

E. 結論

1) H27年度(3年目)は、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。

2) 初年度の研究で明らかにしたように、エンテロウイルス検査体制は地衛研間で大きく異なる。全国レベルの流行状況を把握するためには、技術の標準化が望まれるが、実務的には、現状の資源を有効活用しつつ、検査の信頼性確保に努めることが妥当である。

3) このため、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。

4) 従来、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、WSは検査体制の違いを共有する機会になった。

5) 研究班で扱った疾患は一部であり、こうした複数の疾患の検査体制を、施設間で横断的に討議することは必要と考えられる。

6) 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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 吉田弘, 伊藤俊之, 梅木和宣, 中嶋健介. H26年5月に実施した病原体サーベイランス等に関する調査より-地方衛生研究所における検査実施体制について 病原体検出情報 . 36 : 114-116, 2015

2. 安藤克幸, 伊藤雅, 伊東愛梨, 内野

清子, 岡山文香, 内山友里恵, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 後藤明子, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 滝澤剛則, 筒井理華, 中野守, 濱崎光宏, 堀田千恵美, 松岡保博, 山崎謙治, 中田恵子, 吉田弘. 平成26年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査にて検出されたウイルスについて 病原体検出情報 オンライン 2015/10/8

3. 筒井理華, 武差愛美, 坂恭平, 藤田真司, 鈴木豊, 吉田弘 エンテロウイルス D68型が検出された麻痺症状を呈する小児症例を含む2症例—青森県. 病原体検出情報 . 37:12-13, 2016.

4. Nakamura T, Hamasaki M, Yoshitomi H, Ishibashi T, Yoshiyama C, Maeda E, Sera N, Yoshida H. Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water around the Introduction Period of Inactivated Polio Vaccine in Japan. Appl Environ Microbiol. 81 : 1859-1864, 2015.

学会発表

国際学会

該当なし

国内学会

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

表1 疾患による標準作業書の整備 (◎は詳細、○は通常に記載)

	1類、2類、新型インフル、新感染症 (15条第4項)	季節性インフル (14条の2第3項)	3.4.5類 (15条第4項)	
検査標準作業書	◎	○	○	分担研究班にて、ポリオウイルス検査実施時を想定し項目と記載内容を検討
試薬等管理標準作業書	○			
培養細胞管理標準作業書	○			
機械器具保守管理標準作業書	○			
検体取扱標準作業書	○			
信頼性確保標準作業書	○	○	○	

表2 標準作業書の項目

(◎は詳細、○は通常に記載)

SOP記載項目	定義・内容等	2類、新型インフル、新感染症 (15条第4項)	季節性インフル (14条の2第3項)	3.4.5類 (15条第4項)
検査項目	検査の名称	○		○
検体の種類	血液、尿、咽頭ぬぐい液等を記載。	○		○
検査方法	原理	PCR法、分離・同定法等検査法を記載	○	○
	出典	SOP見直しの際に必要。	○	○
作業環境	バイオセーフティレベルの記載。実施場所(部屋番号等)を含む	○		○
試薬等に関する事項	調整法・保管	取扱手順・保管方法を記載	◎	○
	標準品/株		◎	○
検体等取扱方法	前処理		◎	○
	保管	検査までの一時保管方法を記載	◎	○
機械器具に関する事項	機器・器具	使用する機器等の種類、設置場所の詳細	◎	○
	器材(消耗品)	ピペット、チップ等必要な消耗品を記載	◎	○
	機器点検・消耗品管理	別にSOP作成	◎	○
検査/操作上の注意点		◎		○
検査の手順	検査の名称	検査の方法を列挙	○	○
	手順	列挙された方法ごとに手順を作成。	◎	○
	結果の判定	技術的な観点からの判定について記載し、臨床症状等を含め、総合的に判定。	◎	○
記録の作成要領及び保管方法	検査結果の記録要領、保管場所	○		○
検査に必要な資格	検査を実施する際に必要な研修や資格等	◎		○
作成/改訂年月日		○		○

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

real-time PCR法の利用促進に関する検討

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長

研究協力者 森 嘉生 国立感染症研究所ウイルス第3部第2室長
竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第3部 部長

研究要旨 麻疹はWHOが排除を目指す感染症であり、麻疹排除には検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制が求められている。麻疹排除期にはより正確な診断のためには、血清学的検査とウイルス学的検査の併用が望ましく、簡便で感度よく検査できるreal-time PCR法は麻疹検査診断ネットワークの向上に必要と考えられている。昨年度、病原体検出マニュアルを改訂し、real-time PCR法を公開した。本年度はreal-time PCR法の利用を促す事について検討した。試薬の配布やアンケートの実施等により、real-time PCR法の公開後約半年で約75%の地衛研で導入が検討された。また2015年に検査された麻疹疑い例のうちおよそ70%がreal-time PCR法によって検査されていた。これらの事はreal-time PCR が周知され、麻疹検査法として整備されつつある事を示すと考えられた。

A. 研究目的

麻疹は天然痘、ポリオについてWHOが排除を目指している感染症である。WHOは麻疹排除を「優れたサーベイランス体制が存在する下で、その地域に常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が1年間以上ない状態」と定義し、またその状態が3年間、継続している事を排除認定基準としている。麻疹排除の達成には適切なサーベイランス体制の確立が必須である。日本においては、平成25年4月に改訂された「麻しんに関する特定感染症予防指針」において、麻疹疑い患者の全数検査診断を原則とする事、また民間検査センターで実施する血清IgM検査と、地方衛生研究所(以下地衛研)で実施する遺伝子型解析を含む遺伝子検査を併用

する事を求めている。地衛研における遺伝子検査は、従来はnested RT-PCR法を用いていたが、操作が煩雑で時間がかかる事、検体間等のクロスコンタミネーションの可能性が高い事等の理由から、同等の感度で、より簡便で、多数の検体も同時に処理できるreal-time PCR法への転換を諮っていた。またWHOもnested RT-PCR法によるコンタミネーションのリスクを指摘しreal-time PCR法に基づく麻疹サーベイランス体制の確立を求めている。real-time PCR法は平成25年度の本研究班活動の一環として検討、確立し、麻疹風疹レファレンスセンター(以下レファレンスセンター)とともに評価した。本年度は麻疹検査を実際に実施している地衛研へのreal-time PCR法の導

入の促進する方法について検討を行った。

B. 研究方法

病原体検出マニュアル（以下マニュアル）を改訂し、real-time PCR法を記載した。また早期の導入の促進を諮るため、real-time PCR法に用いるプライマー、プローブ、ならびに標準RNAを73地衛研に配布した。その後、レファレンスセンターを通じて導入状況のアンケートを実施し、周知、ならびに導入を促した。また、年明けに平成27年の麻疹検査実績アンケートを実施し、real-time PCRの使用状況を調査した。

C. 研究結果

1. real-time PCR 用プローブ、プライマー、標準 RNA の配布

real-time PCR 用、プローブ、プライマー、ならびに標準 RNA を合成し、100 試験相当分に分注し、73 地衛研に配布した。標準 RNA は RNA 安定化剤である RNA stable (Biomatrix, Inc) を加え乾燥し、冷蔵で送付した。

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。アンケートは、プライマー、プローブ等を配布した 73 地衛研を対象に、レファレンスセンターを通じて行われ、すべての施設から回収された。アンケートの結果、73 地衛研中、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（マニュアルに記載された方法以外の方法を含む）（図 1）。また、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（図 2）。

3. 平成 27 年の麻疹検査状況の調査

平成 27 年に各地衛研で実施した麻疹検査診断の状況を、レファレンスセンターを通じてアンケートを実施し、調査した。平成 27 年は麻疹の流行がなく、感染症発生動向に報告された麻疹症例数は 35 例であった。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。（ワクチン株が検出された 16 症例を含む）。1045 症例のうち、708 症例については real-time PCR 法が用いられていた。陽性症例が、real-time PCR 法によって陽性となったのか、従来の nested RT-PCR によったのかは正確には把握できなかったが、少なくとも 21 症例は real-time PCR 法で陽性となったと考えられた。うち 11 症例からはワクチン株が検出され、野生株が 9 症例から検出されていた（1 例は鑑別不能）。

D. 考察

麻疹は、WHO が排除を目指す感染症であり、その排除認定には、検査診断に基づいた質の高いサーベイランス体制が求められている。

麻疹の検査診断は麻疹特異的 IgM を検出する血清学的検査と、遺伝子検査、ウイルス分離等のウイルス学的検査に大別される。それぞれの検査法には一長一短があり、可能ならば両方法を併用する事がより正確な診断に望ましい。特に罹患者が減少した時には、検査の陽性的中率が減少し、偽陽性の割合が増加する事が知られている。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。

地衛研で実施されているウイルス遺伝子検出法は Nested RT-PCR 法を用いていたが、操作が煩雑で時間がかかる事、クロスコンタミネーションの可能性が高い事等から、これらの欠点を減じ、さらに一度に多検体の処理が可能な real-time PCR の導入が望まれていた。麻疹 real-time PCR 法についてはすでに確立、レファレンスセンターと共同で評価を終え、平成 26 年度に改訂されたマニュアルに記載されている。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。

Real-time PCR 法に用いるプライマーやプローブは比較的高価であり、個別にオーダーしなければならない事から、これらの試薬を配布する事が検査法確立に着手することを容易にすると考えた。そこでおよそ 100 試験分のプライマー、プローブ、ならびに標準 RNA を 73 地衛研に配布した。標準 RNA は RNA stable を加え乾燥し、冷蔵で配布したが、特に品質に関するクレームはなく、RNA を送付する簡便で適切な方法と考えられた。

アンケートの結果、試薬配布後およそ 5 ヶ月の時点で、約 75% の地衛研で real time PCR の導入を検討し、マニュアルで求めた「標準 RNA を用いた系の最適化」を開始していた。この時点で 3 回以上の「最適化」試行を行い、最適化された系を確立した地衛研は 39 カ所あった。これらから、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。一方、陽性だった場合、nested RT-PCR 法で遺伝子型、遺伝子配列を決定する必要がある事から、従来通り、最初から nested RT-PCR を実施する方が便利であるとする意見や、標準 RNA のコンタミネーションによる偽陽性の可能性があることから

導入に消極的な意見もあった。また、まだ最適化が十分になされていない地衛研も存在する事から、外部精度管理等を通じて系を調整していく必要があると考えられた。

2015 年の検査実績調査から、ワクチンの副反応を思われる遺伝子型 A を検出したケースが多かった。ワクチンによる副反応の場合は野生株が感染した時と比較してウイルスの増殖が少なく、ウイルス遺伝子の検出が困難な可能性が考えられるが、高い頻度でワクチン株の検出が可能だった事は real-time PCR 法の高い実用性を示したように思えた。

E. 結論

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、維持に必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. (2015) A mutant H3N2 influenza virus uses an

- alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol.* 89: 5154-8.
2. Seki, F., Someya, K., Komase, K. and Takeda, M. (2016) A chicken homologue of nectin-4 functions as a measles virus receptor, *Vaccine.* 34(1):7-12.
 3. 竹田誠、駒瀬勝啓、麻疹排除へ向けて、化学療法の領域 31:1326-32 (2015)
 4. 竹田誠、駒瀬勝啓、近年の歩みとこれからの課題、生体の科学 66:309-12 (2015)
 5. 駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠、麻疹検査診断の現状、病原微生物検出情報 36:59-60 (2015)
 6. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠、海外の麻疹の状況-2014年のWPR、EUR、AMRの状況、病原微生物検出情報 36:68-70 (2015)
 7. 駒瀬勝啓、日本の麻疹の状況と麻疹排除の進捗、モダンメディア 61(4):81-90 (2015)
 8. 駒瀬勝啓、欧米における麻疹の状況と日本の麻疹排除の維持、感染炎症免疫 45(3): 86-8 (2015)
- 学会発表
- 国際学会
1. なし
- 国内学会
1. 駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹排除の進捗状況- 流行ウイルスの解析による評価 - 第 56 回日本臨床ウイルス学会学術集会 平成 27 年 6 月 13 日~14 日 岡山
 2. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Tsuyoshi Sekizuka, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, Molecular determinants of proteolytic activation of respiratory Ortho- and Paramyxoviruses *in vivo*, 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 平成 27 年 9 月 8 日~11 日 淡路島
 3. 竹田誠、酒井宏治、網康至、北沢実乃莉、中島勝紘、SANGSRIRATANAKUL Natthanan、安楽正輝、中島典子、駒瀬勝啓、竹原一明、長谷川秀樹、田代真人、A natural host animal model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日~24 日 福岡
 4. Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizuka, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日~24 日 福岡
 5. 關文緒、染谷健二、田原舞乃、中津祐一郎、酒井宏治、駒瀬勝啓、竹田誠、ニワトリ nectin-4 の同定と初代鶏胚繊維芽細胞への麻疹ウイルス感染における役割、第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日~24 日 福岡

6. 駒瀬勝啓、大園強、緑川圭、三柴雅昭、渡辺創、永田明義、梅木和宣、竹田誠、麻疹 IgM EIA キットの改良が麻疹排除に与えたインパクト、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 27 年 11 月 14 日～15 日 犬山

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得
特記事項なし
実用新案登録
特記事項なし
その他
特記事項なし

図1. アンケート結果(1)
real-time PCRの導入の検討について

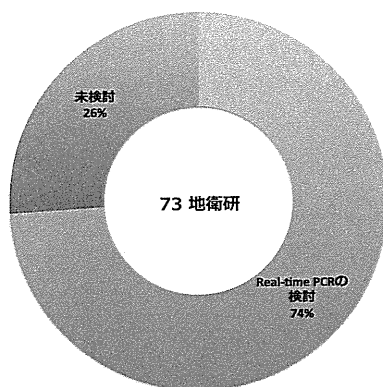
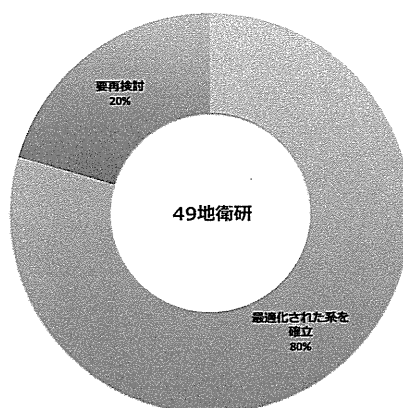


図2. アンケート結果(2)
系の最適化について



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

百日咳レファレンスセンター

研究分担者	蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	平松征洋	国立感染症研究所	細菌第二部
	大塚菜緒	国立感染症研究所	細菌第二部
	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、地方衛生研究所を対象にレファレンスの整備・配布を行った。平成27年度は11施設に12件の検査キットを配布するとともに、昨年度に引き続き百日咳菌の国内病原体サーベイランスを実施した。その結果、定着因子パータクチンの欠損株は国内では減少傾向にあること、さらに2010~2015年の臨床分離株（n=78）はすべてエリスロマシン感性菌（MIC, <10 µg/mL）であることが判明した。

A. 研究目的

百日咳は小児の急性呼吸器感染症であり、主な起 因 菌 は 百 日 咳 菌 *Bordetella pertussis* である。近年ではワクチン効果が減弱した青年・成人の罹患者の増加が認められている。百日咳様疾患を引き起こす病原体として百日咳類縁菌（パラ百日咳菌, *Bordetella holmesii*）と *Mycoplasma pneumoniae*, その他に呼吸器系ウイルスが挙げられるが、臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは困難である。百日咳の正確な診断には遺伝子検査が有用であり、アウトブレイクなどの病原体検索では必須の検査法となっている。現在、米国では菌培養検査や血清学的検査に代わり遺伝子検査が百日咳の標準検査法となっている。

百日咳菌は種々の定着因子を産生するが、多くの先進国で定着因子パータクチン（Prn）の欠損株が認められている。Prn 欠損株は精製百日せきワクチンを導入した国で出現が認められており、米国では臨床分離株の 85%を占めるまでになっている。

精製百日せきワクチンは感染予防抗原として Prn を含むことから、Prn 欠損とワクチン有効性との関係が世界的に論議されている。そのため、本菌の発生動向には継続した監視が必要となっている。また、中国ではマクロライド高度耐性の百日咳菌が出現し、2013~2014 年には臨床分離株の 9 割以上を占めた。わが国ではこれまでにマクロライド耐性菌の報告例は無いが、Prn 欠損株と同様にその発生動向には注意が必要である。

百日咳レファレンスセンターでは、百日咳検査の精度向上を目的に遺伝子検査キットを含むレファレンスの整備・配布を行っている。また、レファレンス活動として百日咳病原体サーベイランスを地方衛生研究所とともに実施している。本研究では、昨年度に引き続きレファレンスの整備・配布ならびに Prn 欠損株とマクロライド耐性菌の国内流行調査を行った。

B. 研究方法

1. レファレンス関係

B. holmesii-LAMP は既報に従ってキット化し、48 試験分を 1 キットとした。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 (ver.3.2, 4Plex-RT キット) はプレミックス、混合プライマー&プローブ、ROX reference dye、4 菌種に対する陽性コントロール DNA をキット化した。国立感染症研究所から供与可能なレファレンスとして衛生微生物技術協議会などでアナウンスを行い、分与依頼を受けて配布した。

2. Prn 欠損株の流行調査

地方衛生研究所および国内医療機関に百日咳臨床分離株の分与を依頼し、2015 年の国内分離株 18 株を収集した(感染研での分離株を含む)。菌体から全タンパク質を抽出し、抗 Prn 抗体を用いたイムノブロット解析に供試した。Prn 欠損が確認された菌株はシーケンス解析に供試し、その欠損機構を解析した。

3. マクロライド耐性菌の調査

2015 年の国内臨床分離株 18 株について、エリスロマイシン (EM) に対する MIC を測定した。MIC が未測定であった 2000~2014 年の臨床分離株についても同時に実施した。MIC は E-test (BG 培地) または EM (0.1 µg/mL) を含む CSM 培地で測定し、E-test は常法に従って判定した。CSM 培地では菌増殖が認められなかったものを MIC <0.1 µg/mL と判定した。なお、中国で分離されたマクロライド高度耐性菌は、エリスロマイシンに対し 256 µg/mL 以上の MIC を示すことが報告されている (Yang *et al.*, PLOS ONE, 2015)。

C. 研究結果

1. レファレンスの配布

平成 27 年度は地方衛生研究所 11 施設に *B. holmesii*-LAMP キット 2 件、4Plex-RT キット 10 件を配布した (表 1, 平成 28 年 1 月現在)。conventional PCR に使用する陽性コントロール DNA の配布は 0 件であった。

2. Prn 欠損株の流行調査

図 1 に 2000~2015 年における Prn 欠損株の分離率を示した。Prn 欠損株は百日咳流行があった 2008~2009 年に一時的に分離率が低下し、2010~2011 年に再度分離率が上昇した。その後は分離率が減少し、2014~2015 年は 10%を下回った。2015 年に分離された Prn 欠損株は 3 株であり、2 株はこれまでと同様に *prn* シグナル配列 (87 bp) の欠損であった。残り 1 株は挿入配列 IS481 による遺伝子破壊 (*prn246::IS481*) であったが、これまでの挿入位置 (*prn1599::IS481*) とは異なる位置に遺伝子破壊が認められた。この挿入位置は欧米の Prn 欠損株に多く認められており、本菌も欧米株と等しい遺伝子型 MT27 を示した。

3. マクロライド耐性菌の調査

2015 年の国内臨床分離株 18 株はすべて EM 濃度 0.1 µg/mL 未満の MIC を示した (表 2)。2010~2014 年の臨床分離株 60 株もすべて EM 感受性を示し、マクロライド耐性菌は不検出であった。

D. 考察

百日咳レファレンスセンターでは遺伝子検査の拡充・整備を進め、平成 26 年度から新たな遺伝子検査キットである 4Plex-RT キット (ver.3.2) の配布を開始した。今年度は 10 件の 4Plex-RT キット、2 件の *B. holmesii*-LAMP キットを地方衛生研究所に配布した。遺伝子検査キットは昨年度と

同様な配布実績を示したことから、今後も継続して検査キットの配布を行う必要性がある。なお、レファレンス活動として4Plex-RTを用いた国内病原体サーベイランスを実施したところ、国内の百日咳菌感染者は乳児以外に10歳代が多いことが確認された。

Prn 欠損株の流行調査により、わが国では近年 Prn 欠損株の分離率が減少していることが確認された。これまで Prn 欠損株は遺伝子型 MT186 に多く認められていたが、2000 年以降 MT186 が減少し、一方、Prn を発現する MT27 が増加した。このことから、Prn 欠損株の分離率減少に流行株の変化が関与した可能性が示唆された。MT27 は欧米の流行株に多く認められることから、近年日本の流行株は欧米型への入れ替わりが生じている。ただし、この遺伝子型の変化を引き起こす選択圧は解明されておらず、今後の検討課題となる。欧米では Prn 欠損株が現在も高い頻度で分離されていることから、今後も本菌の発生動向には継続した監視が必要である。

中国では北京を含む北東部でマクロライド高度耐性百日咳菌が高頻度に分離され、医療現場では重大な問題となっている。欧米ではマクロライド耐性菌が散発的に認められているが、中国では2013~2014年の臨床分離株の9割以上がマクロライド高度耐性を示した。わが国ではこれまでマクロライド耐性菌の報告例はなく、今年度の調査でも耐性菌は検出されなかった。ただし、今後他国から流入する可能性は否定出来ないため、百日咳レファレンス活動として国内臨床分離株の収集と薬剤耐性のモニタリングを継続して進める必要がある。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayma K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect.* 8:70-74, 2015.
2. 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳の国際動向と検査法・ワクチンの問題点. *感染・炎症・免疫.* 45:46-56, 2015.

学会発表

国際学会

1. Kamachi K. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Asia. The 12th Japan-Taiwan Symposium on Emerging and re-emerging infectious diseases. Sept. 11, 2015, Tokyo, Japan.

国内学会

1. 平松征洋, 齋藤桃子, 大塚菜緒, 渡邊峰雄, 柴山恵吾, 蒲地一成. BipA is an autoagglutination inhibitor required for biofilm formation in *Bordetella*

holmesii. 第89回日本細菌学会総会. 3
月23-25日, 2016年, 大阪.

なし
実用新案登録

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし
その他
なし

特許取得

表1. 平成27年度のレファレンス関係の配布実績 (平成28年1月現在)

品目		件数	地研数
レファレンス	百日咳菌 DNA	0	0
	百日咳類縁菌 DNA (パラ百日咳菌, <i>Bordetella holmesii</i>)	0	0
検査キット	<i>Bordetella holmesii</i> -LAMP	2	2
	4Plex リアルタイム PCR キット (ver.3.2)	10	9

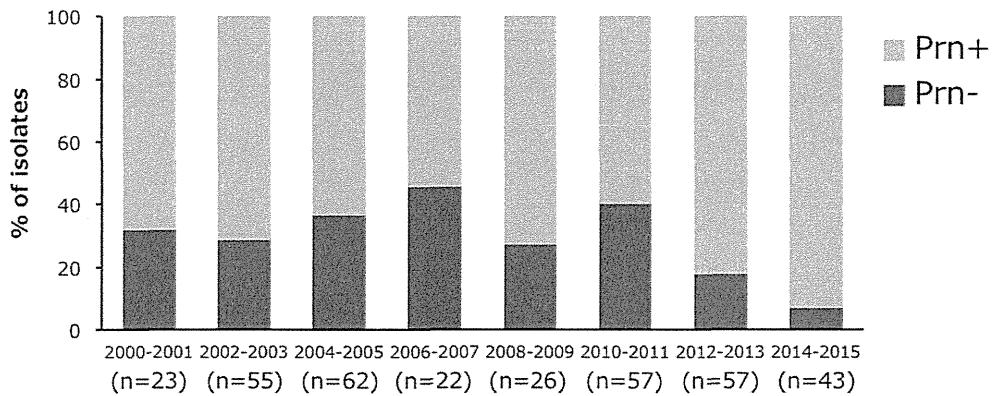


図1. 日本における百日咳菌 Prn 欠損株の分離状況 (2000~2015年)
2015年の臨床分離株18株のうち3株が Prn 欠損株, 15株が Prn 発現株であった

表2. 百日咳菌のエリスロマイシン感受性試験 (2010~2015年国内臨床分離株)

臨床分離年	解析菌株数	マクロライド耐性菌*
2010~2012	20	0
2013	12	0
2014	28	0
2015	18	0

* <0.1 µg/mLまたは10 µg/mL EM

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

結核菌型別分析における精度保証

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

研究協力者 村瀬良朗 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科

研究要旨 地域あるいは集団における結核菌の感染動態を調査するため、多くの地方衛生研究所では結核菌のVNTR型別解析法が導入されている。2014年度に実施されたVNTR解析の外部精度評価（External Quality Assessment: EQA）では、一部に精度不十分な状況が認められ、さらなる分析精度向上の必要が考えられた。そこで、2015年度は内部精度管理（Internal Quality Control: IQC）用検体を配布することでIQCの実施を支援するとともに、2回目のEQAを実施した。本邦で結核菌型別によく用いられている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年度はより多くの施設から正答と完全一致の結果が報告された（分析結果が完全一致した施設の割合：66.7% [36/54] vs. 92.0% [46/50], $p=0.002$ ）また、2014年度のEQAで成績の悪かった5つのローサイにおいても高い正答率（99–100%）が示された。地域におけるVNTR情報の蓄積や他施設との情報共有を推進するためには精度保証（Quality Assurance: QA）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も必要と考えられる。

A. 研究目的

近年、結核菌の疫学的感染動態を把握する上で、遺伝子型別技術が重要な役割を果たしつつあることはよく知られている。この遺伝子型別技術には様々なものがあるが、地方衛生研究所を中心に国内で実地疫学的によく利用されているのはVNTR（Variable Number of Tandem Repeat）である。VNTRは結果が数値（デジタル）であり、自治体間でデータを容易に共有・比較できることが大きな利点である。そのためには、解析精度の信頼性の確保（精度保証）が必要であり、実践的な観点からは外部精度評価の実施が有用である。2014年度、本邦で初めて実施された結核菌VNTR分析における外

部精度評価では、結核菌3株をJATA（12）-VNTR法で分析した場合に全ローサイが完全一致した施設が66.7%（36/54）であり、分析精度改善の必要性が示されている。

そこで、2015年度は各施設における内部精度管理の実施を支援するとともに、2014年度に引き続いて2回目となる外部精度評価を実施することとした。

B. 研究方法

用語の規定

精度保証（Quality Assurance: QA）は検査精度の永続的維持と改善を目的とした監視評価活動であるが、その因子として内部精度管理（Internal Quality Control: IQC）と外

部精度評価（External Quality Assessment: EQA）及びトレーニング（Training: TA）を有している。今回それぞれの呼称・日本語訳として上記を用いる。

参加施設の募集

衛生微生物技術協議会レファレンス会議の各ブロックの代表を通して VNTR に関する内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価への参加希望を募った。

参加施設へ送付した検体：

① 外部精度評価用結核菌 DNA（※）

精製した結核菌の DNA 3 検体（3 株）を外部精度評価用検体として使用した。

② 内部精度管理用結核菌 DNA（※）

コピー数既知の結核菌 4 株（臨床分離株 3 株+H37Rv 1 株）の DNA を内部精度管理用 DNA として希望施設に配布した。これらを、コピー数を同定するための汎用コントロール検体とした。

（※）今回送付する菌株 DNA は結核予防会結核研究所抗酸菌部及び神戸市環境保健研究所で実施した VNTR 解析において、一致した VNTR プロファイルを示した菌株であり、その一致した評価を基準として解析した。また、PCR 反応が良好であることを両機関で確認した。

③ 内部精度管理用 VNTR ステップラダーマーカー

2014 年度の外部精度評価において特に成績の悪かった試験領域（1955, 3336, QUB26, 4156, 2163a）について、コピー数既知の DNA フラグメントを混和した VNTR ステップラダーマーカー（図 1）を結核研究所内で作製し、希望施設へ配布した。このマ

ーカーはアガロースゲル電気泳動用であり、電気泳動における解像度の確認およびコピー数を換算する際の参照試料として施設内改善活動（IQC）に用いることができる。

④ QIAxcel 用 VNTR マーカー

2014 年度の外部精度評価において QIAxcel（QIAGEN）を使用していた施設を中心に、今回（2015 年度）試験的に作成し VNTR マーカー（QIAGEN）を配布した。このマーカーは QIAxcel 専用であり、QIAxcel にてコピー数を同定する際の参照試料として用いることができる。

試験領域（使用ローカス）：

JATA 12、JATA 15、Supply 15 に含まれるローサイ、および HV（Hypervariable Regions/ 超過変領域: 3232, 3820, 4120）を評価対象とした。基本的に JATA 12 を最小実施単位とし、その他をオプションとした。

外部精度評価の実施：

各施設は VNTR 分析結果報告シートを用い、施設名、PCR 産物の分析法、VNTR 分析結果をチューター（結核研究所・村瀬良朗）へ電子メールにて送付し、結核研究所内で集計・分析を実施した。

C. 研究結果

1. 内部精度管理用検体の提供と外部精度評価の実施

全国の 79 施設を対象に、内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価参加についての希望を調査した。内部精度管理用結核菌 DNA（4 株）については 53 施設、アガロースゲル電気泳動用 VNTR ステップラダーマーカーについては 45 施設から配布希望があり、全ての希望施設に配布した。また

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。2016 年 2 月 5 日時点で 50 施設から分析結果が送付されており、この分析結果を対象として全体評価を実施した。

2. 各施設における VNTR 分析に利用しているローカセット

VNTR 分析システムには、JATA (12)、JATA (15)、HV 及びその他のローサイ (Supply[15]分析システムに含まれる) がある。今回の外部精度保証では最低限 JATA (12) での分析を依頼した。その他に JATA (15) (JATA[12]に追加 3 ローサイ)、HV は 3 ローサイ、他に Supply らの 6 ローサイなどが分析対象ローサイとして想定されるため対応した報告様式を準備した。2015 年度に各分析システムを利用していた施設数は、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 (図 2)。

3. 外部精度評価用検体を JATA (12) 分析した場合の正答施設数

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%, 46/50)、1 ローカセット違いは 1 施設 (2%, 1/19)、2 箇所以上違いは 3 施設 (6%, 3/50) だった (表 1)。全ローサイ完全一致した施設の割合は 2014 年度と比べて 2015 年度では有意に高かった (66.7% vs. 92.0%, $p=0.002$)。

4. PCR 産物のサイズ測定方法

PCR 産物のサイズ測定のための方法として、アガロースゲル電気泳動、自動シーケンサーを用いたフラグメント解析、マイクロチップ電気泳動装置 (マルチナ、島津製

作所)、キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel (QIAGEN)、キャピラリー電気泳動装置 (コスモアイ、日立製作所) などが各施設で採用されていた。2015 年度の調査では 2014 年度と同様に、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 (66.0%, 33/50)。次いで自動シーケンサーを用いたフラグメント解析が 10 施設 (20%, 10/50)、マルチナと QIAxcel を使っている施設が各 3 施設 (6.0%, 3/50) であった。また 1 施設 (2.0%, 1/50) がコスモアイを利用して分析していた (表 2)。

5. 各分析法におけるローカセットの正答率

PCR 産物の分子量分析法の違いごとに、JATA (12)、JATA (15)、HV、Supply における正答率をまとめた (表 3)。正答率は、ローカセットの分析を実施した施設の成績を集計することで算出した。

2014 年度と比べると 2015 年度はいずれの分析法においても全体的に高い正答率であった。10 施設で用いられていた自動シーケンサーは全てのローカセットで正答率 100%であった。最も多くの施設で採用されていたアガロースゲル電気泳動法は、一部の施設 (2/15) で誤回答があったため HV の正答率が 97%であったが、その他のローサイでは良好な正答率 (99.7-100%) であった。マルチナ、QIAxcel はそれぞれ 3 つの施設で採用されており、一部施設ではアガロースゲル電気泳動が併用されていた。実施施設数が少ないものの、JATA (12) については高い正答率であると考えられた。QIAxcel の JATA (15)、HV については正答率が低い施設があった。

6. 各ローカセットの正答率の比較

分析ローカスごとの正答率を比較した(図3)。2014年度は5つのローサイ(1955, 3336, 4052, 4156, 2163a)で正答率が低かった(77-96%)が、2015年度の調査ではいずれのローカスでも99-100%であり、高い正答率を示した。尚、2014年度の成績が最も悪かった2163aローカスでは、2014年度は3株中1株が2163a欠損(PCR増幅されない)であり、2015年度は3株すべてコピー数測定可能な株を採用したという違いがあり、正答率に影響を与えた可能性がある。

D. 考察

2015年度は、2014年度の外部精度評価成績に基づいて内部精度管理用検体の提供と2回目の外部精度評価を希望施設に対して実施した。

PCR産物の分子量測定法については、2014年度と同様に2015年度の調査でも最もシンプルなアガロースゲル電気泳動が主要な分析法として66%(33/50)の施設で用いられていた。正確な測定が期待できる自動シーケンサーについては、採用する施設の割合が13.0%から20.0%へ増加傾向が見られた。これら二つの主要な分析法について分析精度を比較すると、自動シーケンサーの採用施設ではJATA(12/15)、HV、Supplyらのローサイの全てで100%の正答率が報告されており、分析精度が極めて高い結果となった。一方、アガロースゲル電気泳動の採用施設についても、2014年度と比べると正答率が改善しており、JATA(12)、JATA(15)、Supplyらのローサイでは高い正答率(99.7%、100%、100%)であった。しかしながら、HVローサイについては正答率が97.0%であり、自動シーケンサーよりも正答率が低かった。自動シーケンサーの導入を検討している施設が一定数あると思われる

ため、導入に際して技術支援の在り方について検討する必要があると考えられた。マルチナ及びQIAxcelはそれぞれ3施設で採用されており、一部施設ではアガロースゲル電気泳動が併用されていた。実施施設数が少ないものの、JATA(12)については高い正答率であった。

VNTR分析に利用されているローカスセットの調査では、JATA(15)、HV、Supplyらの6ローサイを分析している施設数が、それぞれ34、28、15であり、HVを分析対象とした施設の割合が2014年度より若干上昇していた(51.9 vs 56.0)。この上昇は、主にHVローサイの測定に適した自動シーケンサーを採用する施設の割合が増加したためと考えられた。今後、自動シーケンサーが普及することによって、HVローサイを分析対象とする施設が増加する可能性がある。

2014年度と比較して、2015年度はVNTR分析における正答率の改善が確認された。2014年度と2015年度の違いとしては、2015年度は内部精度管理用の検体を配布したことが挙げられる。2014年度の外部精度評価ではJATA(15)のうち10ローサイでは分析精度が高かった(98-100%)が、残りの5ローサイでは分析精度が劣って(77-96%)おり、コピー数を同定する過程に問題があることが示唆された。そのため、これら5ローサイのコピー数を同定するための基準となるラダーマーカークラウドやコピー数既知株のDNAを配布し、各施設における内部精度管理の実施を支援した。こうした内部精度管理用検体の提供が分析精度の向上に役立った可能性がある。また、VNTR外部精度評価が2回目となったため、分析担当者の習熟度が向上したことが影響した可能性も考えられる。外部精度評価用検体については、

2014年度は幾つかの施設から PCR 増幅不良の報告があったが、2015年度は無かったため、検体 DNA の品質による影響も考えられた。今後の精度保証については、評価株数を増やすことに加え、日常分析業務で遭遇するイレギュラーな検体（一部ローカスの欠損株や複数コピー数が検出される株など）を評価対象に加えることを検討する必要がある。

2014年度、2015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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

結核菌株の取扱については、感染症法の基準に適合した実験室内で実施した。

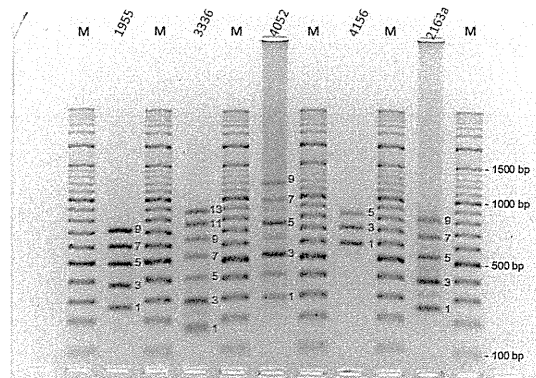
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

図1. アガロースゲル電気泳動用VNTRステップラダーマーカー



5つのローサイについて奇数コピー数のDNA断片を混和したマーカーを作製し、希望施設に配布した。図は2%アガロースゲル電気泳動像であり、各施設においてゲル分離能や分子量からコピー数へ換算する過程を確認することができる。M:100bpラダーマーカー

図2. VNTR分析システムと報告施設数

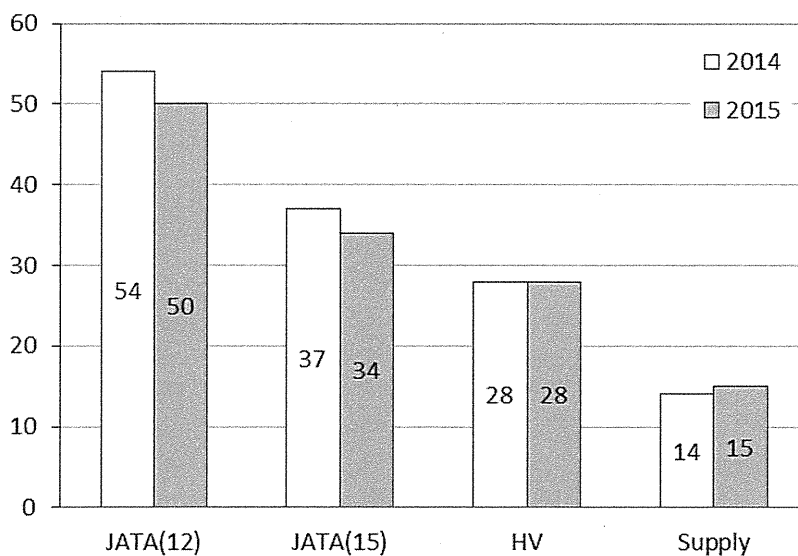


表1. 3株をJATA(12)で分析した場合の正答施設数

	2014 施設数 (54施設中の割合)		2015 施設数 (50施設中の割合)	
	全ローサイ完全一致	36施設	66.7%(36/54)	46施設
1ローカス違い	7施設	13.0%(7/54)	1施設	2%(1/50)
2カ所以上違い	11施設	20.3%(11/54)	3施設	6%(3/50)

表2. 分子量の分析方法と報告施設数

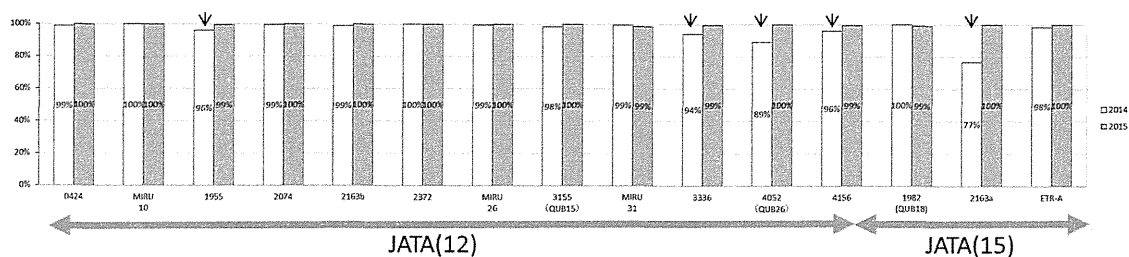
分析方法	2014年度		2015年度	
	実施施設数	割合 %	実施施設数	割合 %
アガロースゲル	37	68.5%	33	66.0%
自動シーケンサー	7	13.0%	10	20.0%
マルチナ	4	7.4%	3	6.0%
QIAxcel	4	7.4%	3	6.0%
コスモアイ	2	3.7%	1	2.0%
Total	54	100.0%	50	100.0%

表3. 各分析法におけるローカセットの正答率

分析法	JATA(12)		JATA(15)		HV		Supply	
	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)
アガロースゲル	33	99.7	21	100	15	97	5	100
自動シーケンサー	10	100	9	100	10	100	9	100
マルチナ	3	100	1	100	1	100	1	100
QIAxcel	3	99.1	2	94.4	2	66.7		
コスモアイ	1	100	1	100				

n: 各分析法による報告施設数

図3. 各ローカスにおける正答率



主要な分析法であるJATA(12/15)各ローカスにおける正答率を2014年度と2015年度と比較した。2015年度は全てのローカスで高い正答率(99%-100%)であった。矢印は2014年度の正答率が悪かったためアガロースゲル電気泳動用VNTRマーカーの作成対象とした5つのローカスを示す。

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

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

研究分担者 森川茂 獣医科学部長
研究協力者 木村昌伸 獣医科学部 主任研究官
今岡浩一 獣医科学部 第一室長
奥谷晶子 獣医科学部 主任研究官
井上智 獣医科学部 第二室長

研究要旨 衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属している7箇所に加えて12箇所の計19箇所の地方衛生研究所の参加協力のもと、平成27年度は「重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の各種動物の血清疫学を行うためのELISA系の配布と外部品質保証（EQA）を実施した。その結果、参加19箇所のうち試験実施できた18箇所のうち14箇所では感染研とほぼ同等の成績が得られた。低感度或いはデータ不良により良好な成績が得られなかった1箇所に関しては研修を実施予定である。多くの地方衛生研究所で、各自治体の動物の血清疫学を実施可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属している7箇所の地方衛生研究所において、重要な動物由来感染症に関して検査法、検出法等の標準化を行うことを目的とする。一昨年度には、PCRの「炭疽菌芽胞換算の検出感度評価」を行い、全ての参加衛生研究所においてPCR検査が正常に実施可能であることを確認した。昨年度は、狂犬病の検査ネットワーク構築と検査系の検証および標準化を参加7箇所に加えて16箇所の地方衛生研究所を対象に、狂犬病のNAT（遺伝子検査試験）を実施した結果、いずれもPCR検査が正常に実施可能であることを確認した。本年度は、アンケート調査を行なった結果、SFTSウイルス抗体を各種動物から検出するELISA法のキット配布と外部品質保証（EQA）を行うこととなった。

B. 研究方法

1. アンケート調査

これまで、動物由来感染症レファレンスセンターでは、野兔病、ブルセラ症、狂犬病、炭疽の病原体診断法の標準化とEQAを各年1つの動物由来感染症を対象に実施してきた。そこで、参加7衛生研究所に、案1）これまで実施してきた重要な動物由来感染症の診断、検査法が一巡したので、4年前に実施した野兔病の検査法のEQA等を行う、案2）重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の各種動物の血清疫学を行うためのELISA系の供与と外部品質保証（EQA）を行う、のいずれを希望するかをアンケート調査した。また、アドホックで参加したい地衛研の有無に関して、各参加衛生研の所属ブロック内で希望調査を依頼した。