

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

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	吉野修司 勝川千尋 梅田 薫 平松征洋 大塚菜緒 森内 巧 宮地悠輔	宮崎県衛生環境研究所 微生物部 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 大阪市立環境科学研究所 微生物保健グループ 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 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・配布を行った。平成25年度は13施設に17件、平成26年度は8施設に12件、平成27年度は11施設に12件のレファレンスを配布した。また、百日咳菌の国内病原体サーベイランスを実施し、定着因子パータクチンの欠損株が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イシン感性菌（MIC, <10 µg/mL）であることを確認した。

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。

本研究では、百日咳検査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整備・配布を行

った。また、百日咳レファレンス活動として、Prn 欠損株とマクロライド耐性菌の国内流行調査を実施した。

B. 研究方法

1. レファレンスの整備・配布

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 (4Plex-RT) 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 (Kamachi *et al.*, *New Microbes New Infect*, 2015)。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、全国から国内分離株を収集した。2000~2015 年の分離株計 345 株 (感染研での分離株を含む) について、Prn 発現の有無をイムノブロット法により確認した。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

2010~2015 年の国内臨床分離株 78 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 は E-test (BG 培地) または平板希釈法 (CSM 培地) により測定し、平板希釈法では 0.1 µg/mL または 10 µg/mL の EM 濃度で実施した。判定は 7 日後の菌増殖を指標に行った。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

現在、百日咳レファレンスセンターは 6 ブロックの 10 地方衛生研究所および感染研細菌第二部の計 11 施設で構成されている (表 1)。平成 25 年度は地方衛生研究所 13 施設に 17 件、平成 26 年度は 8 施設に 12 件、平成 27 年度は 11 施設に 12 件のレファレンス (遺伝子検査キットを含む) を配布した。 (表 2, 平成 28 年 1 月現在)。conventional PCR に使用する陽性コントロール DNA の配布は平成 26 年度が 1 件、平成 27 年度が 0 件と減少した。一方、4Plex-RT の配布は平成 26, 27 年度に各 10 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 3 株の Prn 欠損株のうち、2 株はこれまでと同じ *prn* シグナル配列 (87 bp) の欠損であった。一方、残り 1 株は挿入配列 IS481 による遺伝子破壊 (*prn246::IS481*) を示したが、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

2010~2015 年の国内分離株 78 株はすべてエリスロマイシンに感受性を示した (MIC, <0.1 µg/mL または 10 µg/mL) (表 3)。近

年の国内分離菌にマクロライド高度耐性菌は認められなかった。

D. 考察

本研究では遺伝子検査の拡充・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。近年では陽性コントロールの配布数は減少し、その一方で検査キットの配布が増加傾向にある。4Plex-RT キットは一度に複数の病原体を検査出来るという利点があるため、今後も地方衛生研究所からの配布希望は続くと考えられる。ただし、本キットは特定のリアルタイム PCR 装置 (ABI 7500Fast system) に至適化しており、他の PCR 装置では検査ができないという欠点がある。今後は PCR 装置の適用範囲を広げる検討が必要である。

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、平成 27 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

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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. PLOS ONE. 8(10):e77165, 2013.
2. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET,

- He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5:e01074, 2014.
3. Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J Infect Chemother.* 20:635-8, 2014.
 4. Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol.* 64:463-465, 2015.
 5. Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama 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. 蒲地一成. 百日咳検査の使い方. SRL宝函. p41-43, vol. 34, No. 3, 2013, エスアールエル, 東京.
 3. 蒲地一成. 微生物 ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2):18-21, 2014.
 4. 蒲地一成. 百日咳菌のサーベイランス, 分離菌株の性状変化, *Bordetella holmesii* について. 臨床とウイルス. 43:17-22, 2015.
 5. 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. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo, Japan.
2. Kamachi K. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Asia. The 12th Japan-Taiwan Symposium on Emerging and re-emerging infectious diseases. September 10-11, 2015, Tokyo, Japan.

国内学会

1. 勝川千尋, 梅田薫, 河原隆二, 蒲地一成. 百日咳の診断における培養検査と遺伝子検査の有用性の検討. 第87回日本細菌学会総会. 3月26-28日, 2014年, 東京
2. 勝川千尋, 櫛引千恵子, 西戸温美, 蒲

和文

1. 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 新興・再興感染症 up to date. 化学療法の領域 2013 年増刊号. p71-79, 医薬ジャーナル社, 大阪.

- 地一成. 百日咳の細菌学的検査精度向上に関する多方面からの検討. 第25回日本臨床微生物学会総会. 2月1-2日, 2014年, 名古屋
3. 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第88回日本細菌学会総会. 3月26-28日, 2015年, 岐阜
4. 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第88回日本細菌学会総会. 3月26-28日, 2015年, 岐阜
5. 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
百日咳の血清診断法 (特願2013-77138, 平成25年4月出願)
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

表1. 百日咳レファレンスセンター (平成27年度現在)

ブロック	施設
北海道・東北・新潟ブロック	秋田県健康環境センター
関東・甲・信・静岡ブロック	東京都健康安全研究センター 千葉県衛生研究所 国立感染症研究所 細菌第二部
東海・北陸ブロック	三重県保健環境研究所
近畿ブロック	大阪市立環境科学研究所
中国・四国ブロック	愛媛県立衛生環境研究所 岡山県環境保健センター 山口県環境保健センター
九州ブロック	福岡県保健環境研究所 熊本県保健環境科学研究所

表2. 平成25~27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		平成 25 年度 (13 施設)	平成 26 年度 (8 施設)	平成 27 年度 (11 施設)
レファレンス	百日咳菌 DNA	0	0	0
	百日咳類縁菌 DNA (パラ百日咳菌, <i>Bordetella holmesii</i>)	5	1	0
遺伝子検査キット	<i>Bordetella holmesii</i> -LAMP	8	1	2
	4PlexリアルタイムPCRキット (ver.3.2)	4*	10	10

* 4Plex-RT (ver.1), () は地方衛生研究所の施設数

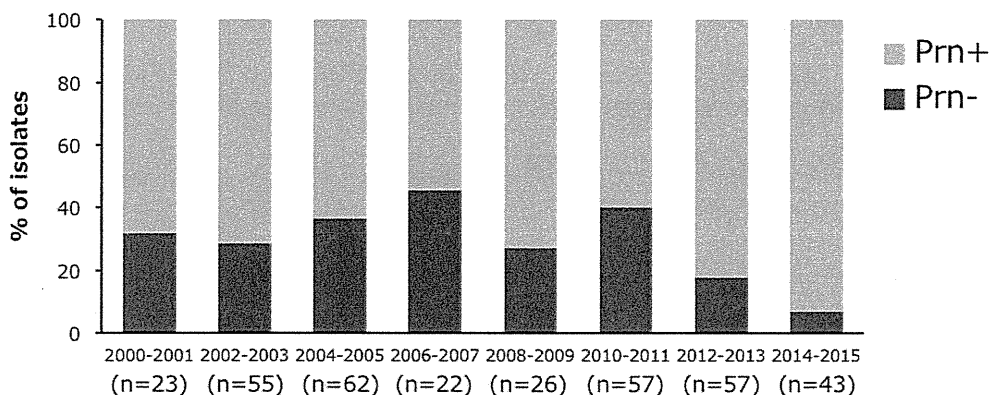


図1. 日本における百日咳菌 Prn 欠損株の分離状況（2000~2015年）
2010年以降、Prn 欠損株は分離率が減少傾向を示した

表3. 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

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
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 地域における結核菌の疫学的感染動態を調査するため、地方衛生研究所では結核菌VNTR分析が導入されているが、精度保証に関する取り組みがなされていなかった。そこで本分担研究では、精度保証の一環として地方衛生研究所を対象としたVNTR分析外部精度評価を実施し、さらに各施設における内部精度管理の実施を支援する取り組みをおこなった。2013年度は本邦におけるVNTR分析法や使用されているVNTRローサイについてアンケート調査を実施した。2014年度は、アンケート調査の結果に基づいて第1回目のVNTR分析外部精度評価を実施した。2015年度は、2014年の評価において分析精度の低かったローサイを対象としたマーカーやコピー数既知株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。さらに、希望施設に対して第2回の外部精度評価を実施した。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年度はより多くの施設から正答と完全一致する結果が報告された（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年度の外部精度評価で精度の低かった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

日本国内における平成26年1月1日～12月31日間の結核罹患率（人口10万対の新規登録患者数）は15.4で、年々低下傾向である。しかし、米国（3.4）の4.5倍という現状である。患者年齢構成は、再発例が多いと考えられる70歳以上の高齢者が全結核患者の47.9%を占めている。また、登録された患者についての保健所等の接触者調査が精力的に行われており、結核感染の広がりを防止するための対策が進められてい

る。しかし、毎年、集団感染事例の報告があり平成24年は、事業所（24例）、病院（院内感染9例）、社会福祉施設（5例）、学校（3例）など合計49件が報告されているなど、接触者検診で大きな集団感染が発見されることがある。このような例では、分離された結核菌の遺伝子型別分析で同一クローンかどうかを調べることで接触者調査の結果を確認することができる。

結核菌の型別分析は、診療・診断に直接結びつかないため保険点数もなく衛生検査

所(検査センター)等では行われていない。そのため、各都道府県・政令市の衛生研究所で分析することが期待され、環境も整いつつある。これまで、結核研究所では、北京型結核菌を効率よく型別できる VNTR システムである Justified Analytical Tool Application (JATA) (12)を樹立して報告している。また、反復配列多型(variable number of tandem repeat: VNTR) 分析用のプライマーセット(18 loci)を希望する衛生研究所に送付している。JATA (12)-VNTR システムは、北京型結核菌の識別能は若干低い型別結果は集団感染事例か否かの判断に利用可能である。また、本分析システムは、特別な装置は必要なく各 PCR 産物の分析にアガロースゲルを用いた電気泳動が利用できるという利点がある。

VNTR は結果が一連の数値(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。しかしながら、そのためには信頼性の確保が必要であり、全国的な精度保証の実施が必要である。

そこで本分担研究では地方衛生研究所を対象とした VNTR 分析外部精度評価を実施し、さらに各施設における内部精度管理の実施を支援する取り組みをおこなった。2013 年度は外部精度評価の実施に先立ち、本邦で用いられている VNTR 分析システムの詳細についてアンケート調査を実施した。2014 年度は、アンケート調査の結果に基づいて結核菌 VNTR 分析における外部精度評価を本邦で初めて全国的に実施した。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た。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した。

B. 研究方法

結核菌遺伝子解析(タイピング)に関するアンケート調査

衛生微生物技術協議会結核部会における各ブロックのレファレンス施設を通じて結核菌遺伝子型別法の実施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の募集

衛生微生物技術協議会結核部会における各ブロックのレファレンス施設を通じて 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。

外部精度評価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 増幅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精度の低かった試験領域（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精度管理活動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、試験的に作成された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（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：

参加各施設は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. 結核菌遺伝子型別法に関するアンケート調査

アンケート調査により、結核菌型別（タ

イピング）を実施しているか尋ねたところ、回答のあった79施設（100%）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2013年現在扱っていないが予定はある（6施設は2013年度中に開始、2施設は準備中）、30施設は扱っていないという回答であった。利用している型別法としては、92%がVNTR法による型別法で、ついで26%がIS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism（RFLP）法であった。

2. 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。2015年度は、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施設が参加を希望した。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2015年度の全体評価を実施した。

3. 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)、ハイパーバリアブル（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)。

4. 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 ローカス違いは 1 施設 (2%, 1/19)、2 箇所以上違いは 3 施設 (6%, 3/50) であった (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 (92.0% vs. 66.7%, $p=0.002$)。

5. 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る。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%) であった。また、1 施設 (2.0%) がコスモアイを利用して分析していた (表 2)。

6. 各分析法におけるローカスセットの正答率

PCR 産物の分子量分析法の違い毎に、JATA (12)、JATA (15)、HV、Supply におけ

る正答率をまとめた (表 3)。正答率は、ローカス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スセットで正答率 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。

7. 各ローカスの正答率の比較

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

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。

PCR 産物の分子量測定法については、2014 年度、2015 年度共に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% (2014 年度) から 20.0% (2015 年度) 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 (2015 年度) 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 2015 年度を比べると経時的に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% (2015 年度) 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。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った。

VNTR 分析に利用されているローカセットの調査 (2015 年度) 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であった。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が (98-100%)、残りの 5 ローサイでは分析精度が低く (77-96%)、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つものと考えられた。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も高精度の結果に影響した可能性も考えられた。

検体 DNA の品質による結果への影響も考えられた。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 年度は皆無であった。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しう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と思われる。

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た。

E. 結論

本分担研究において、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（分析結果が完全一致した施設の割合：66.7% vs. 92.0%, $p=0.002$ ）、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。

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

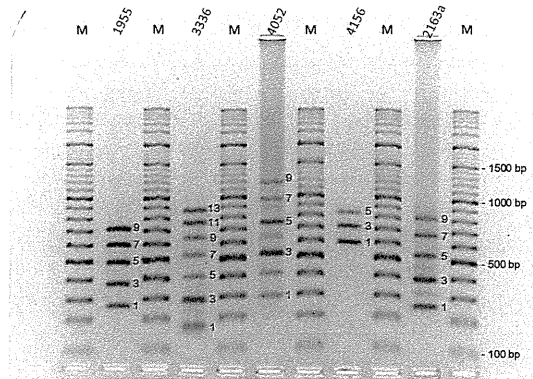
なし

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

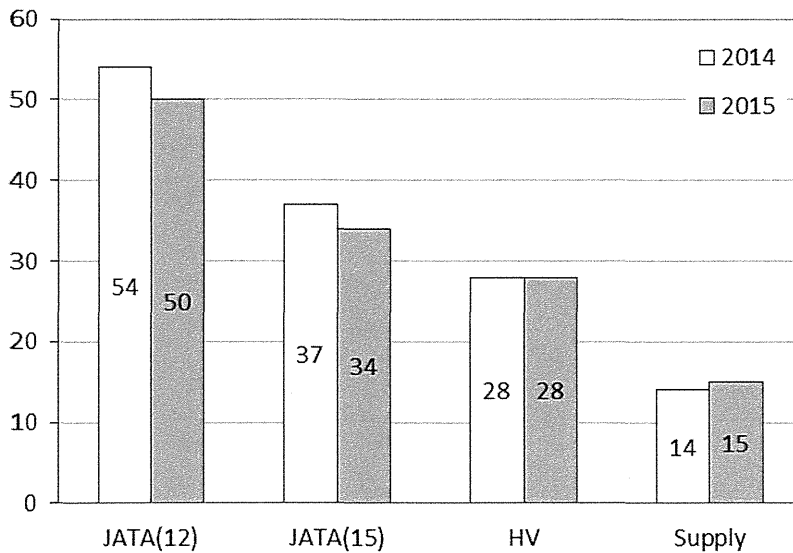


表1. 3株をJATA(12)で分析した場合の正答施設数

	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

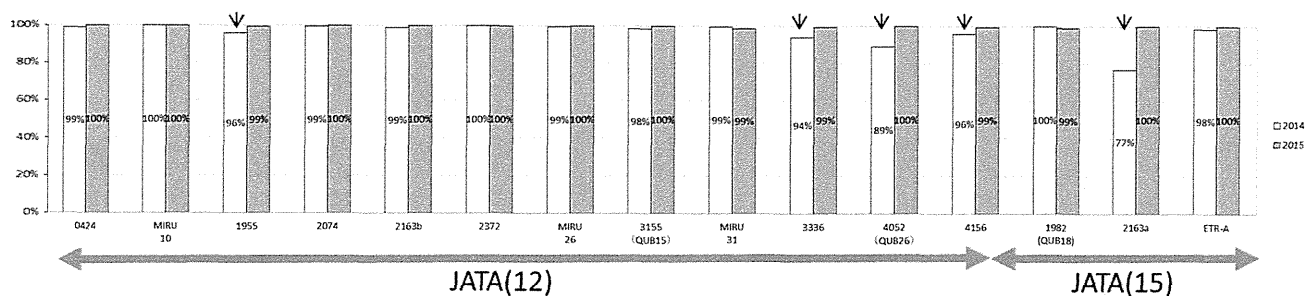
分析方法	2014年度		2015年度	
	実施施設数	割合 %	実施施設数	割合 %
アガロースゲル	37	68.5%	33	66.0%
自動シーケンサー	7	13.0%	10	20.0%
マルチナ	4	7.4%	3	6.0%
QIAxcel	4	7.4%	3	6.0%
コスモアイ	2	3.7%	1	2.0%
Total	54	100.0%	50	100.0%

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年度で比較した。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マーカの作成対象とした5つのローカスを示す。

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

動物由来感染症レファレンスセンター活動報告

研究分担者 森川茂 獣医科学部長

研究協力者 奥谷晶子 獣医科学部 主任研究官
野口章 獣医科学部 主任研究官
井上智 獣医科学部 第二室長
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

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参加している7地方衛生研究所に加えて、年毎に希望があればアドホックに参加する地衛研を対象に、平成25年度は、炭疽菌遺伝子検査で用いるPCR検査系の検出限界の算定を行った結果、全ての施設が炭疽菌芽胞換算で1～100個相当の検出が可能であった。平成26年度は、17地衛研が参加して狂犬病ウイルスのRT-PCR検査の検出の外部品質保証（EQA）を実施し良好な成績が得られた。平成27年度は、19地衛研が参加して、SFTSウイルスの動物の血清疫学用の抗体検出ELISAのEQAを実施し多くの地衛研で良好な成績が得られた。

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。初年度には、PCRの「炭疽菌芽胞換算の検出感度評価」を行い、第2年度には狂犬病ウイルス検出RT-PCRの外部品質保証（EQA）を実施し、第3年度には、SFTSウイルス抗体を各種動物から検出するELISAのEQAを行い、参加衛研の動物由来感染症の診断、疫学手法の標準化を通して、感染症対策に資することを目的とした。

B. 研究方法

1. 炭疽菌検出試験

炭疽菌の臨床分離株（BA103、病原性プラスミドpXO1およびpXO2保持）芽胞数を計測済みの培養液をからDNA抽出した。抽出したDNAの 10^{-1} から 10^{-8} 階段希釈液を作成して検査用DNAとした。低濃度のDNAの分解あるいはチューブへの吸着による減衰を防ぐため、キャリアDNAとして断片化鮭精子DNA（ $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 相当）を加えて -20°C で7日間保管後のDNAを用意した。参加衛生研究所へ各希釈DNA溶液、PCR用プライマー、および陽性対照DNAを梱包し、冷蔵宅急便にて送付した。各施設で行ったPCRの結果については成績を取りまとめた。

2. 狂犬病ウイルス遺伝子検出試験

陽性対照遺伝子とブラインド検体（陽性

検体 2 つと陰性検体 1 つ) 及び PCR 用プライマーを送付して、狂犬病検査マニュアル第 2 版 (感染研の病原体検出マニュアル) に準じた遺伝子診断 (RT-PCR) を参加地衛研が通常使用している PCR 試薬、PCR 機器を用いて試験を行い、結果を取りまとめた。

3. SFTS ウイルス抗体の各種動物からの検出試験

ELISA 抗原は、SFTS ウイルス感染 Huh 7 細胞ライセートと陰性対照抗原として非感染細胞ライセートを約 1,000 検体検査分、二次血清、基質、ブロッキング剤は、感染研で評価し動物の SFTS ウイルス抗体の血清疫学調査に使用している ImmunoPure® Protein A/G Peroxidase Conjugated (Thermo Fisher Scientific)、ABTS Tablet 及び ABTS buffer (Roch)、Blocking-one (Nacalai Tesque) を 100 検体分程、SFTS ウイルス抗体陽性対照血清 1 検体とパネル血清 (SFTS ウイルス抗体陽性、陰性を含む) 11 検体と ELISA のプロトコールを配布した。参加衛研でプロトコールに準じて ELISA を実施し、陽性対照血清の OD 値、パネル血清 (陽性、陰性を含む) 11 検体の OD 値及び判定結果を感染研で集計することにより EQA を行なった。

C. 研究結果

1. 炭疽菌検出試験

配布した DNA 資料を調整後 7 日目の検出感度を感染研で PCR により検討した結果、pag 遺伝子では 10^{-7} 希釈 (芽胞 1 個相当)、cap 遺伝子では 10^{-6} 希釈 (芽胞 10 個相当) まで検出できることを確認した。

参加地衛研での検出成績を一覧にまとめた (表 1)。検出限界の濃度は施設間で差がみ

られた。pag 遺伝子、cap 遺伝子ともに施設により芽胞換算で 1 個から 100 個の検出限界を示した。また、pag 遺伝子をコードする pXO1 と cap 遺伝子をコードする pXO2 で検出限界に差がみられた。

2. 狂犬病ウイルス遺伝子検出試験

1) RT-PCR ブラインドテストの結果

One step RT-PCR (図 1) :

- ・ K 地衛研のサンプル 2 と N 地衛研の陽性対照 RNA 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ K 地衛研で陽性検体が陰性となったが、追試を行うことによって陽性となった。
- ・ N 地衛研で使用した陽性対照 RNA が陰性となったが、使用濃度を調整することで陽性となった。

2) Two step RT-PCR (図 2) :

- ・ F 地衛研のサンプル 3 と K 地衛研のサンプル 2 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ F 地衛研で 2 種類の RT 試薬を使用したところサンプル 3 の検出感度が異なった。
- ・ K 施設で陽性検体が陰性となったが、追試を行うことによって陽性となった。使用した試薬と反応条件が異なっていた。

3) 使用したサーマルサイクラー :

感染研 : ASTEC GeneAtlas

A : TaKaRa PCR

Termal cycler Dice Model TP600

B : ABI 2720 Thermal Cycler

C : BIO RAD

D : ABI GeneAmpPCR System 9700

E : ABI GeneAmpPCR System 9700

F : BIO-RAD My Cycler

G : Bio-Rad C1000 / S1000

H : ABI Veriti Thermal Cycler
I : ABI GeneAmp PCR System 9700
J : ABI veriti Thermal Cycler
K : ABI
L : ABI GeneAmp PCR System 9700
M : ASTEC PC-818-02
N : ABI GeneAmpPCR System 9700
O : ABI GeneAmp PCR System 9700
P : TaKaRa TP-600

4) One step RT-PCR の反応条件 :

- ・ K 地衛研のみ異なる試薬と反応条件で RT-PCR が行われた。
- ・ 4 地衛研で PCR 反応がマニュアルの半量 (25 μ l) であった。

3. SFTS ウイルス抗体の各種動物からの検出試験

本試験にかぎらず配布資料の多くは冷凍保存が必要であることから、ドライアイス詰め冷凍宅配便で送付した。参加した地衛研に受領時にドライアイスが残存しているか、ない場合には凍結状態が保たれているかを確認したところ、4 地衛研でドライアイスが残存していなかったが凍結状態であったとの連絡を受けた。14 地衛研では、ドライアイスが残存していた旨連絡を受けた。1 地衛研からは連絡がなかった。その他、試薬等を再送しかのが 2 地衛研あった。

ELISA の成績は、最終的に、14 地衛研で感染研とほぼ同等の成績が得られたが、有意に感度が低い成績であったのが 3 地衛研、データ不良で判断不能が 1 地衛研、回答なしが 1 地衛研であった (表 2)。当初は低感度の成績だったが、試験法の問題点がないか等を試験担当者でメールで確認して再試験を行なった結果、良好な成績になった地衛研が 3 箇所あった。しかし、感度が低い成績であった 1 地衛研に関しては、メ

ールによるやりとり等で再試験を行なったが改善しなかったため、感染研で年度内に研修を行う予定である。

D. 考察

1. 炭疽菌検出試験

pag 遺伝子をコードする pXO1 と cap 遺伝子をコードする pXO2 では一細胞あたりのプラスミド・コピー数が異なり、pXO1 の方が 3 から 30 倍多いという報告がある。遺伝子間の検出感度の差はこれらのコピー数に由来することが考えられる。しかしながら、conventional PCR 検査系では低濃度 DNA での増幅に影響する他の要因 (例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い) も考えられる。

今回、施設間で検出限界濃度の差が認められたものの、炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には非常に多くの炭疽菌 (通常 10⁶CFU/ml 以上) が存在していることからこれらの検体に関しては、今回検証された検出限界の検査系で検査は可能であると考える。過去に生物テロで使われた芽胞粉末 (いわゆる白い粉) の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、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

台湾での野生動物間での狂犬病の長期に亘る流行実態が明らかにされたことを受けて、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。積極的疫学調査の一環である狂犬病調査を地方自治体で実施可能にするため

に、感染研と地衛研で狂犬病ネットワークを構築してレファレンス機能を向上するために、狂犬病の検査手法の検証と標準化が必須である。17 地衛研の参加を得て、地衛研が RT-PCR 用に通常使用している機器と試薬でブラインドテストを行ったところ、参加地衛研の全てで RT-PCR が可能であった。また、現在実施されている NAT では、One step RT-PCR が Two step RT-PCR よりも高感度であることを、複数の地衛研によって検証でき、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

凍結資料の送付に関しては、ドライアイスと同封しても遠方の地衛研では配送に日数を要してドライアイスが消失してしまうことから、今回のように冷凍宅配便との併用が必須であることがわかった。

多くの地衛研では PCR やリアルタイム PCR 等の NAT は幅広く実施しているが、血清診断に関しては、行なっていないか経験したことがない地衛研があることがわかった。ELISA リーダに関して 10 年以上保守を行なっていない等の機器の保守問題がある地衛研があった。複数台所有しているため、使用可能な ELISA リーダがある場合もあった。また、基質の反応時間を延長することで、感染研と同等の感度に合わせることができた地衛研もあった。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。SFTS は野生動物等での抗体保有率が急激に上昇したり、高率に陽性である場合に患者発生していることがこれまでの研究で明

らかになっている。このため、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。今年度の動物由来感染症レファレンスセンター活動による成果が、このような調査に利用されることを希望する。

今後、感染症法の改正で地衛研が診断等を担当することを求められる感染症が増加すると思われる。感染症によっては NAT だけではなく、血清診断も必要な場合がある。今回の活動は、そのような今後対応すべき動物由来感染症で ELISA による血清診断が必要な場合にも対応可能な地衛研が多いことを示唆している。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

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>）。

G. 研究発表

論文発表

1. Hideki Tani, Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Naoko Iwata-Yoshikawa, Yuko Sato, Tadaki Suzuki, Noriyo Nagata, Hideki Hasegawa, Yasuhiro Kawai, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Haruo Watanabe, Masayuki Saijo. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere* 2016, 00061-15.
2. 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, 212(6):889-98.

3. Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
4. Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5):387-93.
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.*