

あった。保健所と国立感染症研究所の指導が入る前までは、民間検査センターに外部委託していた *Clostridium difficile* 分離培養検査を医療機関の検査室で開始できるよう指導した。1年にわたる保健所による介入指導の後、病院内での検査体制は、検体依頼のステップで問題が残ったものの、院内検査室における *Clostridium difficile* 培養検査は軌道に乗った。平成 27 年 11 月 27 日に当該医療機関から、勉強会への参加依頼があったため、院内勉強会に保健所担当者、および国立感染症研究所担当者が参加した。

79 患者から採取された 99 検体において *Clostridium difficile* 分離培養を行ったところ、77 検体において toxin B 陽性 *Clostridium difficile* が分離培養された。77 菌株において PCR ribotyping 解析を行ったところ、PCR-ribotype 018 が 61 株 (79.2%) をしめた。

5. 情報発信への支援

破傷風症例報告に関しては、外部委託検査センターからの協力支援により、論文発表が可能であった。 *Corynebacterium striatum* アウトブレイクに関しては、医療機関の感染管理認定看護師(ICN)が学会報告した。

D. 考察

ボツリヌス症に関しては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。そのボツリヌス症であっても、「検体」ではなく「感染症事例」として考え、さらに必要な検査（たとえば、食餌性ボツリヌス症を疑うのであれば、食品の調査をしなければならないこと）を提案することが疎かになる事例がみうけられる。提出された検

体をどのように処理するかだけではなく、感染症として理解し、保健所とともに感染症事例に対応することが重要である。平成 24 年から地方衛生研究所の希望により開始した「ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会」では、検査技術だけでなく、疾患に関する情報提供や意見交換も行った。

Clostridium difficile 感染症は、米国 CDC からは urgent threat 「緊急なる脅威」として報道され、英国では全数把握疾患である。日本では、医療機関においても理解度が低いために、多くの症例事例が見過ごされていると推定されている。近年、*Clostridium difficile* アウトブレイク事例発生について、医療機関から保健所に相談されることが増加し、地方衛生研究所には分離菌株の解析とともに、医療機関における適切な細菌学的検査を含めた支援や助言が求められてきたが、対応は自治体により多様である。「院内感染に関連する薬剤耐性菌の検査に関する研修」で行った CDI に関する講義により、少しでも、地方衛生研究所において本疾患の認知度があがることを期待したい。

今回提示した CDI アウトブレイク事例は、認識されはじめた平成 26 年 12 月で発生率が 34/10,000 patient-days を超える大きなアウトブレイクで、管轄している保健所はその公衆衛生学的重要性を認識して対応し、国立感染症研究所は可能な限り支援を行った。菌株の解析結果から、PCR-ribotype 018 株が本事例における流行株と考えられた。PCR-ribotype 018 株は、日本以外でも、イタリア、韓国で優勢株・流行株として注目されている菌株であり、より重症例から分離されるという報告もある。各医療機関における対応はもちろん重要であるが、各地域（自治体）で、あるいは日本全体での分子疫学を含めた感染実態を調べていくた

めにも、医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所のネットワーク構築が必要と考えられた。

*Corynebacterium striatum*感染症アウトブレイク事例については、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(図)。アウトブレイク前の分離菌株におけるデータ整理や、アウトブレイク後の保菌モニタリングを含め、特に院内検査室のない医療機関では、外部委託検査センターの協力はかせないことがわかった。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

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。

G. 研究発表

論文発表

1. 鈴木真紀、黒崎貴子、加藤はる、佐藤隆也、古畑健司、山本明彦、宮上寛之。外部委託検査で創部から *Clostridium tetani* が分離された破傷風の1例。医学検査 62 (6): 698-702, 2013.
2. 廣川秀徹、吉田英樹、中山浩二、澤田好伴、伯井紀隆、坂本徳裕、松生誠子、半羽宏之、松本健二、谷和夫、吉村高尚、中村寛海、西尾孝之、加藤はる、鈴木里和、柴山恵吾。外科手術後患者における多剤耐性 *Corynebacterium striatum* による院内感染事例。IASR 36:90-91, 2015.

学会発表

1. Kohda T, Torii Y, Yamamoto A, Kenri T, Kato H, Shibayama K, Takahashi M, Kozaki S, and Iwaki M. Japanese domestic reference botulinum C, D, and G antitoxins. 52th Interagency Botulism Research Coordinating Committee, 2015 October 25th-28th. Frederick, MD, U.S.
2. 黒田美奈、加藤はる、寺岡利恵、安井良則、堀越敦子、榊田浩禎。心臓外科手術後患者における *Corynebacterium striatum* によるアウトブレイク事例。第30回日本環境感染学会総会 平成28年2月19日-20日京都
3. 加藤はる *Corynebacterium striatum* による院内アウトブレイク事例(ワークショップ、事例に学ぶ細菌学)。第89回日本細菌学会総会 平成28年3月23

日-25日大阪

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

実用新案登録

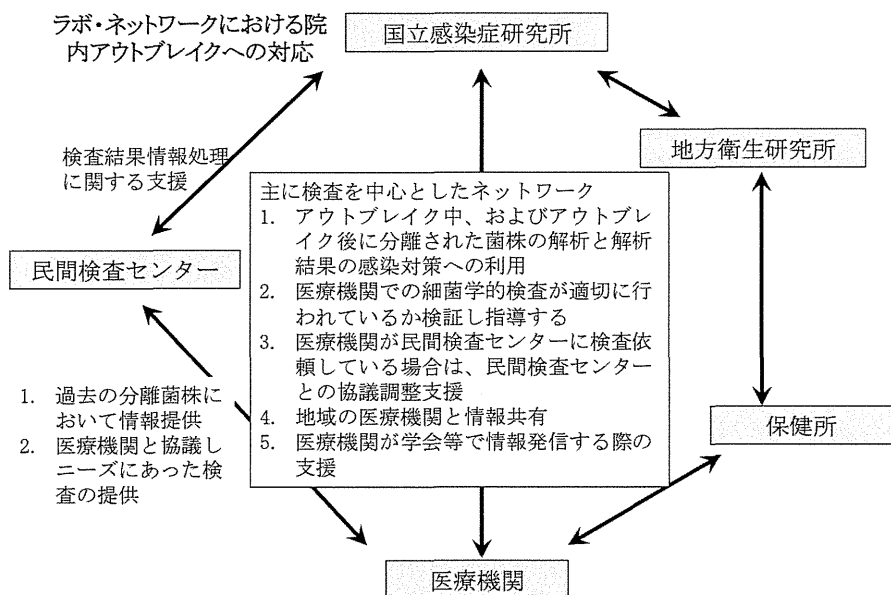
該当なし

特許取得

表 ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会参加施設

平成 25 年度
福島県衛生研究所 北海道立衛生研究所感染症センター 千葉県衛生研究所 東京都健康安全研究センター
平成 26 年度
香川県環境保健研究センター 広島県立総合技術研究所 岡山県環境保健センター 愛媛県立衛生環境研究所
平成 27 年度
千葉市環境保健研究所 福岡県保健環境研究所 熊本県保健環境科学研究所 愛知県衛生研究所

図 アウトブレイク対応のラボネットワーク



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
（H25-新興-指定-002） H25-27 分担総合研究報告書

「蚊媒介性ウイルス感染症の診断体制の拡充」

分担研究者 高崎智彦（ウイルス第一部・室長）
協力研究者 中山絵里（ウイルス第一部・研究官）
モイ メンリン（長崎大学熱帯医学研究所・准教授）
田島茂（ウイルス第一部・主任研究官）

研究要旨 海外からの昆虫媒介性ウイルス感染症のなかで、ジカ熱（Zika fever）、ロスリバー熱の実験室診断法を確立し、それぞれ日本初の輸入症例を確認し、地方衛生研究所に検査法に関して普及を計った。ジカ熱に関しては、ブラジルで小頭症児が目立ちだしたという情報を得た時点で、リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブ、陽性コントロールを地方衛生研究所アルボウイルスレファレンスセンターに配備を計画し、2016年1月中旬には配備を終了した。2月1日に世界保健機関（WHO）が緊急事態宣言を発した後、他の地方衛生研究所にもアルボウイルスレファレンスセンターから分注配布を開始できた。一方、国内で依然として夏季には活動を続ける日本脳炎に関して、現在国内で検出される日本脳炎ウイルスは遺伝子Ⅰ型であるが、1980年代以前は遺伝子Ⅲ型であった。すでに確立していたⅠ型用、Ⅲ型用以外に、Ⅰ・Ⅲ型共通検出用およびⅠ・Ⅲ・Ⅴ型共通検出用リアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）系を開発した。

A. 研究目的

近年、デング熱やチクングニア熱など世界的に蚊が媒介するウイルス感染症の流行が拡大している。ジカ熱とロスリバー熱といった比較的国内で知られていないウイルスの実験室診断法を確立する。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）による感染症でその発地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内で JEV は現在もブタから毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウ

イルスは 90 年代の初頭にⅢ型からⅠ型へと変化した。

B. 研究方法

ジカウイルス（Zika virus）

リアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）を評価した。それらを用いて 2014 年 1 月には日本初のジカ熱輸入症例を確認し、報告した。ジカウイルス病原体検出法の地方衛生研究所アルボウイルスセンターおよび希望施設に情報提供を開始し、2016 年 1 月には全国の地方衛生研究所アルボウイルスレファレンスセンター 9 施

設に陽性コントロール（ジカウイルス RNA）とともに配布し、各ブロック内に普及を図った。

日本脳炎ウイルスに関しては、Genbankに登録された遺伝子配列データに基づいてⅠ型、Ⅲ型を区別するリアルタイム PCR 系とⅠ型およびⅢ型とともに検出できるリアルタイム PCR 系、Ⅰ型・Ⅲ型共通検出系の開発を行った、中国や韓国でⅤ型の検出が目立ってきたためⅠ-Ⅲ-Ⅴを共通で検出できるプライマーを設計し評価し、衛生微生物協議会および希少感染症診断技術研修会で情報提供した。

C. 研究結果

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、日本初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) はまず、Ⅰ型・Ⅲ型共通検出系を開発し、遺伝子Ⅰ型、Ⅲ型およびⅤ型に対する共通検出系を確立し、十分な感度と特異性を確認した。

D. 考察

ジカウイルス (Zika virus) は世界的に流行しているデングウイルスと同じフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで近縁なウイルスである。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。さらに2014年にはブラジルに侵入し2015年には100万人を超える大流行となり他の中南米諸国に拡大した。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。この時点でジカウイルス遺伝子検出系の全国の地方衛生研究所アルボウイルスレファレンスセンター9施設に陽性コントロール（ジカウイルス RNA）の配備が完了しており、そこからさらに各地方衛生研究所に再配分され、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。本研究班の果たした役割は大きかったといえる。ジカ熱は東南アジアなどのデング熱流行地域では流行があっても見過ごされている可能性がある。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。またオーストラリアへの旅行者の多い日本においては、オーストラリアおよびその周辺で時に流行するロスリバー熱も、国内侵入に備えて診断体制を整備すべき蚊媒介性ウイルス感染症である。

一方、我が国に常在する日本脳炎ウイルスの検査は、近年でも検査会社では赤

血球凝集阻止（HI）抗体、補体結合反応（CF）抗体検査で実施されており必ずしも感度は高くない。そこで、より高感度で特異性の高い遺伝子型Ⅰ・Ⅲ共通、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。

E. 結語

- 1) 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、プローブセットを提供した。
- 2) 日本脳炎ウイルス遺伝子型Ⅰ・Ⅲ型共通および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 系を改良した。

- 3) ロスリバーウイルスの実験室検査系を確立した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

関連するものなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし.

2. 実用新案登録

3. その他

なし

平成25-27年度
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
総合研究報告書

リケッチア・レファレンスセンターの活動について

研究分担者 安藤秀二 国立感染症研究所ウイルス第一部 室長

研究協力者 門馬直太・千葉一樹・鈴木理恵： 福島県衛生研究所
東海林彰・木村政明・坂 恭平： 青森県環境保健センター
山本徳栄： 埼玉県衛生研究所
新開敬行・長島真美： 東京都健康安全研究センター
赤地重宏： 三重県保健環境研究所
名古屋真弓・滝澤剛則： 富山県衛生研究所
寺杉文男： 和歌山県環境衛生研究センター
北本寛明・近平雅嗣： 兵庫県健康生活科学研究所健康科学研究センター
木田浩司・濱野雅子・岸本寿男： 岡山県環境保健センター
島津幸枝： 広島県立総合技術研究所保健環境センター
松本道明： 高知県衛生研究所
御供田睦代： 鹿児島県環境保健センター
矢野浩司・野町太朗： 宮崎県衛生環境研究所
川森文彦： 静岡県環境衛生科学研究所
佐藤寛子： 秋田県健康環境センター

研究要旨 国内のリケッチア症は、ベクター種、リケッチア種により、発生時期や患者発生地域など地域特性が強い疾患である。リケッチア症の国内の広がりを考慮すると、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましく、3年間の本研究活動では、全国の横糸となるリケッチア・レファレンスセンターの地方衛生研究所を中心とした全国共通基盤の構築を目指した。幅広いリケッチア症に対応できる各種検査法の検証・現場導入を進めるとともに、リケッチア症の疫学、診断法の情報の共有・更新、マニュアル改訂準備、担当者のスキルアップを積極的に行った。情報発信のあり方で、話題の特定疾患への固執で、鑑別対象とすべきリケッチア症が置き去りにされて治療等が遅れ、死亡例、重症化例が増える危険性があることが指摘された。

A. 研究目的

つつが虫病、日本紅斑熱などリケッチア症は、国内感染患者が多数報告される。抗菌薬治療にもかかわらず死亡例、重症例もいまだ報告される。また、発生時期やつつが虫の血清型等が地域によって異なり、診断用抗原の選択など地域に即した対応が必要となる。さらに BSL3 での病原体取扱、特定病原体指定などが、検査担当者の異動に伴う変更を難しくしている。

現在のリケッチア症の国内での広がりを考慮すると、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましいことから、本研究では、地王衛生研究所(以下、衛研)のリケッチア・レファレンスセンターの活動を通じ、リケッチア症の病原体サーベイランスに必要な実験室診断系の質的標準化、疫学情報の発信、相互信頼と連携、機能強化を目的とした。臨床現場に対応する迅速な診断、情報発信、地域性への

柔軟な対応が期待され、患者の QOL に資することになる。

B. 研究方法

1. 全国情報の共有の機会とレファレンスセンター担当者のスキルアップ

全国およびブロック毎に情報交換の場を作り、疫学、診断情報の収集・分析と共有を行った。また、衛研担当者がスキルアップを行う機会として、技術研修、学会等への積極的な参加と発表を進めた。

2. 全国共通となる検査法の評価

より広範なリケッチアを同時に検出するための multiplex Real Time PCR, one-tube nested PCR について、臨床検体も含み、特異性、汎用性、反応性、臨床現場での有効性、再現性について検討し、複数のレファレンスセンターにおける導入を試行した。また、日本紅斑熱の Real Time PCR の全国導入条件を検討、センター間の相互評価を実施、標準化するための準備を進めた。

3. マニュアル改訂準備

遺伝子検出に適した刺し口(痂皮)や皮膚生検材料などこれまで記載のない点を加え、改訂準備を行った。

(倫理面からの配慮について)

検証臨床検体は、各施設の検査と並行し、各施設の取り扱いによって行った。

C. 研究結果

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、研究協力者である衛研担当者間で、相互連携を可能とする機会を調整、積極的に行い、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、検

体採取法から実験室診断における検査法手技の確認、診断用抗原作成のための標準株の分与等、各施設の準備状況に合わせ体制構築を進め、ブロックセンターが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. センター担当者のスキルアップとブロック毎の活動

診断用抗原の使い分けと同様、感染源対策や発生指標になる各地域特有のベクター分布、保有リケッチア種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。西日本ではマダニ感染症として近年注目された SFTS、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。

D. 考察

リケッチア・レファレンスセンターの存在目的として、各地域の中心となり、各地域を横に繋ぐために、①標準株、分離株の維持(リスク分散)、②診断用抗原並びにPCR陽性コントロールの分担作製と供給、③実験室診断技術の相互評価(技術の維持)、④新規診断法等の相互評価(標準化)、⑤疫学情報、診断情報の収集・分析と共有、⑥緊急時のバックアップ体制、⑦検査マニュアルの作成、改訂、⑧検査技術の研修、⑨地域ごとの課題対応(調査、特定ツールの検討)、⑩その他(個々の担当者のスキ

ルアップ) 等が挙げられ、さまざまな機能が期待されている。

一方、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S himokoshi型の発生地域の拡大など、以前より知られている疾患ながら、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。

リケッチア症の遺伝子検出系において、従来のコンベンショナルPCRではシーケンス解析まで行わないと型別や種別の鑑別ができず、迅速に対応できないケースが考えられる。リケッチア症はテトラサイクリン系抗菌薬により治療可能であることから、まずスクリーニング的にリケッチア症であるか確定することが発生時の実験室診断に負担とならない。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、つつが虫病の一部が民間検査所でも可能であるが、多くの症例が見落とされている可能性が高い。本研究で取り組んだように、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。

E. 結論

リケッチア症の国内での多様性ととも、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。

F. 健康危険情報

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。

G. 研究発表

論文発表

1. 安藤秀二, リケッチア, 平松啓一監修, 中込治, 神谷茂編集, 標準微生物学, 第12版, p307-315, 2月, 2015年

2. 安藤秀二. チフス群リケッチア症. 岡岡部信彦・岩本愛吉・大西真・西條政幸・谷口清州・野崎智義・宮崎義継編. 感染症予防必携改訂3版. p573-576, 2015年, 日本公衆衛生協会, 東京.
3. 安藤秀二. つつが虫病. 木村哲・喜田宏編. 人獣共通感染症 第3版. p192-196, 2016年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
4. 角坂照貴, 安藤秀二. 第3章 病気を起こすダニ②ツツガムシ. 島野智之・高久元編. ダニの話. p43-52, 2016年, 朝倉書店, 東京.
5. 安藤秀二. 紅斑熱群リケッチア・つつが虫病 情報 update, 第22回リケッチア研究会, 11月28~29日, 2015年, 東京
6. 安藤秀二. リケッチア症の最新の検査情報と知見, 第8回日本リケッチア症臨床研究会, 1月9-10日, 2016年, 大津
7. 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 荒畑沙織, 佐原啓二, 安藤秀二, 大橋典男. リケッチア感染症(つつが虫病, 紅斑熱)の迅速検査法体系の構築, 獣医学術学会年次大会「日本獣医公衆衛生学会」, 2月26-28, 2016年, 秋田市

学会発表

国内学会

1. 安藤秀二. リケッチアと関連疾患, 平成25年度希少感染症診断技術研修会, 2月, 2014年, 東京
2. 山本徳栄, 近真理奈, 伊佐拓也, 杉山 郁, 根岸 努, 新井陽子, 小山雅也, 三田和正, 岸本寿男, 安藤秀二: 埼玉県内のイヌ, ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価—第3報—, 第21回リケッチア研究会, 12月, 2014年, 東京
3. 御供田睦代, 岩元由佳, 中堂園文子, 岩切忠文, 福盛順子, 藤田博己, 山本正悟, 角坂照貴, 高橋 守, 川端寛樹, 本田俊郎, 坂元修治, 蔵元 強, 北野智一, 矢野浩二, 藤田信子, 島崎裕子, 門馬直太, 安藤匡子, 高野 愛, 矢野泰弘, 糸川健太郎, 田原研司, 及川陽三郎, 川森文彦, 大橋典男, 高田伸弘, 安藤秀二. 薩南諸島のリケッチア症について, 第21回リケッチア研究会, 平成26年12月20-21日, 東京
4. 山本徳栄, 近 真理奈, 大山通夫, 大山

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

平成25-27年度
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
総合研究報告書

エンテロウイルスのレファレンス

研究分担者 吉田弘 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 エンテロウイルスレファレンスセンター
(福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、
神戸市環境保健研究所、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) 他、全国の地方衛生研究所
の皆様

研究要旨 (初年度)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、ウイルス分離・同定法が施設間で異なっているため、技術の継承が困難な状況が示唆された。(2年目)調査結果及び要望が多かったウイルス分離、細胞維持に関わる基盤的技術について、参加型研修を企画し、各種マニュアルを作成した。(3年目)感染症法改正(H28年4月施行)にあわせ、H26年度作成したマニュアル類を、改正された省令と整合性を取るべく作業部会にて内容を再検討した。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。

A. 研究目的

我が国の感染症発生動向調査事業は昭和56年に予算事業として始まり、感染症法制定(平成11年)時に、法定化されている。このうち小児科定点把握対象疾患としてエンテロウイルス感染症(手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎)は、地方衛生研究所(以下地衛研と略)で実施する病原体サーベイランスとして実施するルーチン検査の中で、比較的大きな比重を占めている。なお感染症発生動向調査は、迅速に流行状況を把握するため、医師等による診断、届け出を基本としているが、定点把握対象の病原体検査は各自治体の裁量で実施されている。

事業開始から30年以上経過し、この間、必要とされる病原体検査の種類が増加、新

技術の導入、と同時に検査従事者の頻繁な人事異動、自治体の財政状況の悪化など、病原体検査を取り巻く環境は大きく変化している。

本研究では、エンテロウイルスレファレンスセンター及び多くの地衛研職員の協力を得つつ、①地衛研で実施するエンテロウイルス検査の現状と問題点をアンケート調査にて把握し、②調査の結果、要望が多かった基礎技術習得のためのマニュアル等の技術文書をワークショップ(WS)形式にて作成し、③改正感染症法(H26年11月公布)に伴う省令改訂に向けた技術文書案を検討した。

B. 研究方法

1. エンテロウイルス検査に関するアンケ

ート調査

エンテロウイルス検査に関する調査項目（人員、検体数、搬入法、検査材料、分離法、同定法、遺伝子解析による同定法、検査の品質管理）につき、6 ブロックのエンテロウイルスレファレンスセンターを通じて2013年12月2日にアンケートを発出した。なお、回答期限は12月27日とした。アンケート書式は別紙(資料1)に示した。

2. エンテロウイルス検査に関するWS(参加型研修)

ア. 初年度実施したエンテロウイルス検査アンケート結果より、細胞を用いたウイルス分離など基盤的技術の要望が多いこと、また検査に関わる標準作業書が未整備のところが多いことが認められた。よって2年次はウイルス分離のため細胞維持管理を目的としたマニュアル類を整備し、標準作業書(SOP)案を作成すべく、WSを開催した。なお、本WSはウイルス検査の新人を対象としている。

イ. WSの企画

1) スケジュール

2014年6月26-27日に開催された衛生微生物技術協議会にて、WSの開催について周知

8月WS企画調整

9月8-15日エンテロウイルスレファレンスセンターとの調整期間。

9月16-25日 レファレンス委員会内の調整

9月25日地全協感染症部会より全衛研へ発出(資料2)

10月10日募集締め切り(各ブロック)

10月30選考結果通知

12月2-5日WS開催

2) 運営

6名(各ブロック1名)と講師3名(うち地衛研2名)で実施を計画した。

ウ. WSの進行

- 細胞感受性試験に弱毒1型ポリオワクチン株を使用。WHOポリオラボネットワークで用いる標準法に基づきSOP案を作成し、WS期間中2種類の細胞の感受性を比較。
- 細胞は感染研で用意したRD-A、L20B細胞と、参加者が持参した細胞を比較できるようにアレンジした。(WS終了後は感染研で観察を継続し、参加者に結果を送付)
- マイコプラズマ否定試験は感染研で実施するプロトコールをもとにSOP案を事前に準備。感染研で準備した検体と、参加者が持参した検体を材料に2種類の商業キットを用いて検査した。
- 試験に用いる細胞培養浮遊液50ulを加熱処理後、①タカラマイコプラズマPCRキット、②e-Myco Plus Mycoplasma PCR検出キット(コスモ扱い)を用いてマイコプラズマ感染の有無を比較した。なお、①は主に11種、②は209種類検出できるとされている。
- SOP案に基づき、参加者が試験を実施。終了後、グループミーティング(各班3名)でSOPを改訂。また検査に必要と考えられる追加すべきSOPについて検討し、後日SOP案を提案してもらうこととした。

3. 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を含む項目の

検討(調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、2年目に作成した各種SOP案について、省令と整合性を図るために内容を再検討した。

病原体検査に関連するSOPに含むことが望ましい項目、内容については、別にH26年度厚生労働科学特別研究事業「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」(主任研究者 調恒明 山口県環境保健センター所長)にて報告されている。

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、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(調地全協会長との共催)

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(国立感染症研究所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。
- 作業部会では3班に分け、SOPに含める下記の項目ごとに討議を行い、記載する内容について検討を行った。
- 項目は次の通り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
- グループディスカッション後、各班が改訂結果を発表し、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文言整理を行い、ポリオウイルス検査SOP、季節性インフルエンザ検査SOPとも、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. 結果

1. エンテロウイルス検査に関するアンケート調査(資料3)

ア. アンケート回答機関数

アンケートを依頼した合計78衛生研究所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。

イ. エンテロウイルス検査体制

- 2-3名以上との回答が55機関を占めたが、1-1.5名のみが12機関あった。
- 年間の検体数（概数）については500検体以上は11機関であり、100-500が32機関、100以下が24機関であった。
- 検体搬入状況について毎週搬入があると回答のあったのは30機関であり、次いで随時と回答があったのは18機関であった。
- 検査材料についてはポリオを除き咽頭ぬぐい液を検査材料として用いる傾向が見られた。

ウ. ウイルス分離について

- 各地衛研で異なる細胞を複数用いており、継代の頻度も多様である状況が明らかになった。
- ウイルス分離時の培養温度は、33度から37度まで各衛研で異なる温度で分離が行われている。

エ. ウイルス同定法

- ウイルス同定には中和法と塩基配列による方法の併用が51機関と多数を占めた。
- 塩基配列解析法による同定ではBLAST検索を用いるとした機関がほとんどを占め、標準株との相同性(RIVMタイプングサービス含む)に基づき判定していると回答した機関はエンテロウイルス検査を行っている機関の1/3程度であった。

オ. 検査の品質管理

- ウイルス分離・同定検査は約1/4程度、PCR-シーケンスについては約1/3程度の機関が検査に関して何らかの品質管理を行っているという回答を得た。

カ. 研修等レファレンスセンターに対する

要望

- 基盤的な技術(細胞培養、分離同定)への研修要望が多く、次いで遺伝子解析による同定検査に関する研修要望が多い傾向が見られた。

2. エンテロウイルス検査に関するWS

ア. WS応募結果

定員6名の募集に対し、20人の応募があった。当初6名としたが、最終的に8名の参加者(各ブロック1名、関東甲信静は3名)と3名の講師でWSを開催(国立感染症研究所村山庁舎)した(資料4-1)

イ. 内部精度管理試験SOPのひな形作成
エンテロウイルス検査に必要な細胞のQAに関する資料説明後、WS前に準備したSOP案に基づき実習。実習後、グループディスカッションにより改定したSOPを成果品とした。

ウ. 細胞感受性試験

同一力価のSabin1を用いて、現在感染研で使用しているRD-Aと過去に分与した細胞(持参したRD-A)を同時に検査に供することで、明確に感受性の違いと形態の変化の比較が可能であった。また、力価試験であるため、細胞の状況を定量的な指標として示すことが可能である。

エ. マイコプラズマ否定試験

①タカラマイコプラズマPCRキットと②e-Myco Plus Mycoplasma PCR検出キットを用い、比較試験を行った。RD-A、L20Bではいずれもマイコプラズマ汚染は見られなかったが、一施設が提供していただいた、RD-A、L20B以外の2種類の細胞では、タカラのキットは陰性、コスモのキットは陽性という結果になった。これは検出対象とする種類が異なるためと考えられる。

オ.細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験の SOP について、実習終了後グループディスカッションを行い、案に取りまとめた。また追加すべき SOP は、細胞継代法、細胞数カウント法、培地作成法、細胞保存・リカバリー法、であり、後日参加者間で SOP 案を分担して作成することとした。

カ.H26年度は厚生労働科学特別研究事業「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」(主任研究者 調恒明 山口県環境保健センター所長)にて病原体検査に関連する SOP に記載する項目、内容を検討し、各種 SOP 案を含めることとなっており、本分担研究にて後日作成した培地調製、細胞継代管理、細胞保存融解 SOP 案ともども、特別研究報告にも反映させている

3. 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(資料4-2)

ア. 作業部会の議論の結果

- 2類感染症検査は検査 SOP の他に、試薬類管理、細胞維持管理、機器保守管理、検体など取り扱い管理作業書および内部精度管理作業書を別途、整備する必要性が認められた。
- 2類感染症以外は検査 SOP に、原則試薬、内部精度管理作業書以外は最小限必要な事項を検査 SOP の項目の中に記載することが妥当であるとの結論に至った(表1、2)。
- ポリオウイルス検査に必要な SOP 案は参照資料(後述)として添付している。

イ. H26年度は厚生労働科学特別研究事業「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」と感染症改正に伴う省令項目との検討

- 本分担研究では、H26年度に細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験 SOP 案を作成し、さらに前述の特別研究班では培地調製、細胞継代管理、細胞保存融解 SOP 案、機器保守管理 SOP、試薬等管理 SOP、検体等取扱 SOP 案を作成しており、最終年度はレファレンスセンター協力のもとポリオウイルス検査 SOP 案を作成した。
- これらの SOP 案を省令で示された作業書に含むべき項目と比較し、適宜統合、そして文言修正等を行い、結核感染症課の依頼により提出した(資料5)。
- 「施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について」(健発1117第2号 平成27年11月17日)の SOP ひな形として本分担研究に関連して以下の技術文書が採用された。
 - ・機械器具保守管理標準作業書の例(DNAシーケンサー)
 - ・機械器具保守管理標準作業書の例(リアルタイムPCR装置)
 - ・機械器具保守管理標準作業書の例(冷凍庫)
 - ・試薬等管理標準作業書の例(全般)
 - ・試薬等管理標準作業書の例(細胞培養に使用する培地)
 - ・培養細胞管理標準作業書の例
 - ・検体取扱標準作業書の例(全般)
 - ・検査標準作業書の例(ポリオウイルス分離)
 - ・検査の信頼性確保試験標準作業書の例(マイコプラズマ汚染否定試験)

D. 考察

1. 我が国の感染症発生動向調査事業においてエンテロウイルスが主たる起因病原体となる感染症は、2類のポリオ、5類小児科定点把握疾患として手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、眼科定点把握疾患として急性出血性結膜炎である。このうち、定期的に検体搬入が行われ、地衛研で検査を実施するのは、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎である。

5類小児科定点把握疾患は、迅速性を担保するために患者届け出を基本とし、病原体検査の実施は自治体の裁量となっている。

2. 本研究のアンケート調査で、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①提出頻度、検体の種類、検査手法が異なること、②人事異動により十分な技術継承が行なわれていない場合があること、③技術習得に時間を要するエンテロウイルス検査に関する基盤的な研修(細胞の維持管理、ウイルス分離・同定検査)の実施、及び当該マニュアル整備の必要性があること、④検査機器の高度化、新技術の導入に伴い、検査の質の信頼性を恒久的に担保する取り組みは必要になっているものの、現行体制では困難(人、予算)である、ことが認められた。

3. 初年度実施したアンケート調査では、ウイルス分離に用いる細胞の種類、維持、継代法が施設間で大きくことなっていることを示した。このことはウイルス分離率への影響が想定される。WS 期間中、複数の機関で維持されている同じ系統の細胞が、異なる感受性、形態を示すことを参加者が認識し、ウイルス分離における細胞の維持管理の重要性を共有した。

4. マイコプラズマ否定試験も細胞維持

管理において重要なファクターである。今般二つのキットを比較することで、ひとつの施設が提供した細胞 2種類でマイコプラズマ汚染が確認されている。マイコプラズマ否定試験結果を改善に結びつけるためには、汚染が見つかった時の措置の検討、特に細胞保管、新たなシード細胞の供給体制を確立する必要がある。

5. 精度管理は、意義を理解しないと、ワークロードが増えるだけで形式的になる恐れがある。初年度のアンケート調査により、細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験とも導入している施設はごく一部であったため、制度として普及するために、①教材、SOP 案の作成、②持続可能な実施スケジュールの検討、③標準参照品の供給体制の確立(含む保管)、など検討してゆく必要があることが認められた。

なおエンテロ・ポリオウイルスに関しては WHO が提供する RD-A、L20B 細胞が利用できるため、国立感染症研究所ウイルス第二部で、すでに実施している品質管理試験後、供給可能である。

6. WS には 8 名が参加した。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。

7. 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。

8. 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。

9. 初年度のアンケート調査においてエ

ンテロウイルス検査体制が異なることを明らかにしたが、インフルエンザ検査でも同様の結果が得られている(引用文献、報告書)

10. ポリオウイルス検査は分離を基本とし、かつ5類定点把握疾患の手足口病等エンテロウイルス感染症とも手技など共通する面が多いこと、他方季節性インフルエンザ検査においても分離及び遺伝子検査等エンテロウイルス検査とある程度、共通する手技がある。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が望まれる。

11. 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。

E. 結論

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。

2. 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してゆく必要がある。

つまり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。

3. 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. 児玉弘美, 小菅裕也, 山田香織, 鈴木智之, 小嶋, 石川和彦, 井上剛彦, 谷口秀美, 吉田弘. 無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出状況 (2013 年) — 滋賀県. 病原体検出情報 34:309-310, 2013.

2. 北川和寛, 千葉一樹, 鈴木理恵, 五十嵐郁美, 柏木佳子, 金成篤子, 吉田学, 笹原賢司, 門馬直太, 吉田弘. 無菌性髄膜炎患者から検出されたエコーウイルス 9 型、2002~2013 年—福島県. 病原体検出情報. 35: 249-250, 2014.

3. 伊藤雅, 岩切章, 内野清子, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 板持雅恵, 筒井理華, 濱崎光宏, 山崎謙治, 中田恵子, 吉田弘. 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4~12 月) に検出されたエンテロウイルスについて. 病原体検出情報. 35: 275-276, 2014.

4. 筒井理華, 古川紗耶香, 木村政明, 工藤真哉, 笹けい子, 吉田弘. 無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出—青森県. 病原体検出情報. 35: 242-243, 2014.

5. 島津幸枝, 久常有里, 池田周平, 東久保靖, 谷澤由枝, 重本直樹, 高尾信一, 米倉圭

二, 白石泰尚, 谷博雄, 原三千丸, 吉田弘. エンテロウイルス D-68 型が検出された小児・乳児の 4 症例—広島県 病原体検出情報. 35 : 295- 296, 2014.

6. 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

7. 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

8. 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.

9. Iwai-Itamochi M, Yoshida H, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Kurata T, Takizawa T. Development of real-time PCR to detect oral vaccine-like poliovirus and its application to environmental surveillance. *Journal of virological methods*, 195, 148-155.2014.

10. Nidaira M, Kuba Y, Saitoh M, Taira K, Maeshiro N, Mahoe Y, Kyan H, Takara T, Okano S, Kudaka J, Yoshida H, Oishi K, Kimura H. Molecular evolution of VP3, VP1, 3Cpro and 3Dpol coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 in Okinawa, Japan.

Microbiology and Immunology, 58: 227–238.2014.

11. 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

該当なし

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			○		○

平成 25 年 12 月 2 日

エンテロウイルス検査に関するアンケート調査

地方衛生研究所
エンテロウイルス検査担当者 様

はじめに、回答者についてお答えください。
貴研究所名 ()
所内所属 ()
氏 名 ()

エンテロウイルス検査実施状況に関するアンケート調査協力のお願い (依頼)

平素より大変お世話になっております。
このたび厚生労働科学研究費「国内の病原体サーベイランスに資するラボネットワーク強化に関する研究：研究代表者 宮崎義雄 (感染研)」の一環として、エンテロウイルス検査ネットワーク強化のための研究を行うこととなりました。
今年度は各地方衛生研究所で実施しているエンテロウイルス検査の現状、及び要望についてアンケート調査をさせていただき、次年度以降、具体的な活動について検討をさせていただきたいと思っております (例、マニュアル作成、研修、検査等)。

エンテロウイルス検査について伺います。以下の質問について、該当する項目の□を塗って下さい。

- 1. 人員について
貴研究所でエンテロウイルス検査に従事する職員数についてお答えください。
() 人
貴研究所でエンテロウイルス検査に従事する職員数について、お答えください。
□3名以上 □2名 □1名 □検査を行っていないため不在
□その他 (例1.5人、職員1名と非常勤職員など) ()

つきましては、お忙しいところ恐縮ですが、別紙の項目についてご回答をお願い申し上げます。
なお、アンケート調査の締め切りは12月27日(金)とさせていただきます、結果を各ブロックのエンテロウイルスリファレンスセンターまでメールにてご返答いただくようお願い申し上げます。

- 2. 検体数について
貴研究所で年間搬入される大まかな検体数 (エンテロウイルスに関連する) について、お答えください。
□2000検体以上 □2000-1000検体 □1000-500検体 □500-100検体
□100検体以下 □当所ではエンテロウイルス検査を実施していない。

研究実施者
国立感染症研究所ウイルス第2部 吉田 弘
h.yoshida@nih.go.jp
研究代表者
国立感染症研究所リファレンス委員長 宮崎義雄

- 3. 検体搬入について
①検体搬入状況について伺います。
□無選 □隔週 □毎月 □その他 ()
②検体搬入までの検体保管方法について伺います。
□冷蔵 □冷凍 □その他 ()

返信先：エンテロウイルスリファレンスセンター (地域ブロック)
福島県衛生研究所 (北海道・東北・新潟)
神奈川県衛生研究所 (関東・甲信・静)
愛知県衛生研究所 (東海・北陸)
神戸市環境保健研究所 (近畿)
愛媛県立衛生環境研究所 (中国・四国)
福岡県保健環境研究所 (九州・沖縄)

- 4. 検査材料について
搬入される検査材料の種類は最近の傾向 (厳密ではなく、おおよそで結構です) について伺います (複数回答可)。なお症例定義に合致せず搬入される検体の場合は「その他エンテロウイルス感染が疑われる場合」の項目で回答ください。

- ①無菌性髄膜炎の場合
□髄液 □糞便 □咽頭ぬぐい液
□その他 (具体的に)
②ヘルパンギーナ、手足口病
□髄液 □糞便 □咽頭ぬぐい液 □水疱

- その他 (具体的に)
③ポリオの場合
□髄液 □糞便 □咽頭ぬぐい液
□その他 (具体的に)
□当所ではポリオの例はこの数年のあいだ益数がない。

- ③乳のみマウスの使用について伺います。
□ルーチン検査で使用 □時折実施 □乳のみマウスは用いていない。

- 5. ウイルス分離について
貴研究所で実施しているエンテロウイルス分離について伺います (分離を行っていない場合は記入不要です)。

- 6. ウイルス同定について (複数回答可)
分離株、臨床材料を用いた場合の同定法について伺います。
□抗血清による中和法のみ実施 □塩基配列による同定のみのみ
□中和法と塩基配列による同定の適宜組み合わせ
□乳のみマウスで分離した株はOF法、及び塩基配列による同定法を適宜組み合わせ
□エンテロウイルス特異的リアルタイムPCRにてスクリーニングし、塩基配列により同定
□その他 ()

- ①分離に用いている細胞について伺います (複数回答可)。
□FL □Vero □RD-18s □RD-A □HEL □HEp-2 □LLCMK
□その他 ()
②分離に用いる細胞の継代数 (凍結保存している細胞との入れ替え頻度) について伺います。
□15代で切り替えている。 □15-30代で切り替えている。 □ウイルス分離率、形態変化など変化が見られたときに適宜切り替えている。 □その他 ()
③分離の際の培養温度について伺います。
□34度 □35度 □36度 □その他 (具体的に) 度

- 7. 塩基配列による同定について
①塩基配列による同定法について伺います (複数回答可)。
□CODRHOP-snPCR法 □VP4-VP2部分領域を増幅するRT-PCR
□VP1領域を増幅するRT-PCR □その他 ()
②CODRHOP法以外にVP1領域を増幅するプライマーをお使いの場合、プライマーの名称 (例040,012,011など) について以下詳しくお願いします。
()

- ④分離に用いる培地について伺います。
□イダーMEM □ダルベッコMEM
□細胞の種類で培地を使い分けている (具体例を記入ください)。
()
□その他を使用 ()
⑤培地調製について伺います。
□液体培地を購入 □粉末培地を購入し、調整している。
□その他 ()
⑥ウイルス分離に用いる資材 (プレート、ガラスチューブなど) について伺います。
□チューブ法により分離 □24穴プレートを使用 □48穴プレートを使用
□96穴プレートを使用 □その他 ()
⑦ポリオウイルス分離に用いるL20B細胞について伺います。
□ポリオウイルスの有無を調べるため使用している。
□ストックしているが使用していない。 □保有していない。

- 8. 塩基配列解析法について
①得られた塩基配列を用いてどのように血清型を同定するか伺います (複数回答可)。
□BLAST検索で上位に現れたものを血清型として報告している。
□オランダRIVMのエンテロウイルスタイプングサービスを用いている。
http://www.rivm.nl/mn/gen/enterovirus/byprint.cgi
□標準株との相同性 (VP1領域の塩基配列で75%以上一致) に基づいて同定している。
□その他 ()
②塩基配列解析に用いるソフトウェアについて伺います (複数回答可)。
□DNASIS □MEGA □BioEdit □Genetyx
□その他 ()

- 9. 品質管理について
①ウイルス分離・同定検査に関する品質管理
□特に実施していない。
□実施している (具体的な事項についてお答えください。細胞、試薬等)。
()