGGGTGCTTYCCTATAATG

TypeB HA R3yam v2 5'-GTTGATAACCTKATMTTTTCATATCCTCTG

FAM-Type B HA Yamagata 5'-(FAM)TCAGGCAACTASCCAATC(MGB)

PCR 産物の長さ： 98 bp

## 6 検査に使用する機械器具

### 1) 器具

- ① ボルテックスミキサー (デルタミキサー Se-08) 同等品
- ② マイクロ遠心機 (スピンドウン用) 同等品
- ③ 冷却遠心器 (KUBOTA 6000) 同等品
- ④ 超低温槽 (パナソニックヘルスケア MDF-594AT) 同等品
- ⑤ マイクロ冷却遠心器 (KUBOTA 1920) 同等品
- ⑥ マイクロピペット (ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000  $\mu$ l) 同等品
- ⑦ 7500 Fast Real-Time PCR System (ABI) 同等品
- ⑧ 高圧蒸気滅菌器 (平山製作所 HV-50) 同等品
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 安全キャビネット
- ⑪ クリーンベンチ
- ⑫ 製氷機

### 2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管 (15 ml)
- ④ マイクロチューブ (1.5 ml、2.0 ml)
- ⑤ MicroAmp Fast 8-Tube Strip(0.1 ml) または MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode(0.1 ml)(ABI) (使用機器に対応した器材)
- ⑥ MicroAmp Optical 8-cap Strip または MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI) (使用機器に対応した器材)
- ⑦ フィルター付き滅菌チップ (P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P-200 用、P-1000 用)

## 7 検体等の取扱

### 1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

## 2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

## 3) 検体の保存

処理済みの検体は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で保存することが望ましい。

## 8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- ② 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心する。
- ③ リアルタイム PCR は高感度な検出法であるため、コンタミには十分注意する。試薬の調整とサンプルを混合する場所は分けることが望ましい。RNA 抽出からサンプル混合においては動線を遡ることのないよう留意して作業する。
- ④ 検査記録を記入する。(必須項目：検査日、検査結果)

## 9 検査の手順

### 1) RNA 抽出

#### (1) 検体の前処理

- ① 1.5 ml チューブに Carrier RNA を添加した Buffer AVL 560  $\mu\text{l}$  を予め分注する。
- ② 処理済みの検体あるいは陰性対照 140  $\mu\text{l}$  を ①に入れ、サンプルと Buffer を充分混合するため 15 秒間 Vortex にかき、室温 ( $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。
- ③ エタノール (96~100%) 560  $\mu\text{l}$  をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、スピンドウンする。
- ④ 混合液 630  $\mu\text{l}$  を QIAamp スピнкаラム (2 ml コレクションチューブ付) に注入し、蓋を閉め、 $6,000\times g$  (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。
- ⑤ QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、残りの液 630  $\mu\text{l}$  を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (サンプル量が 140  $\mu\text{l}$  のときには、通常この操作は 2 回で終わる)。
- ⑥ QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、Buffer

AW1 500  $\mu$ l を入れる。

- ⑦ 蓋を閉め、6,000 $\times$ g(8,000rpm)で1分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい2mlのチューブに移す。ろ液の入っているチューブは捨てる
- ⑧ QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500  $\mu$ l を加え、20,000 $\times$ g (14,000rpm)で3分間遠心する。
- ⑨ QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき1.5 mlのチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- ⑩ QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60  $\mu$ l を加え、蓋を閉めて1分間置いた後、6,000 $\times$ g (8,000rpm)で1分間遠心する。
- ⑪ このろ液が抽出 RNA であり、直ちに使用しない場合、抽出 RNA は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。

## 2) リアルタイム RT-PCR

### (1) カクテルの調製

- ① 表1. に従い必要な分量(検体数+陰性コントロール+陽性コントロール+予備1)を1.5 ml チューブ(滅菌済み)にまとめて調製し、MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode(0.1 ml)または MicroAmp Fast 8-Tube Strip(0.1 ml)の所定の位置に20  $\mu$ l ずつ分注する。

表 1.

試薬	容量	最終濃度
2 $\times$ QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l	1 $\times$
Forward primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
Probe (5 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.1 $\mu$ M
QuantiTect RT Mix	0.25 $\mu$ l	
RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l	
RNase free Water	3.65 $\mu$ l	
RNA template	5 $\mu$ l	
Total 容量	25 $\mu$ l	

### (2) RT-PCR 反応 (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合)

- ① 7500 Fast Real-Time PCR System を起動し、サンプルリストの作成、反応チューブのセッティングを行い、「Start RUN」を押し、反応を開始する。
- ② RT-PCR 反応は、Standard モードで使用し以下の反応条件で行う。  
50 $^{\circ}\text{C}$  30分、95 $^{\circ}\text{C}$  15分、(94 $^{\circ}\text{C}$  15秒、56 $^{\circ}\text{C}$  75秒)  $\times$  45回(約3時間分)

### (3) 結果の解釈と判定

検査結果の判定は、以下の条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つ事ができなかった事が推察されるので、原因を究明した上で再検査を行う。

- ① 各々の検出系で陽性コントロールに蛍光シグナルの立ち上がりがあり、かつそれが予測された Ct 値の範囲内であること。
- ② 全ての陰性コントロールについて、規定のサイクル内において蛍光シグナルの立ち上がりが確認されないこと。

## 10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取日、検体搬入日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検体台帳に記載する。
- ② 検査記録（検査実施日、検体番号、リアルタイム RT-PCR 結果）を記録用紙に記載する。
- ③ 検査結果を成績書に記載する。

### 2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

## 11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。(案)

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

カンピロバクターの型別方法の検討と分離株の特徴

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	横山 敬子	東京都健康安全研究センター
	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	坂田 淳子	大阪府立公衆衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	亀山 光博	山口県環境保健センター
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所

研究要旨 7ヶ所のカンピロバクターレファレンス支部センターで、2014年に散発下痢症患者から分離された*Campylobacter jejuni*（以下*C. jejuni*）株について、Lior法およびPenner法による血清型別を実施した。Lior法では388株中286株（73.7%）、Penner法では388株中187株（48.2%）が型別された。Penner 型別法に関し、市販血清を用いたPHA法およびマルチプレックスPCR法との型別率を比較したところ、PCR法の型別率が高くその有用性が示唆された。2014年分離株のキノロン系薬剤に対する耐性率は、*C. jejuni* で 57.1%、*C. coli* では82.4%であった。EM耐性率は *C. jejuni* で 1.3%、*C. coli* では 35.3%であった。

#### A. 研究目的

カンピロバクターレファレンスセンターでは、Lior 型別用血清の作製および Lior 法による *C. jejuni* 分離菌株の血清型別を実施している。しかし、近年、*C. jejuni* の血清型別法として、耐熱性抗原を認識する Penner 法（市販血清）が主流となってきた。さらに、地方衛生研究所職員の頻繁な人事異動や、予算の削減等により、カンピロバクターレファレンスセンター事業として、型別用血清の安定的な供給が困難となりつつある。

そこで、本レファレンスセンターとして、血清型別方法を Lior 法から Penner 法に切

り替えることを、各支部センター間で検討した。従来実施してきた Lior 法（自家調製血清）と Penner 法（市販血清）の両型別法の比較を行い、問題点および改良点について検討した。また、Penner 法による型別を、PCR 法を用いて遺伝子学的に型別する方法について検討した。

さらに、薬剤耐性菌の出現状況についても引き続き調査した。

#### B. 研究方法

1. カンピロバクター血清型別レファレンス支部センター  
支部センターおよびその所管地区は以下



のとおりである。北海道・東北・新潟地区：秋田県健康環境センター， 関東・甲・信・静地区：東京都健康安全研究センター， 東海・北陸地区：愛知県衛生研究所， 近畿地区：大阪府立公衆衛生研究所， 中国・四国地区：山口県環境保健センター（広島県を除く中国地方）， 広島市衛生研究所（広島県及び四国地方）， 九州地区：熊本県保健環境科学研究所

## 2. Lior 法及び Penner 法による血清型別

各支部センターで分離された *C. jejuni* を対象に，自家調製血清を用いた Lior 法による型別，及び市販血清（デンカ生研）を用いた Penner 法による型別を行った。各方法の概要は表 1 に示した。

## 3. 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 法を検討した。

現在，PCR 法による型別が実施可能なものは，市販 Penner 血清 25 種類のうち 10 種類の血清群である。その内訳は，A 群 (HS1, HS44)，B 群 (HS2)，C 群 (HS3)，D 群 (HS4, HS13, HS50)，F 群 (HS6)，G 群 (HS8)，I 群 (HS10)，L 群 (HS15)，R 群 (HS23/36, HS53) および Z2 群 (HS41) である。プライマーは，Poly F., *et al.* (*J. Clin. Microbiol.*, 49:1750-1757, 2011) の方法を改変した。

## 4. 薬剤耐性菌出現状況の把握

エリスロマイシン (EM)，ナリジクス酸 (NA)，ノルフロキサシン (NFLX)，オフロキサシン (OFLX)，シプロフロキサシン (CPFX) の 5 薬剤を供試し，米国臨床検査標準委員会 (CLSI) の方法に従い，センシディスク (BD) を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。

## C. 研究結果

1. Lior 法および Penner 法による血清型別  
2014 年に本レファレンスセンターで散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 388 株の Lior 法による型別成績をまとめた。最も多く検出された血清型は LI0 4 ; 86 株 (22.2%)，続いて TCK 1 ; 21 株 (5.4%)，LI0 1 ; 17 株 (4.4%)，LI0 7 ; 16 株 (4.1%) であった (表 2)。

Penner 法による型別成績は，O 群 34 株 (8.8%) が最も多く検出され，次いで B 群 21 株 (5.4%)，L 群 21 株 (5.4%)，G 群 20 株 (5.2%) であった。UT 株は，201 株 (51.8%) で，2013 年の 47.9% よりやや増加し，依然として型別不能株の割合は高い状況である (表 3)。

## 2. PCR 法による型別法の検討および臨床分離株での試行

Poly らの方法を用いた PCR 法による型別では，一部の型の反応性が低下することが確認されたため，マルチプレックス PCR 法の反応系を 2 本から 4 本に分けた。また，Penner B 群の型別用プライマーの増幅サイズが，原法では 62bp で判定が難しいため，増幅を 102bp となる様にプライマーを改良した。

2012~2014 年にヒトから分離された *C. jejuni* 90 株について PHA 法および改良 PCR 法により Penner 型別を実施した。その結果，PHA 法では 33%，PCR 法では 72.2% が型別でき，PCR 法の有用性が示唆された。

## 3. 薬剤耐性菌出現状況の把握

2014 年分離の *C. jejuni* 380 株中のキノロン (NA, NFLX, OFLX, CPFX) 耐性株は，57.1% で，本レファレンスで耐性菌出現率を調査してきた中で最も高いものであった。*C. coli* 17 株では，その 82.4% がキノロン耐性株であった。

一方、カンピロバクター下痢症の治療のための第一選択薬として推奨されている EM に対する耐性率は *C. jejuni* で 1.3%, *C. coli* で 24.7%であり、増加傾向は認められなかった (図 1, 2)。

#### D. 考察

市販試薬 (デンカ生研) を用いた PHA 法による Penner 型別率は 48.2%であった。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。そこで、免疫株 (Sero strain) に対する抗体価を測定したところ、問題が無いことが確認された。しかし、患者由来株に対する抗体価を調べると、菌株による抗体価のバラつきが認められたことから、さらに検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. 今野貴之, 高橋志保, 樫尾拓子, 熊谷裕

子, 圓子隆信, 袴田知之, 金 和浩:カンピロバクターの Penner PCR 型別が有用であった食中毒疑い事例への対応—秋田県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 36: 161-162, 2015.

学会発表

国際学会

1. なし

国内学会

1. 甲斐明美: 衛生微生物技術協議会第 36 回研究会 (仙台) レファレンスセンター等報告: カンピロバクター

[http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H27\\_Campyrobacter.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H27_Campyrobacter.pdf)

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

表1. カンピロバクターの血清型別法

	Lior 法 自家調製	Penner 法 市販品(デンカ生研)
方法	スライド凝集反応	受身血球凝集反応
標的抗原	易熱性抗原 (H, K様抗原?)	耐熱性菌体抗原 (LOS)
血清群数	30(原法:118)	25(原法:57)
操作性	容易	煩雑
判定	やや困難	容易
価格	安価	高価(1検体 2000円)

表2. 散発下痢症由来*C. jejuni* のLior血清型別成績  
(全国・2014年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
LIO 4	9	27	10	6	28	6	0	86	(22.2)
TCK 1	2	12	1	0	6	0	0	21	(5.4)
LIO 1	2	4	0	0	7	4	0	17	(4.4)
LIO 7	0	8	0	2	3	3	0	16	(4.1)
LIO 11	1	6	0	2	3	2	0	14	(3.6)
LIO 28	0	4	3	0	4	3	0	14	(3.6)
その他*	8	23	6	3	34	13	3	89	(22.9)
小計	22	83	20	13	85	31	3	257	(66.2)
(%)	(47.8)	(66.4)	(62.5)	(61.9)	(72.6)	(72.1)	(75.0)	(66.2)	
複数血清	6	5	7	0	10	0	0	28	(7.2)
型別不能	18	37	5	8	22	12	1	103	(26.5)
合計	46	125	32	21	117	43	4	388	

\*20種類

表3. 散発下痢症由来*C. jejuni*のPenner血清型別成績  
(全国・2014年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
O群	0	7	1	0	17	9	0	34	(8.8)
B群	2	4	6	0	7	2	0	21	(5.4)
L群	1	14	0	1	5	0	0	21	(5.4)
G群	7	10	0	1	2	0	0	20	(5.2)
D群	6	6	0	2	2	2	0	18	(4.6)
Y群	1	4	5	0	3	4	0	17	(4.4)
その他*	11	16	4	4	9	5	0	49	(12.6)
小計	28	61	16	8	45	22	0	180	(46.4)
(%)	(60.9)	(48.8)	(50.0)	(38.1)	(38.5)	(51.2)	(0)	(46.4)	
複数血清	6	1	0	0	0	0	0	7	(1.8)
型別不能	12	63	16	13	72	21	4	201	(51.8)
合計	46	125	32	21	117	43	4	388	

\*14種類

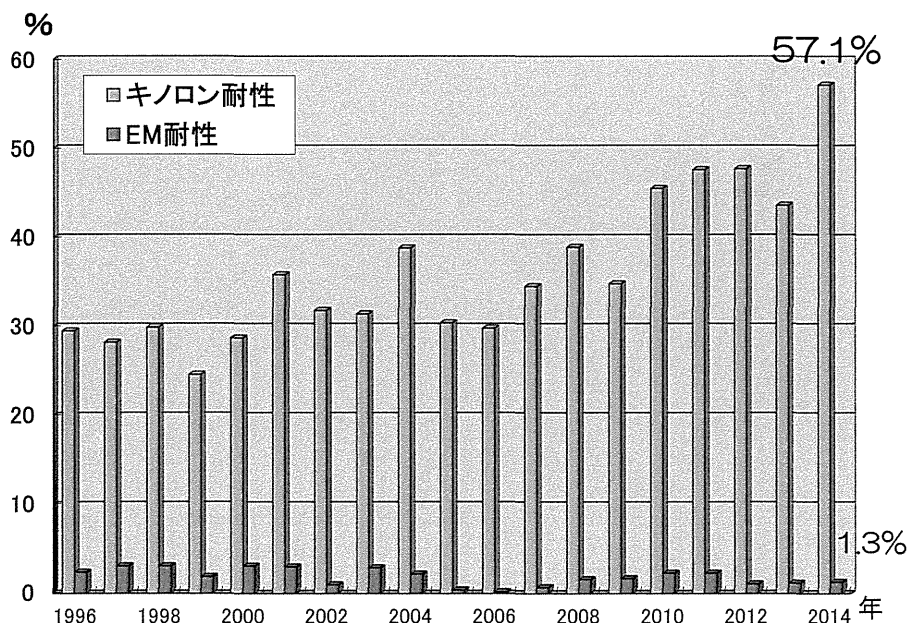


図1. *C. jejuni* キノロン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況  
キノロン耐性: NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性