

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

地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集

研究分担者 調 恒明 山口県環境保健センター

研究協力者 戸田昌一 山口県環境保健センター  
亀山光博 山口県環境保健センター

研究要旨 1. これまで、MERS, SFTS等の新興感染症の発生時に、国立感染症研究所のそれぞれ疾患を所管する部から地方衛生研究所に検査診断試薬が配布されてきたが、これらの記録はなかった。そこで、試薬の更新等を戦略的に行う基礎資料として試薬のリストを作成した。これにより、平成28年度から予算化された精度管理費により試薬を順次更新充実させ、地方衛生研究所の検査の精度向上に貢献する事が期待される。2. 国のAMR対策の一環としてCREの検査を地方衛生研究所で実施するために、検査項目について検討した。これは、厚生労働省結核感染症課より、CRE検査の地方衛生研究所における実施に関する通知を作成するための資料となる。

A. 研究目的

1. これまで、MERS, SFTS 等の新興感染症の発生時に、国立感染症研究所のそれぞれ疾患を所管する部から地方衛生研究所に検査診断試薬が配布されてきたが、これらの統一的記録がなく、試薬の更新に支障を来すため、更新を戦略的に行うための基礎資料として試薬のリストを作成する。

2. 国の AMR 対策の一環として CRE の検査を地方衛生研究所で実施するために、検査項目について検討した。

B. 研究方法

1. 地方衛生研究所に配布された検査試薬リストの作成

過去に地方衛生研究所に国立感染症研究所から送付された全ての試薬について、配布日時、文書の発出元等について調査しリストを作成した。

2. 地方衛生研究所における CRE（カルバ

ペネム耐性腸内細菌科細菌）検査項目の検討

感染症法における CRE 届出基準、国立感染症研究所が作成した薬剤耐性菌の検出マニュアルを参考にし、地方衛生研究所が実施すべき検査項目を作成した。

C. 研究結果

1. 地方衛生研究所に配布された検査試薬リストの作成

これまで、インフルエンザ A (H1N1) pdm09、鳥インフルエンザ H7N9、MERS, SFTS 等の新興感染症の発生に備えて、全国の地方衛生研究所において、統一的検査診断を迅速に立ち上げるため、国立感染症研究所から検査試薬が配布されてきた。しかし、それらの検査試薬はその後更新されておらず、我が国において標準化された検査が実施出来る継続的な体制が保障されているとは言えない。平成 28 年 4 月に感染症

法が改正され、感染症法に基づく検査は都道府県知事が実施することとなり、その検査精度を確保することが自治体に求められるようになった。平成 28 年度から、厚生労働省において予算化された精度管理費により、このリストを利用して試薬を順次更新充実させ、地方衛生研究所の検査の精度向上に貢献する事が期待される。

## 2. 地方衛生研究所における CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）検査項目の検討

CRE では、薬剤の耐性のレベルだけではカルバペネマーゼ産生菌であるかの判断が難しく、薬剤耐性を持つ IMP 遺伝子の PCR と遺伝子配列の決定が必要である。これらの検査は多くの医療機関で行われておらず、地衛研で支援する必要がある。また、この遺伝子はプラスミド上にあり、肺炎桿菌、大腸菌など種を超えて腸内細菌科細菌に広がっていくため、院内感染であることを確認するためにもプラスミドの検査が必要となる。そこで、CRE の検査を地方衛生研究所で統一した方法で実施するために、検査項目について検討した。これは、厚生労働省結核感染症課より、地方衛生研究所における CRE 検査の実施に関する通知を作成するための資料となる。

地方衛生研究所で実施すべき検査項目の検討結果は以下の通りである。

### 1 届出基準の確認

- 腸内細菌科
- メロペネム(MEPM)耐性、又はイミペネム(IPM)耐性かつセフトリアゾール(CMZ)耐性

### 2 耐性遺伝子の検出

- カルバペネマーゼ耐性遺伝子

IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型の4種

- 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)遺伝子

TEM型、SHV型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 groupの5種

- AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子

MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型の6種

↓

いずれも不検出の場合、以下の耐性遺伝子について試験

SMB型、KHM型、VIM型、GES型、IMI型等

### 3 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

- クラブラン酸 阻害有：ESBL
- ボロン酸 阻害有：KPC型
- ボロン酸及びクロキサシリン 阻害有：AmpC型
- メルカプト酢酸(SMA) 阻害有：メタロβ-ラクタマーゼ(MBL)

### 4 MBL産生性を確認する他の方法

- Carba NPテスト
- Carbapenemase Inactivation Method (CIM法)

\*2で検出された遺伝子型と3,4の産生性の結果が一致することを確認

### 5 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析 同一菌種による伝播が疑われる場合

### 6 プラスミド解析 (NGSが導入されていない自治体では感染研に依頼)

S1-PFGEによりプラスミドを単離、精製後、NGS（次世代シーケンサー）解析

#### D. 考察

1. 作成した試薬リストを元に、検査試薬を更新していく必要がある。
2. CRE の検査体制の確立のために、検査項目の検討は重要であると思われる。

#### E. 結論

二類感染症等の新興再興感染症の検査が全国で統一された方法で実施されることは感染症危機管理において不可欠であり、そのために試薬の更新は必要である。本研究で作成された検査試薬リストは、そのために必要なものである。

CRE 患者から分離された菌株の全数について地方衛生研究所で検査を実施し、菌株の遺伝的共通性について解析し、共通の菌による感染の集積が見られた場合は、その情報を地域において共有し対策を講じることが AMR 対策において重要であり、本研究の検討は地方衛生研究所の検査体制の構築に貢献する。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Doan YH, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon N, Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: The appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East

Asian countries. *Infect Genet Evol.* 41:160-73. 2016

2. Suzuki Y, Doan YH, Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. *Microbiol Immunol.* ;60(6):418-26. 2016

3. Okamoto K, Mori Y, Komagome R, Nagano H, Miyoshi M, Okano M, Aoki Y, Ogura A, Hotta C, Ogawa T, Saikusa M, Kodama H, Yasui Y, Minagawa H, Kurata T, Kanbayashi D, Kase T, Murata S, Shirabe K, Hamasaki M, Kato T, Otsuki N, Sakata M, Komase K, Takeda M. Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens. *J Clin Virol.* ;80:98-101. 2016,

4. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nagasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep.* Jul 7;6:29400. 2016

5. 調 恒明、地方衛生研究所によるエンテロウイルスD68感染症流行の把握、臨床とウイルス. 44(4)、156-159、2016

6. 松井真理、調 恒明、AMR 対策におけ

る国立感染症研究所と地方衛生研究所の役割、公衆衛生情報、46 (12)、10-11、2017、

学会発表

1. 調 恒明、地方衛生研究所によるエンテロウイルスD68感染症流行の把握、第57回日本臨床ウイルス学会、パネルディスカッション「感染症法に含まれない感染症のサーベイランス Event-based surveillance (EBS) の意義」6月18日、2016年、福島県郡山市

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

疾患名	文書年月日	文書件名	文書送元
2類_鳥インフルエンザ(H5N1)	※H24年9月	※H5/TypeA(コンタミチェック入り)陽性コントロール ※H24年9月実施のインフルエンザH5N1研修会の出席者に配布 ●H5/TypeA 陽性コントロール(乾燥品) ●「H5TypeA 陽性コントロール(乾燥品)の溶解ならびに保存方法」 ●「H5TypeA 陽性コントロール由来増幅物の有無の確認方法」 ●PC check用プローブ200回分	感染研インフルエンザウイルス研究センター
2類_中東呼吸器症候群(MERS)	2013.2.12	新型コロナウイルス感染症検査対応試薬等の送付について ①新型コロナウイルス(HCoV-EMC/2012)検査マニュアル ②陽性RNAコントロール希釈説明 ③陽性RNAコントロール ○リアルタイム用 F/R プライマー(別便) ○リアルタイム用 Taqmanプローブ(別便)	感染研ウイルス第三部 厚生労働省結核感染症課
2類_鳥インフルエンザ(H7N9)	2013.4.12	Novel Avian A(H7N9) Influenza virus検出試薬送付のお知らせ 感染研より配布 ●H7亜型検出用コントロールRNA(乾燥品) 1本 ●「H7陽性コントロール(乾燥品)の保存方法」 ●「遺伝子診断用陽性コントロールRNA受領書」 別便にて、厚生労働省より配布(厚生省大臣官房会計課長からの譲与品) ○リアルタイム用 F/R プライマー 2本 ○リアルタイム用 Taqmanプローブ 1本 ○QuantiTect Probe RT-PCR kit (200) 1キット 別便にて、感染研より配布 ○コンベンショナル用 F/R プライマー 2本	感染研インフルエンザウイルス研究センター 厚生労働省結核感染症課
4類_重症熱性血小板減少症候群(SFTS)	2013.3.13	SFTSウイルス感染症検査対応試薬等の送付について ①SFTS検査キット(コンベンショナルRT-PCR) ・スーパースク립トIII ワンステップRT-PCRシステム 1キット ・PCRプライマー 4本(2セット) ・陽性コントロールDNA(100倍希釈濃度) 1本 ②SFTSウイルス検査マニュアル	感染研ウイルス第一部 ※研究班より送付
2類_鳥インフルエンザ(H7N9)	2013.7.3	鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検査用の識別マーカ入り陽性コントロール(RT-PCR用)およびH7 RNA陽性コントロール(RT-LAMP用)送付のお知らせ ●H7/TypeA(マーカ入り)陽性コントロール(乾燥品) ●RT-LAMP用 H7 RNA陽性コントロール(乾燥品) ●「RT-PCR用H7/TypeA(マーカ入り)陽性コントロール(乾燥品)の保存方法」 ●「RT-LAMP用 H7 RNA陽性コントロール(乾燥品)の保存方法」 ●「遺伝子診断用陽性コントロールRNA受領書」	感染研インフルエンザウイルス研究センター
4類_デング熱	2014.9.12	デング熱の迅速診断検査キットの配布について ●デングNS1 Ag STRIP 25 test 1箱	厚生労働省結核感染症課
4類_チクングニア熱	2015.3.13	チクングニアウイルス遺伝子検出キットの送付及び受領書の返送について ●リアルタイム用 F/R プライマー 2本 ●リアルタイム用 Taqmanプローブ 1本	感染研総務部会計課契約係
4類_デング熱	※H27年3月	※デングウイルス1~4型遺伝子検出キット ※広島県(アルボ・レファレンスセンター)に感染研から各5セット配布 ※広島県(アルボ・レファレンスセンター)が調整して、中国6地衛研に配布 ●リアルタイム用 F/R プライマー 8本 (4セット) ●リアルタイム用 Taqmanプローブ 4本 (4セット)	※文書なし
4類_デング熱 4類_チクングニア熱	※H27年3月 ※H27年3月	※デングウイルス1~4型 陽性コントロールRNA ※チクングニアウイルス 陽性コントロールRNA ※広島県(アルボ・レファレンスセンター)が取り纏め、感染研に配布依頼 ※感染研から各県に送付 ●デングウイルス1~4型 陽性コントロールRNA ●チクングニアウイルス 陽性コントロールRNA	※文書なし
4類_ジカウイルス感染症	2016.2.5	Zikaウイルスの検出試薬と陽性コントロールRNAの配布について ※広島県(アルボ・レファレンスセンター)が中国ブロック割り当て分を6等分し ●リアルタイム用 F/R プライマー 4本 (2セット) ●リアルタイム用 Taqmanプローブ 2本 (2セット) ●Zikaウイルス RNA	※文書なし
4類_重症熱性血小板減少症候群(SFTS)	2016.2.15	SFTSウイルス定量PCR検査試薬の送付について ①SFTSウイルス定量PCR検査試薬 ・QuantiTect Probe RT-PCR Kit (200) ・Sセグメント用プライマー・プローブ ・Mセグメント用プライマー・プローブ ・PC Check用プライマー・プローブ ②陽性コントロールRNA ・Sセグメント用 ・Mセグメント用 ③陽性コントロール希釈用tRNA ④SFTSウイルス定量PCR検査マニュアル	感染研ウイルス第一部 ※研究班より調研究分担 研究協力者へ送付

5類_風疹・麻疹	2015.4.21	麻疹、風疹リアルタイムPCR用プライマー、プローブ、スタンダードRNAの配布I 感染研ウイルス第三部 ※感染研から配布 リアルタイムPCR法立ち上げのため ①麻疹リアルタイムPCR検査用試薬 ・プローブ MVNP1163P 6.25 μM (80 μl) ・プライマー-MVN1139F 10 μM (80 μl) ・プライマー-MVN1213R 10 μM (80 μl) ・参照RNA(スタンダードRNA) 乾燥品 ②麻疹リアルタイムPCR検査用試薬 ・プローブ NS Probe 10 μM (60 μl) ・プライマー-NS Fwd 10 μM (250 μl) ・プライマー-NS Rev 10 μM (250 μl)	
5類_風疹	※H24.7.31	風疹ウイルス遺伝子検出RT-PCR用参照RNAの配布について ※当所の在庫が無くなったため感染研に依頼し、入手したもの ①風疹参照RNA (2 × 10 <sup>6</sup> コピー/10 μl) 100 μl ②風疹ウイルス野外株増幅サイズマーカー 100 μl ③風疹ウイルス検出用RT-PCR(NS領域RT-PCR)プロトコール	感染研ウイルス第三部
5類_麻疹	※H26.7.10	試料送付のご案内(麻疹新参照RNA) ※当所の在庫が無くなったため感染研に依頼し、入手したもの ①新規参照RNA (乾燥品)	感染研ウイルス第三部
5類_感染性胃腸炎関連 食品衛生法関連	2015.3.27	ノロウイルス定量リアルタイムPCR標準物質の更新について ※広島県(ノロウイルス・レファレンスセンター)から中四国ブロック内の希望地研に配布 ①ノロウイルス定量リアルタイムPCR用標準プラスミド(1.0 × 10 <sup>8</sup> コピー/μl) 600 μl ② ①の保存、使用方法について	地方衛生研究所全国協議会
5類_感染性胃腸炎関連 食品衛生法関連	2015.7.7	サボウイルス定量リアルタイムPCR標準物質の更新について ※広島県(ノロウイルス・レファレンスセンター)から中四国ブロック内の希望地研に配布 ①サボウイルス定量リアルタイムPCR用標準プラスミド(1.0 × 10 <sup>8</sup> コピー/μl) 250 μl ② ①の保存、使用方法について	地方衛生研究所全国協議会

5類_麻疹	2009.11.13	IgM ELISA kit配布、IgM ELISA PTの実施について ※感染研からレファレンスセンターに配布 デンカ生研麻しんIgM ELISA kitを2つ
5類_季節性インフルエンザ	2010.10.19	インフルエンザ耐性サーベイの試薬等について ●コントロールRNA (-80°C保存)計2本 A/Chiba/1016/2009 H275 PC RNA 20μl 1本 A/Chiba/1017/2009 Y275 PC RNA 20μl 1本 ●プライマー & プローブミックス (-20°Cあるいは-80°C保存) 1本 TaqMan SNP Kit 40× PreMix 1本 ●機種に応じたRT-PCR試薬の配布(メーカーから直送)
5類_麻疹	2008.6.26	SLAM/Vero細胞の分与依頼について ※山口県から感染研に分与依頼 ●SLAM/Vero細胞
新型インフルエンザA/H1pdm09	2009.5.1	swH1検出用PCRについて(5/1) 1 RNA陽性コントロールRNA 2 プライマー 3 試薬 4 プローブ 5 RNase Inhibitor PCRマニュアルはWISHを通して地衛研担当者へ配布
5類_麻疹、風疹	2012.8.1	参照RNAを送付いたしました。 ※山口県(麻疹風疹レファレンスセンター)から中四国ブロック各地衛研に配布 1) 新規麻しん参照RNA 2) サイズマーカーN 3) サイズマーカーH 4) 風疹参照RNA 5) 風疹ウイルス野外株増幅サイズマーカー
5類_風疹	2010.7.22	風疹のポジティブコントロール(PC)について ※山口県から感染研に分与依頼 ●風疹陽性コントロールRNA

ポリオは、届出基準が、「分離・同定による病原体の検出」のため、ウイルス分離及び抗血清による中和同定が必要(遺伝子検出だけでは不可)。ポリオの抗血清(プール、単味)は、デンカ生研から購入。

季節性インフルエンザも、基本はウイルス分離で、リアルタイムPCRは、参考扱いでプライマー & プローブの情報が記載されている。季節性インフルエンザのリアルタイムPCR用の陽性コントロールの配布はなく、自分で分離化した株の抽出RNAを希釈して使用。

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

大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部  
前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部  
池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 大腸菌、レジオネラ属菌、溶血性レンサ球菌の機能的なラボネットワークの構築・改善点を抽出することを目的とした。精度の高いサーベイランスを全国的に実施するためにも、技術的基盤の継承が重要である。平成28年度においては、現在実施されている3菌種の病原体サーベイランスの状況を検証した。コントロールDNAの配布とそれを使った試験のトラブルシューティング等を通して試験法の改善等につなげていくことが重要であった。多施設における検査の品質保証を的確に行なうことは必ずしも容易ではない。今後も、問題点の把握とそれを解決するための実施可能な検査法・ツールの開発が不可欠である。

#### A. 研究目的

##### 大腸菌

ヒトに下痢を発症させる下痢原性大腸菌は保有する病原性遺伝子ごとにいくつかのカテゴリーに分類される。このうち、日本国内で死亡者を含む重症例の原因となっているのが腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC）である。2016年も3,640例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,250例以上の重症例（血便または溶血性尿毒症症候群[hemolytic uremic syndrome: HUS]発症例）が報告されている（NESIDの集計による）。原因菌として半数以上を占めるのがO157で、O26, O111, O103, O145, O121, O165で重症例由来株のほとんどを占める（細菌第一部の集計による）。EHEC以外の下痢原性大腸菌カテゴリーについてはEHECと比較して重症例は少ないが、EHECとのハイブリッドタイプとして検出

されるいくつかのカテゴリー（腸管病原性大腸菌[enteropathogenic *E. coli*: EPEC]、腸管凝集接着性大腸菌[enteroaggregative *E. coli*: EAaggEC]）を含む、各病原性遺伝子の検出が重要である。新規下痢原性腸内細菌として同定されている *Escherichia albertii* についてもPCRによる検出を行っている。

##### レジオネラ

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第15条第1項の規定の実施のための法律施行規則第8条第2項に基づき、レジオネラ感染症の発生状況、動向及び原因の調査のため、国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、平成19年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行なっている。レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型を調べたところ、冷却塔由来株、浴槽水



由来株、土壌由来株でそれぞれ異なる結果が得られ、遺伝子型を調べることにより、感染源が推定できる可能性が示唆され、菌株型別の有用性が明らかになってきている。

#### A 群レンサ球菌

A 群溶血レンサ球菌（Group A *Streptococcus*、*Streptococcus pyogenes*、以下 A 群溶レン菌）は、グラム陽性球菌であり、様々な疾患を引き起こす。A 群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、本菌を原因とする代表的な疾患は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、丹毒、蜂窩織炎、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等であり、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う重篤な症状を呈す劇症型溶血性レンサ球菌感染症も本菌による疾患として注目されている。A 群溶レン菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する。

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」において、A 群溶レン菌が引き起こす疾患として、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎と劇症型溶血性レンサ球菌感染症が含まれる。これらの疾患は 5 類感染症に属し、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎は小児科定点把握疾患、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。

A 群レンサ球菌は、溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンターを構築しており、各都道府県の衛生研究所と国立感染症研究所協力の下、本感染症のサーベイランスや新たな検査法の開発に取り組んでいる。

3 つの病原細菌に対して以下の目的で研究を実施した。

大腸菌：EHEC を中心とした下痢原性大腸菌の血清型解析結果に基づいた病原性遺伝子検出法、血清診断法、および菌分離法に

ついて検査マニュアル化すると共に、それらの検査に必要なコントロール株等の配布・精度管理を行う。

レジオネラ：病原体サーベイランスとして、臨床分離株の収集と遺伝子型別を実施する。レジオネラ属菌検出法の確立と普及のため、外部精度管理サーベイを実施する。

A 群溶血レンサ球菌：A 群レンサ球菌感染症の流行株について、現状を把握するため、溶血レンサ球菌感染症のうち咽頭炎患者分離株と劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株を溶血性レンサ球菌レファレンスセンターを通じて収集し、菌株の解析を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 大腸菌血清型別・遺伝子型別

デンマーク血清学研究所（Staten Serum Institut: SSI）あるいはデンカ生研から購入した血清を用いて実施した。PCR 法は定法に従って実施した。

### 2. レジオネラ SBT 法

*L. pneumophila* については、EWGLI (European Working Group of *Legionella* Infections) の提唱する SBT (sequence-based typing) 法に従い、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。

([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))

### 3. 溶血性レンサ球菌の T 型別および M 型別

病原体検出マニュアルに準じて行なった。

## C. 研究結果

### 1.1 EHEC のサーベイランス

2016年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全2,676株であり、主な血清群として、O157(57.8%)、O26(24.4%)、O103(4.5%)、O111(2.7%)、O121(1.9%)、O145(1.5%)、O91(1.2%)、O165(0.3%)、その他(5.7%)があげられる。

## 1.2 コントロール株の配布およびそれらを用いた解析

下痢原性大腸菌の各カテゴリー(EHEC, EPEC, EAaggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [enteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌])のコントロール株、EHECのマーカである志賀毒素遺伝子のサブタイプ検出用コントロール株(またはDNA)の配布を次の各衛生研究所等:さいたま市健康科学研究センター、静岡県環境衛生科学研究所、横須賀市健康安全科学センター、川越市保健所、大阪府立公衆衛生研究所、埼玉県衛生研究所、愛知県衛生研究所、浜松市保健環境研究所、茨城県衛生研究所、群馬県衛生環境研究所、豊中市健康福祉部保健所、姫路市環境衛生研究所へ行った。配布を行ったいくつかの地研からは、解析に関するトラブルシューティング、および解析結果に関する問い合わせを受け付けた。

## 1.3 *Escherichia albertii* コントロール株の設定と配布

新規下痢原性腸内細菌として同定されている*E. albertii*について、大分県衛生環境研究センターの協力でコントロール株および検出用PCR系を設定し、必要に応じてコントロール株を分与することが可能となっていたが、今後は疫学情報センターの村上室長のところに対応して頂くこととした。

## 1.4 下痢原性大腸菌 EQA (External Quality Assurance) の実施

デンマーク血清学研究所 (Statens

Serum Institut: SSI) がヨーロッパ各国間で実施している下痢原性大腸菌のEQA用菌株(2016年用)10株を用いた。感染研以外でEHECタイピング用自家抗血清の準備がある大阪府立公衆衛生研究所へ上記の菌株を送付し、EQAを行ったところ、すべての菌株において生化学的性状(ソルビトール発酵性、 $\beta$ グルクロニダーゼ活性、ヘモリシン活性)血清型(O:H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すべて一致し、これらの結果はSSIから得られた解答と完全に一致した。

## 1.5 EHEC 検査・診断マニュアルの改訂

平成24年に改訂された「腸管出血性大腸菌(EHEC)検査・診断マニュアル」の改訂版を作製し、感染研ホームページ上にアップロードした。

## 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

レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、収集した臨床分離株の遺伝子型別の結果を、毎年、衛生微生物技術協議会研究会のレファレンスセンター関連会議で報告している。今年度の報告では、53株が追加された。*Legionella pneumophila* 血清群(SG)1が48株、SG2、9、13が各1株だった。他に、*Legionella longbeachae* SG2と、*Legionella bozemanii* SG2が各1株あった。2015年は、入浴施設での集団感染事例が2例あり、1例はSG1とSG13の混合感染事例で、もう1例からも2種類の遺伝子型の菌株が分離され、入浴施設からも臨床分離株と同じ遺伝子型およびPFGEパターンの菌株が分離された。他に入浴施設の散発事例でPFGEおよび遺伝子型が一致した例が1例あった。また、菌株が分離されなかった臨床検体(喀痰)からDNA分離を

行い、浴槽水から分離された菌株と遺伝子型が一致した例があった。推定感染源については、3分の1は感染源が不明で、入浴施設が感染源と推定されているのは3分の1で、残りの3分の1については土壌あるいは塵埃等が感染源であると推定されている。

2016年3月末現在で、合計436株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集された（集団感染事例由来の重複している株を含めると452株）。*L. pneumophila*が426株(97.7%)で、*L. pneumophila*血清群1が、全体の85%を占めている。

*L. pneumophila*については遺伝子型別を行って、結果を随時返している。426株は、ST1からST2134まで187種類の遺伝子型に分けられた。遺伝子型と菌が生息する環境に関連性が見られており、遺伝子型別は感染源を推測する手がかりになると考えられる。

## 2.2 レジオネラ属菌外部精度サーベイの実施

レジオネラ属菌外部精度サーベイに参加するあたり、レジオネラ・レファレンスセンターの各支部の担当が取りまとめ等を行なった。71地衛研が参加し、各地衛研で、送付されたサンプル中のレジオネラ属菌の菌数を求めた。菌数は非濃縮検体と濃縮検体についてそれぞれ算出した。非濃縮検体については、94%の機関が良好範囲内の結果となった。ろ過濃縮法については、良好範囲機関が77%、遠心濃縮法は良好範囲機関が56%にとどまったが、いずれの結果も、昨年度より向上した。

### 3.1 咽頭炎患者分離株のT型別

2015年に全国の衛生研究所に収集されたA群レンサ球菌の菌株総数は1013株であり、すべての株に対してT型別を行った。分離

頻度の高かったT型は、TB3264(160/1013, 15.8%)、T12(157/1013, 15.5%)、T1(146/1013, 14.4%)、T4(142/1013, 14.0%)であった。TB3264型の分離比率は、2010年に急激に上昇し、2014年27.1%を占めたが、2015年減少した(2009年, 5.3%、2010年, 12.6%、2011年, 11.1%、2012年, 14.5%、2013年, 19.9%、2014年, 27.1%、2015年15.8%)。T12、T1型は1992年以降、毎年、高い分離頻度を示している。T3型が急増している(2014年, 1.6%、2015年, 9.8%)。

### 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

2015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(STSS)の報告が110症例あった。106例が*S. pyogenes*、4例が*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*による症例であった。最も分離された型は、T1型であり、昨年と同じ程度の分離比率であった(2014年, 39.2%；2015年, 38.7%)。また、咽頭炎由来株の分離比率(14.4%)に比べ、高い分離比率を示している。次いで、TB3264型が多く、その分離比率は昨年と比較して増加した(2014年, 16.2%；2015年, 25.5%)。この2つの型で全体の60%以上を占めている。

### 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

STSSの確定診断例110例中、*emm1*型が41例(37.3%)と最も多く、次いで*emm89*型が27例(24.5%)、*emm12*型が9例(8.2%)と多かった。

2014年と比較し、*emm1*型は、ほぼ横ばいであり、*emm89*型は16.0%(12/75)から24.5%(27/110)に増加した。

## D. 考察

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

EHEC の重症例として分離頻度の高い 7 種類の O 血清群 (0157, 026, 0111, 0103, 0145, 0121, 0165) と *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類を検出可能なワンショット PCR のプロトコール等を EHEC 検査マニュアルに追加して感染研ホームページにアップロードした。今後、これら記載内容について地方衛生研究所および保健所等からトラブルシューティング等を受け付けると共に、コントロール株 (DNA) の配布等を継続的に実施する必要がある。主要な 7 種類のうち、分離頻度のそれほど高くない 0165 や 0121 などの O 群の標準株を選定し、今後必要に応じて配布を行う。

#### 2) レジオネラ外部精度管理サーベイ

今年度は 71 地衛研が外部精度管理サーベイに参加することにより、検水からのレジオネラ検出法の基本的な手法を共有することができ、良好範囲内の結果を出した施設は増加した。しかし、依然として良好範囲外の施設も存在することから、その理由を洗い出し、検証することが必要である。また、フォローアップ体制の構築が求められる。

#### 3) A 群レンサ球菌サーベイランス

咽頭炎患者分離株は、TB3264, T12, T1, T4 型が多く分離されていた。T1, T4, T12 型は 10 年以上前から多く分離されている型であるが、TB3264 型は 6 年前から増えてきた型である。これとともに TB3264 型の劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者分離株が 5 年前から増えてきている。

2015 年に咽頭炎由来の T3 型が急増した。この型は、1992 年劇症型 A 群レンサ球菌感染症が出現したときに最も多く分離された型である。1990 年前半、咽頭炎由来の T3

型が流行すると、それとともに T3 型の劇症型 A 群レンサ球菌感染症由来株が分離されたことが知られている。このことから、2015 年咽頭由来の T3 型が増えてきていることは、T3 型の劇症型 A 群レンサ球菌感染症が増えてきて来るか注目したい。

#### E. 結論

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な手法の共有と、技術的継承が必要である。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 システムは有用であると考えられ、更なる検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

特記事項無し

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. *Sci Rep* 6:28761, 2016.
- 2) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M,

Kura F. Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. Emerg Infect Dis. 23 : 349-351, 2017.

- 3) 今野貴之、高橋志保、鈴木純恵、樫尾拓子、熊谷優子、木内 雄、石井 淳、前川純子、大西 真、倉 文明：2016年に多発傾向がみられたレジオネラ症の解析—秋田県。病原微生物検出情報. 38:22, 2017.

#### 学会発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani J, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特記事項内なし。

##### 2. 実用新案登録

特記事項内なし。

##### 3. その他

特記事項内なし。

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

寄生虫症に関するサーベイランス強化に関する研究

研究分担者	野崎智義	国立感染症研究所寄生動物部	部長
研究協力者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部	第2室長
	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官
	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官
	中野由美子	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官
	案浦 健	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官
	大西 岬	神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター	検査官
	長谷川晶子	愛知県衛生研究所生物学部医動物研究室	主任研究員
	海野友梨	茨城県衛生研究所細菌部	技師

研究要旨 感染症法で第四類に分類されるマラリアとエキノコックスについて、国内における検査体制の整備と発生動向の監視に関する作業に取り組んだ。まずマラリアについては、検査診断法に関する技術研修に取り組み、検疫所への情報提供に努めた。エキノコックスについては、地方衛生研究所等と連携してヒトおよびイヌの疑診例に関する依頼検査を実施し、同時に患者情報を収集して、本病の流行予防に資する体制の整備に努めた。食品媒介寄生虫症である旋毛虫に関しては、地方衛生研究所と連携して、原因に係わる情報の解析に取り組んだ。

A. 研究目的

寄生虫症に関して感染症法では、5つの病原体（類）を原因とする疾病が規定される。このうちマラリアは、エイズおよび結核と並ぶ世界三大感染症とされ、致死性の発熱性疾患として検疫感染症中でも重要な位置を占める（感染症法では4類感染症）。我が国では検疫所が水際での防圧に取り組んでいることから、検疫所の職員に対して、検査診断法に関する技術研修と情報提供が必要と考えられた。今年度はこのための機会を得たので、作業に取り組んだ。

動物由来感染症としても重要なエキノコックス症（多包性と単包性）は、マラリアと同じく感染症法では4類に分類される。ヒトおよびイヌの感染例については、それ

ぞれ診断した医師もしくは獣医師が届出の義務を負う。我が国に土着するエキノコックスは、多包性の原因種である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* であるが、分布は北海道に限局すると考えられてきた。しかし、ヒトへの感染源となるイヌの感染例は、2005年の埼玉県の例に続き、2014年にも愛知県で発見され、我が国全土に及ぶ本症の拡散が懸念されている。そのために、北海道から他の都府県へのエキノコックス症拡散監視を強化する目的で、地方衛生研究所等と連携し、ヒトおよびイヌなどの動物の疑診例に関する依頼検査を実施するとともに、2014年にイヌの感染例が発見された愛知県については新規検査法を導入して、本症の流行監視強化を図った。

食品媒介寄生虫症もまた、地方衛生研究所（以下、地研と略）との間でラボネットワークの強化に取り組むべき重要な課題である。今年度は旋毛虫に関して茨城県で発生した熊肉摂食を原因とする旋毛虫症を例題に、検討に取り組んだ。

## B. 研究方法

### 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に参加した検疫所職員を対象に、マラリアの概論について情報供与し、検査診断法に関する技術研修と情報提供に努めた。また実地に即した研修とするため、迅速診断キットのデモと研修者参加型のクイズ形式でのトレーニングを今年度は実施した。

### 2. エキノコックス症

当部では全国各地の地研または国内外の医療機関からエキノコックス症をはじめとする寄生虫症の依頼検査を受け付けている。今年度は本年（平成 29 年）の 1 月末までに計 56 件の依頼があり、このうちエキノコックス症を疑う新規の依頼はヒトで 8 件、動物（イヌ・フェネックギツネ）で 2 件の計 10 件であった。ヒト由来材料に関しては、血清を材料としてウェスタンブロット法による免疫学的検査を行った。動物の疑い例の場合は、糞便を材料として虫卵検査および遺伝子検査を実施した。また、新規定着が懸念される愛知県においては、衛研が実施しているエキノコックス調査に糞便内 DNA を標的とした検査法を新規に導入し、監視体制の強化を図った。

### 3. 旋毛虫症

旋毛虫症は欧米において、極めて重要な人獣共通の食品媒介寄生蠕虫症とみなされ、

豚肉の喫食を原因とした人体症例が数多く報告されてきた。我が国では熊肉を介した集団感染事例が、1974 年から 1981 年にかけて合計 3 度、発生している。昨年末（2016 年 12 月）に茨城県において、熊肉の喫食を契機とした旋毛虫症の集団事例が発生した。患者が喫食した熊肉からは、旋毛虫 *Trichinella* T9 が検出され、本研究班ではその汚染濃度を調べた。患者が喫食した熊肉を 50～70g 程度の 10 個のブロックに細切した後、各ブロックから筋肉を少量採取して秤量し、ペプシン塩酸液で短時間人工消化して、顕微鏡下に旋毛虫幼虫を検出、その数を数えた。

## C. 研究結果

### 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 13 検疫所本所および支所から、検疫所職員が合計 16 名参加した。マラリアの講義（本邦と近隣諸国の感染状況・診断・最新のワクチン情報）を行い、迅速診断キットに関する実習（デモ）を実施した。また神戸検疫所と関西空港検疫所の職員に、現在実施しているマラリア検査方法に関するプレゼンテーションを実施してもらい、それぞれについて改善点のアドバイスと情報交換を行った。また参加者をグループに分けたクイズ形式での簡単な診断トレーニングを実施し、研修効果の改善に努めた。またレギュラトリーサイエンスなどに精通する専門家が集う「バイオロジクスフォーラム 第 14 回学術集会」にて、マラリアの現状とワクチン開発について講演とパネルディスカッションに登壇し、国内におけるサーベイランス強化にむけての情報交換を行った。

## 2. エキノコックス症

ヒトの疑診例 6 例中 1 例が抗体検査陽性で、単包性エキノコックス症と診断された（関東地方在住のペルー人）。当該患者は 9 歳時より日本に在住していたが、16 歳時に一時帰国しており、その際に感染したものと考えられた。動物の疑診例 2 例はいずれも陰性で、豆状条虫 *Taenia pisiformis*（イヌ）および縮小条虫 *Hymenolepis diminuta*（フェネックギツネ）と同定された。愛知県では、2017 年 1 月までに採取し、従来法（ホルマリンエーテル法）で陰性判定された糞便 78 検体（イヌ 76 検体・キツネ 2 検体）について PCR 法による検査をおこなったが、糞便内 DNA も全例検出されなかった。なお、検査方法の詳細ならびに結果は地研と共有し、本症の流行拡散に関する情報整備の一環とした。

## 3. 旋毛虫症

今回の集団事例で患者や喫食した熊肉 1g あたりの旋毛虫の幼虫数（LPG）は平均 84 であった。過去の熊肉喫食による旋毛虫症集団事例における虫体数（LPG）と比較すると以下のとおりとなる。

発生年	患者数	発生地	LPG
1974	15	青森	5
1979	12	北海道	146
1981	60	三重	41
2016	21	茨城	84

## D. 考察

各検疫所におけるマラリアの検査方法に関しては、概ねコンセンサスが得られており、迅速診断キットを所有する検疫所が昨年より増加し改善は認められるが、所有しない検疫所も散見された。今年より導入を

試みた「迅速診断キットのデモと研修者参加型のクイズ形式トレーニング」は、大変好評なフィードバックを得ており、来年度はこれを更に発展させた「デジタル資料によるバーチャル診断」を実施する予定である。また今後、検査診断法に関する技術研修を定期的実施することで、状況の改善を試みる予定である。

わが国で発生するエキノコックス症は、北海道に常在する多包条虫を原因とする多包性エキノコックス症が主である。しかし、今年度我々が依頼を受けたヒトのエキノコックス症疑い例 8 件の国籍をみると、日本 4 件のほか外国 4 件（アメリカ・インド・ネパール・ペルー各 1）で、疑診したエキノコックスの原因種も国内には常在しない単包条虫による単包性エキノコックス症が 6 件であった（外国人全員のほか日本人 2 名）。日本人渡航者の一般化に加え、訪日外国人も増加していることから、多包性だけでなく、単包性エキノコックス症へ対応できる体制を整備する必要がある。さらに昨年度イヌの陽性例が再検出された愛知県では、監視体制の強化が急務である。

旋毛虫症に関しては、我が国では熊肉を介した集団感染事例が発生している。昨年末（2016 年 12 月）に茨城県で発生した事例は第 4 例目の集団事例であるが、原因となった熊肉における旋毛虫の幼虫数は LPG が 84 と高く、1979 年に発生した第 2 例（LPG : 146）に次いで高い値を示した。今回の集団事例では皮疹、筋肉痛、発熱が主な症状であったが少量の熊肉の喫食でも重篤な症状を呈した事例が含まれていたと聞く。このようなジビエを介した食中毒事例が発生する余地は、現時点でも十分に残されていることが、今回証明された。従って、



熊肉の喫食による旋毛虫食中毒の発生予防に関する啓発活動を全国レベルで至急に取り組む必要がある。このような食品寄生虫に関する地研とのラボネットワークの強化は、感染症・食中毒の枠を超えて、継続的に取り組むべき課題として重要である。まずは情報交換と相互研修が何よりも重要となる。

#### E. 結論

マラリアの検査診断法に関する技術研修は、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などを利用して、定期的を実施することで、検疫所の職員に対し、検査診断法に関する技術研修と情報提供を実施する必要がある。エキノコックス症に関しては、地研および医療機関等から発生情報を積極的に収集する必要がある。このために、終宿主動物・イヌと歩哨動物・ブタの簡易な検査方法を開発・利用する必要がある。食品寄生虫（寄生虫食中毒）に関する地研とのラボネットワークの強化も、感染症・食中毒の枠を超えて、継続的に取り組むべき課題である。これには情報交換と相互研修がまず重要となる。

F. 健康危険情報：特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Morishima Y, Tomaru Y, Fukumoto S, Sugiyama H, Yamasaki H, Hashimoto C & Harada K. Canine echinococcosis due to *Echinococcus multilocularis*: a second notifiable case from mainland Japan. *Jpn J Inf Dis.* 69:448-449, 2016.

##### 学会発表

国際学会：なし

##### 国内学会

1. 案浦 健. 「マラリア概論（本邦と近隣諸国の感染状況・診断・最新のワクチン情報）」．平成28年度感染症検査技術研修会，6月10日，2016年，武蔵村山.
2. 案浦 健. 「マラリア原虫弱毒生ワクチン開発の現状と展望」バイオロジクスフォーラム 第14回学術集会. 1月12日，2017年.
3. 森嶋康之、八木欣平、登丸優子、山崎浩、杉山広、福本真一郎、吉川泰弘. 愛知県における野犬のエキノコックス陽性例の再検出. 第76回日本寄生虫学会東日本支部大会，東京，2016年10月.
4. 森嶋康之、杉山広、山崎浩、八木欣平. エキノコックス（多包条虫）流行地拡大におけるイヌの役割. 第10回蠕虫研究会（熱海），2016年11月.
5. 森嶋康之、杉山 広、山崎 浩、八木田健司、佐藤要介、綿引一裕、土井幹雄、坂本 陽、武藤和広、本多めぐみ、海野友梨、深谷節子、小林雅枝、2016年に発生した旋毛虫による集団食中毒事例について、第86回日本寄生虫学会大会，札幌，2017年5月.

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

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

アルボウイルス検査法の開発・改良と情報提供  
～ジカウイルス病実験室診断法の確立と情報提供～

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第一部 田島茂  
研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 谷口怜

研究要旨 ジカウイルス感染症は今世紀に入ってから太平洋地域で流行が発生するようになり、2015-16年には中南米で大流行した。ジカウイルス病は軽度の発熱や発疹が主症状であり、ほとんどの場合1週間以内に軽快する。しかし妊娠期のジカウイルス感染が小頭症などの先天性異常の原因となることが確認され、公衆衛生上の重大な問題となっている。これまでに国内でのジカウイルス感染は確認されていない。一方、輸入症例としては2015年まででは2014年の3例のみであったが、感染者数および感染地域の拡大により輸入症例の増加および国内感染の発生が懸念される。本年度は、ジカウイルス病の遺伝子検査法および抗体検査を検討、確立し、地方衛生研究所等の検査機関にその方法に関する情報を提供した。

#### A. 研究目的

近年、蚊媒介性ウイルスが世界の熱帯・亜熱帯地域を中心に猛威をふるっている。その中でも最も感染者数の多いとされるのはデングウイルスであり、年間数億人が感染していると推測されている。日本でも2014年にデングウイルスが侵入し、東京の代々木公園を中心に国内感染が起こり、160人以上の患者が発生した。米国では今でも毎年千人以上のウエストナイルウイルス感染症患者が発生している。デング熱と似た症状を引き起こすチクングニアウイルスも生息域を拡大し、2013年にはアメリカ大陸に上陸し、流行を引き起こしている。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に属し東南アジアやアフリカで生息するジカウイルスは、比較的軽度の発熱お

よび発疹を主症状とするジカ熱の原因として以前から知られていたが、症状が軽いことや患者数が少ないことなどからこれまであまり注目されてこなかった。しかし今世紀に入ってからたびたび流行が確認されるようになり、2015年には南米大陸に上陸するなど急速に生息域を拡大した。しかしそれ以上に注目された理由は、このウイルスが胎児に経胎盤感染し小頭症など先天性中枢神経系発育不良を引き起こすことが明らかとなったためである。このような症状を引き起こすフラビウイルスは他に例がなく、ジカウイルスに特徴的と考えられている。また、男性から女性へ、あるいは女性から男性へ性行為により伝搬することも確認されており、これもフラビウイルスの中ではジカウイルスに特徴的である。このように

ジカウイルスは急激に生息地域が拡大し、患者数も急増したため、輸入感染症例の増加と国内への侵入が危惧されるようになった。そこで本研究では上記のような事態に備え、ジカウイルス病の実験室診断法の確立を目指した。また確立した方法については講習会等で紹介し、技術の伝搬に務めた。

## B. 研究方法

1. 「ジカウイルス病の遺伝子検査法の確立」  
ジカウイルスの遺伝子検出法としては TaqMan 法によるリアルタイム RT-PCR 法を採用した。プライマー・プローブ情報は米国 CDC からの論文 (Lanciotti et al. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1232-1239, 2008) を参考に作製した (図 1)。検体からの RNA 抽出には Roche 社の High Pure Viral RNA purification kit を使用した。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応キットとしては、Thermo 社の TaqMan Fast Virus 1-step Master mix と Toyobo 社の RNA-direct Realtime PCR Master mix を使用した。検出感度の算出には、Thermo 社から分与された 2 種類の合成 RNA (アフリカ型 MR766 株由来およびアジア型 SPH2015 株由来) を使用した。検体を用いた検査の一環として、一部の検体については塩基配列の決定やウイルスの分離も試みた。

2. 「ジカウイルス病の抗体検査法の確立」  
抗ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA 法は Dengue IgM キットである Focus 社の Dengue Virus IgM Capture DxSelect を利用する方法を採用した。本キットは、2 次抗体 (検出用抗体) が広範のフラビウイルスに対する反応性を有している。Dengue ウイルス抗原をジカウイルス抗原に変えることで利用可能であることはすでに検証済みである。抗ジカ

ウイルス IgG 検出のための間接蛍光抗体法 (IFA 法) の確立を試みた。IFA 用スライド作製のため、Vero 細胞にジカウイルス MR766 株あるいは PRVABC59 株を感染させ、4 日後に専用スライドに塗布しアセトンにより固定した。血清との反応は 37°C で 1 時間行った。PBS (-) で洗浄後、200 倍に希釈した 2 次抗体 (Alexa 488 anti-human IgG あるいは anti-mouse IgG) を添加し 37°C で 1 時間反応させた。PBS (-) で洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。方法を検討するため、ddY 系統マウスに 2~3 週間隔でジカウイルス MR766 株あるいは PRVABC59 株を 4 回接種することにより得られた高度免疫マウス血清を使用した (別の研究費で作製された抗血清の一部を使用)。

## C. 研究結果

1. 「ジカウイルス病の遺伝子検査法の確立」  
論文を参考にジカウイルスゲノム検出 TaqMan 用プライマーおよびプローブを作製した。参考にした論文には 2 種類のセット (セット 1 およびセット 2) があり、両方作製した (図 1)。2 種類の合成 RNA を用い、2 種類の RT-PCR キットでウイルス RNA を増幅させた (図 2)。セット 1 ではアジア型が高感度かつ高増幅量を示した。しかし Toyobo キットを使用するとアフリカ型に比べ顕著に感度が低下した。同様の低下はセット 2 でも確認された。Thermo キットでもセット 1 ではわずかに感度低下はみられたが、セット 2 では低下はほとんどみられなかった。Toyobo キットでのアフリカ型に対する感度低下は、逆転写反応時の温度が高いことによるものであったが、温度を下げるにより非特異的な増幅も確認されるようになった。以上の結果から、検査は Thermo 社のキットを使用することとし、プ

ライマー・プローブは通常セット 2 または場合によって両方使用することとした。今回確立した方法により検査した結果の 1 例を図 3 に示す。この症例はベトナムから帰国後に発熱、発疹、および結膜充血が現れた例でデングウイルス感染は迅速キットで否定されていた。患者の血清、尿、唾液および全血より RNA を分離精製し、リアルタイム RT-PCR 検査を行った。血清では陰性であったが、尿、唾液および全血では陽性であった。なお、陽性 3 検体のうち尿で最も高いウイルス遺伝子量が検出された。これは他の患者でもみられる現象であり、ジカウイルスの遺伝子検査では尿検体が非常に重要であることを示している。さらに我々はこの尿検体からのジカウイルス分離に成功した。またこれまでの海外からの複数の論文では、精液においてジカウイルスゲノムが非常に高濃度かつ長期間検出されると報告されている。そこで患者の協力の下、精液からのウイルスゲノム検出を試みた。3 種類の RNA 回収法を試したが、何れにおいてもウイルスゲノムは検出されなかった。なお、本研究により確立したジカウイルス遺伝子検出法については、衛生微生物技術協議会等で情報公開した。

2. 「ジカウイルス病の抗体検査法の確立」  
発症からの時間経過により遺伝子検出が困難となる場合、検査としての抗体検査法が必要となる。すでに IgM-ELISA 法については検討済であったが、感染後数か月経過した後の検体については IgG の検出が必要となる。そこで間接蛍光抗体法による抗ジカウイルス IgG 検出法を検討した。はじめに高度免疫マウス血清を用いて作製したスライドが使用可能であることを確認した。このスライドを使用し、実際に患者血清で抗体が検出できることを確認した (図 4)。

最後に今回我々が確立した遺伝子検査法および抗体検査法 (その他の診断法も含む) を用いたジカウイルス病の実験室診断結果の例を図 5 に示す。遺伝子診断でジカウイルスゲノムが検出されている場合でも、ジカウイルス以外のフラビウイルスに対する IgM が高く検出される場合がみられた。また、ウイルス遺伝子が検出されない場合の IgM 抗体検査において、ジカとデングの両方で陽性となる場合もみられた。

#### D. 考察

2015 年から 2016 年に中南米で大きな流行を引き起こしたジカウイルスを検出する方法を確立した。デング熱に比べ、ジカウイルス病では患者血中のウイルス量は低く、検出が困難な場合が多い。一方で尿で血中よりも多くのウイルスゲノムが検出される場合が多い。実際我々が検査した検体で比較すると、すべてで尿の方がゲノム量が多かった。ジカウイルス病を疑う場合は、必ず尿検体を依頼すべきである。血清に比べ全血の方がウイルスゲノムが多いとの報告もあるが、我々が調べた検体では、多い場合もあるが少ない場合もあり、一概に全血の方が血清よりも検査に適しているとは言えない。我々は唾液からも遺伝子を検出しているが、この場合も血清では検出されなかった。患者負担が多くなるとの問題もあるが、なるべく多くの箇所から検体を採取できれば検査の確実性が増すであろう。すでに多くの報告があるが、抗体検査を行う場合、他のフラビウイルスとの交差反応が起こることを我々も経験した。遺伝子検査もそうであるが、他のウイルスとの鑑別は非常に重要である。さらに中和試験まで行っても判別が困難な場合もある。そのような場合、米国 CDC では「最近にフラビウ

ウイルスに感染した」との判断に留めている場合もある。このように判定困難な場合もあることを認識し検査する必要がある。

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

E. 結論

ジカウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 法を確立した。本法を用いて現在検査を行っている。また本法についてはすでに各地の衛生研究所等の検査機関に情報提供されている。今回新たに抗ジカウイルス IgG 検出のための IFA 法を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuboi, M., Kutsuna, S., Kato, Y., Nakayama, E., Shibasaki, K., Tajima, S., Takasaki, T., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N. Autochthonous Chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba. *Emerging Infectious Diseases* 22:1683-1685, 2016.

2. Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, Tajima S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. Chikungunya fever in traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23:156-158, 2016.

学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・RNA回収: Roche社 High Pure Viral RNA Kit

・ワンステップRT-PCR: Thermo社 Fast Virus 1-Step Master Mix

セット	プライマー・プローブ	配列(5'-3')	寸数
セット1	ZIKV 835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857
	ZIKV 911c	CCTTCCACAAAAGTCCCTATTGC	911-890
セット2	ZIKV 860-FAM	FAM-CGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAG-TAMRA	860-898
	ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102
セット2	ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139
	ZIKV 1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA-TAMRA	1107-1137

図1 今回使用したキットおよびプライマー・プローブ

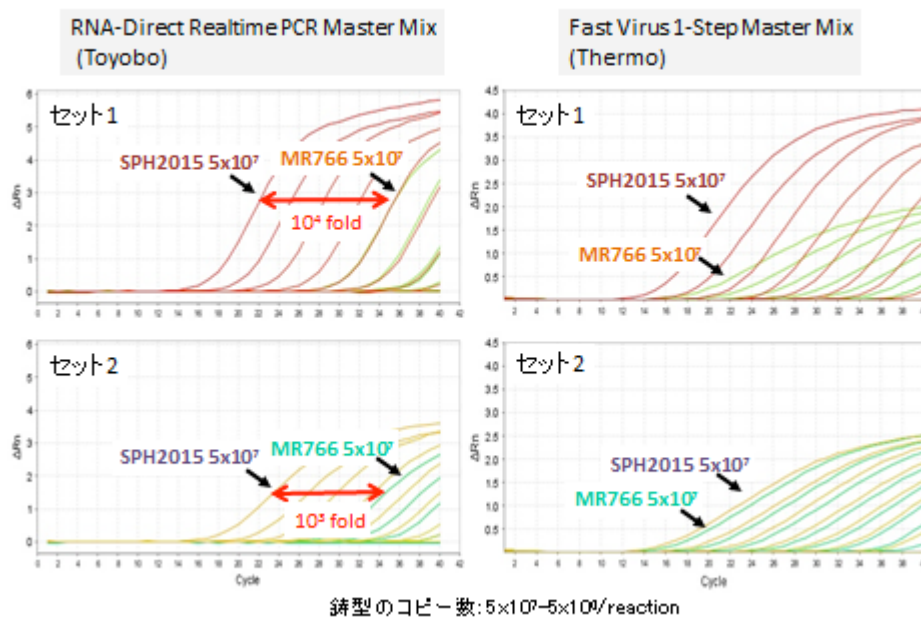


図2 リアルタイムRT-PCRキットおよびプライマー・プローブセットの検討

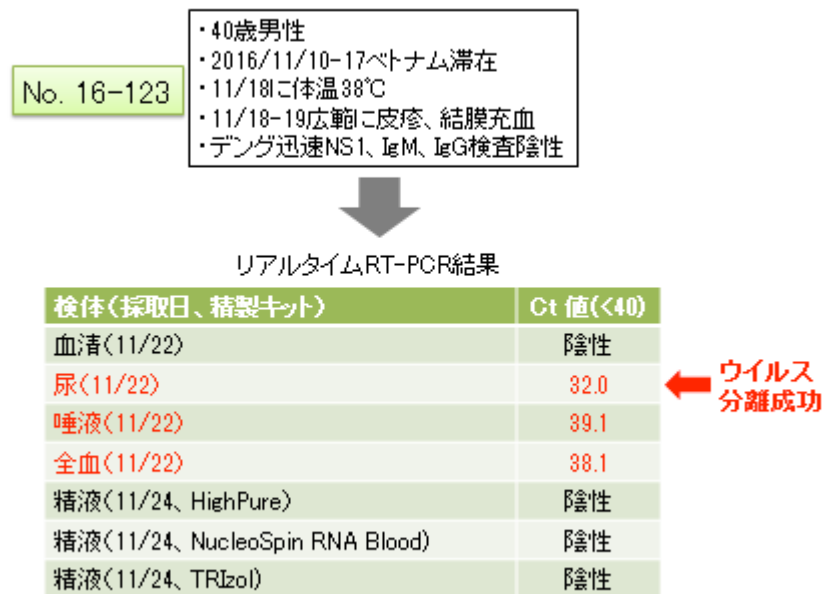


図3 ジカウイルス遺伝子検出診断例

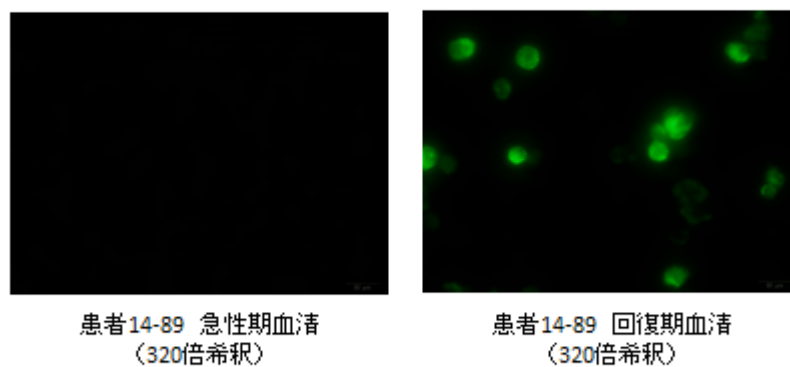


図4 間接蛍光抗体(IFA)法による抗ジカウイルスIgG抗体検出

### 感染研での抗体検査例

検体番号 (診断)	ジカウイルス ゲノム検出 (リアルタイムPCR)	ジカウイルス IgM ELISA	ジカウイルス IgG IFA	ジカウイルス 中和抗体 (PRNT50)	デングウイルス IgM ELISA	日本臨床ウイルス IgM ELISA
14-01 (ジカ)	+	+ (2.1)			- (0.6)	+ (2.0)
14-89 (ジカ)	+	+ (4.8)	>640		+ (0.9)	++ (15.7)
16-28 (ジカ)	+	+ (3.1)		>320	- (0.8)	+ (1.98)
16-36 (ジカ)	+	- (1.5)			+ (1.0)	
16-49 (デング)	- (DENV2+)	+ (2.2) + (6.4, InBios)			+ (4.5)	
16-120 (?)	-	+ (3.1)		ジカ金性期 <10 回復期 320 デング I 金性期 160 回復期 > 20480	+ (3.1)	

≥3 : 陽性  
2-3 : 保留  
<2 : 陰性

≥1.1 : 陽性  
0.9-1.1 : 保留  
<0.9 : 陰性

≥2 : 陽性  
1-2 : 保留  
<1 : 陰性

図5 ジカウイルス病の実験室診断結果例



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

リケッチア・レファレンスセンターの2016年度活動

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	鈴木理恵	福島県衛生研究所	
	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	
	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	
	名古屋真由美	佐賀由美子	富山県衛生研究所
	寺杣文男	和歌山県環境衛生研究センター	
	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	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	中堂園文子	鹿児島県環境保健センター
	野町太朗	宮崎県衛生環境研究所	
	池ヶ谷朝香	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	
	平良雅克	千葉県衛生研究所	
	大橋典男	川森文彦	静岡県立大学

研究要旨 リケッチア症の強い地域特性を考慮し、本研究では、全国ブロックの横糸となる地方衛生研究所のリケッチア・レファレンスセンターを中心とした全国共通基盤の構築を目指している。本年度は、リケッチア科を網羅するマルチプレックス・リアルタイムPCRについて臨床検体用いた評価を試みた。紅斑熱群とつづが虫病については臨床材料による評価でも良好な結果を得た。また、レファレンスセンター会議等においてリケッチア症の疫学、診断法の情報のアップデートにより、全国の担当施設を中心に情報・技術の普及をおこなった。

#### A. 研究目的

地方衛生研究所(以下、衛研)を中心とした地域、全国ラボネットワーク構築方法の検討により、臨床に即したリケッチア症の迅速対応と情報発信が可能で、患者 QOL に資することになる。

つづが虫病、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、死亡例、重症化例もいまだ発生する。発生時期やつづが虫病血清型が地域によって異なり、診断用抗原の選択など地域状況に即した対応が必要となる。また BSL3 を要する取扱

い、特定病原体指定などから、検査担当者の異動に伴う変更を行い難い。

本研究では、リケッチア・レファレンスセンターの活動を通じ、リケッチア症の診断と病原体サーベイランスに必要な実驗室診断系の質的標準化、疫学情報の発信、相互信頼と連携、機能強化を目的とする。

#### B. 研究方法

1. 紅斑熱群リケッチアとつづが虫病リケッチアを標的としたマルチプレックス・リアルタイム PCR の地方衛生研究所での検

討

開発衛研(静岡県)と感染研に保有する各種紅斑熱群リケッチアとつつが虫病標準株を用いて特異性と汎用性を検討し、良好な結果を得てきた。本年度さらに、ブロックレファレンスセンターを中心とした患者報告が多い複数の衛研の協力のものと、臨床検体への適用性について検討した。

## 2. 発疹チフス群リケッチア用の Probe の検討

方法1で検討したマルチプレックス・リアルタイム PCR は一組のプライマーに紅斑熱群用プローブとつつが虫病用プローブを加えただけで、多数の検体を取り扱う現場での汎用性が高いことが期待されている。ここに新たに発疹チフス群用のプローブを加えることにより、すべてのリケッチア科の病原体を網羅できるシステムができるようプローブの設計と評価を試みた。

## 3. レファレンスセンター担当者のスキルアップと情報交換

センター会議等を通じ、各所の問題点ならびに情報交換を行った。

(倫理面からの配慮について)

臨床検体の取り扱いについては、各施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱いによって行った。

## C. 研究結果

### 1. マルチプレックス・リアルタイム PCR の地方衛生研究所での検討

6つの施設の協力を得て、表のような結果を得た。従来法のコンベンショナル PCR、日本紅斑熱を標的としたリアルタイム PCR、血清診断等の結果と比較し、ほぼ同

等以上の結果が得られた。

### 2. 発疹チフス群リケッチア用の Probe の検討

紅斑熱群リケッチアとつつが虫のマルチプレックスの標的領域においては発疹チフス群の候補プローブはいずれも標準株の発疹チフス群リケッチアを検出できなかった。

### 3. レファレンスセンター担当者のスキルアップと情報交換

レファレンスセンター会議、研究会、研修会を通じ、全国とそれぞれの地域の発生状況情報の共有、他のダニ媒介性感染症との類症鑑別の問題点等の情報交換を行った。また、臨床現場と直結する衛研のリケッチア検査対応の情報更新の準備を行った。

## D. 考察

協力衛研による臨床検体への適用性の検討から、紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアのマルチプレックス・リアルタイム PCR は、従来法と比較して十分な結果がえられ、試薬の準備等の簡便さからも使いやすい系であることが示された。発疹チフス群リケッチアについては、当該領域でのプローブ設計はできなかったが、他の領域で構築されている既存法を組み合わせることで、必要な際には対応可能である。紅斑熱群リケッチアでは、*R. japonica* による日本紅斑熱の増加に加え、*R. heilongjiangensis* による極東紅斑熱、*R. tamurae* 感染症例、*R. helvetica* 感染疑い症例等の発生、つつが虫病では標準株 Karp, Kato, Gilliam, Kawasaki, Kuroki に加え、地域が限定されていた Shimokoshi 株の患者発生地域の広がりなど、国内感染患者の多様性が広がっている。さらに、輸入リケッチア症への対応の必要性から、評価

した系は、迅速なスクリーニング系として期待できる。

ブロック衛研によるリケッチア・レファレンスセンターの目的は、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、本年度のように診断系の評価や情報交換から、機能が全国の横系として機能しており、その維持の仕方についてもさらに検討していく必要がある。

#### E. 結論

紅斑熱群リケッチアとつづが虫病リケッチアのマルチプレックス・リアルタイム PCR は、従来法と比較しても十分な結果がえられ、試薬の準備等の簡便さからも、国内のリケッチア症実験室診断の迅速なスクリーニング系として期待できる。

一方、国内での多様性ととともに、地域特性の強いリケッチア症の対応においては、スキル維持が困難となっている衛研と情報共有のためにもレファレンスセンターの維持が必要である。

#### F. 健康危険情報

レファレンスセンターを中心に、各地の地方衛生研究所等からリケッチア症に関する情報発信を試みるも、本年度も死亡例が発生し、迅速な治療につながる情報発信の難しさが示された。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Satoh M, Akashi S, Ogawa M, Wakeyama T, Ogawa H, Fukuma A, Taniguchi S, Tani H, Kurosu T, Fukushi S, Shimojima M, Ando S, Saijo M: Retrospective survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome in patients with suspected rickettsiosis in Japan. *J. Infect. Chemother.*, 23: 34-50, 2017
2. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子, 斎藤博之, 齊藤志保子, 門馬直太, 東海林彰, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二: 秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査 (2011年～2014年), 衛生動物学会誌, 67(3): 167-175, 2016

##### 学会発表

1. 安藤秀二: ダニ媒介感染～リケッチア症, 平成28年度希少感染症診断技術研修会, 2017年2月21～22日, 東京
2. 安藤秀二, 成田雅: リケッチア研究会情報update～リケッチア症の発生状況とトピックスのレビュー, 第23回リケッチア研究会, 2016年12月3-4日, 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

Survey for scrub typhus and JSF in febrile patients with rickettsiosis-like symptoms by the developed multiplex TaqMan PCR, conventional PCRs, and serological tests in 6 endemic prefectures of Japan											
Location (year)	Total nos. of febrile patients examined	Ot-Rj-multiplex TaqMan PCR (%)		Ot-nested PCR positive/total patients (%)	Rj-double PCR positive/total patients (%)	SFGR-double PCR positive/total patients (%)	Serological test (IFA† or IPA‡)		Nos. of Ot-patients diagnosed§/total patients(%)	Nos. of Rj-patients diagnosed§/total patients (%)	
		Ot-positive/total patients	Rj-positive/total patients				Ot- seropositive/total (%)	Rj- seropositive/total (%)			
A (1997-2015)	33	32/33 (97)	0/33	31/33 (94)	NT¶	NT	17/33 (52%)‡	NT	33/33 (100)	0/33	
B (2010-2013)	53	51/53 (96)	0/53	53/53 (100)	NT	NT	52/52 (100)‡	NT	53/53 (100)	0/53	
C (2010-2016)	27	19/27 (70)	3/27 (11)	17/27 (63)	NT	NT	20/27 (74)†	3/27 (11)†	20/27 (74)	4/27 (15)	
D (2008-2012)	22	3/22 (14)	9/22 (41)	3/22 (14)	5/22 (23)	5/22 (23)	3/22 (14)‡	12/22 (54)‡	3/22 (14)	12/22 (56)	
E (2013)	25	1/25 (4)	10/25 (40)	1/25 (4)	10/25 (40)	10/25 (40)	NT	2/7 (29)†	1/25 (4)	11/25 (44)	
F (2008-2009)	28	11/28 (39)	7/28 (25)	11/28 (39)	2/28 (9)	2/28 (7)	11/28 (39)†	9/28 (32)†	11/28 (39)	9/28 (32)	
Total	188	117/188 (62)	20/75 (27)#	116/188 (62)	17/75 (23)#	17/75 (23)#	103/162 (64)	26/86 (31)	121/188 (64)	36/188 (19)	
* PCR condition in each of different laboratories is shown in Technical Appendix Table 2.											
† Assayed by IFA (potentially positive of more than 40 antibody titer).											
‡ Assayed by IPA (potentially positive of more than 80 antibody titer).											
§ The patients showed positive diagnosis in at least either one of Ot-Rj multiplex TaqMan PCR, the conventional PCRs, or serodiagnosis (indirect immunofluorescent or immunoperoxidase assays, IFA and IPA), or in two or three serodiagnostic results of those patients are shown in Technical Appendix Table 3.											
¶ Not tested.											
# Total was obtained from the sum based on the results of Wakayama, Hirohima, and Miyazaki where scrub typhus and JSF both are endemic for comparison of Ot-Rj-multiplex TaqMan PCR and the conventional PCRs.											

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

エンテロウイルスのレファレンスに関する研究

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、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）、及び埼玉県衛生研究所、山梨県衛生環境研究所、長野県環境保全研究所、岩手県環境保健研究センター他、地方衛生研究所のウイルス担当者の皆様

研究要旨 エンテロウイルス感染症には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、2類感染症としてポリオが含まれる。全国レベルの流行状況を把握するため定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスを維持し、一定数の検査を実施することで、ポリオウイルス検査に対応可能である。このため感染症発生動向調査、及び感染症流行予測調査事業のもと、エンテロウイルスのレファレンス活動として、地方衛生研究所との連携のもと、①エンテロウイルス検査に必要な標準抗血清、細胞等の配布、②目的にあわせ感染研あるいは on site における技術研修、を企画/実施、③内部/外部精度管理の方法、検査の質管理用試料の供給体制、実施体制を確立、することが検査の質確保を行ってゆくために必要である。またポリオウイルス封じ込め強化に伴い、検査体制を維持するためには、感染研等ポリオウイルス保有施設において技能試験を兼ねた実技研修を継続してゆくことが必要であると考えられる。

#### A. 研究目的

エンテロウイルスは感染症発生動向調査による5類小児科定点把握疾患である手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎患者を対象とした病原体検査より主に検出される。なお、報告は臨床診断による届け出を基本としており、病原体検査の実施、検査方法の選択は各地方自治体、地方衛生研究所に委ねられている。

平成26年に成立した改正感染症法は平成28年4月に完全施行され、地方衛生研究所等における病原体検査の信頼性確保が図られることとなった。

先行研究（平成25-27年度「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）によ

るアンケート調査ではエンテロウイルス検査体制が全国一律でないこと、検査はエンテロウイルス特異的抗血清を用いた中和法、と各種ウイルスゲノム遺伝子検査による同定法に大別されることを報告している。いずれの手技も定量的な規格検査とは異なる質の管理手法が必要となる。また、技術の維持には一定数の検査を実施することが求められる。

今般の感染症法改正に伴い、感染症発生動向調査実施要領には、5類小児科定点把握疾患における採取すべき検体数の目安が示された。一定の検体提出が行われることにより手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎患者を対象とした病原体サーベイランスでは疾患毎に当該自治体内の小児科定

点で検出される病原体の割合が明らかになることが期待される。例えば、手足口病は一種類のエンテロウイルスではなく EV71、CA16、CA6 等の複数の血清型が関与しており、血清型毎の周期的な流行が観察されている。このうち稀に重篤な症状を引き起こすことが知られている EV71 や、爪甲脱落症を引き起こす CA6 の検出割合を把握することは感染症対策上の意義がある。

一方、エンテロウイルスに属するポリオウイルスは、2 類感染症であるポリオの起因ウイルスである。すでに国内症例はないが、流行地からの輸入のリスクは存在している。ポリオウイルスの検査はエンテロウイルス検査と共通の技術を含む。このためエンテロウイルス検査を日常業務で行うことで、ポリオウイルス検査体制が維持可能となる。実際 WHO のポリオ実験室の認定条件として（国内は感染研ウイルス二部）、年間約 150 検体の糞便検査を指標として取り入れている（Polio laboratory manual WHO/IVB/04.10）。したがって平時における手足口病など 5 類のエンテロウイルス感染症の検査体制の維持により、ポリオウイルス検査が可能になると考えられる。

エンテロウイルスは、主に腸管などで増殖し糞便中に 1 か月程度排出されことから、糞便を材料とした方が検出率が高いことが知られている。しかし近年は、咽頭ぬぐい液が多く搬入される傾向にあり、この場合ウイルス量が少ない場合も多いため、分離以外に検出感度が高い遺伝子検出が実施される傾向にある。

平成 25 年に開始した感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査は、糞便が流れ込む流入下水を材料としてウイルスを分離することを基本としている。

このように感染症発生動向調査及び環境

水サーベイランスにおいて細胞を用いた分離、遺伝子検査法が用いられている。

エンテロウイルスのレファレンス活動として細胞を用いた分離、同定技術、遺伝子検査による同定検査の質を確保するため、必要な標準品の配布方法、技術研修の内容、内部/外部精度管理試料の送付・保管条件の検討を行った。

## B. 研究方法

1. エンテロウイルス検査用標準品の配布  
平成28年7月21-22日に開催された衛生微生物協議会エンテロウイルスレファレンスセンター会議等で、エンテロウイルス抗血清、ポリオウイルスへの感受性を確認済みの分離用細胞（RD-AとL20B）の配布を周知した。

2. 技術研修を通じた信頼性確保について

平成 28 年度は 2 種類の技術研修を行った。

1) ポリオウイルス検査技術研修

平成 28 年度短期研修ウイルス研修においてポリオウイルス検査に関わる研修を実施。世界ポリオ根絶計画の進展とともにポリオウイルスの封じ込め（GAPIII）の必要性から、ポリオウイルス保有施設の登録が求められている。国内施設では 2 型ポリオウイルスの原則廃棄など、ポリオウイルスの保有が困難になってきている現状から、感染研で開催されるウイルスコースにてポリオウイルスワクチン株（1、3 型）を用いた研修を実施した。

ア) ポリオウイルス中和試験と信頼性の判定

あらかじめ力価を測定したポリオウイルスワクチン株 1 型、3 型及び 1 + 3 型 3 種類の試料を準備。4 名が同一サンプルを試験するようブラインドによる中和試験を行った。

中和反応後、毎日観察を行い、研修では4日目で判定を行った。なおウイルス力価測定（バックタイトレーション：BT）を同時に実施し、攻撃ウイルスが32-320CCID<sub>50</sub>/50u1の範囲に希釈されているものとした。

イ) その他（日程、参加者、追加した実習）  
ポリオウイルス検査技術研修（参加者 23人）：

11月21日午後、11月25日午前  
（ウイルスコースの全日程は11月7日～25日）

内容：

- ・ポリオウイルスの中和法による同定
- ・細胞数カウント
- ・ウイルス分離（チューブ法）

## 2) 環境水サーベイランスの技術研修

ポリオウイルス環境水サーベイランスは感染症流行予測調査事業感染源調査として実施している。調査は、採水-濃縮-ウイルス分離同定、の3段階に大別される。

採水では、流入下水を出発材料として用いるが、採水方法、搬送方法等、実際に採水を行っている地点における説明が効果的である。このため研修希望のあった2か所の地衛研担当者を対象に岩手県環境保健センターの協力を得て採水からウイルス分離までの研修を企画した

期間：平成28年6月28-29日

場所：岩手県環境保健研究センター

参加者：山梨県衛環研、長野県環保研の担当者各1名、及び岩手県環保研セの担当者及び吉田の計4名

## 3. 外部/内部精度管理試料の送付・保管条件検討

エンテロウイルス同定検査に用いるCODEHOP-snPCR法に関わる精度管理用のRNA試料送付条件検討のため、エンテロウイルスレファレンスセンターを中心とした担当者の協力を得てワークショップを2回企画した。なお本研究は平成28年度厚労科研費「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」とも一部連携している。

ワークショップの概要

第1回目平成28年10月26-28日（5名参加）

主に輸送を想定したFTAカードおよびFTAeluteカードを用いてCA6とEV71のRNA回収の条件検討。

第2回目平成28年12月15-16日（4名参加）

FTAeluteカード他と比較した試料送付の再検討。

## C. 研究結果

### 1. エンテロウイルス検査用標準品の配布

平成28年度抗血清は3カ所に延べ15種類の抗血清を配布、細胞はRD-Aを5か所、L20Bを3カ所に配布した。

### 2. 技術研修を通じた信頼性確保について

#### 1) ポリオウイルス検査技術研修

同定結果は参加した23名全員正答であった。また、バックタイトレーションの値から攻撃ウイルスが32-320CCID<sub>50</sub>/50u1の範囲に希釈されていることが確認され、試験の信頼性は担保されていた。

ただし信頼性は担保されているものの23名中2名は試料調製時の力価測定結果の許容範囲外となり、細胞変性効果（CPE）の観察に不慣れであることが原因と考えられ

た。

## 2) 環境水サーベイランスの技術研修

### ア. 採水の現場視察

採水地点、採水容器、運搬方法などの確認を処理場にて行った。

### イ. 濃縮、分離法の技術研修及び討議

流入下水を用いて、濃縮及び細胞への接種まで研修を行った。

また、採水から結果判定までの全工程における問題点、注意点など、参加者間で討議を行った。

## 3. 内部/外部精度管理試料の送付・保管条件検討

第1回目：5人の術者による RNA 試料送付・保管用に FTA と FTAelute カードを用いた比較を行った結果、スパイク試料のウイルス量が少ないことが原因で当初目的は達成されないものの、操作の面で、FTAelute カードの方が容易でありかつ操作時間が短く汎用性がある知見が得られた。

第2回目：ウイルス RNA のスパイク量を段階的に変え、FTAelute カードで送付・保管する場合を想定し RNA 回収率を測定した結果、ゲノムコピー数 (GC) が小さい場合は大きくばらつき、分離株のような多量の GC 数を含む場合はばらつくが比較的少なく利用可能であると考えられた。更に他の市販品 (RNA Stable) を用いた場合、RNA の回収率が 100bp 程度の短い配列の場合は、安定して回収できることが明らかになった。しかし、CODEHOP 法は 1000bp 程度をターゲットにするため、追加して検討を行う必要性が認められた。

## D. 考察

### 1. エンテロウイルス検査用標準品の配布

エンテロウイルス検査用中和抗血清

(EP95 プール抗血清) は 1994 年に地衛研と感染研で分担して作製し、1995 年より 6 支部にて一定量保管し、支部内で配布を継続している。また細胞及び単味抗血清は感染研に直接依頼することとなっている。これらの活動は無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、ポリオウイルス検査マニュアルに記載しているが、地研内の異動などの事由もあり、衛生微生物協議会等を通じて周知を続けてゆく必要がある。

## 2. 技術研修を通じた信頼性確保について

### 1) ポリオウイルス検査技術研修

ポリオウイルス検査の質の管理には感染性ウイルスを用いることが望ましいが、ウイルスの封じ込め厳格化に伴い、保有施設は限定されている。このため信頼性を確保するためには、感染研等のウイルス保有施設において実技研修を実施、同時に技能試験を兼ねる、ことが妥当であると思われる。

また、同一試料を用いることにより研修参加者間で、観察結果等のばらつきを相互確認できる利点があると考えられた。

### 2) 環境水サーベイランスの技術研修

環境水サーベイランスは、採水-濃縮-ウイルス分離同定、の3段階に大別されるが、採水に関しては、調査を行っている機関の協力を得て、視察することが効果的と考えられる。これは、処理場における採水ポイント、他の調査との関係、輸送方法など処理施設との調整が必要なため、実施している地点を参考にしつつ採水計画を定めてゆく必要がある。

また、濃縮処理の研修は、実習用流入下水の入手の点で、調査を実施している地衛研で行うことが望ましい。

## 3. 外部/内部精度管理試料の送付、保管条件検討

手足口病を引き起こす EV71 等のエンテ



ロウイルスは RNA ウイルスであるため、検査の質保証には、感染性ウイルスあるいは RNA 陽性コントロールを用いることとなる。しかし外部精度管理調査を目的とし定期的に、かつ 60~70 施設に感染性ウイルスを送付することはセキュリティ上、困難さを伴うため、精度管理用 RNA 試料の輸送法について検討した。ワークショップの目的は、事前に検討した条件について術者が異なる場合の測定結果のばらつきを検討するために企画した。その結果、参加者から、コスト面、術式の改善点、用いる器具へのコメント、結果判定など多方面から意見を短期間で得ることができた。

RNA 陽性コントロールの保管条件の検討は、内部精度管理にも応用可能でありさらにデータを蓄積することで、エンテロウイルス検査の質の管理に用いることが期待される。

#### E. 結論

1) エンテロウイルス感染症には 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、2 類感染症としてポリオが含まれる。全国レベルの流行状況を把握するための定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスを維持し、一定数の検査を実施することで、ポリオウイルス検査に対応可能である。このため感染症発生動向調査、及び感染症流行予測調査事業のもと、エンテロウイルスのレファレンス活動として、①必要な標準品の配布の継続、②目的に応じ柔軟な技術研修を企画/実施、③内部/外部精度管理の方法、検査の質管理用試料の供給体制、実施体制を確立、することが、ポリオウイルスを含むエンテロウイルス検査の質確保に必要であると考えられた。

2) ポリオウイルス封じ込む強化に伴い、

検査体制を維持するためには、ポリオウイルスを保有する感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが効果的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. 板持雅恵, 滝澤剛則, 伊東愛梨, 三浦美穂, 伊藤雅, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 後藤明子, 島あかり, 下野尚悦, 高橋雅輝 筒井理華, 中田恵子, 中野守, 西澤佳奈子, 濱崎光宏, 吉富秀亮, 堀田千恵美, 松岡保博, 三好龍也, 吉田弘 平成 27 年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて病原体検出情報 37 (10) ; 208-209: 2016
2. 濱崎光宏, 吉田弘:エンテロウイルスのウイルス学的検査診断 小児科 57, 949-956, 2016.
3. Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Sci. Rep. 6, 31474; doi: 10.1038/srep31474 .2016.

##### 学会発表

1. 吉田弘. 環境水ウイルスサーベイランスとは」第57回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー-平成28年6月19日郡山市
2. 吉田弘. 感染症法改正にかかわる病原体サーベイランスと信頼性確保について. 平成28年度地域保健総合推進事業 地全

協九州支部地域専門家会議2016年10月  
20-21日，佐賀市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. その他

該当なし

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

麻疹検査診断ラボラトリーネットワークの維持、改善に関する研究

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

研究要旨

麻疹はWHOが排除を目指す感染症である。麻疹排除の認定には検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制が要件となっている。日本においては平成25年4月に「麻しんに関する特定感染症予防指針」を改正し、麻疹疑い例すべてにIgM抗体検査、並びに遺伝子検査の実施を求めている。2016年に、地方衛生研究所では1,865症例の麻疹疑い例を検査診断し、139症例から検出された麻疹ウイルス遺伝子解析を実施した。また民間検査センターにおいて麻疹IgM抗体検査を行い、約1.1%がIgM陽性値を示した。感染研が試行した民間検査センターに対する習熟度試験の結果から、参加したすべての民間検査センターの検査精度は良好であると判断された。またアウトブレイク時の試薬等の配布について検討した。これらは麻疹検査診断体制の維持、改善に対して有用な情報となると考えられた。

A. 研究目的

麻疹は天然痘、ポリオに続きWHOが排除を目指している感染症である。麻疹排除は「優れたサーベイランス体制が存在する特定の地域において、1年間以上継続して伝播した麻疹ウイルスが存在しないこと」と定義されており、排除認定を受けるためには、麻疹症例数を一定数以下にする事とともに、検査診断によるサーベイランス体制の確立や検出された麻疹ウイルス株の鑑別が求められている。日本においては、これに対応するために平成25年4月に「麻しんに関する特定感染症予防指針」(以下、指針)を改正し、麻疹疑い例すべてに麻疹IgM抗体検査等の免疫学的検査の実施を求めると共に、ウイルス遺伝子の検出による病原体検査の実施を求めている。麻疹IgM抗体検査

等による血清学的検査は民間検査センターで、RT-PCR法等によるウイルス遺伝子検出検査は地方衛生研究所(以下、地衛研)に担われている。本研究では2016年の麻疹の検査診断状況を把握し、検査診断体制の維持、改善する事を目的に、地衛研への検査実績の調査、民間検査センターへの検査情報の提供の依頼、並びに、習熟度試験(Proficiency test; 以下PT)の試行を実施した。

B. 研究方法

1. 地衛研の麻疹遺伝子検査実施状況

麻疹・風疹レファレンスセンターを通じて、全国74地衛研にアンケートを実施し、2016年における麻疹遺伝子検査の実施状況を調査した。調査内容は検査症例数、リ

アルタイム PCR 法を用いた検査症例数、検査陽性症例数、遺伝子解析を実施した症例数、遺伝子型解析の結果等である。

## 2. 麻疹アウトブレイク時の検査体制維持の検討

2016年8月におこった麻疹アウトブレイク時に、各地衛研にプライマー、標準品等の準備状況に関するアンケートを実施し、必要に応じてプライマー、標準品等を配布した。

## 3. 民間検査センターにおける麻疹 IgM 抗体検査状況の調査

主要民間検査センター5社に協力を依頼し、検査実績等を一般に公開しないという条件の下で、検査実施数、検査陽性数等の情報の提供を受けた。

## 4. 民間検査センターへの麻疹、風疹 IgM 抗体測定 PT の試み

麻疹 IgM 抗体陽性血清、風疹 IgM 抗体陽性血清を含む10本の血清からなる PT 用パネル血清を作製、主要民間検査センター5社に配布し、測定結果を評価した。

## C. 研究結果

### 1. 地衛研における麻疹の遺伝子検査の状況

全国74の地衛研うち、2016年に麻疹の検査診断を行った地衛研は72カ所、検査された症例数は1865症例であった。また、麻疹の検査を実施した72カ所の地衛研のうち、2015年から導入されたリアルタイム PCR 法を検査に使用した地衛研は61カ所であった。1865症例中1592症例の診断にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査された1865症例のうち、麻疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は171症例であった（検査陽性）。171症例のうち、139症例で遺伝子型解析が行われ、65症例から遺伝子型 D8 の麻疹ウイルスが、58症例から遺伝子型 H1 の麻疹ウイルスが、一症例から遺伝子型 B3 の麻疹ウイルスが検出された。またワクチン株である遺伝子型 A

が15症例から検出された（表1）。

## 2. 麻疹アウトブレイク時の検査体制維持の検討

2016年8月には関西国際空港で感染した者を発端に、感染者50名以上になる麻疹のアウトブレイクが発生した。検査用プライマー、標準品等が不足する事態が懸念されたので、緊急に地衛研に向けてアンケートを実施し、各地衛研のストック状況を調査した。24カ所からリアルタイム PCR 用のプライマー、標準品の配布の依頼があった。求めに応じて、感染研に保存してあったプライマー、標準品等を地衛研に配布した。

## 3. 民間検査センターによる IgM 抗体検査の状況

大手民間検査センターから麻疹 IgM 抗体検査を実施数、陽性数に関する情報を収集した。麻疹 IgM 抗体検査の陽性率は約1.1%であった。

## 4. 民間検査センターへの麻疹、風疹 IgM 抗体測定習熟度検査 (PT) の試み

PT を実施するためには麻疹 IgM 抗体陽性血清、風疹 IgM 抗体陽性血清が必要である。陽性血清を確保するために、民間検査センターから検査済み、廃棄予定の麻疹、並びに風疹 IgM 抗体陽性血清の提供を受けた。これらの血清を使用するにあたり、事前に倫理委員会の承認を得た。収集した血清の抗体価を測定し、抗体価の近い血清を混合して、麻疹、並びに風疹のプール血清(2~3ml)をそれぞれ5種類作製した。感染研においてこれらのプール血清の抗体価を測定し、抗体価が陽性値にある事を確定した。麻疹、風疹 IgM 陽性抗体各4種類、陰性血清2種類を含む10本の血清からなるパネル血清を作製し、民間検査センターに配布、各社の通常の方法による測定を依頼し、検査結果を回収した。すべての民間検査センターの結果は感染研の定めた適合条件に合致した。

#### 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を求められている。また、検査診断の質を担保するために、WHO が認証した国家検査機関 (National Laboratory; NL、日本においては感染研) か、NL によって精度管理された検査施設において検査が実施される事を求めている。一方、日本においては平成 25 年 4 月より改正された「指針」において、麻疹疑い例すべてに麻疹 IgM 抗体検査等の実施を求めると共に、ウイルス遺伝子の検出による検査の実施を求めている。

地衛研における検査実施状況を把握する目的で、アンケート調査を実施した。指針改訂以降、地衛研で実施される検査頻度は上昇し、2016 年もおよそ麻疹症例のおよそ 80%が地衛研でウイルス遺伝子検出による診断がされていた。また、2015 年より麻疹ウイルス遺伝子検出法として導入したリアルタイム PCR 法の利用状況を調査した。リアルタイム PCR は感度が優れている事に加え、反応終了後にチューブを解放するステップがなく、検査行程での交差交雑のリスクが低減すること、また、一度の多検体を処理でキル等の利点があり、感染研では地衛研にリアルタイム PCR 法の導入を勧めてきた。2016 年では地衛研で実施された 1865 症例の検査のうち、およそ 85%がリアルタイム PCR で行われており、リアルタイム PCR 法の普及が進んでいると思われた。また、2016 年にあった麻疹のアウトブレイクが、リアルタイム PCR 法の実施を促進した面もあると考えられる。麻疹は、患者が発生した場合には積極的疫学調査が実施され、患者周囲への接触者調査が行われる。接触者の中に複数の発熱者や発疹者が存在した場合、一度に多くの検体を検査する事が求められる場合がある。こういった事が

リアルタイム PCR 法の導入を促した面もある。

関西国際空港 (関空) を中心に患者 50 名をこすアウトブレイクが発生した。また患者の中には九州や関東まで移動した者がおり、広域に麻疹が拡散する可能性が懸念され、検査に必要なプライマー、標準品等が不足する事態が想定された。そこで地衛研における試薬の準備状況の調査を実施し、必要に応じてプライマー、標準品の配布を行った。日本は麻疹排除にあるので、地衛研によっては十分量の試薬等が準備されていない場合もある。アウトブレイクに備えて、感染研、あるいはレファレンスセンター等に緊急用の試薬等を用意しておく事は、検査診断体制の機能を維持する上で重要であると思われた。

麻疹 IgM 抗体検査は WHO が麻疹検査診断の標準法とする検査法である。その検査状況等の把握は、日本の麻疹サーベイランス体制の質を示すために重要である。日本においては、麻疹 IgM 抗体検査は民間検査センターに担われている。麻疹 IgM 抗体検査の状況を把握する目的で主要 5 民間検査センターに情報提供を求めた。民間検査センターの要望により、当報告書での検査実績数、陽性数の報告は控えるが、麻疹 IgM 検査陽性率はおよそ 1.1 %であった。2013 年まで使用されていた IgM 抗体検査キットは、伝染性紅斑患者等との非特異的反応が問題となり、2014 年からは改良されたキットが使用されている。2013 年以前の検査陽性率が 6%前後であったことから、検査キットの改善により検査の特異度は向上していると考えられる。

大手民間検査センター、5 社では ISO 151809 や “College of American Pathologist” の外部精度管理を受けて、適合している。一方、WHO は NL による精度管理の実施を求めていることから、PT 試験の試

行を実施した。各施設にはPT用パネルを配布し、通常用いている検査機器、検査方法で抗体価の測定し、診断を依頼した。診断結果はほぼ感染研での診断結果と一致した。今回のPTに参加した民間検査センターにおける麻疹の検査診断の精度は良好と判断した。

#### E. 結論

麻疹の診断のおよそ95%で、血清学的診断法、または病原体診断法のいずれか、あるいは両方の検査診断で行われている。今後もこ検査診断体制、検査診断精度を評価し、維持、改善していく事が求められる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

##### a 英文

1. Do Phuong Loan, Nguyen Minh Hang, Trieu Thi Thanh Van, Thi Mai Duyen, Katsuhiko Komase, Nguyen Tran Hien, Comparison of laboratory methods for measles diagnosis in Northern Vietnam, 2014. (2016) Vietnam Journal of Preventive Medicine. 12 (185) 24-9.
2. Seki F, Someya K, Komase K, Takeda M. A chicken homologue of nectin-4 functions as a measles virus receptor. Vaccine. 2016 Jan 2;34(1):7-12.
3. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. (2016) TMPRSS2

Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. Sci Rep. 6:29430.

4. Okamoto K, Mori Y, Komagome R, Nagano H, Miyoshi M, Okano M, Aoki Y, Ogura A, Hotta C, Ogawa T, Saikusa M, Kodama H, Yasui Y, Minagawa H, Kurata T, Kanbayashi D, Kase T, Murata S, Shirabe K, Hamasaki M, Kato T, Otsuki N, Sakata M, Komase K, Takeda M. (2016) Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens. J. Clin. Virol. 80: 98-101.

##### b. 和文

1. 駒瀬勝啓、竹田誠、(2016)インドネシアにおける麻疹の状況、病原微生物検出情報 37:67-68.
2. 駒瀬勝啓 (2016) わが国における麻疹対策の現状と課題、検査と技術、医学書院 44(11); 1046-48.

学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 酒井宏治、中島典子、駒瀬勝啓、竹田誠呼吸器病ウイルスの病原性発言に関わる宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の意義、第57回日本臨床ウイルス学会平成28年6月18日～19日、福島

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

表1

### 地方衛生研究所における麻疹検査実績(2016年)

ブロック	検査症例数	陽性症例数	Genotype					ウイルス分離数
			D8	B3	H1	A	NT	
北海道	24	1	1	0	0	0	0	0
東北・新潟	56	1	0	0	0	1	0	0
北関東・千葉・東京	563	54	32	0	6	6	10	9
神奈川・甲・信・静岡	211	10	9	0	0	1	0	4
北陸	20	1	1	0	0	0	0	0
東海	101	11	7	1	2	1	0	3
近畿	684	85	12	0	48	3	22	5
中国・四国	123	5	2	0	0	3	0	1
九州	58	3	1	0	2	0	0	0
沖縄	25	0	0	0	0	0	0	0
計	1865	171	65	1	58	15	32	22

NT: Not typed

2016年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

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

Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の性能評価

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	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部
	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

研究要旨 百日咳感染症の新規検査法である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D（栄研化学）の性能評価を実施した。本検査キットの LAMP プライマーは百日咳毒素プロモーター *ptxP1* アレルに対し設計されたものであるが、一塩基多型を持つ *ptxP3* 株 (SNP; G>A at -65 position) ならびに *ptxP8* 株 (C>T at -60 position) に対しても高い検出感度を持つことが確認された。世界の百日咳流行株は *ptxP1* 株と *ptxP3* 株が臨床分離株の 99%以上を占めることから、本検査キットは百日咳の遺伝子検査として有用である。

#### A. 研究目的

百日咳は咳嗽を主訴とする急性呼吸器感染症であり、正確な診断には実験室診断が必要である。わが国では 2016 年 11 月に体外診断薬である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D (以下、百日咳菌 LAMP キット) が健康保険適用となり、診断精度の向上に寄与することが期待されている。百日咳菌 LAMP キットのプライマーは百日咳毒素プロモーター (*ptxP1* アレル) に対し設計されているが、この *ptxP* 遺伝子には複数の一塩基多型 (SNP) が認められている。

世界の流行株には *ptxP1* から *ptxP3* アレルへの入れ替わりが認められ、わが国では *ptxP1* 株以外に *ptxP3* 株と *ptxP8* 株が臨床分離されている (図 1)。これら *ptxP* 遺伝子上の SNP は百日咳 LAMP キットの感度低下を招く恐れがあるが、これまでに実験的な検証は行われていない。そのため、本研究では百日咳菌 LAMP キットの *ptxP3* 株と *ptxP8* 株に対する検出感度を評価した。

#### B. 研究方法

##### 1. *ptxP* 遺伝子と百日咳菌ゲノム DNA の調製

国内臨床分離株 (*ptxP1* 株, *ptxP3* 株, *ptxP8* 株) を用いて、PCR により 3 種類の *ptxP* 遺伝子 (*ptxP1*, *ptxP3*, *ptxP8*) を増幅した。*ptxP* 遺伝子 (341-bp) は QIAEX II Gel Extraction Kit を用いて精製した。

*ptxP1* 株 (n=20), *ptxP3* 株 (n=20), *ptxP8* 株 (n=1, 国内で 1 株のみ分離) から, Wizard Genomic DNA Purification Kit を用いてゲノム DNA を精製した。

##### 2. Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の感度評価

キャリア RNA (0.1 µg/mL) を含む TE 緩衝液を用いて *ptxP* 遺伝子を連続希釈し、 $10^5$  コピーから  $10^2$  コピーの鋳型 DNA 溶液を調製した。同様にゲノム DNA を希釈し、100 pg と 1 pg の DNA 溶液を調製した。希釈した DNA 溶液を Loopamp 百日咳菌検



出試薬キット D (LMP542, 栄研化学) に供試し, 濁度測定装置 (LA-320C, 栄研化学) を用いて *ptxP* 遺伝子の増幅を行った (66°C, 40 分間)。Tt 値は濁度 (OD<sub>650</sub>) が 0.1 を超えた時間 (min) とした。

## C. 研究結果

### 1. *ptxP* 遺伝子を用いた感度評価

PCR により増幅した 3 種類の *ptxP* 遺伝子 (*ptxP1*, *ptxP3*, *ptxP8*) は, すべて 10<sup>2</sup> から 10<sup>5</sup> コピーで増幅が認められた (図 2)。*ptxP1* と *ptxP8* は同様な Tt 値を示したが, *ptxP3* は *ptxP1* と *ptxP8* に比べ有意に低い Tt 値を示した ( $p < 0.05$ , 10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> コピー)。*ptxP3* に対する検出感度は *ptxP1* と *ptxP8* よりも約 100 倍高いことが示された。

### 2. ゲノム DNA を用いた感度評価

*ptxP* 遺伝子を用いた感度評価と同様に, *ptxP1* 株と *ptxP8* 株は同様な Tt 値を示した。一方, *ptxP3* 株は *ptxP1* 株よりも有意に低い Tt 値を示した ( $p < 0.01$ ) (表 1)。ゲノム DNA を用いた感度評価においても, *ptxP3* 株に対する高い検出感度が確認された。

## D. 考察

今回の検討により, 百日咳菌 LAMP キットは *ptxP1* 株以外に *ptxP3* 株と *ptxP8* 株に対しても高い検出感度を持つことが判明した。さらに, *ptxP3* 株は LAMP プライマーの標的配列内に SNP が存在するにも関わらず, *ptxP1* 株と *ptxP8* 株よりも高い感度で検出されることが示された。

ウイルス性疾患であるウエストナイル熱とリフトバレー熱に対する LAMP 検出系では, プライマー内の 2~3 塩基のミスマッチは検出感度に影響しないと報告されている。ただし, プライマー内の SNP により検

出感度が高くなるという報告はなく, 本研究が初めてとなる。この感度上昇の理由として, *ptxP3* の SNP が DNA の立体構造に影響し, 結果として LAMP プライマーのアニーリング効率が高まった可能性が挙げられる。

世界の百日咳流行株の主要な *ptxP* アレルは *ptxP1* と *ptxP3* であり, 臨床分離株の 99% 以上を占めている。百日咳菌 LAMP キットが *ptxP1* 株のみならず *ptxP3* 株も高感度に検出したことから, 本法は現在の百日咳流行株の検出に有用と判断された。ただし, 新たな *ptxP* アレルを持つ流行株が今後増加する可能性は否定できないため, 臨床分離株の *ptxP* アレル変化に関しては継続的な調査が必要である。

## E. 結論

百日咳感染症の体外診断薬 Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D は世界の流行株である *ptxP1* 株と *ptxP3* 株を高感度に検出し, 百日咳菌の遺伝子検査法として有用である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. *Emerg Infect Dis.* in press.
2. Kamachi K, Moriuchi T, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for

diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Microbiol Methods. 133:20-22, 2017.

2016年, 岡山.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

学会発表

1. 森内巧, 文元礼, 品川文乃, 新谷亮, 宮地悠輔, 勝田友博, 大塚菜緒, 平松征洋, 柴山恵吾, 蒲地一成. わが国の小児と成人における百日咳抗体の量的・質的解析. 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会. 11月19-20日,

1. 特許取得

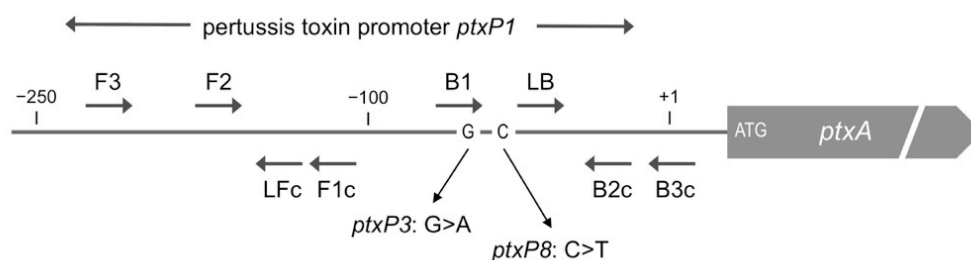
該当なし

2. 実用新案登録

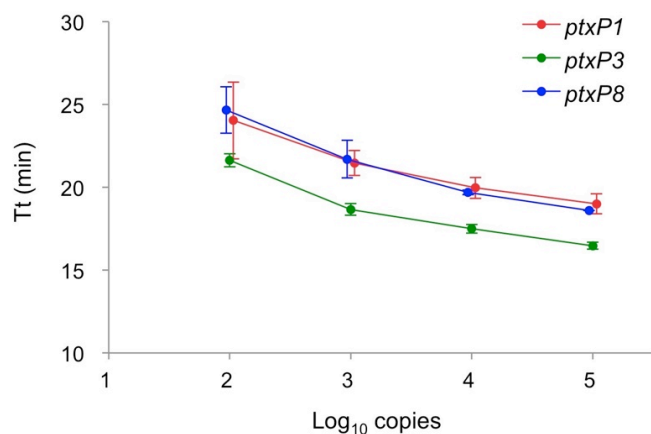
該当なし

3. その他

該当なし



**Fig. 1.** Schematic representation of the LAMP primers for *Bordetella pertussis* detection. The LAMP primers are designed to target the *B. pertussis* *ptxP1* allele. The *ptxP3* and *ptxP8* alleles contain a SNP at positions  $-65$  (G>A) and  $-60$  (C>T), respectively. The transcription start site is shown at position  $+1$ . *ptxA*, pertussis toxin S1 subunit gene.



**Fig. 2.** Standard curves for *ptxP1*, *ptxP3*, and *ptxP8* alleles generated with PCR fragments. The LAMP assay was performed with 10-fold serial dilutions of PCR fragments ( $10^5$  to  $10^2$  copies per reaction). Data represent the mean and standard deviations from three separate measurements.

Table 1. Detection of *Bordetella pertussis* *ptxP1*, *ptxP3*, and *ptxP8* strains by the commercial LAMP assay

Strain	No. of clinical strains tested <sup>a</sup>	Tt value (min) <sup>b</sup>	
		100 pg DNA <sup>c</sup>	1 pg DNA
<i>ptxP1</i>	20	19.3 ± 0.5	21.8 ± 0.5
<i>ptxP3</i>	20	16.9 ± 0.3	19.0 ± 0.4
<i>ptxP8</i>	1	18.5 <sup>d</sup>	21.5 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Genomic DNA sample prepared from *B. pertussis* clinical isolate.

<sup>b</sup> Threshold time when the turbidity value reached OD<sub>650</sub> of 0.1.

<sup>c</sup> Genomic DNA/reaction tube.

<sup>d</sup> Average Tt values from two separate measurements.

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VNTR解析の外部精度評価

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細菌科

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分析の外部精度評価（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、2016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、2015年度に引き続いて3回目となる外部精度評価を実施することとした。

2016年度は、56施設が外部精度評価を希望し、55施設から解析結果が送付された。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48施設（87%、48/55）であった。2016年度の完全正答施設の割合は、2015年度（93%、49/53）と比べて低下しているものの、2014年度（67%、36/54）からの改善傾向（ $P=0.01$ ）が認められた。

#### 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、2016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、2015年度に引き続いて3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臨床分離株 2 株の DNA を内部精度管理用 DNA として参加施設に配布した。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 分析において、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。

### 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 分析結果を解析担当者 (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電子メールにて調査した (2016 年 11 月)。2016 年 12 月までに 56 施設より外部精度評価の参加希望があった。2017 年 3 月 1 日までに 1 施設を除いた 55 施設から分析結果が送付された。本報告書では、55 施設の分析結果に基づい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スセット

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。

2016 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 41、33、19 であり 2014 年度、2015 年度と比べて増加傾向であった (図 1)。

#### 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 48 施設 (87%、

48/55)、1 ローカス違いは 5 施設 (9.1%, 5/55)、2 箇所以上違いは 2 施設 (3.6%, 2/55) だった (表 1)。2016 年度に全ローサイ完全一致した施設の割合は、2014 年度と比べると有意に高かった (67% vs. 87%,  $p=0.01$ ) が、2015 年度と比べると低下していた (93% vs. 87%,  $p=0.24$ )。この成績低下の原因は、2016 年度は 2015 年度と比べて 1 ローカス違いの施設の割合が増えたためであった (1.9% vs. 9.1%)。

#### 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 (表 2)。2016 年度の調査では 2015 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%, 36/55)。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 (18%, 10/55)、マルチナ 5 施設 (9%, 5/55)、QIAxcel 2 施設 (4%, 2/55)、コスモアイおよび Agilent 2100 Bioanalyzer が 1 施設 (2%, 1/55) であった。

#### 5. 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、各ローカスセットにおける 1 ローカスあたりの正答率として算出した。

2016 年度は 2014 年度と比べるといずれ

の分析法においても全体的に高い正答率であったが、2015 年度と比較すると一部の分析法で正答率が低下していた。全施設において共通の評価対象領域とした JATA (12) では、最も主要な分析法であるアガロースゲルでは 2016 年度と 2015 年度の正答率はほぼ同様 (99.7% [2015] vs. 99.8% [2016]) であったが、10 施設で用いられていた自動シーケンサーでは正答率が低下していた (100% [2015] vs. 98.9% [2016])。また、採用施設数が 5 施設と少ないものの、マルチナにおいても正答率の低下が見られた (100% [2015] vs. 97.2% [2016])。

任意の評価対象とした JATA (15)、Supply では、主要な分析法 (アガロースゲル、自動シーケンサー) は高い正答率を示していた (99.6%-100%)。一方、他領域と比べて測定の難易度が高い HV では、アガロースゲルは昨年度とほぼ同様 (97.2% [2015]、97.8% [2016]) であったが、自動シーケンサーでは正答率が低下していた (100% [2015] vs 98.8% [2016])。採用施設数が 1 施設と限られているものの、コスモアイ、Agilent 2100 Bioanalyzer は良好な成績が確認された。QIAxcel については、正答率が低い施設があった。

#### 6. 各ローカスの正答率の比較

JATA (12)、JATA (15) における分析ローカスごとの正答率を年度別に比較した (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。この改善傾向は 2016 年度も同様 (98-100%) であったが、誤回答が報告されたローカス数は増えていた (誤回答が報告されたローカス数: 5 ローサ

イ [2015] vs. 9 ローサイ [2016])。

#### D. 考察

2016 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、2015 年度に引き続いて3回目となる外部精度評価を実施した。

各施設で用いられていた PCR 産物の分子量測定法については、2016 年度は 2014 年度、2015 年度とほぼ同様の内訳であった (表 2)。主要な分析法として、最もシンプルなアガロースゲル電気泳動が 36 施設で用いられており、高い分析精度が期待される自動シーケンサーは 10 施設で使われていた。続いてマルチナが 5 施設、QIAxcel 2 施設、コスモアイ、Agilent 2100 Bioanalyzer が各 1 施設で採用されていた。昨年と採用施設数が同数だった自動シーケンサーは、分析系の導入に労力を要するものの、高い分析精度と自動化が期待できるため、欧米では幅広く用いられている。本邦でも自動シーケンサー導入希望施設に対して技術支援を行っていく必要がある。

外部精度評価株 3 株において JATA (12) 全ローサイが完全一致した施設の割合は、2016 年度は 2014 年度と比べると有意に高かった (67% vs. 87%,  $p=0.01$ ) が、2015 年度と比べると低下していた (93% vs. 87%,  $p=0.24$ )。この成績低下の原因は、2016 年度は 2015 年度と比べて 1 ローカス違いの施設数が増えたためであった (1 施設 vs. 5 施設)。1 ローカス違いの施設における誤回答は特定のローサイではなく、4 ローサイに分布して発生していた (data not shown)。そのため、特定ローサイの測定難易度が高かったのではなく、VNTR 分析過程における人為的なミス (DNA 分子量の推定、コピー数への換算、コピー数の入力など) の影

響が推察された。また、何らかの誤回答が報告された 7 施設のうちの 5 施設では分析担当者が交代しており、VNTR 分析に関する熟練度が分析精度に影響した可能性も考えられた (data not shown)。

2016 年度は 2014 年度と比べると分析精度の改善傾向が維持されていた。外部精度評価の実施は、分析精度の向上と維持に有用であることが報告されている。また、最近改正された感染症法においても、病原体等検査の信頼性を確保することが求められている。これらのことから、今後も外部精度評価を継続的に実施していく必要がある。

2014 年度に分析精度が低かった 5 ローサイでは、2015 年度と同様に 2016 年度も分析精度が改善していた (図 2)。各施設における分析精度を改善するために、2015 年度はコピー数ラダーマーカー及び VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を、2016 年度は VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を内部精度管理用検体として配布した。内部精度管理用検体の配布が、分析精度の維持と向上に寄与していた可能性がある。

VNTR 分析に利用されていたローカセットの調査では、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 41、33、21 であり、過去 3 年間で最も多くなった (表 2)。JATA (12) は分析難易度が低く、集団発生疑い事例の鑑別等に有用である。一方、地域で発生した結核菌の網羅的解析から感染経路を推定する場合 (サーベイランス調査) 等では菌株識別能が不足することが分かっている。そのため、調査目的に応じて分析領域を追加する必要がある。地域分子疫学調査研究が普及してきたことにより、JATA (12) に加えてその他のローカセットを分析対象とする自治体が増えたと考えられる。

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、2016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

2016年度は、55施設を対象にVNTR分析に関する外部精度評価を実施した。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(87%, 48/55)であった。2016年度の完全正答施設の割合は、2015年度(93%, 49/53)と比べて低下しているものの、2014年度(67%, 36/54)からの改善傾向は認められた。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

論文発表

なし

学会発表

1. 村瀬良朗、瀧井猛将、前田伸司、御手洗聡.結核菌型別分析における精度保証(2014-2015). 第92回日本結核病学会総会. 3月23-24日, 2017年, 東京.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図1. 参加施設で採用されているVNTR分析システム

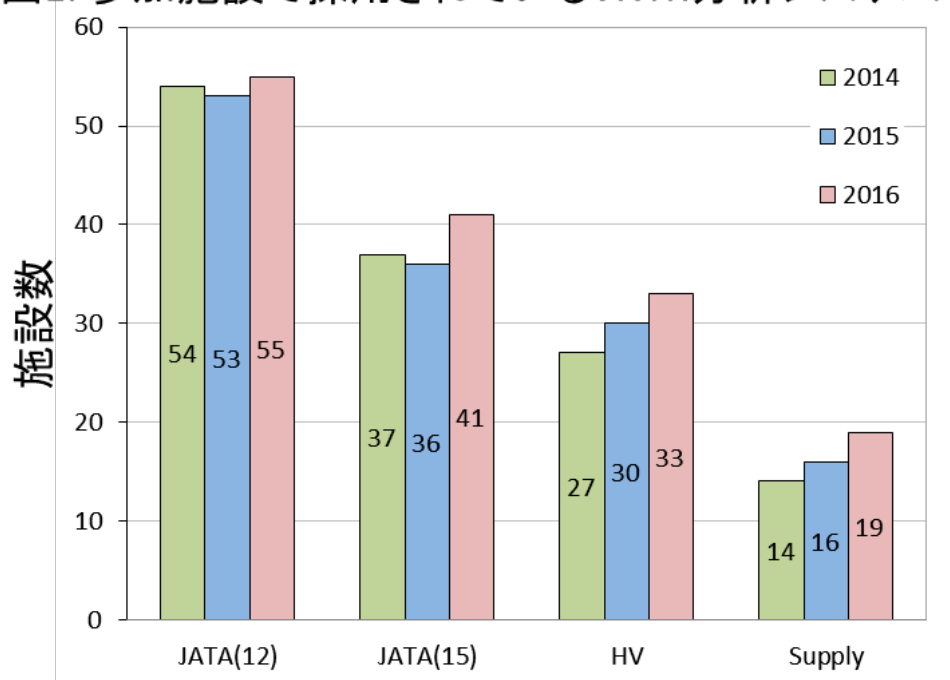


表1. 3株をJATA(12)で分析した場合の正答施設数

	2014		2015		2016	
	施設数	( 54施設中, % )	施設数	( 53施設中, % )	施設数	( 55施設中, % )
全ローサイ完全一致	36	67% ( 36/54 )	49	93% ( 49/53 )	48	87% ( 48/55 )
1口ーカス違い	7	13% ( 7/54 )	1	1.9% ( 1/53 )	5	9.1% ( 5/55 )
2カ所以上違い	11	20% ( 11/54 )	3	5.7% ( 3/53 )	2	3.6% ( 2/55 )

表2. 各施設で用いられていたPCR産物の分子量測定方法

	2014		2015		2016	
	施設数	割合(%)	施設数	割合(%)	施設数	割合(%)
アガロースゲル	37	69	34	64	36	66
自動シーケンサー	7	13	10	19	10	18
マルチナ	4	7.4	4	7.5	5	9.1
QIAxcel	4	7.4	3	5.7	2	3.6
コスモアイ	2	3.7	2	3.8	1	1.8
Agilent 2100 Bioanalyzer					1	1.8

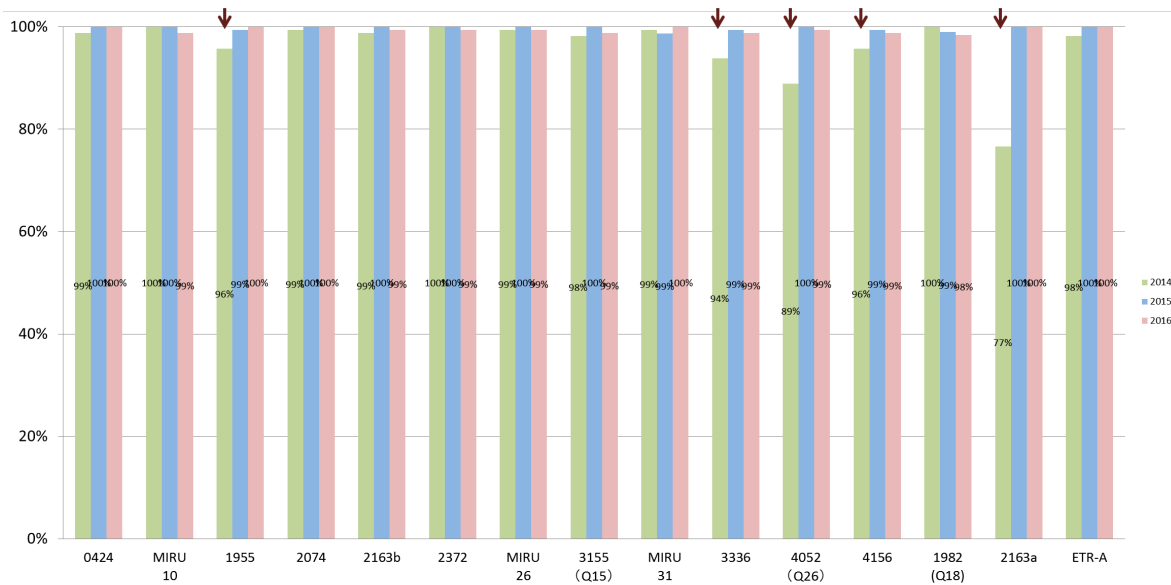
表3. 各分析法におけるローカセットの正答率

	JATA(12)		JATA(15)		HV		Supply		
	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	
2014	アガロースゲル	37	98.5	22	94.4	15	94.8	5	96.7
	自動シーケンサー	7	97.6	7	92.1	7	92.1	7	95.2
	マルチナ	4	96.5	2	83.3				
	QIAxcel	4	86.1	4	80.6	4	75	1	94.4
	コスモアイ	2	98.6	2	83.3	1	100	1	100
2015	アガロースゲル	34	99.7	22	100	16	97.2	5	100
	自動シーケンサー	10	100	9	100	10	100	9	100
	マルチナ	4	100	2	100	2	100	1	100
	QIAxcel	3	99.1	2	94.4	2	66.7		
	コスモアイ	2	100	1	100			1	100
2016	アガロースゲル	36	99.8	27	99.6	20	97.8	8	100
	自動シーケンサー	10	98.9	9	100	9	98.8	9	100
	マルチナ	5	97.8	3	100	2	100	1	100
	QIAxcel	2	97.2	1	88.9	1	66.7		
	コスモアイ	1	100	1	100	1	100	1	100
Agilent 2100 Bioanalyzer	1	100							

n: 各分析法による報告施設数

正答率(%): 各ローカセットにおける1ローカセットあたりの正答率(%)

図2. 各ローカセットにおける正答率



主要な分析法であるJATA(12/15)各ローカセットにおける正答率を2014年度、2015年度、2016年度で比較した。2016年度は2015年度と同様に全てのローカセットで高い正答率を示していたが、誤回答が1以上あったローカセットの数が多かった。矢印は2014年度の正答率が悪かった5つのローカセットを示す。

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28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 井上 智 獣医科学部 第二室長  
堀田明豊 獣医科学部 主任研究官  
藤田 修 獣医科学部 主任研究官

研究要旨 野兔病の血清学的検査（微量凝集反応）および遺伝子検出（conventional PCR）について外部品質保証（EQA）を行った。計24の地方衛生研究所に各検査に必要な試薬、陽性および陰性対照、模擬3検体ならびにSOPを送付し、各機関における検査結果を集計した。血清学的検査にて測定した凝集力価は全機関で安定していた。遺伝子検出では機関間で感度に1,000倍の差が認められたが、23機関が模擬検体から適切に遺伝子検出したため、核酸濃度が10pg/ $\mu$ l以上であれば野兔病菌核酸の検出、判定が可能と考えられた。これらの成績より野兔病の検査は殆どの地方衛生研究所において適切に実施可能と考えられた。

#### A. 研究目的

本研究班の目的は、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する7地方衛生研究所（山形県、東京都、愛知県、京都府、広島県、徳島県および長崎県）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である。一昨年度は、狂犬病の検査ネットワーク構築と遺伝子検査系の検証および標準化を、7地方衛生研究所を含む16地方衛生研究所を対象に実施し、いずれもPCR検査による狂犬病ウイルス遺伝子検出が適切に実施可能であることを確認した。昨年度は、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスの各種動物の血清疫学調査のためのELISA系の検査試薬の配布と外部品質保証（EQA）を実施し、7地方衛生研究所を含む14地方衛生研究所で、SFTSウイルス感染についての動物の血清疫学が実施可能であることが明らかとなった。本年度は

7地方衛生研究所へのアンケート調査の結果、野兔病の検査に関するEQAを行うこととなった。

野兔病は、東北地方全域および関東地方東部に発生が多い動物由来感染症で、ヒトは主に野兔病菌感染ノウサギ取扱い時に感染する。これまで国内の約1,400症例の多くは高齢の男性で、リンパ節の腫脹が認められている。しかし、2008年7月以降に報告された4例（和歌山、兵庫、徳島および福島県）の野兔病患者はいずれもノウサギ等野生動物との接触歴、リンパ節の腫脹は認めず、性別、年齢に偏りはなかった。これらは不明熱によりリケッチア症が疑われた後、血清学的に野兔病と診断されている。

野兔病は一般に血清学的検査や遺伝子検出の結果から診断される。国立感染症研究所では野兔病の行政検査として、凝集反応試験による血清学的検査、16srRNAおよび*fopA*領域を増幅させるPCR法による野兔

病菌特異的遺伝子配列の検出および判定を実施している。

以上のように国内の野兎病発生状況および検査法について、本年度7月に開催された衛生微生物協議会にて説明し、EQAへのアドホック参加を募ったところ、17(青森、岩手、福島、新潟、茨城、群馬、神奈川、香川、福岡、佐賀、熊本および宮崎県、ならびに、新潟、名古屋、福岡、北九州および長崎市)の地方衛生研究所が参加表明し、計24機関でEQAを実施することとなった。

## B. 研究方法

### 1. 血清学的検査(微量凝集反応)

フォルマリン不活化野兎病菌(Yama株)抗原液、抗原染色液(サフラニン溶液)、陽性対照ウサギ血清、陰性対照ウサギ血清および擬似3検体をEQA参加地方衛生研究所に冷蔵送付した。また野兎病の行政検査に使用している検査手順書(SOP)も配布した。擬似3検体No.1、2および3の内容はそれぞれ陽性対照ウサギ血清とウマ血清を、1:33、1:3、1:15の比で混合した。各機関にて送付した陽性対照ウサギ血清を陽性対照(強)、陽性対照ウサギ血清と陰性対照ウサギ血清の7:1の混合液を陽性対照(弱)として供試した。ピペット、チップ、96穴プレート、インキュベーターなどは各機関所有の物品を供試した。各機関はSOP通りに必要事項を記入しながら対照3検体と共に、模擬3検体の凝集力価を測定し、反応像を写真撮影した。これら試験結果は国立感染症研究所獣医科学部にて集計された。

### 2. 遺伝子検査(conventional PCR)

16srRNAおよび*fopA*領域増幅用プライマーセット、陽性対照野兎病菌核酸(LVS

由来100pg/μl)および擬似3検体(各100pg/μl)を国立感染症研究所で実施している野兎病の行政検査用のSOPと共にEQA参加地方衛生研究所に冷蔵送付した。擬似3検体No.1、2、3の内容は、*Francisella novicida* U112株由来核酸、*Francisella philomiragia* 029株由来核酸、*Wolbachia* sp.由来核酸とした。ピペット、チップ、サーマルサイクラー、電気泳動装置、撮影装置などは各機関所有の物品を供試することとした。各機関はSOPに従い、陽性対照核酸を10倍段階希釈し、各PCR系における検出感度を確認した。また、擬似3検体について、PCRによる16srRNAおよび*fopA*領域の増幅の有無と、およその分子量を電気泳動により確認した。配布したSOP通りに必要事項を記入し、泳動像などの写真とともに結果を国立感染症研究所獣医科学部に報告した。

## C. 研究結果

### 1. 血清学的検査(微量凝集反応)

配布した抗原液のOD<sub>560</sub>値は測定機器を有す11地方衛生研究所において0.94~1.3であった。全24機関で使用された96穴プレートは品番不明も含め16種以上であった。各機関における凝集力価は陽性対照(強)が320または640倍、陽性対照(弱)が40または80倍、陰性対照は全てで10倍未満であった(図1)。擬似検体No.1は10倍未満が1機関、10倍が12機関、20倍が10機関、40倍が1機関と異なった。擬似検体No.2は80倍が18機関、160倍が6機関、擬似検体No.3は20倍が13機関、40倍が11機関であった(図2)。報告されたSOPを確認したところ、不鮮明さにより、凝集の有無の判定の正確性が確認できない写真がいくつか確認された。

## 2. 遺伝子検査 (conventional PCR)

全 24 地方衛生研究所における 16srRNA を標的とした PCR の感度は 1pg-1fg/μl (10<sup>-2</sup> から 10<sup>-5</sup> 希釈) 以上で、*fopA* では 10pg-10fg/μl (10<sup>-1</sup> から 10<sup>-4</sup> 希釈) 以上であった (図 3)。擬似検体における 16srRNA および *fopA* を標的とした PCR の結果は、No.1 が+/+, No.2 が+/-、と全 24 機関が同じ結果であったが、No.3 については 23 機関が-/-、1 機関が-/+であった (表 1)。擬似検体 No.3 が-/+と報告した機関は再検査においても同じ結果であり、反応酵素として Fast PCR 用酵素を使用していたことがわかった。また多くの機関が SOP に遺伝子増幅の有無を記載するのみであり、2 つの PCR の結果から想定される各擬似検体に含まれる菌種について記述していた機関は少なかった。全機関で 6 種の反応酵素が使用されていて、Takara 社の ExTaq HS および ExTaq がそれぞれ 11、10 機関と多かった。PCR 産物の電気泳動には 4 機関が既成のゲル泳動システムを利用していた。

### D. 考察

回収した SOP と検査結果を確認したところ、使用した試薬などのメーカー名、品番、開封日などに記入不備が多かった。また凝集反応の結果の写真は、解像度やピント等の調整不備により、凝集像確認には不適であった。PCR の泳動像データは泳動装置など使用している機器の相異により、機関間で異なったが、全て鮮明であったことから、検査者の幾人かは専用の撮影装置以外の検査結果の写真撮影に不慣れであったと考えられた。今後、EQA 実施時には SOP への記入例や結果報告方法についての説明書を配布する必要があるだろう。

血清学的検査については、低力価の模擬検体 No.1 が 10 倍未満～40 倍と機関間で異なった。40 倍とした 1 機関は 96 穴プレートに一般的なポリスチレン製とは異なるポリエチレンテフタレート製を使用していたため、プレートの材質の違いが凝集反応に影響した可能性がある。本 EQA では使用プレートは指定しなかったが、今後プレートの材質の凝集反応の結果への影響を確認する必要があるかもしれない。一方、野兔病の血清診断において単一血清で陽性と判断される 80 倍以上の凝集力価を有す擬似検体 No.2 と、それを 4 倍希釈した擬似検体 No.3 の凝集力価が機関間で大きな差がなかったことから、野兔病の血清診断は参加全機関で適正に実施可能と考えられた。

PCR における感度が 24 地方衛生研究所間で 1,000 倍異なった事は、使用酵素やサーマルサイクラーの性能、検査者の手技の相異などに起因する可能性がある。検体の核酸濃度が少なくとも 10pg/μl (600 copies/μl 相当) 以上であれば、適正に検出可能と考えられたため、今後、病原体の核酸精製や核酸の濃度測定についての EQA を実施する必要があるかもしれない。

*Francisella* 属菌に最も近縁とされる *Wolbachia* の核酸 (擬似検体 No.3) から *fopA* 領域を増幅させる PCR にて野兔病菌と同程度の分子量の PCR 産物が増幅された原因は不明だが、当該機関のみが Fast PCR 用の酵素を使用し、一般の酵素用のプログラムで反応させていたことが一因と考えられる。今後、擬似検体 No.3 から増幅された遺伝子産物のシーケンス解読などの検証を試みたい。いずれにしろ 16srRNA と *fopA* を標的とした PCR では、+/+の場合、*F. tularensis* または *F. novicida*、+/-の場合、*F. tularensis* と *F. novicida* 以外の

*Francisella* 属菌、-/の場合、*Francisella* 属菌以外の菌と判定され、-/+の場合は判定不能となり、再検査を要する。本 EQA において、PCR の結果から検体の菌種判定を記述した機関は少なかった。このため各検査者に検査の目的と結果の意味について十分理解してもらう必要がある。今後、病原体検出マニュアルや SOP の改変時には、明快な説明や、PCR の結果からの菌種の判定の記入欄を追加するなどして改善するべきである。

近年、血液培養機器などにより野兎病菌以外の *Francisella* 属菌など、病原性や増殖性が乏しい環境菌が臨床検体から偶発的に分離されることがある。本 EQA の実施により多数の自治体において病院検査室などで認められた野兎病菌疑い菌のスムーズな確認検査が可能となるだろう。

#### E. 結論

参加 24 地方衛生研究所間で遺伝子検出において感度に差はあったものの、診断や菌種の判定に問題が生じる結果の相異はなかった。それぞれの機関で SOP を改善する必要があるが、野兎病の血清学的診断・遺伝子検査は、必要試薬を配布することにより、殆どの地方衛生研究所で適正に実施できると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 遺伝子検査における疑似検体の結果分布と解釈

疑似検体 No.	PCRの結果		回答 地衛研数	結果の解釈
	16srRNA	fop A		
1	+	+	24	<i>F. tularensis</i> または <i>F. novicida</i>
2	+	-	24	<i>F. tularensis</i> 、 <i>F. novicida</i> 以外の <i>Francisella</i> 属菌
3	-	-	23	<i>Francisella</i> 属菌以外
	-	+	1	

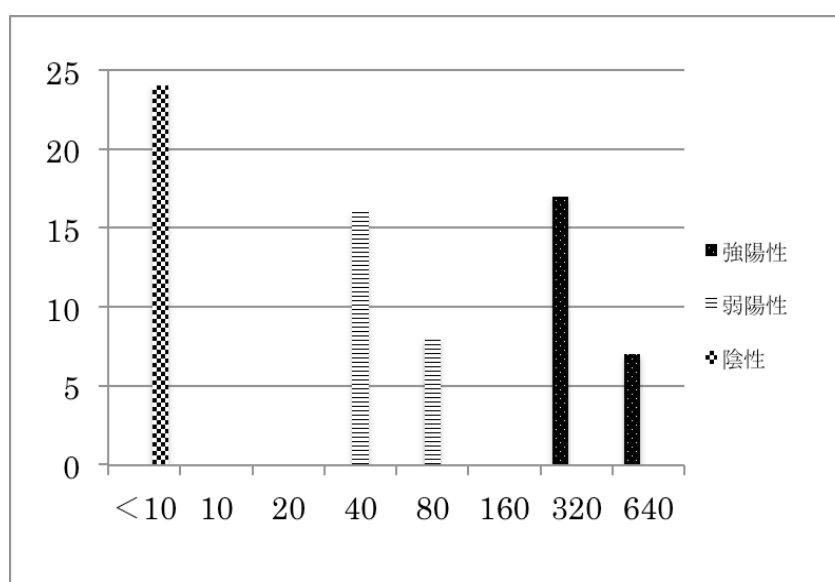


図1 抗野兔病菌対照血清の凝集力価の差（縦軸：地方衛生研究所数、横軸：凝集力価）  
陰性対照は全機関が10倍未満と判定し、陽性対照（強および弱）の凝集力価は1管の差であった。

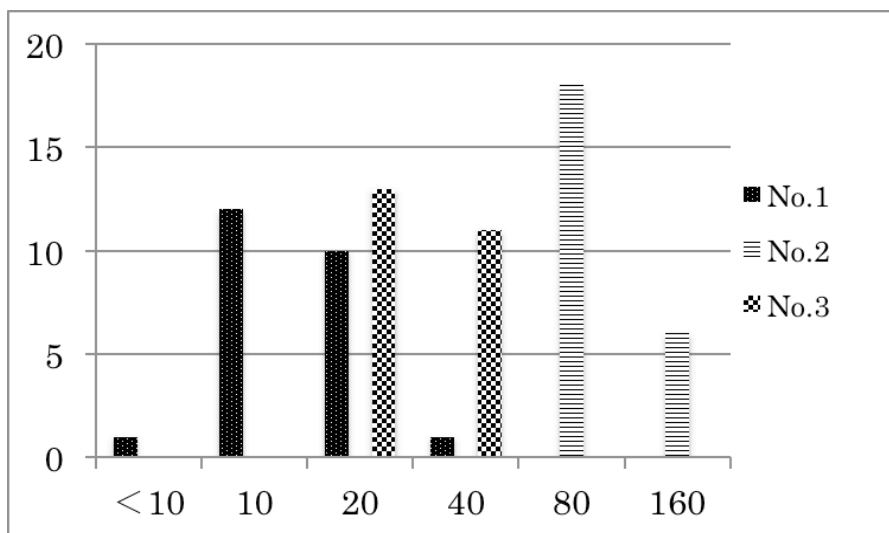


図2 血清学的検査用擬似3検体の凝集力価（縦軸：地方衛生研究所数、横軸：凝集力価）  
 低力価の擬似検体No.1は機関間で差があったが、擬似検体No.2および3では差は1管であった。



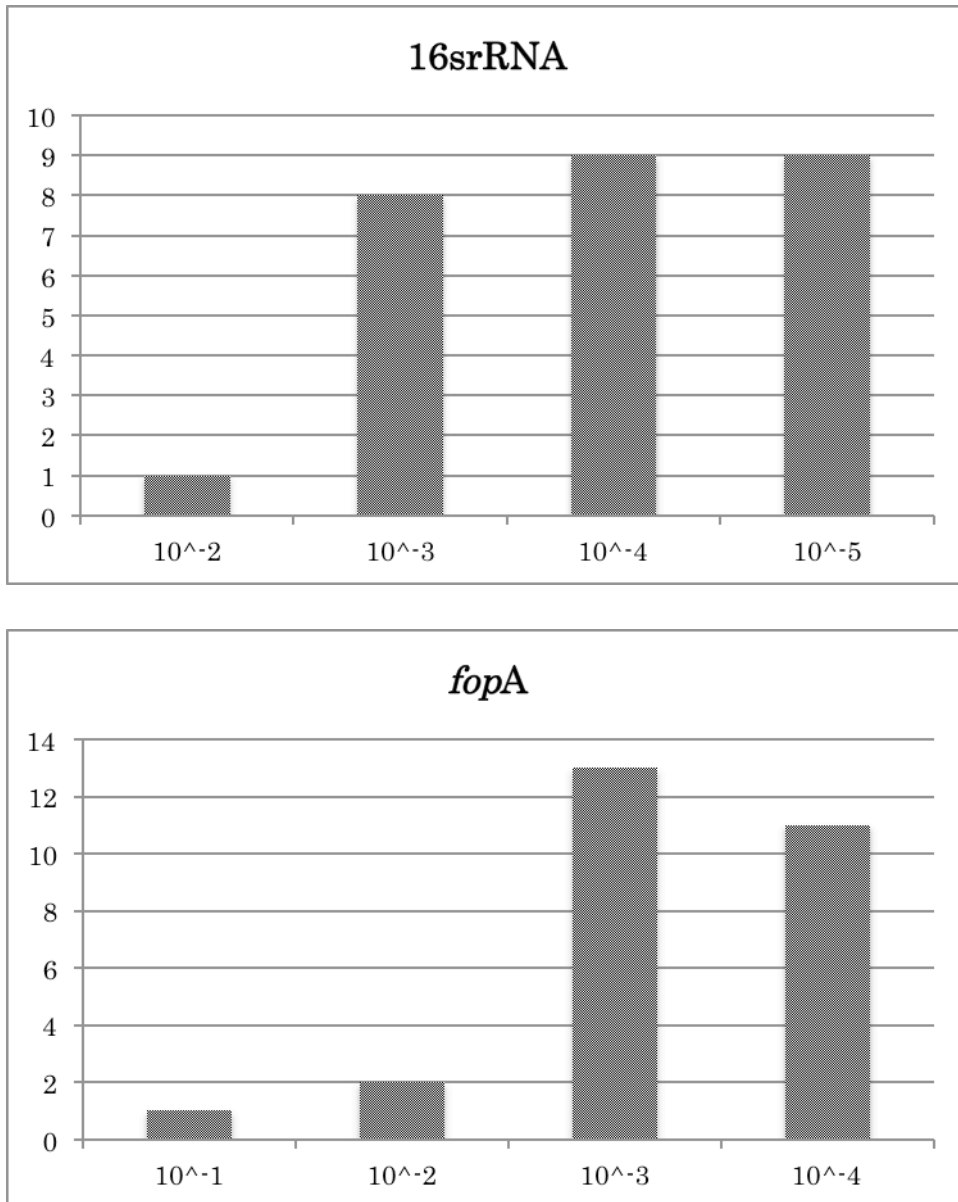


図3 野兔病菌対照遺伝子を用いたPCR（16srRNAおよび*fopA*領域）の感度比較（縦軸：機関数、横軸：核酸希釈倍率）  
両PCR検出系において機関間で感度の差が1,000倍あった。

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  
HIV関連感染症

研究分担者	松岡 佐織	国立感染症研究所	エイズ研究センター
研究協力者	俣野 哲朗	国立感染症研究所	エイズ研究センター
	吉村 和久	国立感染症研究所	エイズ研究センター
	立川 愛	国立感染症研究所	エイズ研究センター
	草川 茂	国立感染症研究所	エイズ研究センター

研究要旨 HIV診断技術の維持・向上に向け地方衛生研究所等とのネットワーク体制を構築を推進した。平成28年度は次年以降の病原体検出マニュアルの改訂を念頭に、地方衛生研究所におけるHIV診断体制の現状、課題を把握するための情報収集（アンケート調査）の企画、実施に協力した。

#### A. 研究目的

HIV感染症は感染症法で全数把握が義務付けられている5感染症である。日本国内でHIVが診断された場合は感染症サーベイランスシステム（NESID）を介して報告される。エイズ動向委員会を介して2006年以降は年間約1500件前後の新規HIV感染が報告されているが、このうち約3割はAIDS発症によりHIV感染が判明している。すなわち実際の日本国内のHIV感染者は報告数を上回り、早期診断に結び付いていないことが予想される。

早期診断においては感染リスクの頻度に応じてHIV感染者が自発的に検査を受けることが重要である。先に述べた通りAIDS発症前に検査を受け年間約1000件のHIV感染が診断されている。この内約500件が保健所等の公的検査機関の無力匿名検査で診断されていることから、HIV診断において地方衛生研究所が担う役割は極めて大きいと考えられる。同時に感染急性期の受検

者を正確に診断するために遺伝子診断など新たな診断技術の導入が求められている。

本研究では日本国内のHIV発生動向をより詳細に解析するための体制の整備、及び地方衛生研究所との共同により早期診断技術の導入・検査技術の変化に対応した病原体検出マニュアルの改訂の2点を柱とし、研究を推進する。

#### B. 研究方法

##### 1. 病原体検出マニュアルの改訂を念頭においた予備調査

公的検査機関におけるHIV診断体制の現状、課題を把握するため地方衛生研究所、中核市保健所等に対し、HIVスクリーニング検査の実施状況、確認検査実施状況、検査体制などに関する現状及び課題、精度管理に関してアンケート調査を行った。本調査は厚生労働研究補助金エイズ対策政策事業「HIV検査受検勧奨に関する研究」と共同で企画、実施した。

## 2. 日本国内の HIV 発生動向をより詳細に解析するための体制の整備

エイズ発生動向調査報告数を基に都道府県別に比較解析を行い、衛生微生物協議会、病原微生物検出情報（IASR）、及びエイズ発生動向年報等で広く結果を公表した。また技術提携など要望があった研究機関については内容に応じて個別に協議、連携を進めた。

### C. 研究結果

HIV 検査体制に関する調査、個別の追加聴取調査から HIV 診断体制（使用する診断薬、検体の保管状況）は自治体により異なり、特に早期診断に有用な抗原抗体同時検出スクリーニング診断薬、または遺伝子検査を導入している機関は全体の 2 割以下であり、早期診断の体制が十分に整備されていないことが示唆された。陽性率、検査数と早期診断体制の整備状況の関連に関しては解析中である。

HIV 報告数の解析から、日本国内の HIV 感染者は東京都、大阪府、愛知県、神奈川県など 3 大都市圏からの報告が多いものの、2014 年以降の人口 10 万人当たりの発生数は九州・四国地方の自治体が上位に入ること、該当の県では新規報告数に占める AIDS 発症者の割合が高いことを報告した。また発生動向、分子疫学解析など各自治体で独自の調査研究について相談があった研究機関に対し倫理面を含め研究体制の整備に協力した。

### D. 考察

日本国内の HIV 感染拡大防止にむけ早期診断に関する継続的な情報提供、技術・体制整備への支援が重要であることが示唆された。現状を踏まえ、来年度以降の病原体

検出マニュアルの改訂版に反映させる。

### E. 結論

HIV 診断技術の維持・向上に向けた地方衛生研究所等とのネットワーク体制を構築した。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

論文発表

1. 松岡佐織. 都道府県別 HIV 感染発生動向. 病原微生物検出情報（IASR）. 37:169, 2016

学会発表

- 1) Nii-Trebi N, Ishikawa K, Matsuoka S, Takeda S, Bonney E.Y, Ofori S.B., Yoshimura K., Ampofo W.K. and Matano T. Analysis of HLA genotypes in HIV-1-infected Ghanaians. ASLM 2016 Conference. December 3-6, 2016. Cape Town, South Africa.
- 2) Matsuoka S. HI-1 epidemiology in Ghana. 7<sup>th</sup> KOREA-JAPAN joint symposium on HIV/AIDS. January 14, 2017. Soul, South Korea.
- 3) 松岡佐織、長島真美、森治代、貞升健志. 日本国内の HIV 感染者数の推定理論に関する研究. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016 年 11 月、鹿児島.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

## 全国規模で流行する新型アデノウイルスとその対応

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  
研究協力者 花岡 希 国立感染症研究所 感染症疫学センター  
研究協力者 小長谷昌未 国立感染症研究所 感染症疫学センター  
研究協力者 木下 一美 国立感染症研究所 感染症疫学センター  
研究協力者 砂川 富正 国立感染症研究所 感染症疫学センター  
全国地方衛生研究所 アデノウイルス担当者

**研究要旨** アデノウイルスは種および型によって病原性が異なることが知られている。特にD種およびB種でその傾向が見られる。アデノウイルスのうち52型以降は全塩基配列の決定による遺伝型として規定された型であり、なかでも54型は日本のみで検出され、2015～2016年に流行性角結膜炎の流行を引き起こしている。組換え型の遺伝型も流行しており、我々は新規の79型を地方衛生研究所との共同研究で見出した。集積した知見をもとに流行性角結膜炎、咽頭結膜熱 検査診断マニュアルを改訂した。

### A. 研究目的

2015年に流行性角結膜炎（EKC）の病原体としてアデノウイルス54型が流行した。これまで2年間続けて特定の型が流行することはなく54型の日本における流行を監視することを目的とした。

さらに、その他の地方衛生研究所で同定が出来なかった株の同定をすること、型別同定法をより明確にすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. EKCの起因病原体

2013～2016年に全国の地方衛生研究所および我々自身によるEKC患者からの検出ウイルスの型および種を調べた。2017年3月現在、感染症発生動向調査のウイルス検出報告でEKCからアデノウイルスが検

出された803件について、種および型を解析した。

#### 2. 検査マニュアルの改訂・啓発活動

流行性角結膜炎 咽頭結膜熱 検査診断マニュアル平成24年（2012年）の第2版を掲載してから5年が経過し古くなったため、改訂を行い第3版とした。論文と学会発表等によりEKCに関する啓発活動を行った。全国の地方衛生研究所との連携により病原体の検出・同定を実施した。

#### 3. 種および型の同定法

現在、アデノウイルスに関して新型の報告が続いている。19a型とされていた型が64型とされたことに伴う地方衛生研究所での検査結果の解釈に関する混乱も見られ

る。その解決に向け、取り組んだ。

### C. 研究結果

#### 1. EKC の起因病原体

D 種 (58%)、B 種 : 3 型 (18%)、E 種 : 4 型 (11%) の順に検出が多かった。13% は、その他アデノウイルスと分類され、C 種 (2 型、5 型など) や組換え型の株で型別が困難であった株が含まれると考えられる。D 種は EKC を引き起こすことで知られる全ての型が検出され、54 型が 24% を占め、37、56、8、19 および 53 型の順に検出が多かった。(表 1)

#### 2. 検査マニュアルの改訂・啓発活動

2017 年 3 月にマニュアルの改訂をおこなって国立感染症研究所のホームページにアップした。前回の第二版からの修正箇所が分かるようにした。眼科の医師へのアデノウイルスによる EKC の流行に関する啓発も日本語論文や学会発表により行った。新型アデノウイルス 79 型を福岡県衛生研究所とともに発見・論文報告した。

#### 3. 種および型の同定法

アデノウイルスの種別・同定法に関して論文化を進めた。完成した段階で報告・マニュアルへの反映を進める。組換え型のアデノウイルスの同定は複数領域の塩基配列決定を要しコストと時間がかかるので、その解決は理論的には単純であるが実際には難しい課題である。

NESID への登録を近年に日本および周辺国で検出されている 48、49、55、57 および 64 型 (以前の 19a 型) について出来るように改変した(2017 年 2 月 9 日)。

全国の地区レファレンスセンターとの連絡を密にとり意見を伺った。

表 1. EKC 患者からの検出 adenovirus

	2013	2014	2015	2016
Ade 54	12	10	91	80
Ade 3	18	48	41	37
Ade 37	10	56	34	10
Ade 4	35	23	19	9
Ade 56	19	29	14	11
Ade 8	17	13	8	2
Ade 19	1	4	4	21
Ade 53	3	4	8	6
Other adeno	23	21	25	37

### D. 考察

アデノウイルス 54 型は日本でしか検出されていない新型アデノウイルスである。昨年の報告で 2015 年における全国流行を報告した。通常の流行は 1 年で収束することが多いが、2015 年～2016 年の 2 年間にわたり 54 型が流行し EKC の起因病原体であった。

EKC の起因病原体としては D 種の 54 型を含む 6 つの型 (54 型について 37、56、8、19、53 型の順に検出数が多かった) が検出された。B 種の 3 型、E 種の 4 型も EKC 患者からの報告が多かった。

アデノウイルスによる EKC は感染力が非常に強く、院内感染も引き起こしやすい。そのため例年、大学病院での院内感染に伴う病棟閉鎖が大きな問題になっている。54 型流行時にも多数の事例が報告され (パーソナルコミュニケーション)、流行の正確な探知と起因病原体の解析が重要と考えられた。EKC は数か月、数年に及ぶ角膜混濁などの後遺症を引き起こすことがあるあなどれない疾患であり、特異的な薬剤がないため感染予防が重要である。

19 型は、標準株は EKC を引き起こさない。制限酵素切断解析により 19a 型とされてきた型が EKC を引き起こす。近年に 19a 型が全塩基配列の系統樹解析により 64 型

とされた。そのため、NESID（病原体検出情報システム）で64型も64(19a)として報告できるように改変した。

## E. 結論

新型アデノウイルスによるEKCが続いており、新興感染症の様相を呈している。そのためのレファレンス活動をラボネットワークにより実施した。

## F. 健康危険情報

新型アデノウイルス(53型以降の型)が新興感染症として眼科領域で流行していることを眼科医師に周知した。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Yoshitomi H, Sera N, Gonzalez G, Hanaoka N, Fujimoto T. First isolation of a new type of human virus (genotype 79), species Human mastadenovirus B (B2) from sewage water in Japan. *J Med Virol.* 2016 Dec 12. doi: 10.1002/jmv.24749.
2. Hai le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis.*;22(4):687-90, 2016.
3. 花岡希、小長谷昌未、藤本嗣人. 日本におけるアデノウイルス病原体サーベイランスの実施状況-2014年-、感染症学雑誌. 90(4)、507~511. 2016
4. 花岡希、萬田和志、草刈栄治、伊藤晋、

藤本嗣人. 郵送検査残渣を用いた尿道炎起因微生物の探索. *性感染症学雑誌.* 27(1)、69~73、2016

5. 藤本嗣人、小林正明. 咽頭結膜熱に関する現状. *健康づくり.* 460 : 11, 2016.
6. 藤本嗣人、小林正明. 咽頭結膜熱の予防法・診断法. *健康づくり.* 461 : 11,2016
7. 藤本嗣人、内尾英一. 流行性角結膜炎とその対策. *健康づくり.* 462 : 11, 2016
8. 藤本嗣人. 新型アデノウイルスの流行. *日本の眼科.* 87(6) : 748~750 2016

### 学会発表

- 1 Hanaoka N. Adenovirus Infection as STI; adenoviral urethritis. 19th IUSTI Asia-Pacific Conference. Dec-2, 2016, Okayama city.
2. 藤本嗣人、小長谷昌未、花岡希. 日本におけるアデノウイルスサーベイランスの実施状況(2014年). 第53回日本眼感染症学会. 7月2日、2016年、東京.
3. 藤本嗣人. 日本におけるアデノウイルスレファレンス体制に関するアンケート結果からみえた課題とその解決のための取組. 第17回日本アデノウイルス研究会. 7月2日、2016年、東京.
4. 藤本嗣人. アデノウイルスレファレンスセンター報告. 衛生微生物技術協議会第37回研究会. 7月22日、2016年、広島市(学会でないが本研究に関連するため記載).
5. 花岡希、木下一美、砂川富正、大石和徳、藤本嗣人. 新型アデノウイルス53、54および56型の日本における検出状況および臨床診断(2000~2015年)の疫学解析. 第90回日本感染症学会総会・学術講演. 4月15日、2016年、仙台市.
6. 高橋健一郎、花岡希、田村まり子、志田

洋子、安田菜穂子、渡邊日出海、鈴木葉子、藤本嗣人、杉原茂孝. アデノウイルス咽頭扁桃炎の迅速検査による後方視的検討. 第90回日本感染症学会総会・学術講演. 4月16日、2016年、仙台市.

7. Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima. A variety of virus commonly causing diarrhea detected in untreated sewage. The 64<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society of Virology. October 25<sup>th</sup>, 2016, Sapporo city.

8. 中村晴奈、落合仁、花岡希、藤本嗣人、長尾みづほ、菅 秀、谷口清州、伊藤正寛. アデノウイルス感染における血清サイトカインの特徴. 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会. 11月19日、2016年、岡山市.

9. 金子明依、高梨さやか、Thongprachum Aksara、井上茉南、花岡希、藤本嗣人、沖津祥子、早川智、水口雅、牛島廣治. ロタウイルスワクチン株に起因する急性胃腸炎の実態調査. 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会. 11月20日、2016年、岡山市.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

流行性角結膜炎、咽頭結膜熱 検査、診断マニュアル(第3版)平成29年3月2日

# NESID病原体検出情報システムの検出病原体に アデノウイルスの下記の型が新規追加・変更されました。

**【新規】 Adenovirus 48, 49, 55, 57, 64(19a)**

**【変更】 Adenovirus 53/22→ Adenovirus 53**

## 入力画面

<input type="checkbox"/> 【アデノウイルス】		
<input type="checkbox"/> Adenovirus - not typed	<input type="checkbox"/> Adenovirus 1	<input type="checkbox"/> Adenovirus 2
<input type="checkbox"/> Adenovirus 3	<input type="checkbox"/> Adenovirus 4	<input type="checkbox"/> Adenovirus 5
<input type="checkbox"/> Adenovirus 6	<input type="checkbox"/> Adenovirus 7	<input type="checkbox"/> Adenovirus 8
<input type="checkbox"/> Adenovirus 9	<input type="checkbox"/> Adenovirus 10	<input type="checkbox"/> Adenovirus 11
<input type="checkbox"/> Adenovirus 12	<input type="checkbox"/> Adenovirus 13	<input type="checkbox"/> Adenovirus 14
<input type="checkbox"/> Adenovirus 15	<input type="checkbox"/> Adenovirus 16	<input type="checkbox"/> Adenovirus 17
<input type="checkbox"/> Adenovirus 18	<input type="checkbox"/> Adenovirus 19	<input type="checkbox"/> Adenovirus 20
<input type="checkbox"/> Adenovirus 21	<input type="checkbox"/> Adenovirus 22	<input type="checkbox"/> Adenovirus 23
<input type="checkbox"/> Adenovirus 24	<input type="checkbox"/> Adenovirus 25	<input type="checkbox"/> Adenovirus 26
<input type="checkbox"/> Adenovirus 27	<input type="checkbox"/> Adenovirus 28	<input type="checkbox"/> Adenovirus 29
<input type="checkbox"/> Adenovirus 30	<input type="checkbox"/> Adenovirus 31	<input type="checkbox"/> Adenovirus 32
<input type="checkbox"/> Adenovirus 33	<input type="checkbox"/> Adenovirus 34/35	<input type="checkbox"/> Adenovirus 34
<input type="checkbox"/> Adenovirus 35	<input type="checkbox"/> Adenovirus 36	<input type="checkbox"/> Adenovirus 37
<input type="checkbox"/> Adenovirus 38	<input type="checkbox"/> Adenovirus 39	<input type="checkbox"/> Adenovirus 40/41
<input type="checkbox"/> Adenovirus 40	<input type="checkbox"/> Adenovirus 41	<input type="checkbox"/> Adenovirus 42
<input type="checkbox"/> Adenovirus 43	<input type="checkbox"/> Adenovirus 44	<input type="checkbox"/> Adenovirus 45
<input type="checkbox"/> Adenovirus 46	<input type="checkbox"/> Adenovirus 47	<input type="checkbox"/> Adenovirus 48
<input type="checkbox"/> Adenovirus 49	<input type="checkbox"/> Adenovirus 53	<input type="checkbox"/> Adenovirus 54
<input type="checkbox"/> Adenovirus 55	<input type="checkbox"/> Adenovirus 56	<input type="checkbox"/> Adenovirus 57
<input type="checkbox"/> Adenovirus 64 (19a)	<input type="checkbox"/> Adenovirus その他	

Adenovirus 53/22  
から変更



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

薬剤耐性菌レファレンスセンターの活動および今後の展望

研究分担者 国立感染症研究所 細菌第2部 鈴木里和

研究協力者 国立感染症研究所 細菌第2部 松井真理

研究要旨 近年、地方衛生研究所がより積極的に薬剤耐性菌の試験を実施するようになった。現在の薬剤耐性菌の検査体制や国立感染症研究所が実施してきた薬剤耐性菌研修会に関するアンケート調査と、研修参加実績等について検討した結果、平成28年度の段階で、ほぼすべての都道府県に主要な薬剤耐性菌の検査が実施可能な地方衛生研究所が存在する状況となっていた。今後、より高い水準での薬剤耐性菌検査体制を構築・維持するためには初心者向けから最新の遺伝子解析技術を取り入れた研修まで、受講者の経験年数に応じた研修を継続的に実施するとともに、行政的な枠組みの整備が必要と思われた。

#### A. 研究目的

平成 23 (2011) 年 6 月に発出された医政局指導課課長通知において、地方衛生研究所（地研）においても院内感染起因微生物を検査できるよう、体制を充実強化することが明記された。この通知における院内感染の起因微生物が薬剤耐性菌を想定していたことや、平成 22 (2010) 年以降カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の世界的拡散が公衆衛生学的な問題ととらえられたこともあり、地研において薬剤耐性菌の検査体制整備の必要性への認識が急速に高まった。これらの動きを受け、平成 27 (2015) 年の衛生微生物協議会で薬剤耐性菌レファレンスセンターが設立された。

本研究では、薬剤耐性菌レファレンスセンター等の地研における薬剤耐性菌検査体制構築およびその強化に必要な研修および技術支援の在り方について検討した。

#### B. 研究方法

1. 平成 28 (2016) 年 6 月に薬剤耐性菌レファレンス事業の一環として行ったアンケート結果から、薬剤耐性菌検査の実施状況および今後必要な研修内容を検討した。アンケートは薬剤耐性菌レファレンスセンターの各ブロック担当者の協力のもと、全国の地方衛生研究所にメールで質問表を送付し行った。

2. 平成 28 (2016) 年 9 月に実施した薬剤耐性菌研修の参加者にアンケート調査を実施し、要望の高い研修内容を明らかにした。平成 27 年度の薬剤耐性菌研修は、「基本コース」として薬剤耐性菌の基本知識に関する講義と抗菌薬ディスクと阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検出方法の実習を行った。また、「応用コース」として、全ゲノム解読によるプラスミド解析手法の理論と実習を実施した。基本コースは 3 日間、応用コースは 2 日間の日程で

実施し、応用コースは平成 27 年度以前に基本コースの受講したことがある者のみを対象とした。

アンケートは、基本コース、応用コースそれぞれの下記に示す研修項目より有用であったものを選択してもらった。また、今後の要望等については自由記載とした。

応用コースについては、今後プラスミド解析を実施可能か、また可能な場合は開始時期についても調査をした。

＜基本コース 研修項目＞

- a. 薬剤耐性菌総論（講義）
- b. 抗菌薬の種類に（講義）
- c. 薬剤感受性試験結果の読み取り（感染症法届け出基準の確認・実習）
- d. ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼのスクリーニング（実習・判定）
- e. Etest（実習・判定）
- f. CarbaNP test（実習・判定）
- g. JANIS について（講義）
- h. タイピング解析（講義）
- i. *Clostridium difficile* 感染症（講義・見学）
- j. 確認テスト

＜応用コース 研修項目＞

- a. 次世代シーケンサーMiseq を用いたゲノム解析の一連の概要（講義）
- b. S1-PFGE について（講義）
- c. 演習 1・演習 2
- d. プラスミド解析用サンプル作製と送付・バンドの読み取りと切り出しサイズ確認（講義）
- e. S1-PFGE バンド切り出し（実習）

3. これまでの薬剤耐性菌研修の参加者および研修資料の希望施設を整理し、薬剤耐性菌研修および検査の普及状況を明らかにした。

### C. 研究結果

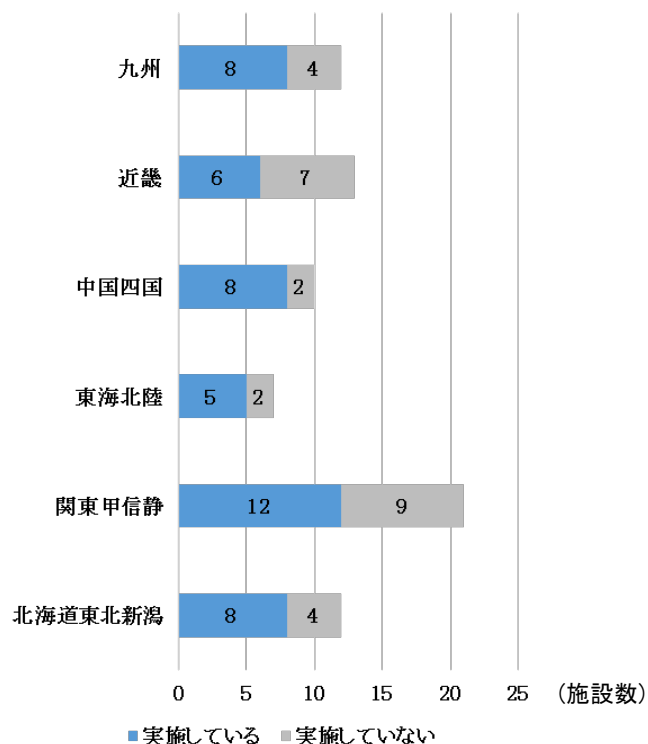
#### 1. 薬剤耐性菌レファレンス事業・検査実施状況アンケート結果

アンケートへの回答を依頼した 81 施設のうち 80 施設より回答を得られた。

##### a. 薬剤耐性菌検査実施状況

図 1 にブロック別の薬剤耐性菌検査実施状況を示す。解析を実施している施設の割合が最も高かったのは中国四国ブロックの 80%で、もっとも低かったのは関東甲信静ブロックの 57%であった。全体としては約 6 割（47 施設/80 施設、59%）が薬剤耐性菌検査を実施していた。

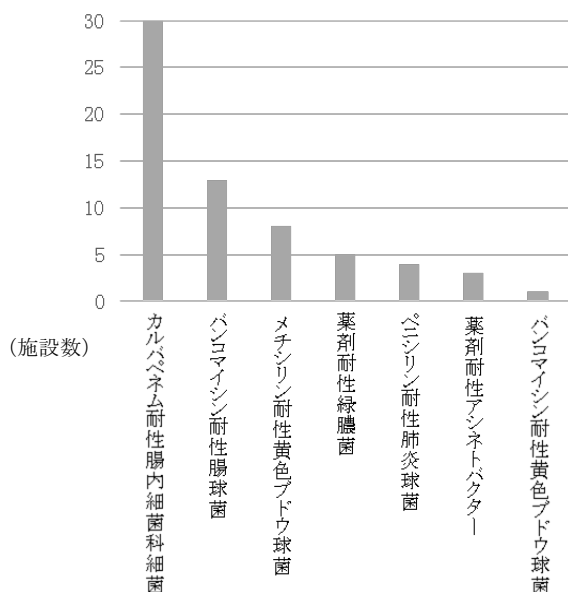
図 1 ブロック別 薬剤耐性菌検査実施状況 (N=80)



##### b. 薬剤耐性菌別 検査実施施設数

図 2 に感染症法に基づく発生動向調査の対象に含まれる薬剤耐性菌ごとの検査実施施設数を示す。最も多かったのがカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）で、次の

でバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）であった。その他に実施したことのある薬剤耐性菌としては基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌や、耐性菌ではあるものの感染症法における基準を満たさな



### c. 菌株の入手経路

地研の薬剤耐性菌入手経路として最も多かったものは法律等に基づいた検査としての行政検査の38件であった。ついで、地研が実施している自主調査研究（調査研究のための予算措置に基づいた検査、科研費等によるものを含む）が22件、医療機関等からの依頼検査12件であった。

### d. 実施可能な解析法

菌種の同定、薬剤感受性試験、表現型に基づくβ-ラクタマーゼ鑑別試験法について、実施可能な施設の割合を表1に示す。生化学性状に基づく菌種の同定は約6割の施設で、遺伝子解析に基づく菌種同定は3-4割

の施設で実施可能であった。近年、医療機関等において急速に普及している質量分析機（MALDI-TOF MS）による菌種同定は1施設のみ実施可能であった。

表1

実施可能と回答した施設数（割合）	
菌種同定方法	
生培地等の生化学検査	53(66%)
同定キット	50(63%)
16S rRNA	26(33%)
菌種特異的 PCR	30(38%)
薬剤感受性試験	
ディスク拡散法	58(73%)
寒天平板希釈法	3(4%)
微量液体希釈法	8(10%)
Etest	28(35%)
表現型によるβ-ラクタマーゼ鑑別試験	
ESBL	44(55%)
メタロ-β-ラクタマーゼ	44(55%)
AmpC β-ラクタマーゼ	40(50%)
KPC	23(29%)
CarbaNP	11(14%)

薬剤感受性試験は約8割の施設がディスク拡散法を実施可能である一方で、医療機関で主流となっている微量液体希釈法が実施可能な施設は約1割にとどまっていた。最小発育阻止濃度（MIC）を測定できるEtestは3.5割の施設が実施可能であった。

表現型によるβ-ラクタマーゼ鑑別試験は、ESBL、メタロ-β-ラクタマーゼ、AmpC β-ラクタマーゼといった国内で比較的遭遇する可能性の高いものについては約半数の施設が実施可能であった。

PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子の

検出は、主要なカルバペネマーゼである IMP 型、NDM 型、VIM 型、KPC 型、OXA-48 型の遺伝子についてはほぼ 6 割の施設が実施可能であった。カルバペネマーゼ遺伝子以外では、検出の多い ESBL 遺伝子も 6 割以上の施設で実施可能であった。一方、OXA-51 型や OXA-23 型など、分離数の少ないアシネトバクター属のカルバペネマーゼ遺伝子については実施できる施設は 4 割弱とやや少なかった。なお、次世代シーケンサーによる遺伝子解析は 7 施設が実施していた。

#### e. レファレンスセンター等への要望

レファレンスセンターの活動内容としては 6-7 割の施設が、感染研での継続的な研修の開催、検出法マニュアルの整備、陽性コントロールの配布を希望していた。このうち、最も多かったのが、陽性コントロール菌株の配布で 58 施設 (73%) の希望があった。

その他に、技術的な面では、菌種の同定に関する研修の希望が複数の施設よりあげられた。一方、行政的な面では、薬剤耐性菌対策や解析における地研の役割の明確化など行政的な枠組みの整備の要望があげられていた。

## 2. 平成 28 年度薬剤耐性菌研修参加者アンケート調査結果

平成 28 (2016) 年度は、従来の薬剤耐性菌研修の内容 (基本コース) に加えて、次世代シーケンサーを用いたプラスミド解析研修 (応用コース) を実施した。基本コースは定員約 20 名のところ参加希望が 36 名であったため、これまで参加実績のない施設を優先的に選び、最終的に 27 名が参加した (農林水産省からの 2 名を含む)。応用コースは 30 名が参加した。

基本コースの研修項目のうち、有用と思われた研修項目として最も多かったのが「ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼのスクリーニング (実習・判定)」(89%、24 名/27 名)、ついで「薬剤耐性菌総論 (講義)」(52%、14 名/27 名)、「抗菌薬の種類について (講義)」(41%、11 名/27 名)、タイピング解析 (講義) (33%、9 名/27 名) の順であった。

今後必要な研修内容として、各種の薬剤耐性遺伝子の解説やグラム陽性菌も含めた多種類の薬剤耐性菌に関する研修、タイピング解析の実習といった、より専門的な研修を求める意見があった一方で、初心者向けのより基本的な研修を求める声もあった。また、研修全体への意見としては、研修内容に比べ研修日数が短いとの意見が複数あげられた。

応用コースは参加者 30 名中 29 名よりアンケートの回答を得た。応用コースでは、研修の中心となるゲノム解析の概要に関する講義と、実際の解読データを用いた演習について 24 名 (83%) の参加者が特に有用と回答した。プラスミド解析の予定については、8 名 (28%) が年度内にサンプルを送付可能と回答、10 名 (34%) が時期は未定であるものの、サンプル送付の検討中であった。一方、6 名 (21%) は現時点ではプラスミド解析の実施は難しいとのことであった。

## 3. 薬剤耐性菌研修参加状況および研修資料と陽性コントロールの配布実績

平成 25 (2013) 年度以降、60 施設が少なくとも 1 名以上の担当者を薬剤耐性菌研修に派遣しており、これまで一度も研修受講歴の無い施設は 21 施設であった。

また、平成 27 (2015) 年度以降、研修資

料と陽性コントロールを希望施設に配布しており、平成 27(2015)年度、平成 28(2016)年度とも 64 施設に発送した。平成 27(2015)年度に希望しなかった 17 施設中、平成 28(2016)年度に希望した施設は 9 施設で、残りの 8 施設は両年度とも希望しなかった。さらにこの 8 施設のうち過去に研修受講歴もなかったのは 6 施設であった。

#### D. 考察

平成 23(2011)年 6 月の通知を契機に地研における薬剤耐性菌の検査体制は段階的に整備されつつあり、平成 28(2016)年度初めの時点で、地域による大きな偏りもなくすでに約 6 割の施設が薬剤耐性菌の検査を実施していた。

検査対象となった薬剤耐性菌は、感染症発生動向調査の届出症例数と関連していると考えられ、年間約 1500 例が届け出られている CRE が最も多く次いで 100 例弱の VRE であった。届出数の比でみると CRE の検査数が少ないが、これは、VRE がすでに 10 年以上前から全数対象であり、多くの地研が実施可能であったのに対し、CRE が比較的最近全数届出対象となっており、検査法が普及していないためと思われた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は分離数ではおそらく最も多い耐性菌であるが、定点把握疾患のため、地研での検査を実施される割合が少ないものと考えられた。

菌株の入手経路として最も多いのが行政検査であった。地研における薬剤耐性菌の検査体制を構築する際に問題となっていたのが、検査体制を維持するために必要な薬剤耐性菌の検査数が確保できないとことであつた。CRE 感染症が感染症法の全数届出対象疾患に追加されたことや、院内感染が疑われる際の届出が通知により義務付けら

れたことにより、行政検査として実施する件数は今後も増加すると思われる。一方、自主研究としても 22 件実施されていた。比較可能な過去のデータは無いものの、地研担当者にとって薬剤耐性菌が関心の高い研究主題になってきていることを反映していると思われる。

一般的な試験法(生化学性状による菌種の同定)は多くの施設で実施可能であり、これは、細菌性食中毒の検査などですでに実施経験があるためと思われた。一方で薬剤耐性菌に特徴的な  $\beta$ -ラクタマーゼ鑑別試験や耐性遺伝子検出については、過去の研修で取り上げた方法の実施可能率が高かった。研修で取り上げたものの、国内で遭遇する可能性の低い薬剤耐性菌(薬剤耐性アシネトバクターや、KPC 型カルバペネマーゼ産生菌)については実施可能率が低い傾向があつた。

平成 28 年度の研修は、従来に比べ定員枠を拡大したものの、それを超える応募があつた。過去に研修に参加したことのある施設であっても、人事異動により新たに派遣する必要が生じた場合や、複数の担当者に研修を受講させたい場合などがあり、今後も継続的に研修を開催する必要があると考えられた。研修の内容については、参加者の満足度は概して高かつたが、一方で、より高いレベルの研修を望む声から、より基本的な研修を希望する声まであり、今後は参加者の経験に応じた多様なコースの設定が必要と思われる。これは、人事異動により定期的に未経験者が薬剤耐性菌解析を担当する場合から、長期にわたり同一担当者が薬剤耐性菌解析を実施している場合まで、各地研の体制の多様性によると考えられる。

平成 28 年度は初めての試みとして、プラスミド解析の研修を開催した。プラスミド

を介した多菌種にわたるカルバペネム耐性菌の院内感染事例の報告もあり、また、その事例に関する注意喚起もなされたことから、地研担当者への関心も高く、多くの参加希望があった。薬剤耐性菌の解析において次世代シーケンス技術を用いた全ゲノム解析は今後ますますその重要性が高まると考えられる。全ゲノム解析の強みは、網羅的な耐性遺伝子の把握や、プラスミド解析が可能であり、かつそれらをデータベースに蓄積することで、地域ごとの高精度の分子疫学解析が可能となる点である。すでに一部の地研では全ゲノム解析に取り組んでおり、また、取り組む予定の地研も増えつつある。今後も応用コースの研修内容をより充実し、最新の遺伝子解析技術を活用することで、薬剤耐性菌ラボネットワークの構築が進められると思われる。

#### E. 結論

地研における薬剤耐性菌の検査体制は着実に整備されつつあり、対応可能な施設がほぼすべての都道府県に少なくとも1施設は存在する状況になったと思われる。今後、行政的な枠組みの整備と研修を継続的に実施することで、全国で高水準の薬剤耐性菌検査が実施可能な体制が確立できると思われる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 鈴木里和、松井真理、柴山恵吾. 地方衛生研究所を対象とした薬剤耐性菌研修の実施状況. 第28回日本臨床微生物

学会総会・学術集荷. 1月20-22日, 2017年, 長崎.

2. 綿引正則、松本裕子、鈴木匡弘、河原隆二、増田加奈子、福田千恵美、四宮博人、調恒明、鈴木里和、松井真理、柴山恵吾. 地方衛生研究所における薬剤耐性レファレンスセンターの発足とその役割と現状. 第28回日本臨床微生物学会総会・学術集荷. 1月20-22日, 2017年, 長崎.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし