

平成28-30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）

総括研究報告書

国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究

研究代表者： 宮崎 義継 （国立感染症研究所真菌部）
研究分担者： 調 恒明 （山口県環境保健センター）
大西 真 （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）
野崎 智義 （国立感染症研究所寄生動物部）
永宗 喜三郎 （国立感染症研究所寄生動物部）
田島 茂 （国立感染症研究所ウイルス第一部）
林 昌宏 （国立感染症研究所ウイルス第一部）
安藤 秀二 （国立感染症研究所ウイルス第一部）
吉田 弘 （国立感染症研究所ウイルス第二部）
駒瀬 勝啓 （国立感染症研究所ウイルス第三部）
森 嘉生 （国立感染症研究所ウイルス第三部）
蒲地 一成 （国立感染症研究所細菌第二部）
御手洗 聡 （結核予防会結核研究所抗酸菌部）
森川 茂 （国立感染症研究所獣医科学部）
松岡 佐織 （国立感染症研究所エイズ研究センター）
藤本 嗣人 （国立感染症研究所感染症疫学センター）
鈴木 里和 （国立感染症研究所薬剤耐性研究センター）
朝倉 宏 （国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部）

研究要旨 国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所は病原体検査に関して、各種の病原体情報を共同で発信しているが、両者は行政上、所属の違う組織であり連携する法的根拠が無いいため、共同作業の障壁になっている。危機的感染症発症の迅速な察知、正確な疫学情報の把握を目的として、検査方法の標準化、および疫学調査を通じて感染研と地衛研の連携体制を構築する研究を実施した。

A. 研究目的

薬剤耐性菌、新型インフルエンザ等の感染症アウトブレイク、ジカ熱・デング熱等の再興感染症など国民生活に脅威となる感染症は継続的に発生しており、令和元年ラグビーワールドカップ、令和2年開催予定の東京オリンピック・パラリンピック競技大会に際して、訪日外国人が増加し、感染症発生リスクの上昇が懸念される。また、平成28年度から自治体は病原体検査を実

施する法的な義務を負っている。

これら行政が関与する感染症対策の初動スキームは、先ず病原体を特定、判明した病原体のサーベイランスによる感染拡大状況の把握である。しかし、現行では国と自治体が統一的に上記スキームを可能とする公的システムが存在しないため、何らかの手段により必要な病原体検査を全国規模で実施可能とするラボネットワークを構築・維持することは国の感染症危

機管理上、必須である。

本研究は、感染研と全国の地衛研が相互に補完協力して、国内の感染症に対処することを目的として、ウイルス・細菌・真菌・寄生虫などあらゆる病原体を想定し、行政の関与が必要な感染症に備える研究を実施する。研究の性格上、公衆衛生学的に重要性が高まった感染症や病原体を優先対象としていく。

具体的には、以下の共同作業を通じてラボネットワーク機能を強化し、危機的感染症発生に際して、全国で病原体検査が実施可能な体制を構築・維持する。公衆衛生上問題となりうる病原体に関する診断・検査法の研究、診断・検査法共有を目的とした相互研修・情報収集やマニュアル作成、

病原体診断用機器や試薬等の整備、診断・検査法の精度管理基盤の構築。

感染症の診断は病原診断により行われるため、正確な病原診断を実施できることが感染症サーベイランスの基本となる。本研究の成果は、全国の行政機関における病原体検査能力の向上と維持につながり、わが国における精度の高い感染症発生動向調査結果として反映される。感染症の発生動向は施策に直接反映される。

また、インフルエンザ等のパンデミックにおいて流行状況を把握する必要が生じた場合、緊急に検査法を構築し共有する必要があるが、本研究成果の活用により、全国で統一された病原体検査が迅速かつ円滑に行われる。さらに、検査法の統一化により国と自治体との病原体情報共有が容易かつ正確となることで疫学の精度を高め、効果的なパンデミック対策に資する。

B. 研究方法

研究は研究代表者(宮崎)、研究分担者19名の計20名によって行われた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が総括する形で遂行された。研究は、各病原体レファレンスセンター活動、病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立を中心に行った。具体的には、以下の方法で研究を遂行した。

レファレンスセンター活動の内容:レファレンスセンター世話人と衛生微生物協議会レファレンス委員の間で、センター活動の必要性について検討した。カンピロバクターレファレンスセンターの体制を再構築した。

病原体マニュアルの改訂:感染研の病原体検出マニュアルのホームページに掲載されている各病原体検出マニュアルについて、3年間で11疾患の改訂および5疾患の追加を行った。68疾患のマニュアルのpdfファイル、それぞれの最終更新年月を調査し、ホームページに反映させた。

地方衛生研究所検査室の機能:感染研から平成29年以前に配布された病原体検査試料リストを作成した。感染症法に基づく病原体等検査に係る地衛研の信頼性確保部門を対象としたベースライン調査を実施し、信頼性確保のために必要な要因を分析、チェックリストを作成した。地衛研信頼性確保部門担当者向け研修ガイドラインを作成した。病原体検体数を調査した。

大腸菌:血清型別・遺伝子型別を行った。

レジオネラ:SBT法による遺伝子型別を行った。

レンサ球菌:T型別を行った。

寄生虫:マラリアに関しては、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提供し、検査診断法に関する技術研修と情報提供に努めた。ヒトのエキノコックス症を疑う症例が23件あり、ウエスタンブロットによる免疫学的検査および遺伝子検査を行った。旋毛虫症の平成28年12月の集団発生事例について、加熱処理前後の発症率を比較した。住肉孢子虫については、18S rDNAの多型領域を含む部分のシーケンス解析からシカ感染サルコシスティス特異的プライマーを設計し、定性PCR系を構築した。

アルボウイルス:ジカウイルス病実験室診断法および遺伝子型V型日本脳炎ウイ

ルスゲノム検出法を確立し、黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法を改良した。

リケッチア：紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアを標的とした Duplex Real time PCR を地衛研で検討し、リケッチア症実験室診断を体系化した。発疹チフス群リケッチア用 Probe を検討した。リケッチア症に関して施設間情報共有のための資料収集とリスト化を試みた。レファレンスセンター各所の問題点ならびに情報交換を行うとともに、技術研修などにより担当者の相互連携の構築を図った。

エンテロウイルス：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の配布を周知した。手足口病 EQA 用の RNA 試料送付のため、温度保管条件など安定性の検討を行った。12 地衛研に手足口病検査用 EQA 試料を配布し、PCR 法による EQA 試料の検出感度と同定に用いる塩基配列の施設間比較を行った。検査の質管理のためのワークショップを開催し、教材作成のために課題を整理することとした。病原体検査における共通の基盤技術として、DNA シークエンサーを用いる塩基配列解析について質評価指標の検討を行うこととした。塩基配列の質に与える要因を分析し、重点的に管理項目を明らかにするとともに、必要な技術管理研修のメソッド開発を行なった。

麻疹・風疹：毎年、麻疹・風疹レファレンスセンターを通じて、全国 74-76 地衛研にアンケートを実施し、麻疹風疹遺伝子検査の実施状況を調査した。平成 28 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。遺伝子検査に用いる参照 RNA を改良した。収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列を感染研が他の自治体へ提供することについて、検討を依頼し、その結果を踏まえて提供方法について検討を行った。

百日咳：百日咳菌 LAMP キットを評価し

た。パラ百日咳菌の VNTR 候補のスクリーニングを行い、MLVA 解析法を開発し、臨床分離株の MLVA 型別を行った。

結核：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り、参加施設への検体送付および検査成績の集計・分析を行った。

動物由来感染症：野兔病の血清学的検査および遺伝子検査、ブルセラ症の血清学的検査および遺伝子検査、炭疽菌の遺伝子検査を行うための検体を、参加を希望する地衛研に送付し、EQA を実施した。

HIV 関連感染症：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、地衛研、中核市保健所等の HIV 検査担当者に直接インタビューを行った。国内承認診断薬、世界的な検査手法の改変の流れについて、情報共有を行った。病原体検出マニュアルを改訂し、HIV 診断技術維持・向上のための技術支援を行った。

アデノウイルス：全国の地衛研との共同研究により、分離株の検出・解析を行った。

薬剤耐性菌：全国の地衛研で実施可能な薬剤耐性菌の検査項目を把握するため、平成 28 年に全国の地衛研に対し薬剤耐性菌検査の実施状況および必要な研修に関するアンケート調査を実施した。CRE の検査結果の報告方法を検討した。サーベイランスデータの精度およびデータの可用性を担保するため、登録した自治体に内容の確認もしくは修正を依頼した。平成 29 年の CRE 菌株の病原体サーベイランスデータについては、カルバペネマーゼ遺伝子の保有状況を中心に集計し公開した。

カンピロバクター：分離株について薬剤感受性試験および Penner 法による血清型別を行った。PCR 型別法の成績を評価した。検査法に関するアンケート調査を行った。

真菌：播種性クリプトコックス症の病原体検出マニュアルをあらたに作成し、ホームページに掲載した。

C. 研究結果

レファレンスセンター再構成：希少疾患あるいは国内の患者発生が近年みられな

いジフテリア・ボツリヌス・レファレンスセンター活動を一時休止し、感染研で検査能力を維持する体制を構築することとした。カンピロバクター・レファレンスセンターの継続を決定し新体制を構築した。

病原体マニュアルの改訂:病原体検出マニュアルの改訂を継続し、更新年月を感染研ウェブサイトに掲載した。

地方衛生研究所検査室の機能:

- 1.これまで、MERS、SFTS、麻疹等の新興・再興感染症に対し感染研から地衛研に検査試料が配布されてきたが、いつ、どのような参照品・試薬が配布されたかのリストを作成した。
- 2.信頼性確保部門に対するアンケート調査を行い、改正感染症法施行後の業務状況と研修への要望を把握することとした。
- 3.アンケート調査結果に基づき病原体検査担当者及び信頼性確保部門担当者と信頼性確保のために確認すべきチェックリストの内容を検討し、地衛研の信頼性確保に関するガイドラインを作成した。
- 4.インフルエンザの検体数を法改正前後で比較したところ、14都道府県で改正前の2倍以上に増加していた。その他の五類感染症の検体数が減少していた自治体は見られなかった。

大腸菌:「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掲載した。平成28-30年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全8,952株であった。参照株を配布し、問合せを受け付けた。O-/H-genotyping PCR法を大腸菌サーベイランスに導入した。下痢原性大腸菌EQAを実施した。

レジオネラ:3年間で207株が追加され平成29年3月末現在で、合計614株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。レジオネラ属菌外部精度サーベイを3年間継続して実施し、毎年70-71地衛研が参加した。地衛研および保健所におけるレジオネラ検査の実態を調査した。

レンサ球菌:平成27-29年に全国の衛生研究所に収集された咽頭炎患者分離株

数は、2693株であり、劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)患者からは397株であった。すべての株に対してT型別を行った。

寄生虫

- 1.マラリア:厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会には、全国13検疫所本所および3空港検疫所支所から、毎年20名前後の参加があった。マラリア種別の依頼検体は15例であり、10件が陽性であった。12件の診断に関する相談を受け入れ、14の地衛研・検疫所に診断のための陽性参照品を配布した。
- 2.エキノコックス症:ヒト疑診例は、北海道居住歴がある1例、外国人の2例が陽性であった。
- 3.旋毛虫症:加熱等の処理による発症率への影響を検討したところ、有意に異なり、処理による不活化の可能性が示された。
- 4.住肉胞子虫:タイプ特異的PCRプライマーを用いたPCR系を構築し、有症事例のシカ肉抽出DNAを調べた。

アルボウイルス

- 1.ジカウイルスゲノム検出法として、TaqMan法によるリアルタイムRT-PCR法を採用し、衛生微生物技術協議会等で情報公開した。抗体検査法については、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、実際に患者血清で抗体が検出できることを確認した。
- 2.黄熱ウイルスゲノム検出用TaqManプローブ・プライマーSet AからSet Cまでは米国CDCからの情報に従い作製し、増幅能を調べた。ダニ媒介性ウイルスゲノム検出のためのTaqManプローブ・プライマーは、過去の文献より引用した。抗ダニ媒介性ウイルスIgMおよびIgG ELISA法は、各々TestLine社製のキットを使用した。
- 3.遺伝子型V型日本脳炎ウイルスのゲノム検出法を確立した。広範なウエストナイルウイルスゲノム検出用セットWNV comを用いて、日本脳炎ウイルスゲノムに対する反応性を調べた結果、日本脳炎ウ

イルスゲノムに反応するが、その検出感度はウエストナイルウイルスゲノムに比べ顕著に低いことがわかった。

リケッチア：

1. 既報の conventional 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、ほぼ同等以上の検出率の結果が得られた。臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は、同等以上の検出結果を示し、供試した検出機器と試薬の組み合わせにおいても同等の結果を示した。さらに、感染細胞の希釈列を用いた比較においても同等の検出感度を示した。遺伝子検出系におけるスクリーニング法ならびに確定法、既存の血清診断法の流れを示し、各地衛研での検査の運用が始まった。あわせて、一部の地衛研で実施された評価段階よりさらに多数の臨床検体に適用することで課題の洗い出しを進め、各検出系の非特異等と考えられるケースや、表在菌との反応などいくつかの課題もスクリーニング法において報告された。

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

紅斑熱群リケッチアとつつが虫病のマルチプレックスの標的領域においては設計した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. 全国の地衛研の年報についてリケッチア関連情報を過去に遡って抽出した。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、他のダニ媒介性感染症との類症鑑別の問題点等の情報共有・交換を行い、臨床現場と直結する地衛研のリケッチア検査対応の情報更新の準備を行った。

エンテロウイルス：

エンテロウイルス検査の質評価を目的とした外部精度評価用試料について保管条件を設定した。エンテロウイルス EQA を実施し、送付条件検討等行うため、ネットワーク維持が重要であることを確認された。病原体検査のプロセス改善のため、

ヒューマンエラー予防に焦点を絞り、教材を作成した。研修はブレインストーミングによる少人数のグループワークが有用であることを確認できた。標準作業書等の技術文書作成支援にあたり、地衛研各支部で必要な文書類の整備促進を図った。塩基配列データ分析の結果、単独あるいは複数の要因が解析結果の信頼性に影響を与えていることが明らかになった。多施設間のデータ比較の結果、消耗品の質、方法の選択がヒューマンエラー予防のために重点管理すべき事項として明らかになった。これら共通因子を含む演習用課題を作成し、グループワークによる研修に用いて実証的検討を行った。

麻疹・風疹

1. 平成 28-30 年において毎年、地衛研における麻疹風疹遺伝子検査実施状況を調査した。平成 30 年に全国 76 の地衛研で実施した麻疹検査 6,251 症例のうち、328 症例が陽性であった。269 症例で遺伝子型解析が試みられ、228 症例で遺伝子型の決定ができた。風疹検査を実施した 6,110 症例のうち、1,859 症例（30.4%）が陽性であった。1,616 症例で遺伝子型解析が試みられ、1,339 症例（82.9%）で遺伝子型の決定ができた。

2. 麻疹の感染者が 50 名を超えるアウトブレイクが発生した（平成 28 年 8 月）。各地衛研のストック状況を緊急に調査し、感染研に保存してあったプライマー、標準品等を 24 の地衛研に配布した。

3. 麻疹風疹の新規参照 RNA をそれぞれ作製し、配布可能な状況が整えることができた。

4. 感染研に収集された麻疹ウイルス遺伝子配列情報について、1) 自治体内の使用に限って使用する、2) 一般公開する場合には遺伝子配列情報を提供した地衛研の承諾が必要であることを条件に、求めに応じてウイルス株の「遺伝子配列」、「検体採取日」、「検出自治体名」、「(依頼があれば)系統樹」を提供することとした。

百日咳：百日咳菌 LAMP キットを評価す

るために、PCR 産物および臨床分離株からのゲノム DNA を用いて検出感度を確認した。パラ百日咳菌の VNTR の安定性・多様度を調べ、4 箇所 VNTR の組み合わせから臨床分離株 53 株の MLVA 解析を行い、25 種類の遺伝子型に分類された。

結核：平成 28～30 年の三年間で、それぞれ 56 施設、57 施設、59 施設に対して EQA を実施した。年度毎に解析対象とする JATA (15)、HV、Supply らのローカスが増加していた。各施設で 3 株の EQA 用検体を JATA12 で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは平成 28-30 年でそれぞれ 48 施設 (87%)、40 施設 (70.2%)、55 施設 (93%) であった。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。正答率はそれぞれ、99.8%、97.6%、99.7% であった。

動物由来感染症：

1. 野兎病菌検査：血清学的検査では、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。遺伝子検査では、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、PCR の結果から想定される各疑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。

2. ブルセラ症検査：21 地衛研でブルセラ症の抗体検出および遺伝子検出の EQA を行った。抗体検出について、10 地衛研で判定方法に誤りが見られた。遺伝子検出については、検出限界の検討では、各地衛研間での感度の差が大きく認められた。

3. 炭疽菌遺伝子検査：37 地衛研で炭疽菌の *pag* 遺伝子、*cap* 遺伝子の遺伝子検出の EQA を行った。検出限界の濃度は施設間で差がみられた。

HIV 関連感染症：HIV 遺伝子検査法が未導入の施設には、コントロール検体、参照品の配布など個別に対応した。またすでに遺伝子検査導入済みの施設を含め、国際標準参照品を用いて HIV-RNA コピー数に関して精度管理調査を行った。平成

30 年度内に 14 施設の参加、および結果報告を受けている。

アデノウイルス

1. 熊本県保健環境科学研究所と共同研究で発見した株は、全塩基配列とその配列解析により HAdV-85 であることが明らかになり、新しい EKC 起因病原体として、今後も流行する恐れが十分に考えられた。地衛研と感染研の連名で結果を論文発表した。

2. 鳥根県保健環境科学研究所と共同で 57 型が平成 17 年には既に日本国内に侵入していたことを明らかにした。市販抗血清の中で 6 型に対する抗血清のみが HAdV-57 と反応することを明らかにし論文発表した。

3. 千葉県衛生研究所との共同研究で、ペントンベース、ヘキソン、ファイバー領域でそれぞれ HAdV-65、48 および 60 型と最も配列が近く P65H48F60 として論文報告していた株が HAdV-81 とされた。

4. 広島市衛生研究所との共同研究として、国内最初の HAdV-21 の検出であることを確認した。

5. 横浜市衛生研究所との共同研究で、HAdV-82 および HAdV-85 が全国規模で流行していることが示唆された。フルゲノムを決定した。

6. 福岡県衛生研究所との共同研究により HAdV-79 を発見し、地衛研と感染研の連名で結果を論文発表した。

薬剤耐性菌：依頼した 81 施設のうち 80 施設よりアンケートの回答を得、何らかの薬剤耐性菌検査を実施していたのは 47 施設 (59%) であった。実施対象の薬剤耐性菌は CRE が最も多く次いでバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) であった。薬剤耐性遺伝子 (カルバパネマーゼ遺伝子) の PCR 法による検出はほぼ 6 割の施設で実施可能であった。平成 29 年の 865 名由来 865 株の検査結果について集計解析を行い病原微生物情報 (IASR) 平成 30 年 9 月号で公表した。865 株のうち少なくとも一つのカルバパネマーゼ遺伝子が検出された株の割合は 239 株 (28%) であり、う

ち 227 株(95%)が IMP 型であった。平成 30 年 10 月より毎週 IDSC と AMR-RC との間でテレカンファレンスを 22 回実施し(平成 30 年度実績)サーベイランスの結果に加え、AMR-RC は地衛研、IDSC は保健所などから寄せられたアウトブレイク事例の相談などについても情報共有し、リスク評価後に自治体に対応を確認した事例もあった。

カンピロバクター

1.平成 29~30 年度に検出された *C. jejuni* 計 292 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、シプロフロキサシン耐性は 142 株(48.6%)、テトラサイクリン耐性は 94 株(32.2%)と高い頻度で認められた。エリスロマイシン耐性は 7 株(2.4%)であった。

2.平成 29 年度に収集された *C. jejuni* 計 183 株について Penner 血清型別試験を行ったところ、型別不能株は 129 株と約 70.5%を占めた。平成 30 年度には Penner 血清型別が可能となった計 142 株の構成について報告を求めた。

3.平成 29 年度に実施した Penner 血清型別試験において型別不能と判定された 120 株について、Penner-PCR 法による遺伝子型別を行ったところ、113 株については型別化が可能であった。平成 30 年度には、Penner 血清型別が可能であった計 142 株を対象に同遺伝子型別法を実施したところ、136 株が同一の型別結果を示し、一致率は 95.8%であった。

4.臨床検査については、最大で 50 機関から、食品検査については、最大 47 機関から有効回答が得られた。

真菌：臨床情報、検査方法、感染症法届出基準から構成される播種性クリプトコックス症の病原体検出マニュアルを作成した。PDF ファイルを感染研の病原体検出マニュアルホームページ上に公開した。

D. 考察

地方衛生研究所検査室の機能：

1.信頼性確保の在り方：感染症分野における検査機器、試薬、検査環境、手法及

び研修内容等は、食品や水道分野と異なり、加えて検査の質の管理に用いる標準試薬や参照品、手法も異なる。信頼性確保部門担当者に病原体等の検査経験がないこと及び人事異動による担当者の変更を考慮すると、研修内容は、検査技術の詳しい説明等ではなく、検査プロセスに存在する各種要因が検査結果の信頼性に与える影響を理解できるものにするのが重要である。

2.病原体サーベイランスの変化：法改正によりインフルエンザの検体数が省令で規定され、一部の自治体で検査数が増加し、他の病原体検査に影響があることが懸念されたが、インフルエンザの検査数が 2 倍以上増加した自治体においてもその他の五類感染症の検査数に大きな変化はなく、懸念された影響は少ないと思われた。

大腸菌：平成 29 年 2 月に更新した「EHEC 検査マニュアル」の記載内容について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)の配布等をさらに継続的に実施する必要がある。加えて、抗血清を用いた型別法と O-/H-genotyping PCR 法との整合性解析から重症例由来の新規 O 群および血清型(O:H 型)について明らかにする必要がある。

レジオネラ：レジオネラ症の感染源となりえる水系施設の衛生管理状態の把握のために不可欠なレジオネラ培養検査は、ほとんどの地衛研で実施されていた。外部精度管理への継続参加で、検査精度の向上が認められるが、検査結果が良好範囲とならない地衛研も一部存在した。また、迅速検査の導入度合いはさまざまであり、検査精度の担保と種々の検査法活用のためには、さらなる研修の実施等が必要と考えられた。*L. pneumophila* の遺伝子型とその生息環境には関連性が見られており、本菌の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。分離菌の遺伝子型別の結果を地衛研から保健所、医療機関に還元することで、感

染源の解明につながることを期待される。

レンサ球菌：T1型の株は、平成27年から平成28年にかけて、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ともに増加していたが、平成29年ともに減少しており、パラレルに推移している傾向にある。また、TB3264型も平成24年頃から急増していることや、平成28年から平成29年にかけて増加しており、パラレルに推移している。今後どの型が増加傾向にあるか傾向を注視する必要がある。

寄生虫：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講習を重ねる毎に増加し、改善は認められるが、所有しない検疫所も散見された。国内では、多包性エキノコックス症が主であるが、外国人4例、日本人5例、単包性エキノコックス症を疑われた。日本人の海外渡航一般化に加え、訪日外国人も増加の一方であることから、単包性エキノコックス症にも対応可能な体制を整備する必要がある。愛知県では新規に遺伝子検査を導入したところ、顕微鏡検査で陰性であった検体から3検体のエキノコックス陽性が発見された。複数の検査法を組み合わせることにより検出感度は向上している。35年ぶりの国内発生となった旋毛虫症では、原因種はTrichinella T9と分子同定された。本種は我が国固有種であるが、これまでの感染事例で分子同定が行われたことがない。野生獣肉を介した寄生虫性食中毒の発生予防に関する啓発活動に全国レベルで至急に取り組む必要がある。シカ肉寄生のサルコシスティスによる有症事例および食中毒事例におけるサルコシスティスの遺伝子解析により、有症あるいは食中毒事例と原因種との関係を調べた。事例に関与するシカのサルコシスティスに関しては、現状でタイプAやBが健康被害に関与することが明らかとなり、その汚染レベルも定量的にみて馬肉の食中毒レベルに相当するものであることが分かった。

野生の個体中にも食中毒レベルに近い汚染が認められることから、ジビエとして野生シカ肉を利用するにあたっては、加熱あるいは冷凍によるサルコシスティス不活化を徹底する必要がある。

アルボウイルス：

1. ジカウイルスを検出する方法を確立した。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。疑う場合は、必ず尿検体を依頼すべきである。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。抗体検査の場合、他のフラビウイルスとの交差反応が起こることを経験した。中和試験まで行っても判別が困難な場合もある。
2. 我々が新規にデザインしたセットは、より広範囲の黄熱ウイルスに対し適用可能であると思われる。ただし、今後黄熱疑い患者が発生した場合には、捕り逃しを防ぐために複数のセットを使用した方が良いと思われる。
3. ダニ媒介性脳炎ウイルスの遺伝子検出法、抗体検出法および中和試験法を確立し、検査体制を万全にすることができた。今後は、当検査法を各所で実践できるよう、病原体検出マニュアルの改訂および作成を進める必要がある。
4. 遺伝子型GVの日本脳炎ウイルスの確立を目指した。従来のGI、GIIIゲノム検出系ではGVゲノムは検出できないことが明らかとなった。新たなプライマー・プローブセット3NCRは、GI、GIIIだけでなく、GVゲノムも検出可能であった。ウエストナイルウイルスゲノム用のセットWNV comも共用することにより、同定することとした。
5. これまでに確立したアルボウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、情報提供した。また分与を希望した各地衛研に実験室検査用陽性対照を配布し、アルボウイルスに対する検査体制の整備を進めることができた。

リケッチア：日本紅斑熱、つつが虫病を中心とした国内のリケッチア症は、患

者数、発生地域ともに拡大している。臨床現場に近い、地衛研での実験室診断体制の維持・強化は重要性を増している。複数の地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、従来法と比較して遜色ない検出感度を示すなど十分な結果が得られ、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。さらに、評価した系は地衛研でのスクリーニングに強力なツールとなり、迅速な情報発信につながることを期待される。リケッチア症の実験室診断系の体系を再構築、実施と情報交換の中で、診断系の問題、課題の抽出を試み、非特異と考えられるケースなど報告された。報告された問題や課題を共有し、あくまでもスクリーニング系という意味で、簡便性のメリットが勝ると考える。診断系の評価や情報交換から、機能が全国の横糸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。

エンテロウイルス：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。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。このためにレファレンス活動を通じて、必要な標準品(細胞、抗血清)の配布、実技研修等、検査体制の維持、結果の質を担保するために継続する必要がある。

□ポリオウイルス封じ込め強化に伴い、感染性ウイルス保有施設が限定されることから、感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが、検査体制の維持には効果的である。

□横断的な基盤技術として塩基配列解析に焦点を当て、解析結果の質評価法の検討、塩基配列解析時に起こりうるヒューマンエラー予防に対する技術管理研修の実証的検討を行い、一定の効果を認めた。

地衛研では、経験豊富な職員の退職、異動などの事由により施設内 OJT の実施状況、施設毎で状況は大きく異なる。共通の基盤技術については、地域支部単位で様々な機会を活用しつつ、ヒューマンエラー予防に向けた技術管理研修等の取り組みを行うことが望まれる。

麻疹・風疹：検査実施状況を把握するため、リアルタイム PCR 法の利用状況を調査したところ、麻疹は 79.5%-85.4%で、風疹は 76.3%でリアルタイム PCR が使用されており、普及が進んでいるとみられる。平成 30 年は麻疹、風疹共に検査症例数の大幅な増大が確認されており、人的・経済的に十分な対応が可能かについての検討を要する。

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、検査診断体制の機能を維持する必要がある。

麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査用の参照 RNA の新規候補を作製した。麻疹についてはリアルタイム RT-PCR とコンベンショナル RT-PCR の両法に共通して使用でき、風疹については、もし参照 RNA のコンタミネーションが起きた場合でも即座に判別が付き、検査時間の短縮に繋がることが期待される。

麻疹ウイルスの遺伝子情報を自治体間で共有する方法の構築によって、より迅速に麻疹の疫学調査が可能になったと考えられる。現在、麻疹についてのみ運用を開始しているが、今後は風疹にも拡大していきたい。

百日咳：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。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。

本研究ではパラ百日咳菌に対する新規 MLVA 法を開発し、本法が高い解析能力を持つことを確認した。これまでパラ百日咳菌は遺伝的な多様性が低いことが報告されていたが、本研究により百日咳菌など他の病原細菌と同様に高い多様性を持つことが示された。また、家族内感染事例から分離された 2 株の国内臨床分離株が同じ遺伝子型を示したことから、アウトブレイクなどの分子疫学的調査に適用可能であると考えられた。今後、アウトブレイク調査のみならず、世界の流行株解析や系統進化の解析において有用な解析手段となることが期待できる。

結核：平成 28～30 年にかけて結核菌遺伝子型別解析法としての VNTR の外部精度評価を実施した。実施年によって複数のローカスで精度が上下しているものの、平均的には高い精度が保たれており、適切な検査精度が維持されているものと考えられた。

外部精度評価の実施に当たっては適切な検体を適切な数、適切に送付して適切な期間内で実施することが求められる。これまでの外部精度評価において常に安定して高精度な結果が得られるローカスと、不安定なローカスに関する知見が蓄積されてきており、特に安定しているローカスについては対象領域外とし、領域を少数に絞って検体数を増やした方が精度評価的には有効性が高いと思われる。今後は、全ての参加施設が同じ領域を検査し、相互比較が容易になるよう方法の変更を考えたい。外部精度評価は、精度保証活動の一部に過ぎない。本質的には内部精度管理の補完であり、内部精度活動が円滑に実施できるよう標準手順書の整備や標準物質・基準結核菌株の分与等を進める必要がある。

動物由来感染症：

1. 野兔病菌：EQA に際し回収した SOP と検査結果では、使用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。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。野兔病の血清診断は全参加機関で適正に実施可能と考えられた。PCR の感度が施設間で 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。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ため、記入欄を追加するなどして改善するべきである。

2. ブルセラ症：EQA を実施した。現状、抗体検査については、手技に関しては、1 地衛研を除き問題は無いと考えられたが、抗体価の判定方法に誤りが認められた地衛研が半数近くのにのぼり、フォローが必要である。遺伝子検出については、特に定性試験に関しては、問題なく実施されたと思われる。ただ、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間で異なっており、場合によっては、感度や特異性に影響を及ぼすことが推測された。行政検査対象項目に関しては、結果の共有を行うためにも、可能な限り使用機器やアガロースについて、地衛研間で統一を図ることが望ましいと考えられた。

3. 炭疽菌検査：各参加機関の間でみられた conventional PCR 検査系での検出限界の差は、使用したサーマルサイクラーの違い、低濃度 DNA での増幅に影響する要因（例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い）増幅産物の確認方法によるものと考えられる。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 10^6 CFU/ml 以上）が存在していることから考察すると、これらの検体からの検査においては、今回検証された検出限界の検査系で検出は可能であると考えられる。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、PCR 検査系としてはどの機関も十分な検出限界を有していると考えられる。

HIV 関連感染症：本研究の実施により、地衛研における HIV 遺伝子診断実施の増加に結び付いたと考えられる。遺伝子検査は感染急性期被検者に対する正確な診断につながることから、日本国内の早期診断率の改善、および新規感染者数の抑制に結びつくことが期待される。

アデノウイルス：日本において、新しい型として HAdV-79、HAdV-81 および HAdV-85 を新しい型として論文報告した。また、HAdV-57 が日本に侵入していることも明らかにした。

日本においては、HAdV-54 が EKC の大規模流行を平成 27～30 年に引き起こし 4 年連続で大規模な流行がみられた。このように単一の型が複数年にわたって全国流行をしたことは珍しく、HAdV-54 は流行しやすく、かつ重症の EKC を引き起こしやすい型であることが明らかになった。日本以外では HAdV-54 が検出されない状況だったが、ギリシャでの検出報告により世界的な流行が懸念される。地衛研と共同でネットワークを介した研究は有益であり、流行性角結膜炎の起因病原体としての新たな 4 種類の型を地衛研と連名で論文報告することができた。

薬剤耐性菌：地衛研における薬剤耐性菌の検査体制の充実強化は、平成 27 年の薬剤耐性菌レファレンスセンターの設置、平成 29 年の結核感染症課長通知に基づく CRE 病原体サーベイランスの開始によりおおむね達成したと考えられる。今後は、全数報告である患者報告とほぼ同数の病原体サーベイランス報告を志向することが、代表性担保のうえでも重要である。また、地衛研を対象とした薬剤耐性機序に関する基本的な知識の伝達・定着を目的とした感染研における継続的な研修の実施、および実際の菌株を用いた精度管理事業の実施による検査精度の評価・確認の機会の提供が

必要不可欠である。

カンピロバクター：*C. jejuni* の薬剤感受性については、これまでと同様にフルオロキノロン耐性率が高い状況にあること、テトラサイクリン耐性率は徐々に上昇傾向にあることが明らかとなった。国際的に AMR 対策が求められる状況の中、本病原体の成績に関する収集・報告体制を維持管理する意味において、本研究班の役割は今後も継続発展的に大きなものと位置付けられよう。遺伝子検査法については血清型別成績と高い一致率を認めたことから、同法は選択肢の一つとなる可能性が示唆されたと考えられる。検査法に関するアンケート調査においては、臨床・食品検体の別を問わず、Preston-mCCDA を用いた増菌培養が最も多く採用されており、この傾向は国際動向に合致したものと見える。原因食品が殆ど特定されていないわが国におけるカンピロバクター食中毒の発生動向を踏まえると、今後適切な検査方法について国内においても検証をふまえた改訂を検討する必要があると思われる。

真菌：感染症法に規定されて間もない播種性クリプトコックス症の病原体検出マニュアルを作成・公開した。地衛研等への真菌症検査法の普及に貢献できると考えられる

E . 結論

地方衛生研究所検査室の機能：

1. 過去に感染研から地衛研向けに配布された検査試薬のリストを作成し、厚生労働省健康局結核感染症課に提出し、今後の補充検討のための資料とした。
2. 平成 28 年の感染症法改正にともない、国が実施する信頼性確保部門の研修のための資料を作成した。
3. 病原体サーベイランスの変化について調査を実施し、その影響を評価した。

大腸菌・レジオネラ：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、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。本研究の具体的実施項目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、問題点、ニーズが明らかになることが期待できる。

レンサ球菌：咽頭炎由来株の T 型は、T1 型と 12 型の分離頻度が高かった。一方、劇症型溶連菌感染症患者由来株の T 型は T1 型が最も多かった。咽頭炎由来株の T1 型と劇症型溶連菌感染症患者由来株の T1、TB3264 型は、近年パラレルに推移している傾向にあった。

寄生虫：

マラリアの検査診断法については、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の機会を利用し、検疫所の職員に対し、定期的な技術研修や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、地衛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）に関する地衛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。

シカ肉のサルコシスティスはヒトの健康被害の原因となり得ることが有症事例また食中毒事例で示唆されている。その寄生率と寄生量のレベルの高さは、シカ肉のリスクを高める要因となっていると考える必要があり、ジビエ利用におけるサルコシスティスに関する衛生管理の徹底が必要である。

アルボウイルス：黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立した。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おり、また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。黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒

介性脳炎の実験室診断法を確立した。

日本脳炎ウイルス GV のゲノム検出系を確立したが、今後改善の余地がある。

リケッチア：リケッチア・レファレンスセンターは、患者数の増加とともに多様な鑑別対象疾患からも重要性がさらに増している。近年、国内で SFTS をはじめ複数のダニ媒介感染症が報告され、輸入症例でも Dengue 熱をはじめとする様々な節足動物媒介感染症が報告される。リケッチア症はこれらの疾患との鑑別も重要であり、現場での網羅的な診断体制の構築を実現し、特定の疾患にとらわれず適切かつ迅速な診断を行うための情報発信について、一層の検討が求められている。

エンテロウイルス：改正感染症法施行後、病原体検査には一定の信頼性が求められることが規定された。本研究ではエンテロウイルスレファレンスネットワークのみならず、既存の各種ネットワーク活動を cross-cutting に活用することにより、利用可能な各種リソース(人、物、金、情報)を集約することで、病原体検査の信頼性確保の取り組みに投入していくことが有用であることを示した。汎用性の有る基盤技術に関する技術管理研修は、持続性の観点から、比較的小規模な地域支部単位で取り組むことが望ましいと考えられるが、具体的な運営方法について今後とも検討していく必要がある。

麻疹・風疹：麻疹風疹の検査には、血清学的検査法、または病原体検査法のいずれか、あるいは両方が行われている。今後もこの検査診断体制、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。また、流行時の危機管理体制や自治体間での情報共有が可能な仕組みを今後も構築していく必要があると考えられる。

百日咳：百日咳感染症の新規体外診断薬である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の評価を行い、本検査キットが近年の流行株に対し高い検出感度を持つことを確認した。また、パラ百日咳菌の遺伝子型別法を開発し、本法が病原体サーベイランスやアウトブレイク解析において

有用な解析手段になることを確認した。

結核：結核菌遺伝子型別法としてのVNTRに関して外部精度評価を連続して実施した。施設あるいは使用している解析方法によって差異はあるものの、概ね適切な検査精度が維持されているものと考えられた。今後は検体の性状、数、対象領域数などに改良を加え、さらに評価後の改善の有無をフォローするところまで内容を拡大するべきと思われた。

動物由来感染症：野兔病、ブルセラ症、炭疽のEQAの結果、各地衛研においては、各病原体で必要な血清学的検査および遺伝子検査のいずれも実施可能であり、検査成績についても問題なく評価可能であることが示された。

HIV 関連感染症：本研究期間（3カ年）で、現状のHIV検査診断体制に即し病原体検査マニュアルに改訂し、重点的に改訂した点について講義、技術支援を行った。

アデノウイルス：アデノウイルスの新しい型が流行していることを地衛研とともに明らかにすることができた。このようなネットワークは世界でもまれであり、その有効な活用が公衆衛生的に役立つものであることを行政的・学術的に示すことができた。

薬剤耐性菌：地衛研における基本的な薬剤耐性菌検査体制が整備され、感染症発生動向調査にもとづくCRE病原体サーベイランスが開始され、その集計結果が公表され還元されるとともに、個々の報告についてもリスク評価を行い対策に活用した。今後はさらなるサーベイランスデータの有効活用と精度管理体制の向上に向け、枠組みの整備と運用方法の検討が必要と思われる。

カンピロバクター：*C. jejuni* はシプロフロキサシン、ナリジクス酸、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高く、これらの動向を引き続きモニタリングする必要性がある。分離菌株の型別・分類法として、以前より国内で汎用されるPenner血清型別法の型別率低下は顕著であり、

Penner-PCR法によりこれらの多くを補える可能性が示唆された。一方で国際的には血清型別法そのものが低い識別能であるため、モニタリングやサーベイランスへの適用は望ましくないとする考え方が主流となっており、今後、国内での分離株の特性を探知するための手法については慎重に検討を進める必要がある。

検査法に関するアンケート調査を通じ、今後平準化を図るべき項目について抽出を行うことができた。これらの課題解決に向けて、レファレンス活動の更なる連携が求められよう。

真菌：「播種性クリプトコックス症」の病原体検出マニュアルを作成し、感染研ホームページ上に反映させた。

F．健康危険情報

リケッチア：レファレンスセンターを中心に、リケッチア症に関する情報発信を試みるも、死亡例が発生している。迅速な治療につながる情報発信の難しさが示されている。

結核：結核菌株の取扱いについては、感染症法の基準に適合した実験室内で実施した。

アデノウイルス：アデノウイルス54型のアウトブレイクにより非常に多くの流行性角結膜炎患者が発生した。視力低下などの後遺症も報告された。病原微生物検出情報(IASR)等で注意を呼びかけた。

寄生虫

「愛知県知多半島の犬におけるエキノコックス(多包条虫)感染事例について(情報提供)」。平成30年3月28日・厚生労働省健康局結核感染症課・事務連絡。

G．研究発表

各分担研究報告書を参照。

H．知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書を参照。