

2015170058

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25年度～27年度 総合研究報告書

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25年度～27年度 総合研究報告書

研究代表者 宮崎義継

(国立感染症研究所)

平成 28 (2016) 年 3 月

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
清水 博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部	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
竹田 誠	国立感染症研究所 ウイルス第三部	部長
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. 総合研究報告書

- 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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. 地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動・
真菌検査標準作業手順書（SOP）の作成・
BSL3 真菌取扱マニュアルの作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 5
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 1
研究分担者：太西 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・・・・・・・・・・ 3 3
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・・・・・・・・・・ 4 1
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・・・・・・・・・・ 5 1
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 5
研究分担者：加藤 はる（国立感染症研究所 細菌第二部）
7. 蚊媒介性ウイルス感染症の診断体制の拡充・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 1
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活動について・・・・・・・・・・	65
	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・・・・・・・・・・	69
	研究分担者：吉田 弘（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
10.	麻疹、風疹ラボラトリーネットワークの強化に関する研究 ・	113
	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・・・・・・・・・・	119
	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・・・・・・・・・・	125
	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活動報告・・・・・・・・・・	135
	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・・・・・・・・・・	147
	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・・・・・・・・・・	151
	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・・・・・・・・・・	157

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、それぞれの施設は行政上、所属の違う別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、および疫学調査を通じて国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所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的食物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、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

■レファレンスセンターの位置付け：国立感染症研究所長をはじめとする感染研のスタッフと、地方衛生協議会全国協議会会長、および、感染症対策部会の委員が協議を行った。

■真菌の病原体検査標準作業手順書 (SOP) および BSL3 取扱マニュアルの作成：真菌検査についての SOP および BSL3 真菌取扱マニュアルを作成した。作成した文書に基づき検査を行い、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：薬剤耐性菌レファレンスセンターの設置に向けて活動を行った。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、検疫所職員等を対象に、検査診断法に関する技術研修と情報提供に努めた。全国の地研および医療機関から受け付けた寄生虫症の依頼検査は 3 年間で計 189 件であった。ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は 14 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地研とともに取り

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。全国共通となる検査法の評価を行った。マニュアル改訂準備を行った。

■エンテロウイルス：エンテロウイルス検査に関するアンケート調査を行った。エンテロウイルス検査に関する参加型研修を行った。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：nested RT-PCR 法の EQA を 22 地衛研を対象に試行した。麻疹の real-time PCR 法の評価を地衛研にて行った。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。2000-2015 年の国内臨床分離株 345 株について Prn 欠

損株の流行調査を行った。2010-2015 年の国内臨床分離株 78 株についてマクロライド耐性菌の調査を行った。

■抗酸菌：結核菌遺伝子検査に関するアンケート調査を実施した。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：平成 25 年度は炭疽菌検出試験の検出限界、平成 26 年度は狂犬病ウイルス遺伝子検出試験、平成 27 年度は SFTS ウイルス抗体の各種動物からの検出試験の ELISA 系の EQA を実施した。

■HIV 関連感染症：2013 年 7 月の衛生微生物技術協議会第 34 回研究会(名古屋)、2014 年 6 月の衛生微生物技術協議会第 35 回研究会(東京)、2015 年 7 月の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。また、2013 年秋および 2014 年秋の国立病院機構名古屋医療センター主催の、地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力した。

■アデノウイルス：レファレンスセンター改善のためのアンケート調査を行った。54 型による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。48 型組換え株を検出し、ゲノム解析を行った。57 型および近縁ウイルスを検出した。

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を製造し、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、情報提供を行った。

■麻疹・風疹：麻疹の real-time PCR 法を確立した。

C. 研究結果

■レファレンスセンターの位置付け：感染研と地衛研の間で常時連携して特定の疾病に対応する機能的な枠組みとしてレファレンスセンターをおくこととし、その概要につき明文化した。

■真菌の SOP および BSL3 取扱マニュアルの作成：遺伝子検査を中心とした真菌検査を実施する上での統一ルールを記載した SOP を作成した。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た。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：

1. 薬剤耐性菌レファレンスセンターの新規設置：6 ブロックに支部を設置した。CRE の検査について技術研修を 4 回に渡って行った。

2. 季節性インフルエンザの検査に関する標準作業書ひな形の作成：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：2013-2015 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 9,038 株であった。

1.2 下痢原性大腸菌のコントロール株を配

布し、要望・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 (2013-2015 年用) 各年 10 株ずつ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：3 年間で 158 株収集された。

2.2 レジオネラ免疫血清の委託作製：最初の 2 年間は混合血清 3 種を試作し配布した。3 年目は免疫抗血清 3 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2012-2014 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 3138 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：2012-2014 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 237 症例あった。最も多く分離された型は T1 型で全体の 40.1%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 237 例中、*emm1* 型が 101 例(42.6%)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：2012-2014 年に分離された *C. jejuni*990 株を Lior 法および 964 株を 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、CPFX)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、全国の検疫所本所及び空港検疫所支所の職員を対象として情報を提供した。

2. エキノコックス症：3年間でヒトの疑診例14例中7例が遺伝子検査・抗体検査ともに陽性で、5例が多包性エキノコックス症、2例が単包性エキノコックス症と診断され、いずれも北海道との関連が認められた

3. クドア感染症：情報交換を通じて、ナナホシクドア以外のクドア属寄生虫に起因する一過性下痢症は、現時点では有症苦情事例として取り扱うことを確認し、食中毒としてどのような形で取り扱うかは、厚生労働省(監視安全課)を交えて、更に検討・協議するとの結論を導いた。

4. 肺吸虫症：検査したイノシシ37頭のうち、12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。

2. 診断用ボツリヌス抗毒素の標準化：C, D, G型抗毒素を作製した。

3. アウトブレイク事例

① *Corynebacterium striatum* 感染症によるアウトブレイク事例の調査：4患者から分離された8菌株はPFGEによるパターン解析・質量分析から院内伝播と考えられた。

② *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、77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

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。

ロスリバー熱の実験室診断法を確立し、日本発の輸入症例を確定診断した。

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を共有した。また、各施設の準備状況に合わせ体制構築を進め、各ブロック内の衛研等にも抗原分与・技術供与等、全国の診断体制維持を継続的に行った。

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. 全国共通となる検査法の評価：multiplex Real Time PCR, one-tube nested PCR の特異性と汎用性は、現在国内で課題となっている紅斑熱群リケッチアや

つつが虫病に対し、臨床検体も含めおおむね有効性であり、スクリーニング系として有効と考えられた。日本紅斑熱特異的 Real Time PCR についても同様であった。

■エンテロウイルス：アンケートを依頼した 78 地衛研のうちエンテロウイルス検査を行っている 67 機関から回答を得た。参加型 WS を開催し、実習後に内部精度管理試験 SOP のひな形を作製した。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 に含む項目の検討について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. 麻疹 real-time PCR 法の確立及びその評価：10 カ所のレファレンスセンターにおいて最適化を実施したところ、97%(32/33)で最適化の規格を満たしていた。real-time PCR 法は nested RT-PCR 法とほぼ同等の感度、特異度であると判断した。

2. nested RT-PCR 法の EQA の検討、ならびに精度管理結果：22 施設に対して標準 RNA、ブランド検体を配布した。遺伝子解析技術に問題のある施設が 4 カ所あった。

3. real-time PCR の導入と利用促進に関する検討：real-time PCR 用プローブ、プライマー、標準 RNA を合成し、地衛研に配布した。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。約 75%の地衛研で real-time PCR の導入を検討し、「標準 RNA を用いた系の最適化」を開始していた。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。

■百日咳

1. レファレンス関係： *B. holmesii*-LAMP キット、4Plex リアルタイム PCR キットを

リクエストに応じて配布した。

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. 結核菌遺伝子型別法に関するアンケート調査：79 施設の内、41 施設では結核菌を扱っており、遺伝子型別等が可能、8 施設は予定している、との回答を得た。

2. 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。

3. 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。

4. 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、各ローカセットの正答率を評価した。

5. 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：

1. 炭疽菌検出試験：DNA 試料を配布し、参加地衛研の検出成績をまとめた。芽胞換算で 1~100 個の検出限界を示した。

2. 狂犬病ウイルス遺伝子検出試験：RT-PCR ブラインドテストを行った。反応

条件や試薬が異なっていた地衛研では、期待する結果が得られなかった。

3. SFTS ウイルス抗体の各種動物からの検出試験：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。また、地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力し、検査技術の維持・向上に努めた。年齢別にみると、30 歳代後半が最多で、年齢人口 10 万人あたりの HIV 感染者数では 20 歳代後半が最も高かった。地理的にみると、関東・甲信越、近畿に多い状況であったが、2014 年には九州の件数が、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：

1. レファレンスセンター改善のためのアンケート：回収率は 77 施設で 100%であった。ウイルス分離、PCR による型別の実施状況などを調査した（それぞれ、65 施設、58 施設が実施）。

2. 54 型による流行性角結膜炎の流行の把握 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。

3. 48 型組換え株の検出・ゲノム解析および 57 型および近縁ウイルスの検出：48 型および 57 型はこれまで日本で検出されたこ

とがなかった。48 型(組換え株)は最初に千葉県衛生研究所で 2012 年に分離され、ウイルスゲノムの全塩基配列解析により複数の型が複雑な組換えを起こした株であることが明らかになった。

D. 考察

■ レファレンスセンターの位置付け：レファレンスセンターの概要について明文化したことにより、わが国の病原体検査が円滑に実施できることが期待される。実際に運用し修正が必要な事項等が明らかになれば、協議の上変更が可能と考える。

■ 真菌の SOP および BSL3 取扱マニュアルの作成：本研究で作成した SOP 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。病原体検査における品質・精度の向上のためにも SOP の作成は基本である。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され検査の精度管理基盤となることを期待する。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。この検査マニュアル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を期待する。

■ 地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：

1. レファレンスセンターのあり方：今後重要なことは、対応が来ている検査の精度を確保することと、新たに対応が必要となる新興感染症の検査を迅速に確立できる体制を整えておくことであると考えられる。

1) 精度管理、GLP 対応が必要と思われる感染症：インフルエンザ、麻疹・風疹、ノロウイルス、新興感染症

2) 検査の強化が必要と思われる感染症：
薬剤耐性菌

2. 季節性インフルエンザの検査に関する標準作業書ひな形の作成：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りません。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. レジオネラサーベイランス：臨床検体から菌を分離することの重要性が認知されるにつれ、菌株分離例が少しずつ増えてきた。その結果、データが蓄積し、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。

4. 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。PCR 法による型別は、操作性の煩雑さから、多数検体を処理する日常のルーチン検査での実用化が現実的か否かについては、さらに検討が必要である。

■寄生虫：マラリアの検査診断法に関する技術研修を定期的の実施し、状況を改善する必要がある。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。寄

生虫に関する地研とのラボネットワークの強化は、今後も継続的に取り組むべき課題であることが認識された。特に具体的な活動として、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* アウトブレイク事例：日本では、医療機関においても理解度が低いため、多くの症例事例が見過ごされていると推定されている。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 striatum* 感染症アウトブレイク事例：医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所、さらには、外部委託検査センターのネットワークで情報共有し協力することで対応が可能であった

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：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。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：近年の国内におけるリケッチア症の多様性に加え、日本紅斑熱患者発生地域の拡大と患者数増加、つつが虫病における Shimokoshi 型の発生地域の拡大など、年々情報の更新が行われ、それに合わせた検査体制の維持が重要になっている。昨今、多様な感染症への対応が求められる衛研において、本研究で検討した multiplex Real Time PCR や one-tube nested PCR 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。リケッチア症の血清診断では、多くの症例が見落とされている可能性が高い。取り扱いに法的規制、バイオセーフティレベルの制約が多い多様なリケッチア症に柔軟に対応できる multiplex な診断系の現場導入を試み、衛研を中心としたリケッチア・レファレンスセンターを強化、地域ごとに適切な実験室診断が行われ、地域に即した情報発信を行えるようにすることが、患者発生に対応する医療と地域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：アンケート調査で、明らかになったことは、エンテロウイルス検査は自治体間で手法などが異なり、技術継承が行われていないこと、基盤的な研修・マニュアル整備の必要性、などが挙げられた。参加型 WS には 8 名が参加し、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。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。一定の検査体制を確保するためには、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ため、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：平成 27 年 3 月に日本は麻疹排除状態にあると WHO から認定された。麻疹の排除の定義から、麻疹排除が近づいた時期には、ウイルス遺伝子検査が重要であり、品質が担保された方法、施設でウイルス遺伝子検査が実施される事が求められる。real-time PCR は nested RT-PCR とほぼ同等の感度、特異度をもち、簡便で多検体の処理が可能であり、クロスコンタミネーションの可能性も小さくなる。積極的な使用が望まれる。感染症法の改正もあることから、精度管理等を通じてラボラトリーネットワーク機能の維持、強化をしていく必要があるだろう。

■百日咳：遺伝子検査の拡充・整備を進め、地方衛生研究所を対象に conventional PCR 用の陽性コントロール DNA と遺伝子検査キットの配布を行った。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を継続して進める必要がある。

■抗酸菌：2013 年度の結核菌型別実施状況調査に基づき、2014 年度と 2015 年度に外

部精度評価を実施した。2015年度には内部精度管理用検体の提供も実施した。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。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ものと考えられた。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。

■動物由来感染症：

1. 炭疽菌検出試験：First screeningとしてのPCR検査系としては十分な検出限界を有していると考えられる。
2. 狂犬病ウイルス遺伝子検出試験：参加地衛研の全てでRT-PCRが可能であった。当面、One step RT-PCRによる疑い検体からの狂犬病ウイルス検出試験を行うことが適当と考えられた。
3. SFTSウイルス抗体の各種動物からの検出試験：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場所が確認された。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患者発生の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については特に沖縄が極めて高い件数となっており、留意が必要と考えられた。

■アデノウイルス：

1. アデノウイルスレファレンスセンター改善のためのアンケート：84%がアデノウイルスの分離を実施し、75%の施設が塩基配列による同定法を用いているため新型の同定も可能であると考えられた。検体採取において地域的に病原体情報が十分とれていないところがあり、今後の改善が期待される。
2. 54型による流行性角結膜炎の流行の把握：日本以外で54型検出の報告はなく、本流行は世界初の54型流行を日本の感染症発生動向調査が捕捉した事例と考えられた。
3. 48型組換え株の検出・ゲノム解析および57型および近縁ウイルスの検出：感染症発生動向調査における病原体サーベイランスによって、3年間に2つの新しい型（組換え型）が日本において流行していることを明らかに出来た。

E. 結論

■レファレンスセンターの概要について明文化した。真菌検査のための標準作業手順書（SOP）および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：①特定の感染症について定期的にEQAを課すことにより地方衛生研究所のレベルはある程度保障されるようになるであろう。②薬剤耐性菌レファレンスセンターを設置し、研修を行い、全国における検査体制の強化が図られた。③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1117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：2012年から2014年の3年間に全国でヒトから分離された *C. jejuni* 約1,000株について血清型別を実施したところ、型別率は、Lior法で76.2%、Penner法で51.0%であった。Penner法は、Lior法に比べ型別率が低い傾向であった。原因の検討を行ったところ、市販血清の力価に問題があることが示唆されたが、未だ、解決には至っていない。一方、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、型別可能な血清群を増やすこと、その操作性を簡便にすること等が課題である。

薬剤耐性株の出現状況を継続的に調査しているが、2014年の *C. jejuni* 分離株のキノロン系薬剤に対する耐性率は57.1%で、1996年以来最も高かった。カンピロバクター一食中毒が非常に多いことから、十分な監視が必要である。

■寄生虫：エキノコックス症に関しては、監視体制の改築も踏まえつつ、発生情報を積極的に収集し、地研や医療機関等に情報提供する必要がある。マラリアや食品媒介寄生虫に関しては、本研究班の活動を通じて、法に則した届出に必要な検査体制の整備と普及において、一定の貢献を果たすことができたと考える。寄生虫症発生動向の監視と検疫体制を更に強化するには、地研や検疫所との間における情報交換と相互研修が、まず重要である。地研および検疫所とのラボネットワークの強化には、継続して取り組む必要がある。

■ジフテリア・ボツリヌス：地方衛生研究所において、提出された病原体や臨床検体において検査を行うだけではなく、その感染症を疾患として理解し、保健所、医療機関とともに対応にあたっていく姿勢が求められていると考えられた。

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（特に検査が外部委託されている場合は）民間検査センターがネットワークを結び、対処することが重要と考えられた。

■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系を改良した。ロスリバーウイルスの実験室検査系を確立した。

■リケッチア：リケッチア症の国内での多様性ととともに、地域特性の強い感染症であることも踏まえ、全国のラボネットワーク

の構築方法の検討、各ブロックのレファレンスセンターを中心とした地衛研の検査体制を維持するために、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、臨床に即した迅速対応と情報発信と信頼性の高い調査検査が可能となり、患者のみならず住民の QOL に資することになる。また、多様性を考慮し、本研究において多施設間で検討した特異性の範囲をリケッチアにユニバーサルに設定した検出系は、輸入症例としても注意すべきリケッチア症に効果的と考えられ、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。

■エンテロウイルス：

1. エンテロウイルス検査体制に関するアンケート調査の結果は、自治体間で取り組みに大きく異なることを示唆した。全国レベルの病原体サーベイランスによりエンテロウイルスを詳細に解析するには、検体採取法や、検査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と考えられた。しかし、基準となる標準的な手法などについては、地衛研と国のネットワーク間でアップデート等の必要性を検討する必要がある。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共同作業、参加型研修等、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一部であり、複数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。

2. 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：麻疹検査診断ラボラトリーネットワークの機能を強化するために、real-time PCR 法を導入、試薬等の配布やアンケートを通して利用を促した。また nested RT-PCR 法ならびに遺伝子解析技術に関する EQA を試行し、検査技術上の問題点を探った。real-time PCR 法は短い期間にかなり普及したと考えられたが、一方、いくつかの検査上の問題も見つかった。今後も EQA 等を通じてラボラトリーネットワーク機能の維持、強化を継続していく必要があると思われた。なお、平成 27 年 3 月に日本は麻疹排除状態にあると WHO から認定された。

■百日咳：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遺伝子検査キットを含むレファレンスの配布を行った（計 41 件）。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：VNTR 分析における外部精度評価を本邦で初めて導入・推進した。国内結核菌遺伝子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 年度は多くの施設において分析精度の高い結果が認められ、外部精度評価の反復と結果のフィードバックが VNTR 分析精度の改善に有用であることが示されたと考える。

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る。

■動物由来感染症：炭疽菌検出試験に関しては、参加地衛研が実施した PCR による検出限界にばらつきがあったが、想定される

炭疽菌検体の検出に有効な範囲であった。

狂犬病の NAT では、感染研から陽性対照遺伝子とブラインド検体を送付して「狂犬病検査マニュアル：第2版」に準じた遺伝子診断 (RT-PCR) を地衛研で行った結果、通常、各地衛研で使用している機器・試薬等を使用した NAT 検査が可能であることを明らかとした。

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。

■ アデノウイルス：アデノウイルスの病原体サーベイランスは小児科定点(咽頭結膜熱、感染性胃腸炎)および眼科定点(流行性角結膜炎)が感染症法に基づいて実施されている。2014年に実施したアンケート調査で84%がアデノウイルス検査を実施していた。24施設(31%)は小児科からの検体提出はあるが、眼科からの検体提出は無い状況と考えられた。

2015年に眼科定点からの検体の検査結果を解析した結果、54型が最も多く流行性角結膜炎の主要な起因病原体であった。

2013年～2015年までの3年間に地方衛生研究所とのネットワークにより48型組換え株と57型を検出でき、日本のアデノウイルスサーベイランスにより重要な知見を得ることが出来、アデノウイルスの病原体サーベイランスがどのように実施されているかを知ることが出来た。眼科での検体提

出がない自治体が半数程度見られた点は改善されるべき課題である。

F. 健康危機情報

■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。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：

特定の疾患に固執した対応を行うと、有効な治療法がありながら、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡、重症化に至る危険性があり、事実散見された。

また日本紅斑熱患者発生地が広がり、リケッチア症の多様性のため、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。

■動物由来感染症：

半世紀にわたり狂犬病清浄地域とされてきた台湾で、かなり前から野生動物(イタチアナグマ)に狂犬病が侵淫していたことが、平成25年7月に明らかとなった。これを受けて、平成26年8月4日付で厚生労働省結核感染症課から「国内動物を対象とした狂犬病検査実施要領」が都道府県、保健

所設置市、特別区の衛生主管部（局）あてに通知された。

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>）。

■アデノウイルス：2015 年に流行性角結膜炎の全国規模の流行があり、角膜混濁や視力低下などが懸念される状況であった。

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。