

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

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

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎義継

(国立感染症研究所)

平成 30 (2018) 年 5 月

目 次

- I. 総括研究報告書（平成 29 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・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
研究代表者：宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部）

- II. 分担研究報告書
 1. 病原体検出マニュアルの改訂・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 1
研究代表者：宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部）

 2. 地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集・・・・・・・・ 1 3
研究分担者：調 恒明（山口県環境保健センター）

 3. 大腸菌・レジオネラ・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 6
研究分担者：前川 純子（国立感染症研究所 細菌第一部）

 4. 溶血性レンサ球菌レファレンスセンターの活動・・・・・・・・ 2 1
研究分担者：池辺忠義（国立感染症研究所 細菌第一部）

 5. 寄生虫症に関するサーベイランス強化に関する研究・・・・・・・・ 2 5
研究分担者：永宗 喜三郎（国立感染症研究所 寄生動物部）

 6. アルボウイルス検査法の開発・改良と情報提供・・・・・・・・ 3 0
研究分担者：田島 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

 7. リケッチア・レファレンスセンターの 2017 年度活動・・・・・・・・ 3 8
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

 8. エンテロウイルスのレファレンスに関する研究・・・・・・・・ 4 2
研究分担者：吉田 弘（国立感染症研究所 ウイルス第二部）

9.	麻疹・風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	5 2
	研究分担者：森 嘉生（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
10.	パラ百日咳菌の遺伝子型別法の開発	5 8
	研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所 細菌第二部）	
11.	結核菌 VNTR 解析の外部精度評価	6 2
	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）	
12.	動物由来感染症	6 9
	研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）	
13.	HIV 関連感染症	7 5
	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）	
14.	平成 29 年度アデノウイルスレファレンス活動と新たな流行性角結膜炎起 因ウイルス	7 7
	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）	
15.	薬剤耐性菌レファレンスセンターおよび報告体制の整備	8 1
	研究分担者：鈴木 里和（国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	9 0

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)
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)
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)
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)
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)

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の明確な法的根拠は無く、共同作業の障壁になっている。危機的感染症発生の迅速な察知、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・デング熱等の新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いる。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。

これら危機的感染症の発生に対する初動スキームは、先ず病原体を特定する、判明した病原体のサーベイランスにより感染拡大状況を把握することである。しかし、現行では国全体として統一的に初動スキーム

を可能とする法的に整備されたシステムが存在しない。

そこで、危機発生時に直ちに病原体診断を全国規模で実施可能とするラボネットワークを構築・維持することは危機管理上必須である。

本研究は、感染研と全国の地方衛生研究所(地衛研)が相互に補完協力して、国内の感染症に対応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、以下のような共同作業を通じてラボネットワーク機能を強化し、危機的感染症発生に際して、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・検査法共有のための相互研修やマニュアル作成、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。

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診断能力の向上と維持につながり、わが国における精度の高い感染症発生動向調査結果として反映される。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性が生じた場合、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14名の計15名によって行われた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が総括する形で遂行された。研究は、1)各病原体レファレンスセンター活動、2)病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立を中心に行った。具体的には、以下の方法で研究を遂行した。

1)各病原体レファレンスセンター活動

レファレンスセンター活動の内容: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アップデート:病原体検出マニュアルの改訂年月をホームページ上に掲載周知した。

地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集:標準作業書が必要と思われる感染症について調査した。

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、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7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2016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。

リケッチア:紅斑熱群リケッチアとつつが虫病を標的としたDuplex Real time PCRを地衛研で検討した。リケッチア症に関して地衛研の年報等から情報を収集した。

エンテロウイルス:市販RNAを用いてレファレンスセンターと外部精度管理を行った。検査の質改善のための問題分析手法を検討した。

麻疹・風疹:地衛研における麻疹・風疹ウイルス遺伝子検査の実施状況を調査した。

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：ブルセラ症の血清学的検査および遺伝子検査を行うための検体を参加希望地衛研に送付し、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方衛生研究所、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。

アデノウイルス：全国の地方衛生研究所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：薬剤耐性菌検査結果報告体制の整備のために NESID システムの確認を行い、CRE 検査結果の入力形式を検討した。地研より受けた薬剤耐性菌の試験検査結果の問い合わせ内容およびその結果等を整理し、それらをデータベース化するためのテンプレートを検討した。

2) 病原体の診断法・疫学解析法の確立および評価

麻疹・風疹：遺伝子検査に用いる参照 RNA を改良した。

アルボウイルス：黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqManリアルタイム PCR 法およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立した。

リケッチア：発疹チフス群リケッチア用の Probe について検討を行った。

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

寄生虫：18SrDNA の多型領域を含む部分のシーケンズ解析からシカ感染サルコシステイス特異的プライマーを設計し、定性 PCR 系を構築した

C. 研究結果

レファレンスセンター活動の内容：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アップデート：病原体検出マニュアルのアップデートを継続し、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・病原体マニュアル編集：標準作業書が必要であるが病原体検出マニュアルがない感染症を指摘した。

大腸菌：2017年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3,362 株であった。コントロール株を配布し、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。

レジオネラ：今年度 76 株が追加され 2017年3月末現在で、合計 528 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実施し、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：2016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、837 株であり、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) の報告が 143 症例あった。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では、全国 13 検疫所本所および 3 空港検疫所支所から、検疫所職員が合計 17 名参加した。東京国際空港保健衛生管理運営協議会にて 38 名との情報交換により、連携を強化した。マラリア種別の依頼検体は 2 例であり、3 件の診断に関する相談を受入れ、5 箇所地方衛生研究所に診断のための陽性コントロ

ールを配布した。

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、有意に異なった。

4.住肉孢子虫:北海道産エゾシカおよび滋賀県産のシカより形態的に4つのサルコシストのタイプを検出した。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.黄熱病の遺伝子検査法の確立:黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan 用プライマー・プローブセットを作製し、リアルタイム PCR 法を確立した。

2.ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立:ダニ媒介性脳炎ウイルスの TaqMan リアルタイム RT-PCR 法を確立した。ダニ媒介性ウイルスに対する抗体検出系を確立した。

リケッチア:臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は、既報の conventional nested PCR 報と同等以上の検出結果を示したが、一部のリケッチアの遺伝子を検出できない症例も認められた。全国情報の共有やブロック研修会に協力した。

エンテロウイルス:

1.レファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施:検出感度を比較したところ最低限の検出感度は担保されていたが、施設間で最大 100 倍の差があることが判明した。

2. 検査の質改善のための問題解決手法の検討:グループワーク開催のために事前ワークショップを開催し、教材開発を行った。グループワークによる問題分析と対策立案を目的とした研修パッケージを検討した。

麻疹・風疹

1. 地方衛生研究所の麻疹および風疹ウイ

ルス遺伝子検査実施状況:2017年に麻疹の検査を行った地衛研は69カ所、検査された症例数は1516症例であった。リアルタイム PCR 法を検査に使用した地衛研は51カ所であった。1206症例の検査にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査陽性は213症例であった。同様に風疹の検査を行った地衛研は52カ所、検査された症例数は706症例であった。リアルタイム PCR 法を検査に使用した地衛研は41カ所であった。539症例にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査陽性は12症例であった。

2. 麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査に用いる参照 RNA の改良:麻疹ウイルス RT-PCR 用のプライマー、プローブの認識部位と重ならないように外来遺伝子を参照 RNA に挿入した。風疹ウイルス遺伝子型決定領域にプライマー認識部位と重ならないように外来遺伝子を挿入するように合成したプラスミド DNA から RNA を転写合成した。

百日咳:パラ百日咳菌の VNTR の安定性・多様度を調べた。4箇所の VNTR の組み合わせから臨床分離株 34 株の MLVA 解析を行った。

結核

1. IQC 用検体の提供と EQA の実施:全国の 79 施設を対象に、IQC 用検体の配布及び EQA 参加についての希望を調査した(2017年11月)。58施設より参加希望があり、57施設から分析結果が送付された。

2. 各施設における VNTR 分析に利用しているローカセット:各施設の分析対象ローカセットを調査し、JATA 15、HV、Supply らのローサイがそれぞれ 46、41、28 であり、2016年度と比べて増加傾向であった。

3. EQA 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 EQA 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 40 施設 (70.2%) であった。各分析法におけるローカセットの正答率、各ローカスの正答率を評価した。

4. PCR 産物のサイズ測定方法: 2016 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 (59.6%)。

動物由来感染症: 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、いわゆる定性試験は問題なく実施されていたが、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

HIV 関連感染症: HIV 検査体制に関する個別の聴取調査から、遺伝子検査等の新たな診断アルゴリズムを導入する場合、各自治体の年間 HIV 陽性者数に応じて費用対効果の観点から有効となる手法、現実的に導入可能な検査法は異なることが明らかとなった。更に聞きとり調査から、実際に日本国内では HIV-2 の流行は確認されていないものの検査現場では HIV-1/HIV-2 の鑑別診断を要する検体が年間数例あることから、検査の進め方に関する情報を必要としている実態が明らかとなった。

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 2005 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、ペンタベース、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で、これまで日本で最初の HAdV-21 の検出であることを確認した。

薬剤耐性菌

1. 検査項目の入力形式:

誤入力を防ぐため、エクセルファイルを用いてプルダウン形式で検査結果を選択すると、上記入力形式が作成させるツールを作成し、入力に際しこのエクセルツールからコピーペストをしてもらうこととした。CRE については菌種名も重要な情報であるため、菌種名の登録についても統一した。これらの内容を整理した入力手順書(別添)を各ブロックのレファレンスセンターを通じて地研に配布し、平成 29 年に実施した検査について入力を依頼した。

2. 試験検査の精度管理手法の検討

平成 29 年度の問合せ件数は 40 件を超えた。問合せ内容としては、非典型的なディスク法の結果の解釈に関するものが多かった。ディスク法の画像は、カルバペネム耐性度のほか、コロニーの性状、阻止円の詳細(二重阻止円、阻止円内小コロニー、辺縁の形状)など多くの情報が得られ、試験結果の解釈の契機となるものが多かった。

D. 考察

大腸菌: 昨年度更新した「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

析をさらに詳細に実施する必要がある。

レジオネラ：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。98%の地衛研で環境水のレジオネラ検査が行われており、地衛研の重要性が明らかとなった。自治体によりレジオネラ検査の実施状況に差があることが判明した。外部精度管理で検査結果が良好範囲とならない地衛研も一部存在し、研修等の実施が必要と考えられた。

レンサ球菌：T1 型の株は、2015 年から2016 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おり、パラレルに推移している傾向にある。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。エキノコックス症については、種を問わず対応可能な体制の整備は重要である。エキノコックスの生物学的特性として糞便中の虫体由来物は間欠的に出現することから、遺伝子検査であっても偽陰性は避けがたいが、複数の検査法を組み合わせたことにより監視体制が一層強化されたと考えられる。熊肉の喫食による旋毛虫症に関しては、再加熱による旋毛虫の不活化があったと考えられた。しかしながら再加熱品には冷凍処理も行われているため単独の影響を評価は難しい。実験室内維持されている株を用いて検討を進める必要がある。住肉胞子虫に関しては、今後、種あるいは遺伝子型別のサルコシスティスの定量解析を行い、これらと食中毒発症との数量的関係を明らかにする必要がある。

アルボウイルス：近年、黄熱の流行がアフリカや南米でたびたび発生している。日本での流行は考えにくいですが、渡航者による輸入感染症例が発生する可能性はおおいにある。そのためにも、黄熱の実験室診断法を再確認・再評価しておく必要がある。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。2016 年に20 年以上ぶりに国内で患者が確認されたダニ媒介性脳炎であるが、北海道にダニ媒介性脳炎ウイルスが蔓延しているのは確かであり、今後患者が増加する可能性がある。今回我々は、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、今回示してきた検査法を各地方衛生研究所や保健所、検疫所でも実践できるようにするため、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。

リケッチア：より詳細な評価を行えた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 は、既存の PCR と遜色ない検出感度を示した。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。しかしながら、遺伝子検出系の改善・構築により多くの地衛研での検査実施の可能性が広がるものの、PCR の検体としてもっとも有効な刺し口が見つからないなど一部の症例ではなお血清診断に頼らざるを得ない症例も存在する。これらも含め、リケッチア関連疾患実験室診断の体系的な構築はなおも改善の余地があり、今後他の関連疾患も含めた検査体制作りと情報の整理、各機関の密な連携が必要と考えられる。

エンテロウイルス

1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施:エンテロウイルス検査は各施設で用いる試薬等が異なるため、施設間で一律の比較は難しく、あらかじめウイルス力価と対応する検出感度の範囲を設定し、基準値内に収まるかどうかを確認すること、そして施設内では、自施設の検査系の妥当性を確認するためインハウスコントロールで同様に検出感度の幅を設定することが適当である。EQA 実施前に送付試料の質の確認検査ができた。この様に多施設間の技術的な課題を検討するため、ネットワークの維持は重要である。

2. 検査の質改善のための問題解決手法の検討:感染症法改正に伴い、これまで明示されていなかった検体検査が法定化されたことにより、検査の質を担保する必要がある。人材教育が重視されるが、多くの自治体では、ベテラン層が退官しており、施設内で on the job で取り組むべき指導層が大幅に減少している現状がある。問題解決能力開発を目的としたグループワーク研修を試みた。主にウイルス検査上の事例について、交差汚染、PCR 検査、シーケンスなどの課題を収集し、PDCA サイクルに合わせて過去の事例を整理した。次年度以降、さらに多くの事例収集をしていく方法を検討する。

麻疹・風疹: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。麻疹は検査された疑い 1515 症例のうち検査陽性だったのは 14%だったのに対し、風疹疑い症例の場合には 706 症例のうち、2%程度であった。これは風疹を疑ってというよりは、麻疹疑い症例として検査に提出されたものを麻疹検査とあわせて実施したため、陽性率が低かったものと考えられる。また、感染症発生動向調査による 2017 年の麻疹

患者報告数は 189 例であり、今回の調査によるとそのうち約 88%で遺伝子型解析が成功したことが示唆された。一方、風疹患者報告数は 93 例であるが、約 10%でしか遺伝子型の解析が完了していないことが示唆された。平成 30 年 1 月より風疹も地方衛生研究所における遺伝子検査が全例に求められるようになったことから、今後はこれらの検査状況に大きな変化が生じることが予想される。リアルタイム PCR 法の利用状況を調査した。2017 年では地衛研で実施された麻疹疑い 1515 症例の検査のうち 80%、風疹疑い 706 症例のうち 76%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。

百日咳:本研究ではパラ百日咳菌の分子疫学として新規 MLVA 法の開発を行なった。ゲノム情報から選択した 4 箇所の VNTR は in vitro で安定であるとともに、臨床分離株において多様性が認められた。これらの VNTR を用いた MLVA 解析では臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類され、分離年と分離地域で疫学的な関連性が認められた。パラ百日咳菌は百日咳菌と同様な咳症状を引き起こすが、これまでタイピング法が開発されていなかったため流行株に関する知見は得られていない。今回開発を行なった MLVA 法では臨床分離株に疫学的な関連性が認められたことから、本法はパラ百日咳菌の新規型別法として有用と判断された。ただし、解析株が 34 株と少なかったため、今後解析株数を増やす必要がある。パキスタンではパラ百日咳菌の分離症例が多いことから、現在同国の共同研究者に本菌の入手を依頼しているところである。

結核:2017 年度は各施設における IQC の実施を支援するとともに、2014~2016 年度に引き続いて 4 回目となる EQA を実施した。

各施設における分析精度を改善するために、2017年度はVNTRプロファイル既知の菌株DNAをIQC用検体として配布した。IQC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。本年度を含め4回の外部精度評価を実施したことにより、各地方衛生研究所においてVNTR分析系が導入されつつあることが確認された。結核分子疫学調査では、VNTR情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのためにはVNTR分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられた。

動物由来感染症：ブルセラ症(4類感染症)のEQAを実施した。現状、抗体検査については、手技については、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認められ、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まちまちで、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。

HIV関連感染症：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。また実態に即した病原体検査マニュアルの改定に向けて、遺伝子診断においては複数の手法を提示し導入のハードルを下げるということが重要であることが示唆された。以上の点を踏まえ、より実態

に即した病原体検出マニュアルの作成にむけては遺伝子検査、HIV-2の鑑別診断の2項目を重点的に改変することが重要であることが示唆された。

アデノウイルス：日本において、新しい型としてHAdV-81およびHAdV-85を新しい型として論文報告した。日本においては、HAdV-54がEKCの大規模流行を2015～2016年に引き起こし2018年3月現在も、EKCが過去5年と比較して2SDを超えて報告されている。地方衛生研究所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型としてHAdV-85を検出できた。HAdV-85は、熊本県で11名から検出され、その他の都道府県からも検出され始めており、今後の流行が懸念される。鳥根県のEV-D57は、呼吸器感染症を引き起こしていると考えられており、HAdV-6に対する抗血清がHAdV-57と交叉反応性があることが示された。千葉県との共同研究で既にP65H48F60として論文報告していた株がHAdV-85とされた。広島市との共同研究で検出したHAdV-21は国内初の検出であり、21型は重症呼吸器感染症を引き起こすことが知られているので、今後の検出動向に注意が必要である。これらを含め、IASR 7月号で「アデノウイルス感染症 2008～2017年6月」として特集した。

薬剤耐性菌：平成28年3月の地研における薬剤耐性菌の試験検査の実施に関する通知により、今後は試験検査結果の集計と還元、および試験の精度管理がラボネットワークとして取り組む重要な課題になると思われる。NESID病原体サーベイランスシステムにおいて薬剤耐性菌の試験検査結果を報告するためのシステムが整備されていない。現時点では、必要最小限の情報のみ報告できる形式としたが、今後はカルバペネマーゼ遺

伝子以外の -ラクタマーゼ遺伝子の検出結果、カルバペネマーゼ産生菌の試験法の感度特異度、実施の推奨度についても検討を続ける必要がある。精度管理については、画像情報をデータベース化し、地研担当者と共有することが長期的にラボネットワークの試験検査精度の向上に重要と考えられた。試験検査の精度を担保するためには、可能な限り統一した試験法が多くの施設で実施されることが望ましい。薬剤耐性菌、特にカルバペネマーゼ産生菌の検出方法は様々な試薬メーカーが独自の検査キット等を販売しており、中には十分な感度特異度が得られないものもある。可能なかぎり病原体検出マニュアルに準じた試験を実施してもらえるよう依頼し、また最新かつ最適な検査法を提案できるように常にマニュアルの改訂を進める必要があると思われる。

E. 結論

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、T12 型が多かった。一方、劇症型溶連菌感染症由来株の 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。

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。

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も、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。今後、リケッチア性疾患とその他の関連疾患の実験室診断のより効果的な体系化のために、既存のリケッチア関連疾患実験室診断の体系化、検査機関情報の更新、課題の洗い出しを継続検討していく。

エンテロウイルス：1) エンテロウイルスレファレンスセンターを活用した手足口病検査 EQAを実施した。エンテロウイルスレファレンスセンターと連携することで送付試料の条件検討を行うこと、EQA実施前に送付試料の質の確認検査ができた。この様に技術的な課題を検討するため、ネットワークの維持は重要である。

2) 感染症検査における結果は総合的な解

釈が必要であり、多角的に問題を分析することが求められる。ブレインストーミングで行うグループワーク研修を実施し、一定の効果が認められた。

3) グループワーク研修実施には、ファシリテーターの確保、ブレインストーミング用教材が必要であると考えられる。過去の問題解決事例を収集し、事例集を作成した。

麻疹・風疹: アンケート調査で、地方衛生研究所74か所における2017年の麻疹および風疹の検査実態について把握を行なった。また、麻疹ならびに風疹ウイルスの遺伝子検査法の参照RNAの改良を行なった。

百日咳: 近年増加傾向にあるパラ百日咳菌について新規の遺伝子型別法を開発した。本法により臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類されたことから、パラ百日咳菌の遺伝子型別に適用可能と考えられた。

結核: 2017 年度は、57 施設を対象に VNTR 分析に関する EQA を実施した。3 株の EQA 用検体を JATA 12 で分析した場合、2016 年と比べて全株 12 ロール完全正答した施設数と割合は 48 施設 87.3% [2016] から 40 施設 70.2% [2017] と大幅に減少した。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 QA 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である。

動物由来感染症: 抗体検出については、うまく結果が出なかったところや結果の判定方法が誤っている地衛研も認められた。また、遺伝子検出に関しては、定性試験は良好であったが、検出感度は各地衛研により差が大きく見られた。ただ、全体的にみて参加した 21 地衛研において、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた。

HIV 関連感染症: 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

ワーク体制を構築するとともに、現状の課題、改善案について情報共有、討議を行った。

アデノウイルス: 新型アデノウイルス 3 種類の日本国内における検出を明らかにした。さらに、これまで検出されていなかった 21 型も検出され、地方衛生研究所と国立感染症研究所を含むラボネットワークによるアデノウイルス検出・同定は非常に有効に機能した。これらは、世界に向けて地方衛生研究所と国立感染症の共同研究成果として発信されている。

薬剤耐性菌: 地方衛生研究所における薬剤耐性菌の試験検査体制整備の第一段階は終了し、ほとんどの地研での試験の実施が可能となった。今後は実施された試験結果の集計と解析、結果の公表方法の検討および、試験精度の担保が主な課題になると考えられる。

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る。

結核: 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。

アデノウイルス: アデノウイルスが主要な起因病原体である咽頭結膜熱の過去10年間で最も患者数が多い状況が2017年に発生し HAdV-2およびHAdV-3によるものであることをメディアやIASRを通じて国民に向け報告した。

G. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書を参照。

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

病原体検出マニュアルの改訂

研究代表者 宮崎義継 国立感染症研究所真菌部 部長

研究協力者 梅山 隆 国立感染症研究所真菌部
福田恵子 国立感染症研究所真菌部

研究要旨 国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所とで相互に補完協力して作成されている病原体検出マニュアルは、病原体検査を行う上で多くの地衛研に参考にされているものであり、精度の高い病原診断を行うためにも、最新の情報を継続的に取り入れる必要がある。本研究では、衛生微生物技術協議会レファンレンス委員会からの要望に沿い、感染研ホームページに掲載されている病原体検出マニュアルの各疾病の更新日を再調査し、更新年月をホームページに反映させた。参照する病原体検出マニュアルが最新か否かが明確になり、病原体検査の精度の維持・向上への貢献が期待できる。

A. 研究目的

多くの地方衛生研究所（地衛研）が病原体検査を行う上で参考にしている病原体検出マニュアルは、全国の地衛研と国立感染症研究所（感染研）とが共同で作成しているものであり、感染症対策に係る行政検査における大きな根拠となっている。感染症法に定められた感染症について病原体検出マニュアルが作成されており、マニュアルの使用と評価を繰り返し、科学の進歩にあわせて内容を改善していくことが常に求められている。本研究では、更新の頻度と時期を明確にするために、感染研ホームページで公開している病原体検出マニュアルの更新日を確認し、全国の地衛研における病原体検査の精度の維持・向上に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

感染研の病原体検出マニュアルのホーム

ページ

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/reference.html>

に掲載されている各病原体検出マニュアルについて、6 疾患のアップデートを行った。また、ホームページに掲載している 60 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。

C. 研究結果

平成 29 年度に、病原体担当から提出され、アップデートを行った病原体検出マニュアルは、風しん、クリプトスポリジウム症・ジアルジア症、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎であった。

掲載されている病原体検出マニュアルの更新年月を調査し、図のように、上記ホームページに反映させた。



図：感染研ホームページへの更新年月の反映（例）

D. 考察

継続的に病原体検出マニュアルを更新する必要があり、今年度もアップデートを行った。従来のホームページでは、病原体検出マニュアルが最新かどうかは、pdf ファイルをダウンロードし、内容を確認する必要があったが、今回の反映作業により、参照する病原体検出マニュアルの最終更新時期が明確になり、マニュアルの信頼性が向上し、全国の地衛研での病原体検査への貢献が期待できる。

E. 結論

病原体検出マニュアルのアップデートおよび更新年月のホームページ上への反映を行った。科学の進歩に合わせた病原体検査の精度の維持向上が期待できる。引き続き改訂や追加が必要な疾病について病原体検出マニュアルを整備する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

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

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 四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨 平成28年4月1日に施行された改正感染症法により、感染症法に基づく検査を都道府県知事が実施することとなり、地方衛生研究所はその検査の精度を保証することが求められるようになった。そのため、地方衛生研究所が実施している感染症の検査について標準作業書等の作成が必要となっているが、これらは病原体検出マニュアルを元に作成されている。法改正後、重要となったマニュアル改訂を促すことを目的として地方衛生研究所が、標準作業書が必要と考える感染症についてリストアップし、マニュアルの有無、改訂年について調査した。

A．研究目的

地方衛生研究所が実施している感染症の検査に必要な標準作業書等の作成は、国立感染症研究所のホームページに掲載されている病原体検出マニュアルを元に作成されている。法改正後、重要となったマニュアル改訂を促すことを目的として地方衛生研究所が、標準作業書が必要と考える感染症についてアンケート調査を実施し、改訂年月日のリストを作成した。

B．研究方法

1. 国立感染症研究所のホームページに掲載されている病原体検出マニュアルについて、改訂年月日をリスト化し、ホームページ上に掲載した。
2. 感染症法に規定されている感染症のうち、地方衛生研究所において検査を実施する可能性が高く、標準作業書が必要と思われるものについて調査を実施した。

C．研究結果

1. 標準作業書が必要であるが病原体検出マニュアルがない感染症

地方衛生研究所において検査を実施しており、もしくは実施する可能性が高く、かつ未だに病原体検出マニュアルが作成されていない感染症は以下の通りである。これまでに、地方衛生研究所は、マニュアルの作成を国立感染症研究所に対して要望してきたが、未だに作成されていないものがある。平成28年4月の感染症法改正において標準作業書の作成が義務化されたことから、これを支援するために病原体検出マニュアルを常に最新のものにしておくことが重要である。マニュアルが作成されていない感染症は以下の通りであり早急な作成が望まれる。

二類感染症：

鳥インフルエンザ（H7N9）

中東呼吸器症候群（MERS）

四類感染症：

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）

オウム病

Q熱

ツツガムシ病

日本紅斑熱

E型肝炎

A型肝炎

五類感染症：

急性脳炎（ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く）

侵襲性インフルエンザ菌感染症

侵襲性肺炎球菌感染症

五類定点把握疾患：

RSウイルス感染症

感染性胃腸炎（ロタウイルス感染症は掲載済み）

伝染性紅斑

クラミジア肺炎

2. 改訂年

改訂の期日については以下の通りであり、2012年以來改訂されていないものについては改訂を検討する必要がある。

2018年2月：無菌性髄膜炎、ヘルパンギーナ、手足口病

2017年：風疹、麻疹、腸管出血性大腸菌感染症、流行性角結膜炎、咽頭結膜熱

2016年：ジカウイルス感染症、ヘンドラウイルス感染症、ニパウイルス感染症、薬剤

耐性緑膿菌感染症、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症、バンコマイシン耐性腸球菌感染症、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症

2015年：コレラ、突発性発しん、野兔病、先天性風しん症候群、百日咳、流行性耳下腺炎

2014年：インフルエンザ（鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く）、デング熱、破傷風、感染性胃腸炎（ロタウイルス）、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症

2013年：淋菌感染症、日本脳炎、コクシジオイデス症、チクングニア熱

2012年：尖圭コンジローマ、ハンタウイルス肺症候群、ブルセラ症、アメーバ赤痢、マラリア、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、ライム病、エキノコックス症、細菌性赤痢、侵襲性髄膜炎菌感染症、後天性免疫不全症候群、パラチフス、腸チフス、ペスト、狂犬病、鳥インフルエンザ（H5N1）、マールブルグ病、性器ヘルペスウイルス感染症、ポツリヌス症、炭疽、急性灰白髄炎、回帰熱、エボラ出血熱

2011年：マイコプラズマ肺炎、細菌性髄膜炎（髄膜炎菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌を除く）、劇症型溶血性レンサ球菌感染症、鼻疽、レプトスピラ症、レジオネラ症、水痘、水痘（入院例）、類鼻疽、Bウイルス病

2004年：重症急性呼吸器症候群（SARS-CoVに限る）

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016–2017, *Frontiers in Microbiology*, Jan, 2018

2 . Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):144-148.

3. Fujimoto Y, Hasegawa S, Matsushige T, Wakiguchi H, Nakamura T, Hasegawa H, Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsuta R, Morishima T, Ohga S. Pulmonary inflammation and cytokine dynamics of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during A(H1N1)pdm09 influenza infection. *Sci Rep.* 2017 Aug 22;7(1):9128.

4 . 調 恒明、地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に必要な感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化、公衆衛生情報、47 , 10–12 , 2018

5 . 調 恒明、地域保健法と地方衛生研究所、公衆衛生、82 , 238–243 , 2018

学会発表

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

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . 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

大腸菌・レジオネラ

研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳 森本 洋 千田 恭子 大屋 日登美 磯部 順子 田中 忍 平塚 貴大 吉野 修司 川口 定男	国立感染症研究所 細菌第一部 北海道立衛生研究所 仙台市衛生研究所 神奈川県衛生研究所 富山県衛生研究所 神戸市環境保健研究所 広島県立総合技術研究所 宮崎県衛生環境研究所 板橋区保健所

研究要旨 大腸菌、レジオネラ属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29年度においては、大腸菌レファレンスセンターでは、検査に必要なコントロール株およびDNAの配付を行い、レジオネラ・レファレンスセンターでは免疫血清の配布を行なった。また、現在実施されている病原体サーベイランスの状況を検証した。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方法を検討していく。

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。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*:

EAggEC]) を含む、各病原性遺伝子の検出が重要である。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

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、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ための体制作りの支援をする。*L. pneumophila*の血清群別をより簡便に行えるよう市販されていない混合血清を作製し、レファレンスセンターを通じて全国の地衛研に配布する。また、自治体における環境水からのレジオネラ検査の状況を明らかにする。

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Iguchiらの方法 (J Clin Microbiol. 53(8): 2427-32. 2015; 未発表データ)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)

C. 研究結果

1.1 EHEC のサーベイランス

2017年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全3,362株であり、その分布は、血清群 O157 (55.2%)、O26 (24.8%)、O103 (4.8%)、O111 (4.2%)、O121 (2.3%)、O145 (1.6%)、O91 (1.2%)、O165 (0.3%)、その他 (5.6%)であった。

1.2 コントロール株の配布

下痢原性大腸菌の各カテゴリー (EHEC,

EPEC, EAggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [lenteoinvasive *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または保健所等: 福井県衛生環境研究センター、豊田市衛生試験所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、越谷市保健所、船橋市保健所へ行った。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 O-/H-genotyping PCR 法の大腸菌サーベイランスへの導入

共同研究として他の研究班で開発した大腸菌 O-/H-genotyping PCR 法(大腸菌の血清型 [O:H型]をPCRで決定できる手法)をEHECのサーベイランスに導入し、抗血清を用いた型別法との整合性を確認した。EHECの国内分離株の一部に抗血清による型別結果とOg/Hg型別結果が一致しない菌株が存在することが判明した。さらに、感染研・細菌第一部で受け付けた複数のHUS患者便検体から、マイナーなO群のEHECが分離されることが明らかとなった。

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。レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行っている。昨年度の報告以降、76株が追加された(表1)。*Legionella pneumophila* 血清群 (SG)1が71株、SG2、5、9、10、および*Legionella longbeachae* SG2が各1株であ

った。入浴施設の散発事例で施設由来の菌株と PFGE が一致した例は 2 例あった。推定感染源については、およそ半数は感染源が不明で、入浴施設が感染源と推定されているのは 3 分の 1、残りの 6 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。

2017 年 3 月末現在で、合計 528 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた(図 1)。*L. pneumophila* が 517 株(97.7%)で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 87%を占めている(表 2)。

L. pneumophila については遺伝子型別を行っており、結果を随時返している。517 株は、ST1 から ST2387 まで 208 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。

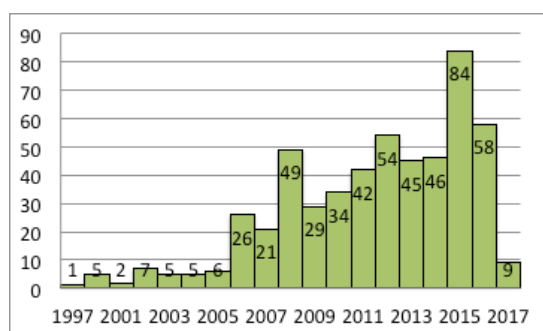


図 1 分離年別レジオネラ臨床分離株
(2017 年 3 月末日現在)

2.2 レジオネラ属菌外部精度管理サーベイの実施および市販されていない *L. pneumophila* 混合免疫血清の配付

レジオネラ属菌外部精度サーベイへの参加および、*L. pneumophila* 混合免疫血清の配付にあたり、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。外部精度管理サーベイには、昨年度同様 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、93%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 75%、遠心濃縮法は良好範囲機関が 80%となり、昨年度同様多くの地衛研が良好範囲内となった。

2.3 地衛研および保健所におけるレジオネラ検査の実態調査

地衛研および保健所における環境水のレジオネラ検査の実態調査を行なった。環境水のレジオネラ検査は98%の地衛研で実施されていた。保健所におけるレジオネラ検査実施状況は自治体により異なっており、全体では481保健所中、104保健所で実施されていた。47都道府県設置保健所でみると、山形県、新潟県、富山県、高知県は全保健所で実施されており、10道府県は一部保健所で実施されていた。保健所設置市(74市)の保健所では、29市の29保健所で実施され、30市は地衛研で実施されていた。7市は検査を委託していた。8市は不明であった。東京23特別区においては、18区保健所で検査を実施していた(一部は地衛研での実施)。2区は委託で、検査担当なしの区が3区あった。

D. 考察

昨年度更新した「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 法との整合性解析をさらに詳細に実施する必要がある。

レジオネラ症は年間 1500 症例を越え、死亡例も少なくないが、多くの場合感染源は不明である。菌分離に取り組んでいる地衛研もあり、現在の菌分離は全症例の 5%程度となってい

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。

今回の調査で、自治体における環境水のレジオネラ検査の実態が初めて明らかとなった。98%の地衛研で環境水のレジオネラ検査が行われており、地衛研の重要性が明らかとなった。また、自治体によりレジオネラ検査の実施状況に差があることが判明した。

環境水のレジオネラ検査は、レジオネラ症の感染源となりえる水系施設の衛生管理の状態の把握のために不可欠である。検査精度の担保のための外部精度管理に参加することで、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、研修等の実施が必要と考えられた。

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、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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 今野貴之、高橋志保、鈴木純恵、檜尾拓子、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. 2017. 38(1):22.

学会発表

1. 中植 竜大、村井美代、前川純子. *Legionella pneumophila*の血清群別を目的とした塩基配列の解析. 第12回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2017年8月、越谷.

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 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2016年4月～2017年3月)

No. 年	性別	感染源	PFGE	NRB (菌株 受付番号)	種名	血清 群	lag-1	ST (Sequence Type)								Group (SG1)	同LSTの報告があるか	
								flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	newA				
453	2015	女	温泉(推定)		3552	<i>L. pneumophila</i>	1	-	739	12	8	11	2	10	12	2	S3	国内3例目、日本・中国環境
454	2016	男	不明(旅行歴なし)		3558	<i>L. longbeachae</i>	2	NA										
455	2016	男	サウナのかげ湯		3559	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1835	11	14	22	16	15	13	2	C2	国内環境(以前の当該施設)
456	2016	男	不明		3617	<i>L. pneumophila</i>	1	+	701	21	14	29	15	15	29	6	N	国内2例目、フランスで7例
457	2016	男	不明(温泉、銭湯の入浴なし)		3629	<i>L. pneumophila</i>	1	+	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内12例目、国外
458	2015	男	温泉(推定)		3630	<i>L. pneumophila</i>	1	+	306	6	10	15	13	9	14	11	B1	国内8例目
459	2015	男	不明(御清近くにて土木業)		3631	<i>L. pneumophila</i>	1	+	132	2	1	6	15	2	1	6	S1	国内7例目
460	2015	男	不明		3632	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内10例目、国外
461	2015	男	不明		3633	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内35例目、国外
462	2015	男	不明		3634	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2128	27	3	9	15	5	5	6	S1	国内2例目
463	2015	男	不明		3635	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内36例目、国外
464	2016	男	不明		3636	<i>L. pneumophila</i>	1	+	142	2	10	3	13	9	4	18	B1	国内6例目
465	2016	男	公衆浴場(推定)		3637	<i>L. pneumophila</i>	1	+	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内9例目
466	2016	女	浴槽水(推定、浴槽水からは血清群5)		3638	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内37例目、国外
467	2016	男	浴槽水(共同住宅、推定)		3640	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内38例目、国外
468	2016	男	不明		3641	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2236	12	3	5	11	2	1	6	S1	無
469	2016	女	自宅のエアコン(推定)		3642	<i>L. pneumophila</i>	1	+	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内25例目、国外
470	2016	男	窓拭きの排水にためた雨水を使用した(推定)		3643	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内11例目、国外
471	2016	男	不明		3644	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内39例目、国外
472	2016	男	公衆浴場(推定、遺伝子型一致せず)		3645	<i>L. pneumophila</i>	1	+	622	3	13	1	3	9	9	9	(U)	国内2例目、国内環境
473	2016	男	不明		3646	<i>L. pneumophila</i>	1	+	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内6例目
474	2016	男	公衆浴場(遺伝子型一致)	確定	3647	<i>L. pneumophila</i>	1	+	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内7例目
475	2016	男	不明		3648	<i>L. pneumophila</i>	1	+	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内2例目、国外
476	2016	男	不明		3649	<i>L. pneumophila</i>	1	+	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内8例目
477	2016	男	不明		3652	<i>L. pneumophila</i>	1	+	552	7	6	17	3	13	9	11	B2	国内2例目
478	2016	男	温泉(推定)		3653	<i>L. pneumophila</i>	1	+	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内11例目
479	2016	男	腐葉土(推定)		3654	<i>L. pneumophila</i>	2	NA	354	3	5	1	7	14	32	8	-	国内5例目、国外2例(全てCSG2)
480	2016	男	マンション建築現場(推定、現場監督)		3661	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2292	2	10	3	10	9	14	3	B1	無
481	2016	男	不明		3673	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2295	12	8	11	10	5	12	2	S3	無
482	2016	男	タンク水(推定、食品会社勤務)		3674	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1364	8	19	5	15	18	5	6	(S1)	国内環境(氷たまり)1例
483	2015	男	不明		3677	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2297	2	3	5	23	2	1	37	S1	無
484	2015	男	不明		3678	<i>L. pneumophila</i>	1	+	973	2	3	5	15	2	1	6	S1	国内4例目
485	2015	女	不明		3679	<i>L. pneumophila</i>	1	+	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内12例目
486	2015	男	不明(家で風呂を使用)		3680	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1027	6	10	17	28	21	7	11	B1	国内環境(浴槽水)1例
487	2015	男	不明(職業は内装業)		3681	<i>L. pneumophila</i>	1	+	876	2	3	6	15	51	1	6	S1	国内4例目
488	2016	女	不明		3682	<i>L. pneumophila</i>	1	-	154	11	14	16	16	15	13	2	C2	国外臨床、国内外環境
489	2016	男	不明(入浴施設利用歴なし)		3683	<i>L. pneumophila</i>	1	+	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内27例目、国外
490	2016	男	不明(入浴施設利用歴なし)		3684	<i>L. pneumophila</i>	1	+	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内28例目、国外
491	2016	男	不明(職業は土木作業員)		3690	<i>L. pneumophila</i>	1	+	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内7例目
492	2016	男	不明(職業は工事作業員)		3691	<i>L. pneumophila</i>	1	+	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内13例目
493	2016	男	不明		3692	<i>L. pneumophila</i>	1	+	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内7例目
494	2016	男	不明(発症前日温泉利用、同一血清群は不検出、職業は水道管工事)		3693	<i>L. pneumophila</i>	1	+	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内8例目
495	2013	男	不明(調査したのが不明、周囲に有症者なし)		3695	<i>L. pneumophila</i>	1	+	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内9例目
496	2016	男	スポーツジムの風呂(推定、遺伝子型一致せず)		3702	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内12例目、国外
497	2016	男	入浴施設(集団感染、環境分離株と一致せず)		3706	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内13例目、国外
498	2016	男	入浴施設(集団感染、NBS706cと同じ施設、環境分離株と一致せず)		3707	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内13例目、国外
499	2016	男	不明		3708	<i>L. pneumophila</i>	1	+	140	2	3	18	11	2	10	12	(S1)	国内2例目
500	2016	男	不明		3709	<i>L. pneumophila</i>	10	NA	1409	6	10	19	28	19	4	207	-	国外環境
501	2016	男	不明(職業は建築業)		3710	<i>L. pneumophila</i>	1	+	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内10例目
502	2016	女	温泉(推定)		3711	<i>L. pneumophila</i>	1	-	493	3	13	1	28	14	9	11	U	国内外環境、国外臨床
503	2016	男	不明(職業は海上コンテナ運搬レーダー運転手、24時間風呂?)		3712	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	国内2例目
504	2016	男	不明(自宅環境からは不検出)		3713	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	国内3例目
505	2016	男	不明		3714	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	国内4例目
506	2016	男	不明(クレーン車を洗う屋外の貯め水からSG6)		3715	<i>L. pneumophila</i>	1	+	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	国内5例目
507	2016	男	不明		3660	<i>L. pneumophila</i>	1	+	553	3	6	1	3	14	11	9	U	国内2例目、国外
508	2016	男	不明		3716	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2327	6	10	15	28	9	4	6	B1	無
509	2016	男	不明(自宅風呂は水を2-3日変えずに使う)		3717	<i>L. pneumophila</i>	1	+	624	12	8	11	10	5	12	6	(S3)	国内2例目、国外臨床環境
510	2016	男	不明		3741	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2311	3	7	1	3	5	11	11	(U)	無
511	2016	男	温泉(推定)		3742	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2332	6	10	19	14	21	4	11	B1	無
512	2016	男	不明(園芸の趣味あり)		3743	<i>L. pneumophila</i>	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内14例目、国外
513	2015	男	不明(入院10日に発症)		3744	<i>L. pneumophila</i>	9	NA	390	1	4	3	28	1	1	6	無	国内環境
514	2016	男	不明(温泉利用か)		3745	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2346	2	6	3	13	14	14	2	N	無
515	2016	男	公衆浴場(推定)		3746	<i>L. pneumophila</i>	1	+	893	7	10	17	3	13	4	11	B2	国内1例(臨床)
516	2017	男	不明(公衆浴場、駐車場管理で清掃)		3747	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2349	7	10	19	3	19	4	6	B1	無
517	2016	男	不明		3748	<i>L. pneumophila</i>	1	+	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内22例目
518	2017	男	公衆浴場(推定、SG5のみ検出)		3749	<i>L. pneumophila</i>	1	+	505	7	6	17	3	11	11	9	B2	国内7例目
519	2017	男	公衆浴場(推定、レジオネラ陰性)		3750	<i>L. pneumophila</i>	1	+	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内8例目
520	2017	男	排水口の清掃		3751	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2350	6	10	15	28	17	14	6	B1	無
521	2016	男	不明		3757	<i>L. pneumophila</i>	1	+	701	21	14	29	15	15	29	6	N	国内3例目、国外多数
522	2016	男	不明		3758	<i>L. pneumophila</i>	1	+	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内11例目
523	2016	女	不明		3759	<i>L. pneumophila</i>	5	NA	1032	3	13	1	6	14	9	38	-	国内2例目、国内環境、国外臨床
524	2017	男	不明		3760	<i>L. pneumophila</i>	1	+	2372	7	6	17	3	13	9	6	B2	無
525	2017	男	配管工事(推定)		3761	<i>L. pneumophila</i>	1	+	23	2	3	9	10	2				

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

溶血性レンサ球菌レファレンスセンターの活動

研究分担者	池辺忠義	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	熊田裕子	福島県衛生研究所	微生物課
	内田 薫	富山県衛生研究所	細菌部
	大屋日登美	神奈川県衛生研究所	微生物部
	山口貴弘	大阪健康安全基盤研究所	微生物部
	大塚 仁	山口県環境保健センター	保健科学部
	神田由子	大分県衛生環境研究センター	微生物担当
	奥野ルミ	東京都健康安全研究センター	微生物部

研究要旨 A群レンサ球菌である*Streptococcus pyogenes*は、咽頭炎のようなありふれた病気から劇症型溶血性レンサ球菌感染症のような重篤な感染症を引き起こす。*S. pyogenes*はTタンパク抗原を保有しており、疫学マーカーとして利用されている。本研究では、ラボネットワークを機能的に強化するため、全国の咽頭炎患者分離株および劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株について、T型別を行い、ラボ間での情報の共有などを行った。咽頭炎由来株のT型は、T1型が最も多かった。一方、劇症型溶連菌感染症患者由来株のT型も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。

A．研究目的

A 群レンサ球菌である *Streptococcus pyogenes* は、咽頭炎のようなありふれた病気から劇症型溶血性レンサ球菌感染症のような重篤な感染症を引き起こす。本菌種の疫学マーカーとして、TタンパクとMタンパクが知られている。M型別は、力価が低いことや市販の抗血清がないことから、限られた施設でのみ行われている。一方、T型別は市販の抗血清があり、簡易に型別可能であることから、様々な施設で実施可能である。本研究では、全国の咽頭炎患者分離株および劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株について、T型別を行い、ラボ間での情報の共有、および強化することを目的とする。

B．研究方法

1. 生物材料と培養方法

咽頭炎分離株は、各都道府県の衛生研究所に集められた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、各都道府県の衛生研究所から各ブロックのレファレンスセンターを通じ国立感染症研究所細菌第一部に集められた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. JAMA 269:390-391.に基づいて定められた感染症法の診断基準に従った。レンサ球菌の生育には、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地（Becton

Dickinson) を使用した。

2. ゲノムDNAの調製

血液寒天培地に塗末した菌を 90 μ L の T E (pH8.0) に懸たく後、mutanolysin (Sigma)を添加し、37 で1時間処理した後、DNA精製キットを用いて精製した。

3. T血清型別

T血清型別は、A群溶血レンサ球菌T型別用免疫血清(デンカ生研)を用い、製品のプロトコールに従い、行った。

C. 研究結果

1. 咽頭炎患者分離株のT型別

2016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、837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、T1(197/837, 23.5%)、T12(161/837, 19.2%)、T4(117/837, 14.0%)、TB3264(97/837, 11.6%)、T3(88/837, 10.5%)であった。T1型の分離比率は、2014年以降、増加傾向であった(2014年, 11.9%、2015年, 14.4%、2016年, 23.5%)。T12、T4型は、毎年、高い分離比率を示した。TB3264型の分離比率は、減少傾向であった(2014年, 27.1%、2015年 15.8%、2016年, 11.6%)。T3型は増加傾向であった(2014年, 1.6%、2015年 9.8%、2016年, 10.5%)(図1)。

2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株のT型別

2016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143症例あった。最も分離された型は、T1型であり、昨年より高い分離比率であった(2014年, 39.2%; 2015年, 38.7%; 2016年, 49.7%)。また、咽頭炎由来株の分離比率(23.5%)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

比較して減少した(2015年, 25.5%; 2016年, 16.1%)。次いでT3型が多く、昨年と比較して分離比率が増加した(2015年, 6.6%; 2016年, 8.4%)。この3つの型で全体の70%以上を占めていた(図2)。

D. 考察

T1型の株は、2015年から2016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おり、パラレルに推移している傾向にある。また、TB3264型も2012年頃から急増していることや、2015年から2016年にかけて減少しており、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。

E. 結論

咽頭炎由来株のT型は、T1、T12型が多かった。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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ikebe T, Okuno R, Sasaki M, Kanda Y, Otsuka H, Kawahara R, Ohya H, Suzuki M, Uchida K, Nihonmatsu H, Ohnishi M, The Working Group for Beta-Hemolytic Streptococci in Japan. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Streptococcus dysgalactiae*

subspecies *equisimilis* isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome. J Infect Chemother. 24:117-122, 2018.

2. Yamamura Y, Mihara Y, Nakatani K, Nishiguchi T, Ikebe T. Unexpected Ventriculitis Complication of Neonatal Meningitis Caused by *Streptococcus gallolyticus* Subsp. *pasteurianus*: a Case Report. Jpn J Infect Dis. 71:68-71, 2018.

学会発表

1. 該当なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 . 特許取得

該当なし

- 2 . 実用新案登録

該当なし

- 3 . その他

該当なし

咽頭炎由来株のT型別（2005-2016）

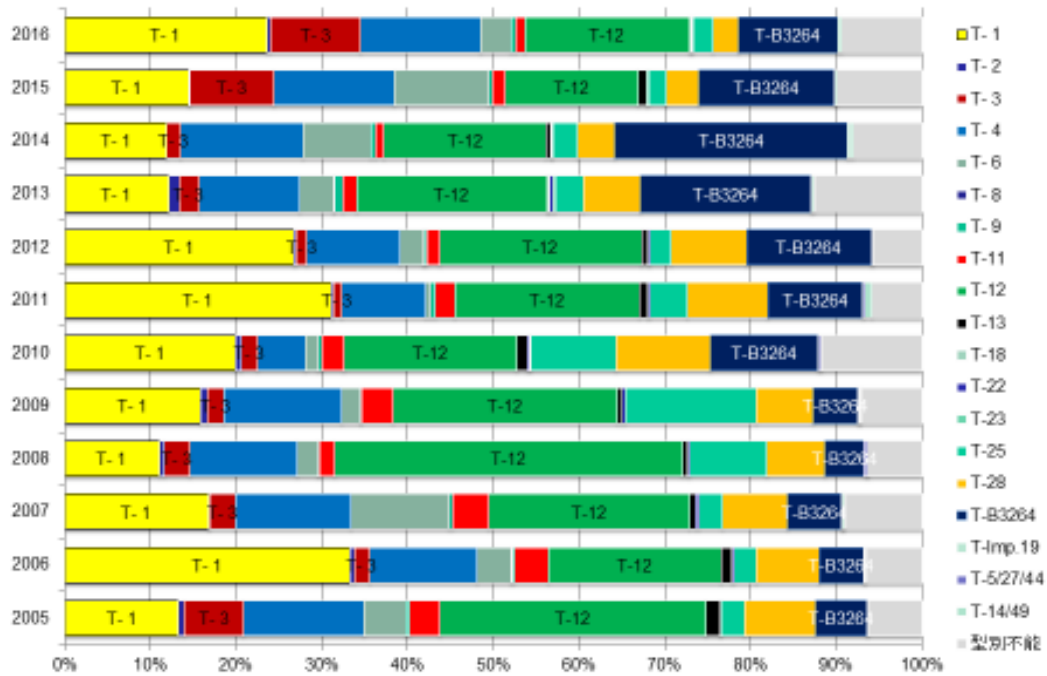


図1．咽頭炎由来株のT型別

劇症型溶レン菌感染症患者由来株のT型別（2005-2016）

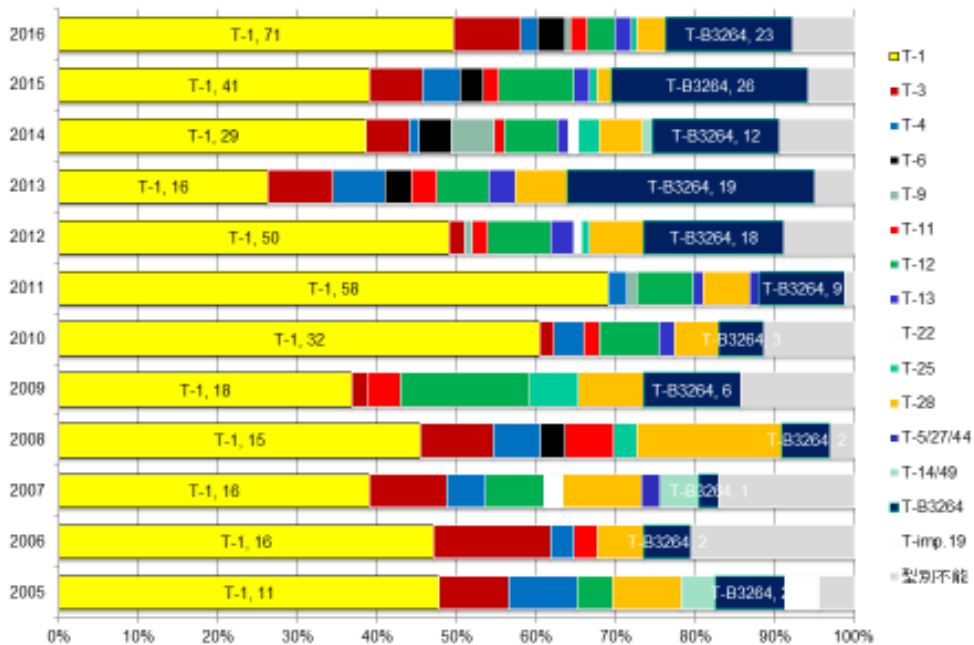


図2．劇症型溶レン菌感染症患者由来株のT型別

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 永宗喜三郎 国立感染症研究所寄生動物部 第1室長

研究協力者 八木田健司 国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官
泉山信司 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
杉山 広 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
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および住肉胞子虫に関しては、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。今年度は昨年度に引き続き、そのための作業に取り組んだ。

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。今年度は旋毛虫および住肉孢子虫に関して、茨城県で発生した熊肉摂食を原因とする旋毛虫症、および滋賀県、茨城県で発生したシカ肉を原因とする住肉孢子虫による有症事例を例題に、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。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

当部では全国の地研や国内外の医療機関から、感染症法で4類に規定されるエキノコックス症をはじめとして、他の寄生虫症に関しても依頼検査を受け付けている。今年度（平成30年3月19日現在）は新規分として計52件の蠕虫症検査依頼があり、このうちエキノコックス症を疑う症例はヒト7件、動物（イヌ、ホンドギツネ）6件の計13件であった。ヒト由来試料は、血清の場合はウェスタンブロット法による免疫学的検査を、組織の場合はPCR法による遺伝子検査をそれぞれ行った。動物由来試料は糞便で、PCR法による遺伝子検査を行った。また、エキノコックス定着が懸念される愛知県では、監視体制強化を図って昨年度よ

りイヌの検査項目に遺伝子検査を導入したので、今年度もこれを継続した。

3. 旋毛虫症

一昨年末（2016年12月）に茨城県で発生した事例は、我が国で第4例目となる集団発生事例である。集団事例はいずれもクマ肉を原因とするが、肉が生あるいは冷凍保管品の非加熱状態で提供された過去の3事例と異なり、本事例は原因肉に1回または2回の加熱処理が行われていたことが茨城県の調査で明らかになった。すなわち、2016年11月24～26日提供品は患者調理品、同11月29以降提供品は患者調理品を小分け冷凍保管し、提供の都度、解凍再加熱を行ったものである。そこでこれらの影響を評価するため、処理前後の発症率を比較した。

4. 住肉孢子虫

検体は滋賀県での有症事例2例および茨城県の有症事例1例のシカ肉残品、北海道産狩猟エゾシカ（市販）、滋賀県内捕獲シカの肉を材料とした。エゾシカならびにシカ肉検体より実体顕微鏡下で形態的な差異に基づきサルコシストを単離し、個別にDNAを抽出し、厚生労働省通知法に基づき18SrDNAの多型領域を含む部分増幅を行った。PCR産物のシーケンス解析から既知種、遺伝子型との相同性を調べ、シカ感染サルコシスティス特異的プライマーを設計し、これを用いた定性PCR系を構築した。

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3空港検疫所支所から、検疫所

職員が合計 17 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。また東京国際空港保健衛生管理運営協議会にてマラリアに関する講演を行い、各委員会メンバー（東京検疫所東京空港検疫所支所長、検疫医療専門職員、検疫官、東京都福祉保健局職員、大田区保健所職員、東京入国管理局職員など他）38 名との情報交換を行い、連携を強化した。H29 年 4 月から H30 年 2 月末までに全国各地の医療機関から受入れたマラリア種別の依頼検体は 2 例であり、それらは熱帯熱マラリアと卵型マラリアの混合感染例、ならびに三日熱マラリア陽性例であった。また 3 件の診断に関する相談を受入れ、5 箇所の地方衛生研究所に診断のための陽性コントロールを配布した。

2. エキノコックス症

ヒト疑診例は、血清 6 例はすべて陰性であったが、組織材料 1 例が陽性であった。この症例は北海道居住歴があり、同地での感染が考えられ、解読した 12S rRNA および *cox1* 塩基配列もそれを支持した。なお、本症例は追加実施した抗体検査でも陽性結果を示した。動物由来試料については海外依頼例 1 例のみが陽性で、国内依頼例（5 例）からは陽性例は検出されなかった。愛知県では 2015 年 10 月から 2018 年 1 月の期間中に県動物保護管理センター知多支所に抑留または保護されたイヌ等に由来する糞便 66 検体（内訳：イヌ 61、キツネ 4、タヌキ 1）について DNA の調製を行い、現在結果を解析中である。

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、加熱品摂取群（10 名摂取、全員発症）と再加熱品摂取群（21 名摂取、11 名発症）の発症率は有意に異なった。

表. 加熱等処理と旋毛虫症発症率の比較

摂取内容	患者/摂取者（発症率%）		
	男	女	合計
加熱品	9/9 (100)	1/1 (100)	10/10 (100)
再加熱品	2/5 (40)	9/16 (56.3)	11/21 (52.4)
合計	11/14 (78.6)	10/17 (58.8)	21/31 (67.7)

加熱品摂取群 vs. 再加熱品摂取群

男：Fisher's exact $P=0.027$

女：Fisher's exact $P=1.000$

合計：Fisher's exact $P=0.012$

合計：Mantel-Haenszel $P=0.043$

3. 住肉孢子虫

北海道産エゾシカより形態的に 2 つのサルコシストのタイプを検出した。18SrDNA 増幅配列を調べた結果、小型のタイプ A はシカでの報告のある *Sarcocystis pilosa* (99%) と、一方大型のタイプ B は、エゾシカより報告のある *Sarcocystis* sp. と高い相同性 (99%) を示した。また滋賀県産のシカより形態的に 2 つのタイプを検出し、大型のタイプ C はノロジカから報告された *S. entzeroth* と高い相同性 (97%) を示した。もう一方のタイプ D は現在解析中である。肉眼的には大型のタイプ B シストは肉内に少数散在するのに対し、小型のタイプ A シストはかなりの高密度で分布

食による食中毒の可能性が指摘されていたところ、2011年にシカ肉が原因と考えられる食中毒様事例（有症苦情事例）の第1例が報告された。

滋賀県の事例ではシカのサルコシスティス *S.sibllensis*、*S.wapiti* が検体より検出されているが、これらの遺伝子情報が登録されておらず、これらと今回の遺伝子検査で検出された *S.pilosa* および *S.trancata* と関係は明らかではない。本研究では複数種が重複感染しても種あるいは遺伝子型別に検出できる検査法を開発することを目的としたが、種は未確定としても、シカ肉中に複数種存在する可能性のあるサルコシスティスを種別あるいは遺伝子型別に検出することが可能であることが示された。現状では小型で数的に多い *S.pilosa* が3例の有症事例に共通して検出されており、本種と食中毒発症との関連性が示唆される。今後種あるいは遺伝子型別のサルコシスティスの定量解析を行い、これらと食中毒発症との量的関係を明らかにする必要がある。

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

なし

学会発表

国際学会：なし

国内学会

1. 木下 彩希, 相澤 悠太, 新井 真衣, 幡谷 浩史, 案浦 健, 中野 由美子, 堀越裕歩. 熱帯熱マラリア・卵型マラリアの混合感染を来したギニア人女性の1例. 日本小児科学会東京都地方会講話会. 2017年12月9日. 東京.
2. 森嶋康之, 杉山広, 山崎浩, 八木田健司, 深谷節子, 海野友梨, 綿引一裕, 佐藤要介, 武藤和弘, 板本陽. 茨城県において2016年末に発生した旋毛虫症による集団食中毒事例. 第28回日本臨床寄生虫学会大会. 6月23日, 2017年6月, 東京.
3. 八木田健司, 杉山 広, 青木佳代. 有症事例を含めたシカ肉におけるサルコシスティス感染. 第87回日本寄生虫学会大会, 3月17-18日, 2018年, 東京

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

～黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良と情報提供～

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 林昌宏
国立感染症研究所 ウイルス第一部 前木孝洋
国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 谷口怜
国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 加藤文博

研究要旨 黄熱はアフリカ中央部およびブラジルを中心とした南米地域に常在する蚊媒介性フラビウイルス黄熱ウイルスによる疾患である。すでに長年使用されてきた生ワクチンが存在するものの、近年でも流行が散発している。一方、同じフラビウイルスに属するダニ媒介性脳炎ウイルスによるダニ媒介性脳炎の患者が、最近北海道で相次いで発生した。これらの疾患は、国内での患者発生がないあるいは非常に少ないため、国内での検査体制が十分とは言えない。そこで本年度は、これらの検査体制の確立を目的とし、検査法の検討およびその結果の地方衛生研究所等検査機関に情報提供した。

A．研究目的

節足動物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。その代表的なも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。さらに最近ではジカウイルス感染症が世界的に大きな問題となった。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、アフリカ

や東南アジアに常在することが知られていたが、2015年には南米大陸など急速に生息域を拡大した。さらに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り、世界的な脅威と認識された。日本脳炎ウイルスはワクチンにより患者発生をコントロール可能になったウイルスではあるが、現在でも免疫力の低下した高齢者を中心に国内で年間10例程度の患者が発生している。デングウイルスや日本脳炎ウイルスと同じフラビウイルス科に属する黄熱ウイルスは、アフリカ中央部やブラジルを中心とする南米に常在している。すでに長年にわたって使用されてきた生ワクチンがあるが、流行地での接種の徹底は困難であり、現在でも患者は発生し続けている。さらに近年では、

流行地域の拡大が懸念されている。これまで南米での流行は主に森林地域であったが、徐々に都市地域に拡大しつつあり、ついには大西洋側海岸地域にまで達している。それに伴い、都市部に近い地域で患者が発生している。

ダニによって媒介されるダニ媒介性脳炎ウイルスにより引き起こされるダニ媒介性脳炎は、国内では1993年に初めて患者が確認されたがそれ以降患者発生は確認されなかった。しかし2016年夏に23年ぶりに北海道で患者が発生し、さらに2017年にもやはり北海道で2例患者が確認された。またダニや動物の調査から、北海道中部以南にはダニ媒介性脳炎ウイルスが常在していることも確認されており、今後も患者の発生が危惧されている。さらに北海道以南にもこのウイルスが生息している可能性も示唆されている。

黄熱の実験室診断法については、すでにマニュアル化されているが、遺伝子診断法については改良が必要な状況であった。一方ダニ媒介性脳炎については、マニュアルが整備されていない状況である。そこで本研究では、黄熱およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法の改良・確立を目的とし、改良・確立した方法については協議会や講習会等で紹介し、地方衛生研究所や保健所への技術の伝搬に務めることとした。

B．研究方法

1.「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」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 US CDC からの情報に従い作製した(表 1)。また Set D は Set B の配列を改変して作製した。増幅評価用の鋳型 RNA は黄熱ワクチン(17D 株)および、増幅

部のみの合成 RNA、およびコピー数測定済みの市販のゲノム RNA(17D 株)を使用した。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応キットには、Thermo 社の TaqMan Fast Virus 1-step Master mix を使用した。

2.「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

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、文献(Schwaiger et al. JCV 27:136-145, 2003)より引用した(表 2)。TaqMan 法は上記黄熱ウイルスの場合と同様に行った。また、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。中和試験は Vero 細胞を使用し、50% ブラーク減少法により行った。

C．研究結果

1.「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」

US CDC からの情報を基に、3 セットの TaqMan プライマー・プローブセットを作製し、増幅能を調べた(図 1)。Set A は西アフリカ株に特異的、Set C は南米株に特異的に反応することが確認された。一方 Set B は西アフリカ型に特異的との情報であったが、実際には西アフリカ型と南米型の両方に反応することが確認された。黄熱ウイルスには、これら 2 つの型以外に、東・中央アフリカ型が知られており、この株にも対応できなければならない。しかし、3 つのセットの配列をみると、Set A, C では東・中央アフリカ型には対応が困難であり、また Set B に関しても改良が必要と考えられた(図 2)。そこで、いずれの型にも対応できるよう、Set B を基に新たなセット Set D を作製した(表 1)。東・中央アフリカ型の鋳型 RNA の入手が困難なため、ひとまず現在保有する鋳型 RNA を使用して Set D を評価した。Set B でみられた、

南米型への低い反応性が著しく改善されたが、西アフリカ型に対する反応性は若干低下した(図3)。また、西アフリカ型のゲノム RNA を用いて検出感度を比較したところ、Set A, B に比べ、Set D では感度が数倍低下していることが明らかとなった(図4)。

2. 「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

今後増加することが予想されるダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立するため、はじめに遺伝子検出系として TaqMan リアルタイム RT-PCR 法の確立を目指した。Schwaigar らの論文(Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003)よりプローブ・プライマーを増幅し、ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム RNA を鋳型にリアルタイム RT-PCR 反応を行った。ウイルスゲノムの増幅が確認され、リアルタイム RT-PCR 系が機能することが確認された(図5)。次にダニ媒介性ウイルスに対する抗体検出系の確立を目指した。TestLine 社の IgM および IgG ELISA キットを用い、2016 年に北海道で発生した患者の血清について抗体価を調べた。キットの取扱説明書に従い、Index が 0.9 未満を陰性、0.9 から 1.1 を判定保留、1.1 以上を陽性とした。患者検体について、IgM は 5.73、IgG は 3.25 であり、いずれも陽性と判断された。また、同時にフラビウイルス感染症疑い患者の血清について試験したところ、IgM が 0.36-0.40、IgG が 0.09 といずれも陰性と判断された。また、上記陽性検体について、中和試験を行なったところ、中和力価は 2560 倍と明らかな陽性を示した。一方、上記陰性血清については 10 倍以下と中和抗体陰性と判断された。

D . 考察

1. 「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」近年、黄熱の流行

がアフリカや南米でたびたび発生している。日本での流行は考えにくい、渡航者による輸入感染症例が発生する可能性はおおいにある。そのためにも、黄熱の実験室診断法を再確認・再評価しておく必要がある。病原体検出マニュアルにある遺伝子検査法がコンベンショナル RT-PCR 法と古典的手法であったため、改訂も考慮し、TaqMan 法の確立を目指した。今回、4 種類のプローブ・プライマーセットを試したが、2 つは遺伝子型に特異的であること、もう 2 つは型共通セットとして使用可能であることが確認された。これらのうち、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。

2. 「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

2016 年に 20 年以上ぶりに国内で患者が確認されたダニ媒介性脳炎であるが、北海道にダニ媒介性脳炎ウイルスが蔓延しているのは確かであり、今後患者が増加する可能性がある。そのためにも実験室診断法の確立は急務であった。今回我々は、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、今回示してきた検査法を各地方衛生研究所や保健所、検疫所でも実践できるようにするため、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。

E . 結論

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。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Taira M, Ogawa T, Nishijima H, Yamamoto K, Hotta C, Akita M, Tajima S, Saijo M. The first isolation of Zika virus from a Japanese patient who returned to Japan from Fiji in 2016. *Jpn J Infect Dis* 70:586-589, 2017.
2. Hashimoto T, Kutsuna S, Tajima S, Nakayama E, Maeki T, Taniguchi S, Lim C-K, Katanami Y, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Ohmagari N. Importation of Zika virus from Vietnam to Japan, November 2016. *Emerg Infect Dis* 23:1223-1225, 2017.
3. Katanami Y, Kutsuna S, Taniguchi S, Tajima S, Takaya S, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Kato Y, Ohmagari N. Detection of Zika virus in a traveler from Vietnam to Japan. *J Travel Med* 24:tax031, 2017.
4. Suzuki T, Kutsuna S, Taniguchi S, Tajima S, Maeki T, Kato F, Lim C-K, Saijo M, Tsuboi M, Yamamoto K, Morioka S, Ishikane M, Hayakawa K, Kato Y, Ohmagari N. Dengue virus exported from Cote d'Ivoire to Japan, June 2017. *Emerg Infect Dis* 23:1758-1760, 2017.
5. Tsuboi M, Kutsuna S, Maeki T, Taniguchi S, Tajima S, Kato F, Lim C-K, Saijo M, Takaya S, Katanami Y, Kato Y, Ohmagari N. Dengue virus type 2 in travelers returning to

Japan from Sri Lanka, 2017. *Emerg Infect Dis* 23:1931-1933, 2017.

6. Hashimoto T, Kutsuna S, Maeki T, Tajima S, Takaya S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. A case of dengue fever imported from Burkina Faso to Japan in October 2016. *Jpn J Infect Dis* 70:675-677, 2017.

学会発表

該当なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

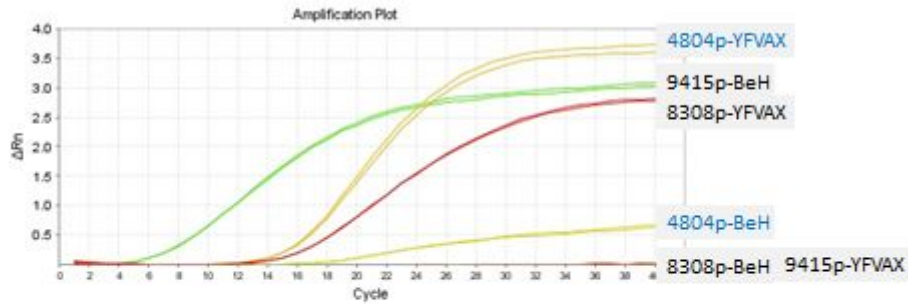
該当なし

表1 黄熱ウイルスゲノム検出用TaqManプライマー・プローブセット

Primer	Name	Sequence
Set A	YF-8280F	TCCACTCATGAAATGTACTACGTGTCT
	YF-8354C	GGAGGCGGGATGTTTGGT
Set B	YF-4769F	TTGATTCCATCTTGGGCTTC
	YF-4862C	GGACCTCTTCCTCTCCATCC
Set C	YF-9393F	CAGGTGGGAAAGCTTACATGG
	YF-9453C	CACCTGCCCCGGATCCTCT
Set D	YFcom-4769F	TTGRTTCCATCYTGGGCYTC
	YFcom-4862C	GGACCTCYTCYTCHCCATCC
Probe		
Set A	YF-8308FAM	AGCCCGCAGCAATGTACATTTACTGT
Set B	YF-4804FAM	TGTCGCCTATGGTGGCTCATGGAAG
Set C	YF-9415FAM	TGTCATAAGCCGGCGGGACCA
Set D	YFcom-4803FAM	TKGTBGCCTATGGTGGCTCATGGAAGCTG

表2 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム検出用TaqManプライマー・プローブセット

Primer	Sequence	Probe	Sequence
F-TBE 1	GGG CGG TTC TTG TTC	TBE-Probe-WT	FAM-TGA GCC ACC ATC
	TCC		ACC CAG ACA CA-TAMRA
R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT		
	GTC AGA CT		



*Thermo
Fast Virus 1-Step
Master Mix
使用

Primer-Probe set	YF-VAX (17D)	BeH655417
A (8308p)	14.3	ND
B (4804p)	13.4	19.0
C (9415p)	ND	5.5

図1 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 (1)

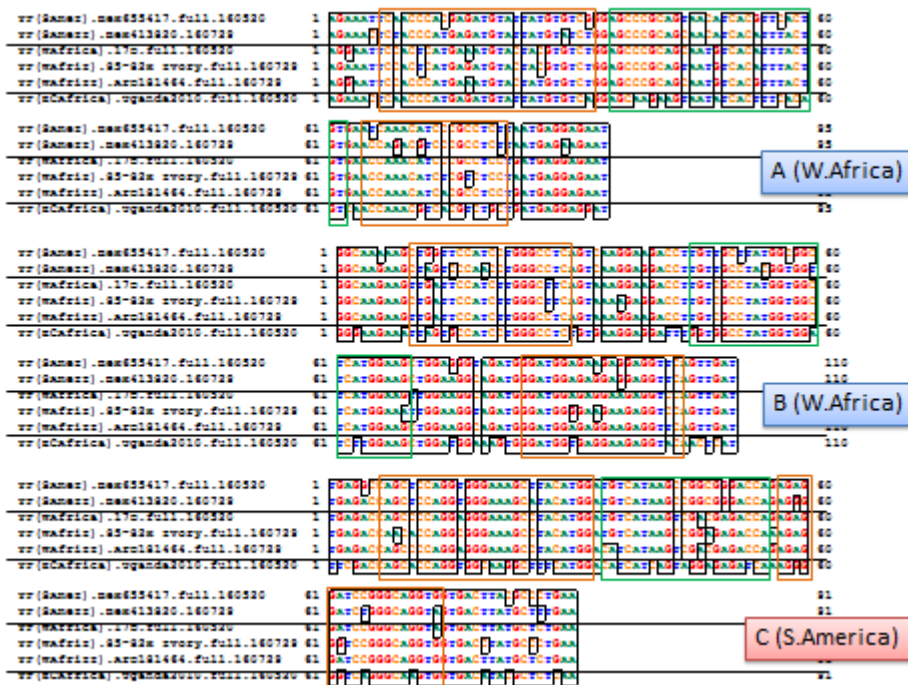


図2 黄熱ウイルスゲノムのプライマー・プローブ部位の配列比較

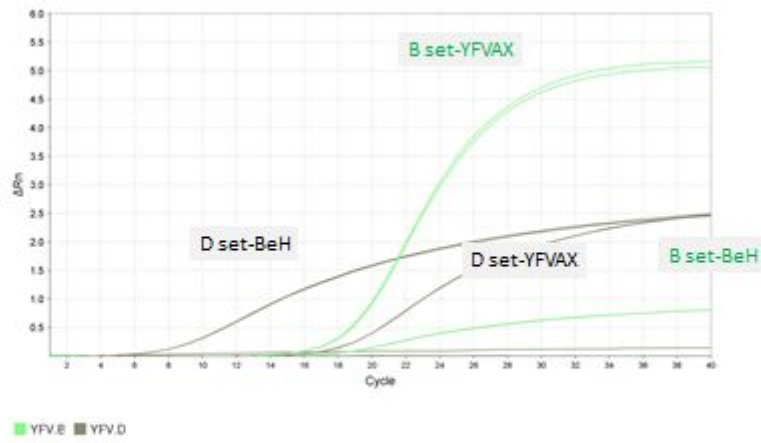


図3 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 (2)

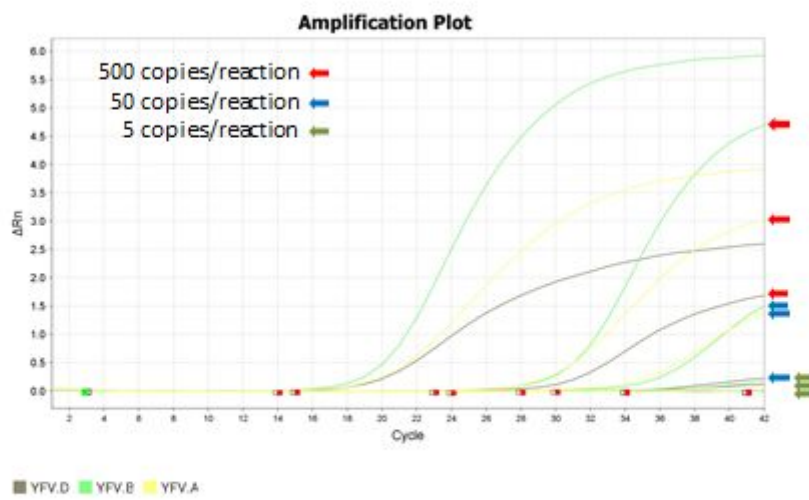


図4 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 (3)

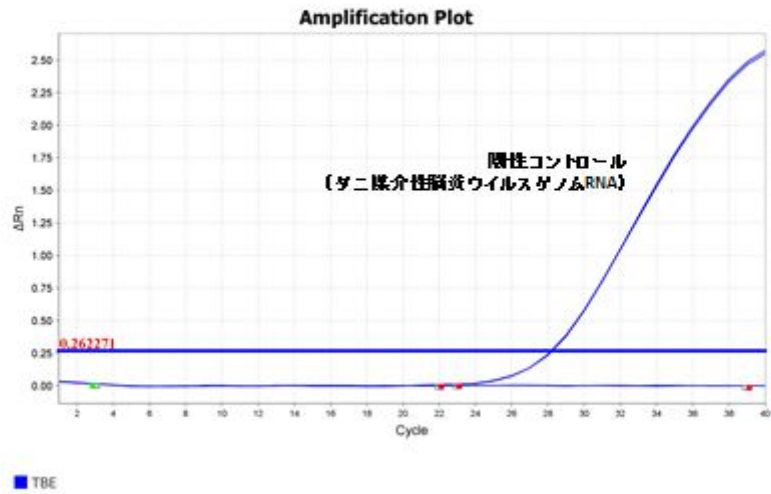


図5 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム検出系の検討

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2017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
平良雅克 千葉県衛生研究所
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
戸梶彰彦 高知県衛生研究所
御供田睦代, 山本真美 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
佐藤寛子 秋田県健康環境センター
大橋典男, 川森文彦 静岡県立大学

研究要旨 日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病を検出可能なDuplex Real time PCRについて臨床検体を用いてリ多施設間評価を実施、成果を学術誌に投稿、採択された。今後のラボスクリーニングが飛躍的に改善することが期待される。また、前年度と同様、全国情報の共有やブロック研修会に協力した。

A. 研究目的

つつが虫病, 日本紅斑熱などリケッチア症は, 国内感染患者が多数報告され, 死亡例, 重症化例もいまだ発生する。発生時期やつつ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。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することは, 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。

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験室診断系の

質的標準化, 疫学情報の発信, 相互信頼と連携, 機能強化を目的とする。

B. 研究方法

1. 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 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, 既報の conventional nested PCR との感度比較を精査するとともに, 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, 複数の検出機器 (ABI7500, ABI StepOnePlus, Lightcycler 480, Lightcycler Nano)ならびに試

薬 (Premix Ex Taq (Perfect Real Time), LightCycler Probes Master)を組み合わせ、臨床検体への適用性について検討した。

2. リケッチア症に関する国内情報収集

地衛研の年報等は、地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多い。施設間情報共有のための資料収集とリスト化を試みた。

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、ブロック会議等を通じ、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とお互いの顔が見えるつながりの構築を図った。

(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、核施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱い規則に従って実施した。

C. 研究結果

1. 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 の地方衛生研究所での検討

臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は、既報の conventional nested PCR と比較し、同等以上の検出結果を示した(表1)。また、供試した検出機器並びに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(data not shown)。しかしながら、血清抗体価の上昇を確認しえた症例のなかで、一部いずれの遺伝子検出系でもリケッチアの遺伝子を検出できない症例も認められた。

2. リケッチア症に関する国内情報収集(表2)

地衛研の年報等は、地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多いことから、全国の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。現在では国内で認められ

ない発疹チフスに関する情報を含め、一般の学術誌では認められない情報、また、ライム病をはじめ、リケッチアと同様に節足動物によって媒介される様々な感染症に関する情報が網羅されていた。

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い、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。また、九州ブロックにおいて開催された地方衛生研究所のリケッチア診断技術研修会(7/24-26、鹿児島県環境保健センター)の取り組みに協力、参加した。

D. 考察

より詳細な評価を行えた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 は、既存の PCR と遜色ない検出感度を示した。このことから、本法が学術誌に掲載されることは、国内のダニ媒介感染症の多様化する中、*R. japonica*, *R. heilongjiangensis*, *R. tamurae*, *R. helvetica*等の国内の紅斑熱群リケッチア症の多様性やつつが虫病 *Orientia* の多様性(最低6型)が増す中、輸入感染症(*O. tsutsugamushi*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. australis*, *Cand. R. indica*等)も検出可能であることから、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。

しかしながら、遺伝子検出系の改善・構築により多くの衛研での検査実施の可能性が広がるものの、PCRの検体としてもっとも有効な刺し口が見つからないなど一部の症例ではなお血清診断に頼らざるを得ない症例も存在する。これらも含め、リケッチア関連疾患実験室診断の

体系的な構築はなおも改善の余地があり、今後他の関連疾患も含めた検査体制作りと情報の整理、各機関の密な連携が必要と考えられる。

E. 結論

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も、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。今後、リケッチア性疾患とその他の関連疾患の実験室診断のより効果的な体系化のために、既存のリケッチア関連疾患実験室診断の体系化、検査機関情報の更新(リケッチアの検査に関する情報の更新と臨床現場への還元)、課題の洗い出しを継続検討していく。

F. 健康危険情報

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る。

G. 研究発表

論文発表

1. Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, Monma N, Ikegaya A, Yamamoto S, Fujita H, Morita H, Tamaki Y, Su H, Shimada M, Takamoto N, Shimamura Y, Masuda S, Ando S, Ohashi N : Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple

Laboratories in Japan. Japanese journal of Infectious Diseases. (in press)

2. 佐藤寛子、村井博宜、石田晋之介、藤田博己、安藤匡子、安藤秀二：秋田県のマダニ刺咬 3 症例における紅斑熱群リケッチア感染の検索。衛生動物学雑誌(印刷中)
3. 安藤秀二：リケッチア、中込治監修、神谷茂・錫谷達夫編集 標準微生物学 第 13 版、p262-270, 2018 年
4. 安藤秀二：発疹チフス epidemic typhus. 特集「グローバル化・温暖化と感染症対策」、小児科臨床増刊号、vol. 70: 2261-2266, 日本小児医事出版社、東京、2017 年

学会発表

1. 佐藤寛子、藤田博己、安藤秀二：秋田県のツキノワグマと刺咬マダニのリケッチア検索。第24回リケッチア研究会、2017年12月2-3日、東京
2. 木下一美、安藤秀二、砂川富正、大石和徳：感染症発生動向調査における「つつが虫病」と「日本紅斑熱」届出報告の検討。第24回リケッチア研究会、2017年12月2-3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

表1

Detection assays of *O. tsutsugamushi* (Ot) and *R. japonica* (Rj) DNAs from febrile patients by Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and serological tests in 6-endemic prefectures of Japan, 1997-2016

Location (year)	Total nos. of febrile patients tested	Laboratory tested ¹⁾	Ot				Rj				Ot-Rj-duplex real-time PCR	Range of Cq value	
			Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs ²⁾	Serological test of IFA ³⁾ or IPA ⁴⁾	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) ⁵⁾	Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs ²⁾		Serological test of IFA ³⁾ or IPA ⁴⁾			Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) ⁵⁾
								Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of positive/patients tested (%)				
Akita (1997-2015)	33	秋田県	33/33 (100)	33/33 (100) ⁶⁾	18/33 (55%) ⁶⁾	33/33 (100)	0/33	NT ¹⁰⁾	NT	NT	0/33	24.4-37.7	
Fukushima (2010-2013)	67	福島県	64/67 (96)	67/67 (100) ⁶⁾	67/67 (100) ⁶⁾	67/67 (100)	0/67	NT	NT	NT	0/67	21.6-41.0	
Shizuoka (2010-2016)	28	静岡県	18/28 (64)	18/28 (64)	21/28 (75) ³⁾	21/28 (75)	3/28 (11) ⁸⁾	NT	NT	3/28 (11)	4/28 (14)	27.9-40.0	
Wakayama (2008-2012)	22	静岡県	3/22 (14)	3/22 (14)	3/22 (14) ³⁾	3/22 (14)	9/22 (41)	5/22 (23)	5/22 (23)	12/22 (55) ⁹⁾	12/22 (55)	21.3-40.1	
Miyazaki (2008-2009)	28	静岡県	11/28 (39)	11/28 (39)	11/28 (39) ³⁾	11/28 (39)	7/28 (25)	2/28 (7)	2/28 (7)	9/28 (32) ³⁾	9/28 (32)	22.6-41.0	
Subtotal ⁷⁾			129/178 (72)	132/178 (74)	120/178 (67)	135/178 (76)	16/50 (32)	7/50 (14)	7/50 (14)	21/50 (42)	21/50 (42)		
Hiroshima (2013-2015)	139	HPTRI	6/139 (4) ⁸⁾	6/33 (18)	2/13 (15) ³⁾	6/139 (4)	55/139 (40) ⁸⁾	12/31 (39)	54/102 (53)	4/13 (31) ³⁾	56/139 (40)	22.0-37.9	
Total	317		135/317 (43)			141/317 (44)	74/317 (23)				81/317 (26)		

¹⁾ Conventional PCRs were performed by the procedures of previous studies: Ot-nested PCR (9, 13), Rj-double PCR (10), and SFGR-double PCR (6).
²⁾ Assayed by indirect immunofluorescent assays (IFA; potentially positive of more than 40 antibody titer).
³⁾ Assayed by indirect immunoperoxidase assays (IPA; potentially positive of more than 80 antibody titer).
⁴⁾ Final results of rickettsiosis determined by a combination of Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and/or serological tests (IFA or IPA).
⁵⁾ Ot-nested PCR was done by some modifications to improve the low detection efficiency of *O. tsutsugamushi* Shimokoshi strain as described previously (first-step PCR and the PCR was run with the 3 primers).
⁶⁾ An alternative degenerate primer (10m2: 5'-CCDCCTCAGCTAMTATATGCCC-3') instead of 11' primer in Table 1 was used for second-step PCR.
⁷⁾ The subtotal consisting of confirmed cases of rickettsiosis was obtained for statistics analysis as shown in Table 5.
⁸⁾ Ot-Rj-duplex real-time PCR was used for diagnosis in clinically suspected cases of rickettsiosis.

Instrument:

- ABI7500
- ABI StepOnePlus
- LightCycler 480 (Roche)
- LightCycler Nano (Roche)

Reagents:

- Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TAKARA BIO)
- LightCycler 480 Probes Master (NIPPON Genetics)

表2

年報名	No.(年数)	タイトル
北海道立衛生研究所報 (1951~2016)	04(1954)	腸管チフス
	07(1957)	ネズミシラミ
	08(1958)	北海道1956年恙虫
	08(1958)	北海道の新しい恙虫種
	08(1958)	札幌島のシラミ類
	09(1959)	札幌島野鼠の吸血性外部寄生虫相
	09(1959)	北海道リス上科のシラミ類
	09(1959)	北海道吸血性昆虫類(7)
	09(1959)	恙虫幼虫の真実ネコツツガムシ
	10(1960)	北海道野鼠類
	10(1960)	恙虫幼虫の真実 遠産Miyazaki群及びAutumnalis群
	11(1961)	エンシカ
	11(1961)	北海道ナキウサギのツツガムシおよびシラミ
	11(1961)	北海道吸血性昆虫類2
	11(1961)	北海道吸血性昆虫類3
	12(1962)	Rickettsia orientalisの免疫1
	13(1963)	北海道の野鼠と体外寄生虫よりリケッチア分
	13(1963)	北海道新記録のツツガムシの一種 Ascoschoenastia sp.について
	14(1964)	Rickettsia orientalisの免疫2
	14(1964)	北海道における鼠害
	15(1965)	エゾモモンガ (Peromyscus volans orii) の害類
	16(1966)	北海道における野鼠寄生マダニ類
	17(1967)	Ritt Valley熱の第1編
	17(1967)	Ritt Valley熱の第2編
	17(1967)	Ritt Valley熱の第3編
	17(1967)	北海道野鼠類2
	18(1968)	北海道における食品昆虫類記録(1959~1967)
	18(1968)	北海道における不快動物発生例
	18(1968)	北海道における野鼠寄生シラミ類
	18(1968)	北海道における野鼠寄生トグダニ類
	18(1968)	北海道に発生した野鼠病
	19(1969)	北海道のネズミに寄生するケモチダニ
	20(1970)	家屋寄虫
	20(1970)	佐野野鼠シラミ力
	20(1970)	北海道カリネズミ寄生シラミ類
	21(1971)	野鼠害類に関する知見補遺10
	21(1971)	北海道野鼠害目録
	22(1972)	北海道野鼠害目録2
	23(1973)	東北地方北部における野鼠のシラミ類
	23(1973)	北海道におけるシラミダニ
	23(1973)	野鼠害類公園における野鼠の外部寄生虫類
	29(1979)	アカネズミ類の飼育と実験動物化
	30(1980)	北海道小哺乳類の外部寄生虫類
	31(1981)	北海道における恙虫病調査小哺乳類からの恙虫病リケッチア分離
	32(1982)	北海道におけるカマムラサキとツツガムシ分布
	35(1985)	エナシ外部寄生虫
	35(1985)	道産野ネズミのツツガムシ病リケッチア株
	38(1988)	美瑛管内動物によるツツガムシの生活史の研究3
	40(1990)	Cases of Erythema and Lyme Disease Associated with Tick Bite in Hokkaido, Japan
	41(1991)	森林作業者のマダニ刺咬と Borrelia burgdorferi に対する抗体
	42(1992)	Antigenic Properties of Borrelia burgdorferi Isolated in Hokkaido
	42(1992)	Serological Survey for Lyme Disease Sika Deer
	43(1993)	北海道におけるアタマシラミ
	46(1996)	エンシカ寄生マダニ類

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 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 松岡由美子(熊本市環境総合センター)
金成篤子(福島県衛生研究所)
濱崎光宏(福岡県保健環境研究所)
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、
大阪健康安全基盤研究所、愛媛県立衛生環境研究所、
福岡県保健環境研究所

研究要旨 地方衛生研究所における手足口病検査に関わる外部精度評価(EQA)の実施可能性について検討するためにエンテロウイルスレファレンスセンターと連携し12か所を対象に実施した。

その結果、EQA実施前に送付試料の質の確認検査ができ、技術的な課題を検討するため、ネットワークの維持は重要であると認められた。

感染症検査における結果は総合的な解釈が必要であり、多角的に問題を分析することが求められる。かつては経験豊かな職員により地方衛生研究所内のon the jobで行われていたが、すでに多くはリタイアしており人材確保が困難な状況である。このため、ブレインストーミングで行うグループワーク研修を実施し、一定の効果が認められた。同時にファシリテーターの確保、ブレインストーミング用教材が必要であると考えられる。このため過去の検査上の問題解決事例を収集し、事例集を作成した。

A. 研究目的

感染症発生動向調査事業のなかで 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、無菌性髄膜炎は臨床診断による届け出を基本とし、病原体の検索は各自治体、地方衛生研究所の積極的疫学調査、あるいは調査研究により実施してきた。このため検査の実施、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た経緯がある。

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。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では、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て

いる。

全国調査において小児科定点における患者報告数とエンテロウイルスの検出数を関連づけるためには、検体提出数のみならず、検出率を考慮することとなる。検出率は検体の質(量、保管条件等)、種類(糞便、咽頭ぬぐい、髄液等)にも影響されるが、検査方法の感度も重要な要因である。これまでエンテロウイルスの施設間の検査方法の感度に関して把握は行われておらず、標準試料を用いた評価法を確立する必要がある。初年度は外部精度管理班(平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金・健康安全・危機管理対策総合研究事業「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」と連携のもと、ウイルス核酸増幅法の検出感度について施設間比較を行うためウイルス RNA 試料の輸送、保管時の安定化条件を検討した。2 年目はレファレンスセンターを活用し、統一 RNA 試料を用いて施設間における検出感度の比較を行うこととした。本研究ではレファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施について検討している。

また検査の質を担保するためには方法の標準化が必要である。法改正に伴い「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」にて検査に関わる標準作業書の策定が求められることとなったが、他に人材開発やマネジメントなどや包括的な取り組みが必要である。施設内で PDCA サイクルにより検査の質の改善を図るには、検査実施上の問題分析と対策立案がポイントとなる。このため分析手法には、産業界で広く導入実績のある特性要因分析図をブレインストーミング方式で作成、各要因に対する対策を検討するグループワーク研修のパッケージ化を試みた(地域保健総合推進事業と連携、平成 29 年度地域保健総合推進事業

「地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に求められる感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化」)。そして本研究では研修に必要と認められる教材を検討することとした。

B. 研究方法

1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施

本分担研究はネットワークの活用について研究を目的とし、技術的な内容とは区別している。外部精度管理班と連携のもとエンテロウイルスレファレンスセンターとともに初年度条件検討した市販 RNA を、12 地方衛生研究所に配布し、CODEHOP-snPCR の検出感度と反応条件(逆転写、1stPCR,2ndPCR)の違いについてアンケートを行った(データの詳細は「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」分担報告書)。

2. 検査の質改善のための問題分析手法の検討

1) 検査実施上の事例集の作成

標準作業書作成時の参考資料、また問題分析と対策立案を目的とした特性要因分析に関するグループワーク研修用の教材として、事例集の作成を企画した。このため事例集の内容、及びグループワーク研修運営時の課題整理のためのワークショップは 2017 年 6 月 27 - 28 日に開催し、教材、問題分析法の検討、ブレインストーミングの実施上の課題の整理を行った。特性要因分析にグループワーク研修開催のために上記の事前ワークショップを行った(資料 1)。

2) グループワークによる問題分析と対策立案

を目的とした研修パッケージ

問題分析と対策立案能力の開発を目的とした研修パッケージを検討した。まず問題分析に用いた手法はQCツールの中の特性要因分析である。主な要因を4M (material, method, man, machine) プラス1E(environment)に分類。次に各要因の解決法、検証法についてブレインストーミング形式で検討。検討結果を「病原体等検査の業務管理要領」および施行規則第7条の3第8項で求められる各種技術文書との関係とリンクさせることを目的とした。

事前WSを踏まえ地域保健総合推進事業九州ブロックレファレンスセンター連絡会議にてグループワークによる問題分析と対策立案を目的とした研修を実施した(2017年10月24日)。

グループワークはファシリテーター(松岡、濱崎、吉田)と、各グループ(5名)で実施。検討結果についてはグループ発表とし、最初に発表者と書記を設定。ファシリテーターの進行のもと、あらかじめ準備した事例について分析を行った。参加者の意見はポストイットノートで書き出し、特性(問題点)を各要因に分類、要因の原因を分析。次に、改善すべき手段、検証方法について、参加者間で検討を行い、グループ発表を行った。

また事後アンケートにより評価を行った(詳細は、平成29年度地域保健総合推進事業「地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に求められる感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化」報告書を参照)。

このように本分担研究では、問題分析、対策立案の研修法とその教材開発を目的としている。

C. 研究結果

1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルスEQA実施

レファレンスセンターと連携することで輸送条件、反応条件の検討、追加データの収集などEQA実施上の詳細について検討を行うことができた。なおEQA試行調査では12施設は逆転写、1stPCR、2ndPCR各反応で異なる酵素を組み合わせることで反応を行っていることが判明した。検出感度を比較したところ最低限の検出感度は担保されていたが、施設間で最大100倍の差があることが判明した。

2. 検査の質改善のための問題解決手法の検討

1) グループワーク開催のための事前ワークショップと教材開発

「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」では各施設の検査体制に応じて標準作業書作成することを想定している。基本はマニュアルなど成書を参考に作成することとなるが、検査実施上、重点的に管理すべき項目などは検査体制にあわせる必要がある。しかし、経験の浅い検査担当者にとり、作業書作成は困難であることが想定される。また、上記の問題分析と対策立案能力開発を目的としたグループワークを実施する場合、課題の設定が必要である。このため経験則を踏まえた事例集を作成することとした。

4名の参加者による事前ワークショップ(2017年6月27-28日)により事例集は、PDCAサイクルに沿って計画、実施、検証、行動のストーリー構成で作成することとした(資料1)。一部の教材は州ブロックレファレンスセンター連絡会議で活用した(資料2 事例集の目次のみ報告書に記載。詳細な資料は分担研究者から配布可能です)。

また事前ワークショップを通じて、グループワークで準備すべきもの(付箋、ホワイトボード、

筆記具)、ファシリテーターの役割、時間配分などを確認できた。

2) グループワークによる問題分析と対策立案を目的とした研修パッケージ

特性要因分析である。主要要因を 4M (material,method,man,machine) プラス 1 E(environment)が製造業では用いられるが、感染症検査では「検体」も特性(問題)に与える重要な要因であると考えられる。このため 4M + 1E 法は状況にあわせ適宜要因を変更することが適切と考えられた。

しかし継続的に行うためにはファシリテーターの ToT 研修(Training of Trainers)と教材の開発の必要性が認められた。

D. 考察

1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施

エンテロウイルス検査は各施設で用いる試薬等が異なるため、施設間で一律の比較は難しく、あらかじめウイルス力価と対応する検出感度の範囲を設定し、基準値内に収まるかどうかを確認すること、そして施設内では、自施設の検査系の妥当性を確認するためインハウスコントロールで同様に検出感度の幅を設定することが適当である。エンテロウイルスレファレンスセンターと連携により条件検討を行った。また EQA 実施前に送付試料の質の確認検査ができた。この様に多施設間の技術的な課題を検討するため、ネットワークの維持は重要である。

2. 検査の質改善のための問題解決手法の検討

地方衛生研究所における感染症検査に関する人材開発の問題は既に地方衛生研究所全国協議会の報告(第3回 厚生科学審議会感染症部会 参考資料 1)などで指摘されてい

るが、実技研修に関する取り組みに限られている。感染症法改正に伴い、これまで明示されていなかった検体検査が法定化されたことにより、検査の質を担保する必要がある。このため人材教育は重視されるが、多くの自治体、地方衛生研究所では、いわゆるベテラン層が退官しており、施設内で on the job で取り組むべき指導層が大幅に減少している現状がある。感染症検査は、流行状況などの疫学背景、臨床像、など検体採取前の背景を踏まえて総合的に検査結果を解釈する必要があり、ルーチン検査でも常に思考訓練が望まれる。このため問題解決能力開発を目的としたグループワーク研修を試みた。事後アンケートの結果、参加した検査担当者はブレインストーミング形式により、問題解決のために多様な方法があることを認識する機会として有用であることが認められた。また施設内検査における標準化の意義、検査フローの中で重点項目の管理についても一定の理解を得ることができたと考える(平成 29 年度地域保健総合推進事業「地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に求められる感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化」報告書)。

今般、グループワーク研修の教材、標準作業書作成時の参照資料として活用すべく事例集は試行的なものを作成した。主にウイルス検査上の事例について、交差汚染、PCR検査、シーケンスなどの課題を収集し、PDCAサイクルに合わせて過去の事例を整理した。次年度以降、さらに多くの事例収集をしていく方法を検討する。

グループワーク開催にあたり事前WSで特性要因分析を検討したが、こうした問題分析、解決法に関する研修を行うならばファシリテーターの育成が必要である。

E. 結論

1) エンテロウイルスレファレンスセンターを活用した手足口病検査EQAを実施した。エンテロウイルスレファレンスセンターと連携することで送付試料の条件検討を行うこと、またEQA実施前に送付試料の質の確認検査ができた。この様に技術的な課題を検討するため、ネットワークの維持は重要である。

2) 感染症検査における結果は総合的な解釈が必要であり、多角的に問題を分析することが求められる。かつては経験豊かな職員により地方衛生研究所内のon the jobで行われていたが、すでに多くはリタイアしており人材確保が困難な状況である。このため、ブレインストーミングで行うグループワーク研修を実施し、一定の効果が認められた。

3) グループワーク研修実施には、ファシリテーターの確保、ブレインストーミング用教材が必要であると考えられる。このため過去の検査上の問題解決事例を収集し、事例集を作成した(資料 2 事例集の目次のみ報告書に記載。詳細な資料は分担研究者から配布可能です)。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 吉田弘. 環境水サーベイランスの意義並びに実態から見える予防医学に関わる知見. 東京小児科医会報 36(1):26-30, 2017

2. 吉田弘, 高橋雅輝, 濱崎光宏, 山下育孝, 四宮博人, 山下照夫, 皆川洋子, 岸本剛, 調恒明. エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原体検出情報. 38(10):199-200, 2017.

学会発表

1. 吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書と精度管理のあり方について」平成 29 年度 地域保健総合推進事業 地全協関東

甲信静支部レファレンスセンター連絡会議. 10月11日, 2017年, 千葉市

2. 吉田弘「改正感染症法における標準作業書と検査の信頼性確保について」平成 29 年度 地域保健総合推進事業 地全協九州支部レファレンスセンター連絡会議. 10月24日, 2017年, 熊本市

3. 吉田弘. 改正感染症法における検査標準作業書の精度管理の在り方について. 平成 29 年度 地域保健総合推進事業 地全協中国四国支部レファレンスセンター連絡会議. 11月8日, 2017年, 岡山市

4. 吉田弘. 改正感染症法における病原体検査の信頼性確保について. 平成 29 年度 地域保健総合推進事業 地全協東海北陸支部レファレンスセンター連絡会議. 11月10日, 2017年, 名古屋市

5. 帖佐徹, 吉田弘, 滝澤剛則. 環境水サーベイランス手法の中国への導入について. 第 76 回日本公衆衛生学会. 10月31-11月2日, 2017年, 鹿児島市

6. 吉田弘, 筒井理華, 堀田千恵美, 小澤広規, 滝澤剛則, 中田恵子, 世良暢之, 濱崎光宏. 環境水サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題. 第 76 回日本公衆衛生学会. 10月31-11月2日, 2017年, 鹿児島市

7. 濱崎光宏, 世良暢之, 吉田弘. 環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生动向調査事業の患者数との関連について. 第 76 回日本公衆衛生学会. 10月31-11月2日, 2017年, 鹿児島市

8. 帖佐徹, 吉田弘, 板持雅恵, 滝澤剛則, Zhang Yong, Xiaohui Hou, Zheng Huanying, Wang Haiyang, Tao Zexin. Collaboration study of environmental surveillance for polio since 2005 between Japan and China グローバルヘルス合同大会. 11月24-26日, 2017年, 東京

9. 松岡由美子, 岩永貴代, 杉谷和加奈, 矢坂多佳子, 阿蘇品早苗, 西澤香織, 吉田弘.

熊本市環境総合センターにおける病原体検査の質管理の取り組み.第31回公衆衛生情報研究協議会 1月 25-26 日.2018 年、和光市.

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

関連する研究及び事業報告書

1)平成 29 年度地域保健総合推進事業「地方

衛生研究所の連携事業による健康危機管理に求められる感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化」、関東甲信静、九州、中国四国、東海北陸ブロック地域レファレンスセンター連絡会議報告書

2)平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「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」分担研究報告書「感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査(EQA)導入の研究」

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・風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 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室長 森 嘉生

研究要旨 麻疹および風疹は天然痘、ポリオに続きWHOが排除を目指している感染症であり、各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ウイルス株の鑑別が求められている。本研究では地方衛生研究所における検査状況を把握するため、アンケートにより検査実績を調査した。麻疹については2017年に報告された症例に対して遺伝子型解析まで行われた例が多かったのに対し、風疹は非常に少なかった。これは2017年時点では風疹については全例の遺伝子検査が求められていなかったことに起因すると考えられる。また、どちらの検査もおよそ80%の症例にリアルタイムRT-PCRが使用されており、本法の普及が進んできたものと考えられた。また、遺伝子検査に陽性コントロールとして用いる参照RNAについて、麻疹風疹のいずれも改良を行った。

A. 研究目的

麻疹および風疹は天然痘、ポリオに続きWHOが排除を目指している感染症である。麻疹および風疹の排除は「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（風疹）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、各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ウイルス株の鑑別が求められている。日本ではこれに対応するために、麻疹については平成24年12月に「麻疹に関する特定感染症予防指針」を、風疹については平成29年12月に「風疹に関する特定感染症予防指針」を改定し、各疑い例に対し、原則として全例にIgM抗体検査等の免疫学的検査の実施を求めると共に、地方衛生研究所においてウイルス遺伝子の検出による病原体検査の実施を求めようになった。麻疹については平成27年にWHO西太平洋地域から排除認

定をうけることに、このことが大いに貢献したと考えられている。

これまでに地方衛生研究所における遺伝子検査に使用する参照RNAを整備し、配布を行っている。麻疹の参照RNAはコンベンショナルRT-PCRとリアルタイムRT-PCRで別々の参照RNAを用いなければならず、現場より改善の声が挙がっている。風疹の参照RNAは、遺伝子検出用コンベンショナルRT-PCR法の標的領域には外来の挿入配列があり、増幅産物のサイズで検体由来増幅産物と見分けることができ、参照RNAからのコンタミネーションの防止に役立っている。しかし、遺伝子型決定領域の標的部位については挿入配列を加えておらず、参照RNAからのコンタミネーションの判別は遺伝子配列を確認するまで不可能である。

本研究では2017年の麻疹および風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、遺伝子検査法の参照RNAの改良を行な

った。

B. 研究方法

1. 地方衛生研究所の麻疹および風疹ウイルス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、2017 年における麻疹・風疹ウイルス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. 麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査に用いる参照 RNA の改良

麻疹ウイルス RT-PCR 用のプライマー、プローブの認識部位と重ならないように外来遺伝子を参照 RNA に挿入し、問題なく検出可能か検討した。また風疹ウイルス遺伝子型決定領域にプライマー認識部位と重ならないように外来遺伝子を挿入するように合成したプラスミド DNA から RNA を転写合成し、問題なく使用できるかを検討した。

C. 研究結果

1. 地方衛生研究所の麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査実施状況

全国 74 の地衛研うち、2017 年に麻疹の検査を行った地衛研は 69 カ所、検査された症例数は 1,516 症例であった。また、麻疹の検査を実施した 69 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 51 カ所であった。1,516 症例中 1,206 症例の検査にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査された 1,516 症例のうち、麻疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は 213 症例であった（検査陽性）。213 症例のうち 185 症例で遺伝子型解析が試みられ、157 症例から遺伝子型 D8 の麻疹ウイルスが、7 症例から遺

伝子型 B3 の麻疹ウイルスが、2 症例から遺伝子型 H1 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 22 症例から検出された（表 1）。同様に風疹の検査を行った地衛研は 52 カ所、検査された症例数は 706 症例であった。また、風疹の検査を実施した 52 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 41 カ所であった。706 症例中 539 症例の検査にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査された 706 症例のうち、風疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は 12 症例であった（検査陽性）。12 症例のうち 10 症例で遺伝子型解析が試みられ、3 症例から遺伝子型 2B の風疹ウイルスが、5 症例から遺伝子型 1E の風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 1a が 1 症例から検出された（表 2）。

2. 麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査に用いる参照 RNA の改良

麻疹ウイルス RT-PCR 用のプライマー、プローブの認識部位と重ならないように外来遺伝子を参照 RNA に挿入した。作成した RNA を段階希釈し、リアルタイム RT-PCR 法で検出を行なったところ、現行の参照 RNA と同様の検出効率であることが確認された。コンベンショナル RT-PCR 法で検出を試みたところ、目的のサイズで増幅されることから今回作成した参照 RNA 候補は、リアルタイム RT-PCR 法ならびにコンベンショナル RT-PCR 法のどちらにも共通して使用できることが示された。今後はこれを大量調製して品質確認をした上で、地方衛生研究所に配布したいと考えている。

風疹ウイルス遺伝子型決定領域にプライマー認識部位と重ならないように外来遺伝子を挿入するように合成したプラスミド DNA から RNA を転写合成した。作成した RNA を

段階希釈し、リアルタイムRT-PCR法で検出を行なったところ、現行の参照RNAと同様の検出効率であることが確認された(図)。コンベンショナルRT-PCR法(遺伝子型決定領域増幅法)で検出を試みたところ、通常ウイルス由来の増幅産物より大きなサイズで増幅されることが確認された。今後はこれを大量調製して品質確認をした上で、地方衛生研究所に配布したいと考えている。

D. 考察

麻疹ならびに風疹は、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「特定感染症予防指針」によって、麻疹および風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、地方衛生研究所における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。風疹に関しては指針が改定される前の調査になるため、全例の遺伝子検査が求められていない時期での調査になることに注意が必要である。麻疹は検査された疑い1515症例のうち検査陽性だったのは14%だったのに対し、風疹疑い症例の場合には706症例のうち、2%程度であった。これは風疹を疑ってというよりは、麻疹疑い症例として検査に提出されたものを麻疹検査とあわせて実施したため、陽性率が低かったものと考えられる。

また、感染症発生動向調査による2017年の

麻疹患者報告数は189例であり、今回の調査によるとそのうち約88%で遺伝子型解析が成功したことが示唆された。一方、風疹患者報告数は93例であるが、約10%でしか遺伝子型の解析が完了していないことが示唆された。平成30年1月より風疹も地方衛生研究所における遺伝子検査が全例に求められるようになったことから、今後はこれらの検査状況に大きな変化が生じることが予想される。今後も地方衛生研究所での検査実績調査を行い、状況の確認をおこなっていききたい。

2015年より麻疹風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きる等の利点があり、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。2017年では地衛研で実施された麻疹疑い1515症例の検査のうち80%、風疹疑い706症例のうち76%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。

麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査用の参照RNAの新規候補を作成した。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るもので、これを用いることで現場での煩わしさを解消できるものと期待される。風疹については遺伝子型決定領域増幅RT-PCRでも増幅サイズで判別が可能にしたもので、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を期待される。いずれもなるべく早期に配布を行えるよう準備を進めたい。

E . 結論

アンケート調査で、地方衛生研究所74か所における2017年の麻疹および風疹の検査実態について把握を行なった。また、麻疹ならびに風疹ウイルスの遺伝子検査法の参照RNAの改良を行なった。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Mori Y, Miyoshi M, Kikuchi M, Sekine M, Umezawa M, Saikusa M, Matsushima Y, Itamochi M, Yasui Y, Kanbayashi D, Miyoshi T, Akiyoshi K, Tatsumi C, Zaito S, Kadoguchi M, Otsuki N, Okamoto K, Sakata M, Komase K, Takeda M. Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012-2013 epidemic in Japan. *Front Microbiol.* 10.3389/fmicb.2017.01513, 2017.

学会発表

1. 該当なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし

表1 地方衛生研究所における麻疹検査実績(2017年)

ブロック	検査症例数	陽性症例数	Genotype					ウイルス分離陽性数
			D8	B3	H1	A	NT	
北海道	17	1	1	0	0	0	0	0
東北・新潟	236	61	53	0	0	3	5	15
北関東・千葉・東京	342	38	34	2	1	1	0	5
神奈川・甲・信・静岡	126	14	10	3	0	1	0	2
北陸	64	6	5	0	0	1	0	1
東海	167	27	20	0	0	5	2	3
近畿	183	13	12	0	0	0	1	1
中国・四国	288	27	16	0	1	9	1	4
九州	72	10	6	2	0	1	1	2
沖縄	21	0	0	0	0	0	0	0
計	1516	198	157	7	2	21	10	33

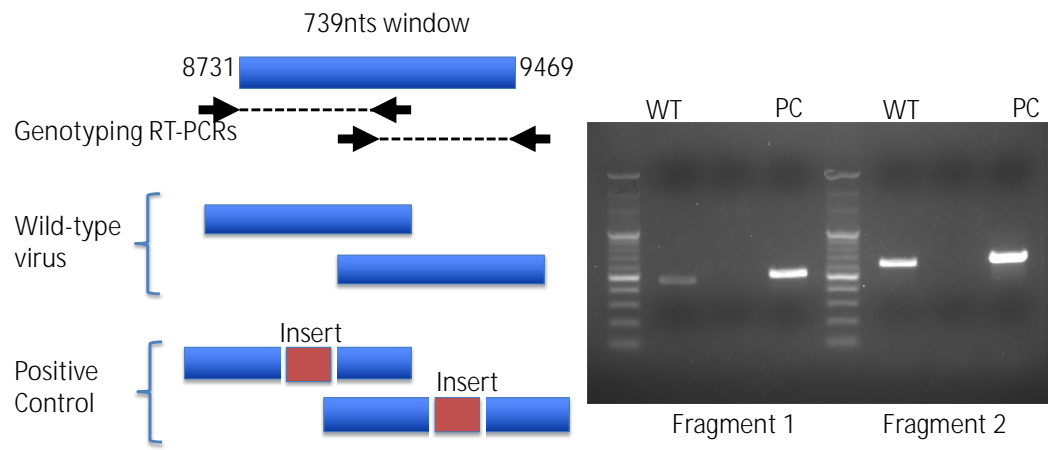
2017年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

表2 地方衛生研究所における風疹検査実績(2017年)

ブロック	検査症例数	陽性症例数	Genotype				ウイルス分離数
			2B	1E	1a	NT	
北海道	2	0	0	0	0	0	0
東北・新潟	69	1	0	1	0	0	0
北関東・千葉・東京	168	1	1	1	0	0	0
神奈川・甲・信・静岡	111	6	1	1	1	0	0
北陸	6	0	0	0	0	0	0
東海	39	0	0	0	0	0	0
近畿	143	4	1	2	0	1	0
中国・四国	135	0	0	0	0	0	0
九州	33	0	0	0	0	0	0
沖縄	0	0	0	0	0	0	0
計	706	12	3	5	1	1	0

2017年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

図 風疹ウイルス検出試験 新規ポジティブコントロール



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

パラ百日咳菌の遺伝子型別法の開発

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 大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部
文元 礼 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨 百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌について、MLVA法を用いた遺伝子型別法の開発を行った。パラ百日咳菌のゲノム情報をもとに17箇所のVNTR候補を抽出し、臨床分離株において多様性を示す4箇所のVNTRを選択した。安定性試験において、これらのVNTRは培養10継代後も繰返し数に変化を認めず、in vitroで高い安定性を示した。また、4箇所のVNTRを用いたMLVA解析により、臨床分離株34株は18種類の遺伝子型に分類され、分離年と分離地域において疫学的な関連性を認めた。以上の結果から、本法はパラ百日咳菌の遺伝子型別法として有用と判断された。

A. 研究目的

パラ百日咳菌(*Bordetella parapertussis*)は百日咳流行後期に臨床分離されることが多く、近年米国では感染例の増加が認められている。わが国では本菌の感染症例は稀であるが、2016年に東京都文京区内で発生した百日咳流行では百日咳菌とともに複数のパラ百日咳菌が臨床分離された。この百日咳流行では3症例から百日咳菌が分離されるとともに、4症例からパラ百日咳菌が分離された。3株の百日咳菌は2種類の遺伝子型(MT186, MT27a)に分類されたが、パラ百日咳菌は遺伝子型別法が開発されていないため臨床分離株の疫学的な関連性は不明であった。

近年病原細菌の遺伝子型別法として multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA 法)が開発され、菌株間の分子疫学に広く活用されている。本法はゲノム中に存在する複数の縦列反復配列(variable numbers of tandem repeats, VNTR)の繰返し数を測定し、その組合せから

遺伝子型を決定する方法である。MLVA法は百日咳菌の遺伝子型別法として世界的に用いられるが、上述の通りパラ百日咳菌ではまだ開発には至っていない。以上の背景を踏まえ、本研究ではパラ百日咳菌の新規型別法として MLVA 法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. VNTR 候補のスクリーニング

パラ百日咳菌 ATCC12822 株のゲノム情報を用いて Tandem repeats finder (Boston Univ.)によりVNTR候補のスクリーニングを行った。抽出された17箇所のVNTR候補に対しゲノム情報ならびに臨床分離株のシーケンス解析を実施し、最終的に4箇所のVNTR候補(VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15)を選択した(表1)。

2. フラグメント解析 (MLVA 解析)

4種類の蛍光色素を用いたマルチプレックスPCR反応系を構築した(表2)。PCR反応は初期変性 94 2 min, 増幅反応 98 10

sec と 68 1 min の計 35 サイクル, 最終伸長反応 72 20 min の条件で行なった。増幅産物を蒸留水で 100 倍希釈した後, その 0.5 μ L を 9 μ L の Hi-Di ホルムアルアミドと 0.5 μ L の GeneScan 600 LIZ dye standard と混合した。95 5 min の熱処理後, キャピラリーシーケンサー (ABI 3130xl) を用いて PCR 産物のフラグメント解析を行なった。

3. VNTR の安定性試験

臨床分離株 (15 株) をサイクロデキストリン加寒天培地で 10 継代した後, 加熱処理により DNA を抽出した。抽出した DNA をマルチプレックス PCR に供試し, フラグメント解析により 4 箇所の VNTR サイズを測定した。比較対照には継代 1 回目の菌体 DNA を用いた。

4. 臨床分離株の MLVA 型別

国内臨床分離株 30 株 (1970s-2016 年分離) と国外株 4 株 (台湾株 2010-2015 年, カンボジア株 2005 年) を上記の MLVA 解析に供試した。系統樹解析は minimum spanning tree 法により行なった。

C. 研究結果

1. VNTR の安定性評価

国内臨床分離株 15 株を 10 継代した後, VNTR 繰返し数の変化を調べた (図1)。その結果, すべての菌株に繰返し数の変化を認めず, *in vitro* における安定性が確認された。

2. 臨床分離株における VNTR の多様度

臨床分離株 34 株を用いて 4 箇所の VNTR について多様度を比較した (表3)。VNTR14 と VNTR15 は高い多様度 (DI, 0.632~0.635) を示し, VNTR4 と VNTR13 はやや低い多様度 (0.324~0.366) を示した。

3. 分子系統樹解析

臨床分離株 34 株を MLVA 解析に供試し, 4 箇所の VNTR 繰返し数の組合せから系統樹を作成した (図2)。国内臨床分離株 30 株と

国外株 4 株は 18 種類の遺伝子型に分類され, 2010 年に都内港区で分離された 3 株は同じ遺伝子型を示した。同様に 1970 年代に分離された国内株 7 株は互いに近縁関係にあることが判明した。一方, 2016 年に都内文京区で分離された菌株は 4 株中 2 株が同じ遺伝子型を示し, 台湾株は 3 株中 2 株が近縁な遺伝子型を示した。

D. 考察

本研究ではパラ百日咳菌の分子疫学として新規 MLVA 法の開発を行なった。ゲノム情報から選択した 4 箇所の VNTR は *in vitro* で安定であるとともに, 臨床分離株において多様性が認められた。これらの VNTR を用いた MLVA 解析では臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類され, 分離年と分離地域で疫学的な関連性が認められた。

近年米国ではパラ百日咳菌の感染例が増加し, 2014 年にミネソタ州南東部では本菌によるアウトブレイクが発生している。パラ百日咳菌は百日咳菌と同様な咳症状を引き起こすが, これまでタイピング法が開発されていなかったため流行株に関する知見は得られていない。今回開発を行なった MLVA 法では臨床分離株に疫学的な関連性が認められたことから, 本法はパラ百日咳菌の新規型別法として有用と判断された。ただし, 解析株が 34 株と少なかつたため, 今後解析株数を増やす必要がある。パキスタンではパラ百日咳菌の分離症例が多いことから, 現在同国の共同研究者に本菌の入手を依頼しているところである。

E. 結論

近年増加傾向にあるパラ百日咳菌について新規の遺伝子型別法を開発した。本法により臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類されたことから, パラ百日咳菌の遺伝子型別

に適用可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. Emerg Infect Dis. 23(4):699-701, 2017

G. 研究発表

論文発表

1. Moriuchi T, Vichit O, Vutthikol Y, Hossain MS, Samnang C, Toda K, Grabovac V, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K, Kamachi K. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. Int J Infect Dis. 62:56-58, 2017.
2. Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. PLoS One 12(7):e0181181, 2017.
3. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N,

学会発表

1. 神谷元, 蒲地一成. 2016年の百日咳流行とその細菌学的解析. 第91回日本細菌学会総会. 3月27-29日, 2018年, 福岡.

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. 標的とする4種類のVNTR

VNTR	VNTR locus name	Size (bp)	Repeat sequence	Genome coordinate	Target gene	Ref.
VNTR4	BPP ₈₀₆	12	AAGGGCAAGGAC	806614	BPP_RS03760	Schouls et al., 2004
VNTR13	BPP ₄₀₀₆	15	CTGTCCGCCTTGCCG	4006745	BPP_RS18680	This study
VNTR14	BPP ₄₀₇₃	10	CGCAYCCTGC	4073141	non-coding	This study
VNTR15	BPP ₂₃₈₈	9	CGGGGCGAG	2388542	non-coding	This study

Bordetella parapertussis strain 12822 NC_002928.3
Y = C or T

表2. VNTR に対する PCR プライマー

VNTR	Primer name	Primer sequence	Genome coordinate	Ref.
VNTR4	VNTR4-F	NED-CGTGCCCTGCGCCTGGACCTG	806713	Schouls et al., 2004
	VNTR4-R	GCCGCTGCTCGACGCCAGGGACAA	806562	
VNTR13	VNTR13-F	PET-CCTTCCAGCGGCAGGTCCTT	4006649	This study
	VNTR13-R	GACGTGCTGGCCGACCCATT	4006931	
VNTR14	VNTR14-F	VIC-CATCCGCAGCACCCGACAGAC	4073112	This study
	VNTR14-R	CGCTCGCAACGGCTGGCTTT	4073293	
VNTR15	VNTR15-F	FAM-AAGGGCGACGTCCGAGCTCA	2388446	This study
	VNTR15-R	CCGACGATCTCACCATCATCGCCA	2388618	

表3. 34株の臨床分離株におけるVNTRの繰返し数と多様度

VNTR	No. repeats	No. alleles	Diversity index
VNTR4	3, 4, 5	3	0.324
VNTR13	5, 6, 7	3	0.366
VNTR14	10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21	8	0.632
VNTR15	3, 4, 5, 8	4	0.635

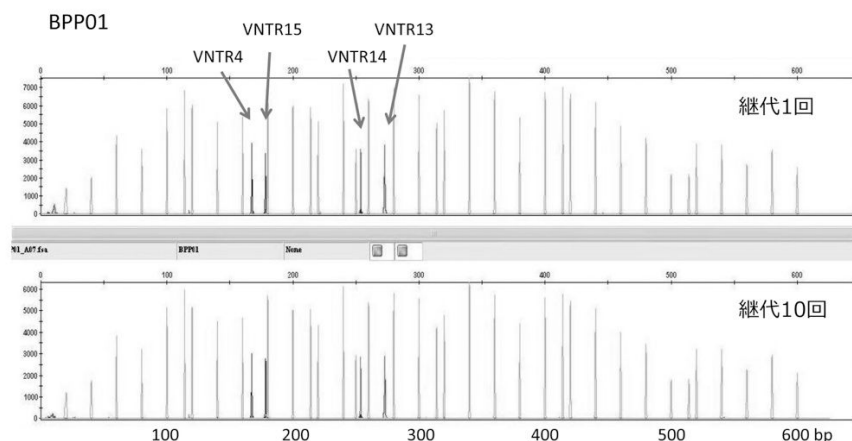


図1. VNTRの安定性評価. 臨床分離株をCSM寒天培地で10継代した後, 4箇所のVNTR(VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15)のサイズを測定した. 解析例として, 国内臨床分離株BPP01株を用いて継代1回目と比較した結果を示した

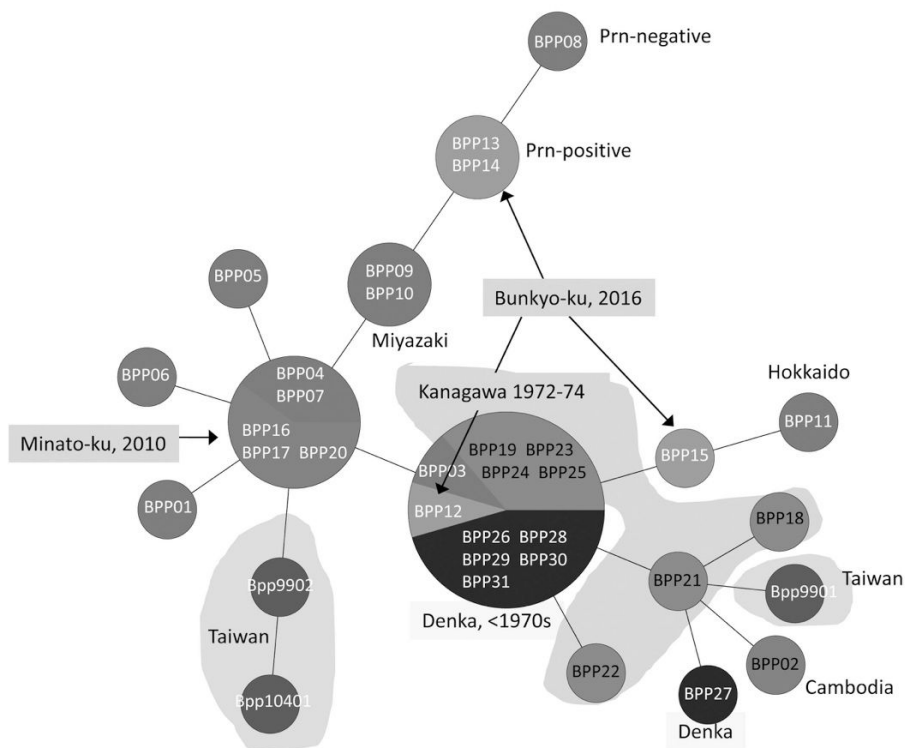


図2. パラ百日咳菌臨床分離株の系統樹. 国内分離株30株と国外分離株4株をMLVA解析に供試し, 4箇所のVNTR繰返し数の組合せから系統樹を作成した. 解析はminimum spanning tree法により

行なった

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

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 瀧井猛将 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

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年度に実施された最初のVNTR解析の外部精度評価（External Quality Assessment: EQA）では、一部施設及びVNTRローカスに精度不十分な状況が認められ、さらなる解析精度向上の必要が考えられた。そこで、各施設における内部精度管理の実施を支援するとともに、2014年度に引き続いて2015年度、2016年度にEQAを実施し、精度の向上を認めた。地方衛生研究所において定期的なEQAの有用性が認識され、継続の実施が要望されたことから、2017年度は第4回となるEQAを実施した。

2017年度はVNTR結果既知の結核菌3株のDNAをEQAに使用した。58施設がEQAに参加し、57施設（98.3%）から解析結果が送付された。各施設でJATA 12で分析した場合、3株/12ローサイで完全正答したのは40施設（70.2%、40/57）であった。2017年度の完全正答率は、2016年度（87.3%、48/55）と比べて低下した（ $p=0.0166$ ）。EQAの結果を受けた改善活動が必要と考えられた。

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てい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解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、2017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、2016年度に引き続いて4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リファレンス委員会の各ブロックの代表を通して VNTR に関する IQC 用検体の配布及び EQA への参加希望を募った。

参加施設へ送付した検体：

EQA 用結核菌 DNA ()

精製した結核菌の DNA 3 検体(3 株)を EQA 用検体として使用した。

IQC 用結核菌 DNA ()

コピー数既知の結核臨床分離株 2 株の DNA を IQC 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 (Hyper Variable 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。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。

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・瀧井猛将)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. IQC 用検体の提供と EQA の実施

全国の 79 施設を対象に、IQC 用検体の配布及び EQA 参加についての希望を調査した(2017 年 11 月)。2017 年 12 月までに 58 施設より EQA への参加希望があった。2018 年 3 月 1 日までに 57 施設から分析結果が送付された。本報告書では、57 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。

2017 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 46、41、28 であり、2016 年度の 41、33、19 と比べて追加領域での分析する施設が増えており、参加実施施設の半数(49%/、28/57)が JATA 12、JATA 15、HV、Supply のローサイ全てを実施していた(図 1)。

3. EQA 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EQA用検体をJATA12で分析した場合、全株で12ローサイについて完全に正答したのは40施設(70.2%, 40/57)、1ローカス違いは12施設(21.1%, 12/57)、2ローサイ以上違いは5施設(8.8%, 5/57)だった(表1)。2017年度に全ローサイ完全一致した施設の割合は、2014年度とほぼ同様だった(70.2% vs. 66.7%, $p=0.691$)が、2016年度と比べると有意に低下していた(87.3% vs. 70.2%, $p=0.027$)。この成績低下の原因は、2016年度と比べて2017年度は、1ローカス違いの施設の割合が増えたためであった(9.1% vs. 21.1%)。

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(MultiNA、島津製作所)、キャピラリー電気泳動装置QIAxcel(QIAGEN)などが各施設で使用されていた(表2)。2017年度の調査では2016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(59.6%, 34/57)。自動シーケンサーを用いたフラグメント解析が13施設(22.8%, 13/57)、MultiNA6施設(10.5%, 6/57)、QIAxcel3施設(5.3%, 3/57)、パーキンエルマーLabChipが1施設(1.8%, 1/57)とアガロース電気泳動以外の方法が増加傾向にあり、6施設はアガロースゲル電気泳動と併用していた。

5. 各分析法におけるローカセットの正答率

PCR産物の分子量分析法の違いごとに、JATA12、JATA15、HV、Supplyにおける正答率をまとめた(表3)。正答率は、各ロー

カセットにおける1ローカスあたりの正答率として算出した。

2017年度は2016年度と比べて全体的に若干低い正答率であった。また、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JATA12では、主要な分析法であるアガロースゲル電気泳動では2017年度は2016年度と比較して若干正答率が低下した(97.6% [2017] vs. 99.8% [2016])。自動シーケンサーでは2017年度と2016年度の正答率はほぼ同様であったが、6施設で用いられていたMultiNAでは正答率が低下していた(91.7% [2017] vs. 97.8% [2016])。

任意の評価対象としたJATA15、HV、Supplyでは、アガロースゲル電気泳動、自動シーケンサー、MultiNAともに高い正答率を示していた(97.6–100%)。一方、QIAxcel、パーキンエルマーLabChipについては、使用施設数が1施設と限られているものの、JATA15、HV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

JATA12、JATA15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2)。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、2016年度の調査ではいずれのローカスでも98–100%であり、高い正答率を示した。2017年度は、2016年度に比べて全体的には正答率が若干低下した。この要因としてJATA12では(2163b, 4052)、JATA15では(1982)の正答率(92.9%、94.7%、93.3%)が若干低かったことが挙げられる。

D. 考察

2017年度は各施設におけるIQCの実施を

支援するとともに、2014 年度、2015 年度、2016 年度に引き続いて 4 回目となる EQA を実施した。

各施設での分析法は、過去に実施した 3 回の結果とほぼ同様の内訳であった(表 2)。主要な分析法として、簡便な手法であるアガロースゲル電気泳動が 34 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 13 施設で使われていた。続いて MultiNA が 6 施設、QIAxcel 3 施設、パーキンエルマー-LabChip が 1 施設で採用されていた。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。

EQA 用 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、2017 年度は 2016 年度と比べて低下していた(70.2% [2017] vs. 87.3% [2016], $p=0.0167$)。この成績低下の原因は、2017 年度は 2016 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(15 施設 [2017] vs. 5 施設 [2016])。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に集中していた。今回の精度評価用に用いた試料には、高分子 DNA の解析を必要とするローサイを含んでいた。そのため、使用した装置の高分子 DNA の分解能や技術による影響が推察された。

2014 年度に EQA を実施して以来、2016 年度までの 3 回は分析精度の改善傾向が維持されていた。2017 年度は若干の減少が見られたが、上述のように分析対象の試料の影響もあることから、2016 年度同等の分析精度が維持されていると考えられた。

EQA 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

ていることから、今後も EQA を継続的に実施していく必要があると考えられた。

2014 年度に分析精度が低かった 5 ローサイでは、2016 年度と同様に 2017 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、2017 年度は VNTR プロファイル既知の菌株 DNA を IQC 用検体として配布した。IQC 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 46、41、28 であり、過去 3 年間で最も多くなった(図 1)。JATA 12 は解析難易度が低く、集団発生疑い事例等の鑑別に有用である。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、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が有用であると考えられる。

本年度を含め 4 回の外部精度評価を実施したことにより、各地方衛生研究所において VNTR 分析系が導入されつつあることが確認された。結核分子疫学調査では、VNTR 情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのため

には VNTR 分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられた。

E．結論

2017 年度は、57 施設を対象に VNTR 分析に関する EQA を実施した。3 株の EQA 用検体を JATA 12 で分析した場合、2016 年と比べて全株 12 ローサイ完全正答した施設数と割合は 48 施設 87.3% [2016]から 40 施設 70.2% [2017]と大幅に減少した。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 QA 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である。

F．健康危険情報

結核菌株の取扱については、感染症法の

基準に適合した実験室内で実施した。

G．研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

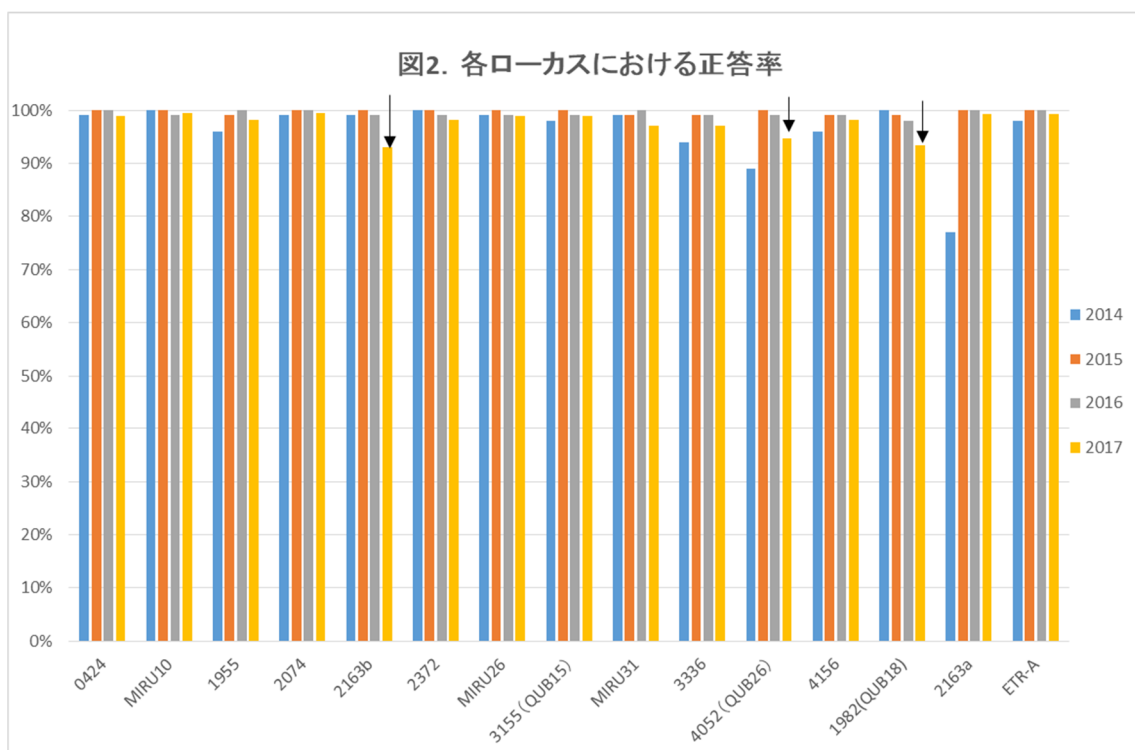
1．特許取得

2．実用新案登録

3．その他

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
	チップ電気泳動 (MultiNA)	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	94.2	5	100
	自動シーケンサー	10	100	9	100	10	100	9	100
	チップ電気泳動 (MultiNA)	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
	チップ電気泳動 (MultiNA)	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						
	アガロースゲル(併用を除く)	34	97.6	27	97.9	23	98.6	12	100
2017	自動シーケンサー	13	98.5	13	99.1	13	98.3	13	100
	チップ電気泳動 (MultiNA)	6	91.7	4	100	3	100	2	100
	QIAxcel	3	97.2	1	88.9	1	66.7		
	パーキンエルマーLabChip	1	83.3	1	55.6	1	100	1	100



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 年度と比較した。2017 年度は、2016 年度に比べると、全体的に正答率の低下が見られ、特定のローカセットに誤回答が集中した。矢印は、2017 年度の正答率が低かった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

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部 部長

研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部 室長
研究協力者 鈴木道雄 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 ブルセラ症(4類感染症)の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地方衛生研究所(地衛研)でブラインド検体を用いた検査(抗体検査:TAT、遺伝子検出:PCR)について、外部精度管理(検査法・手技等の検証)を実施した。抗体検出については、うまく結果が出なかったところや結果の判定方法が誤っている地衛研も認められた。また、遺伝子検出に関しては、定性試験(菌種同定)は良好であったが、検出感度は各地衛研により差が大きく見られた。これは、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まちまちで、感度に違いが出ているのではないかと推測された。行政検査対象項目に関しては、使用機器、アガロースについても統一を図る事が望ましいと考えられた。ただ、全体的にみて参加21地衛研において、今回の結果のフォローを行うことで、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた。

A. 研究目的

ブルセラ症は世界的にも重要な動物由来感染症の一つであるが、日本では感染源家畜の清浄化が達成され、国内で家畜ブルセラ菌感染は認められず、現在ではその患者は、全て流行地からの入国者や流行地への渡航者など輸入症例に限られている。ただ、犬ブルセラ属菌については、国内犬の3%が感染していることから、国内感染患者となっている。感染症法に基づく届出対象(4類感染症)となった1999年4月1日以降、40例の患者が報告されており、うち14例が家畜ブルセラ菌感染、残りは犬ブルセラ菌感染である。

ブルセラ症の検査については、医療機関からの依頼が想定されるが、その内容は、届出基準となる血清抗体検査(TAT)と菌の分離・同定依頼となる。このうち、血清抗体検査につ

いては、ブルセラ症は通常、慢性経過をたどり、有症状期に抗体を保有していることが多いことや、細胞内寄生菌のため“抗体陽性=保菌が疑われる”と考えられることから、診断意義がきわめて大きい。今回、地方衛生研究所(地衛研)でもこれら検査に対応することが求められていることから、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地衛研で検査(抗体検査:TAT、遺伝子検出:PCR)について、ブラインド検体を用いて外部精度管理(検査法・手技等の検証)を実施することとした。

B. 研究方法

1. ブルセラ症検査 EQA

表1に示す21地衛研から参加希望があった。参加希望地衛研に対して、ブラインド検体および凝集反应用菌液、試薬、puReTaq

Ready-To-Go PCR Beads、試験管など感染研の方法で実施するのに必要な物を送付した。実施方法については、感染研で実施している SOP に準じた実施手順書(表2)を作成し、これに沿って実施し、結果を報告することを求めた。

なお、実施内容は以下の通りである。

2. 抗体検出

ブルセラ病診断用菌液(*B. abortus* 用: 農業・食品産業技術総合研究機構、*B. abortus* 99 もしくは 125 株(*B. melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125)の加熱死菌液))を用いた試験管凝集反応により実施した。方法は、抗原添付のプロトコル(感染研 SOP も同じ)に従った。

検査検体には適宜希釈したウサギ免疫血清(TAT-1:*B. suis*、TAT-2:*B. canis*、TAT-3:*Yersinia enterocolitica* O9、TAT-PC:*B. abortus*)を用いた。なお、*Y. enterocolitica* O9 の LPS は家畜ブルセラ菌と相溶性が高いことから、当該免疫血清は家畜ブルセラ属菌に交差反応する。今回はその事象を経験してもらうために検体の1つに加えた。ただ、現実的には、臨床症状がブルセラ症とは異なるので、検査診断上問題になる懸念はないと思われる。

3. 遺伝子検出

遺伝子検出については次の5つの検討を実施した。1) 感染研の方法(puReTaq Ready-To-Go PCR Beads 使用)での実施、2) 各地衛研にて通常使用している DNA Polymerase を使用して実施、3) 血清からの DNA 抽出と PCR による同定、4・5) 感染研および各地衛研の方法で検体希釈列を用いた検出限界の検討、である。

1~3)の PCR では、4セットのプライマーによる増幅パターンの違いから、ヒトに感染しうる主要 4 菌種の鑑別同定ができるかどうかを実

施、検証した(表4、図1)。4・5)では、*bcs31*-PCR のみ実施した。

検査検体は、1・2)の PCR では、#1:*B. abortus*、#2:*B. melitensis*、#3:*B. canis*、#4:*Streptobacillus notomytis*、#PC:*B. suis*より抽出した DNA(1ug/ml)を用いた。また、3)のスパイクテストは、FBS に *B. abortus* 死菌体を添加した物を使用した。4・5)は、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ng/ul(#1~7)の *B. abortus* および DW(#8)を8連 PCR チューブに入れた物を用いた。どのプライマーや検体も、ロット差をなくすために、1つのチューブでまとめて作成し、これを各地衛研用に小分けした。

C. 研究結果

1. 実施状況

参加希望の21地衛研のうち、1機関で、当該地衛研で通常使用している DNA polymerase を用いた検討が未実施だったが、それ以外の機関および検査に関しては、全て実施され、結果が報告された。

2. 抗体検出(表3)

1地衛研で、陽性となるべき検体(TAT-1)が陰性であり、TAT-PC の価も 40 倍と低くなっていた。また、別の地衛研で TAT-PC が 640<と高くなっていた。それ以外については、ほぼどの地衛研も想定していた結果が得られた。ただ、検査は 10~640 まで、7試験管を用いて行われている。そのため、最終の試験管で陽性の場合には 640<、陰性の場合には 320 となる。9地衛研で 640 と判定していたが、今回の検査では、640 の判定は不可能で、これは 640<としなくてはならない。その他、抗体価を、最終陽性となった試験管の次の倍率で提示している1地衛研があった。このように、21地衛研のうち、10地衛研で判定方法に誤りが見られた。

3. 遺伝子検出

1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) および 2) 各地衛研の DNA Polymerase を使用して実施、いずれの方法でも正しく菌種の同定がなされていた。また、3) 血清からの DNA 抽出と PCR による同定でも、菌種の特定がされており、いわゆる定性試験は問題なく実施されていた。

4・5) の、感染研および各地衛研の方法による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 (表 5)。ただ、それぞれの地衛研内では、RTG-PCR beads やその他 DNA polymerase による感度の違いは少なく、使用するサーマルサイクラーやアガロースの組み合わせの違いによると推測される。

そこで、各地衛研で使用している機器、試薬等を表 6 にまとめた。サーマルサイクラーは、ABI Veriti が最も多かったが、使用機器は 5 メーカー、13 機種にも及んだ。アガロースも多くの種類が使用されており、さらに、標的増幅産物のサイズ (今回は 186-249bp) が小さいにもかかわらず、1,000bp 以上の分離に適している Agarose L03 を使用するなど、不適切なアガロースの選択が多く認められた。染色については、エチジウムブロマイドを用いた後染色が多かった。

通常、地衛研で使用している DNA polymerase や DNA 抽出キットは、機器やアガロースの多様性と異なり、Takara Ex Taq、Qiagen QIAamp DNA Mini Kit が大半を占めた。

D. 考察

ブルセラ症 (4 類感染症) の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地衛研でブラインド検体を用いた検査 (抗体検査: TAT、遺伝子検出: PCR) について、外部精度管理 (検査法・手技等の検証) を実施した。

現状、抗体検査については、市販の抗原菌液を使用して実施することも可能だが、民間の臨床検査センターにおいて保険診療に基づく検査を実施しているため、医療機関から当該センターに検査依頼することができる。そのため、我々 (国立感染症研究所獣医科学部) は、医療機関等からの問い合わせの際には、通常は、民間の臨床検査センターに抗体の検査依頼をするよう伝えている。結果、大半のケースで、抗体が検出されず、その時点でブルセラ症が否定される。ただし、1) 検査センターでの抗体検査の結果が陽性であった、2) 菌 (未同定) が分離された、3) 患者背景 (流行地域出身の外国人、流行地への海外渡航歴、臨床症状等) からブルセラ症が強く疑われる、などの場合については、原則、行政検査として、抗体検査および菌の分離培養、菌の同定検査を受けることとしている。今回は、ブルセラ症では診断意義がきわめて大きい抗体検査について、その原理と方法を理解してもらうために EQA 実施項目に入れた。結果、手技については、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認められ、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まちまちで、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。

E. 結論

抗体検出については、うまく結果が出なかったところや結果の判定方法が誤っている地衛

研も認められた。また、遺伝子検出に関しては、定性試験(菌種同定)は良好であったが、検出感度は各地衛研により差が大きく見られた。ただ、全体的にみて参加21地衛研において、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto K, Kato Y, Mutoh Y, Kutsuna S, Imaoka K, Ohmagari N. Photo Quiz: A Traveler from Africa with Fever and Aggravated Chronic Back Pain. *Clinical Infectious Diseases*, 66(5):805-807, 2018

2. 今岡浩一. ブルセラ症. in: JBSA ニュースレター, 日本バイオセーフティ学会, 7(1): 7-13, 2017

学会発表

1. 今岡浩一. 教育講演9:ブルセラ症とバイオセーフティ. 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 岐阜, 2018年2月

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

表1) 参加地方衛生研究所

岩手県環境保健研究センター	京都府保健環境研究所
山形県衛生研究所	兵庫県立健康生活科学研究所
東京都健康安全研究センター	神戸市環境保健研究所
群馬県衛生環境研究所	広島県立総合技術研究所
横浜市衛生研究所	保健環境センター
静岡県環境衛生科学研究所	徳島県立保健製薬環境センター
富山県衛生研究所	香川県環境保健研究センター
愛知県衛生研究所	長崎県環境保健研究センター
名古屋市衛生研究所	長崎市保健環境試験所
岐阜県保健環境研究所	宮崎県衛生環境研究所
三重県保健環境研究所	沖縄県衛生環境研究所

表2) ブルセラ症検査EQA用、実施手順書見本

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく
検査実施手順書をEQA用に一部改変

ブルセラ症検査実施手順書

平成 21

送付先および問い合わせ先：
162-8640 東京都新宿区戸山
国立感染症研究所
第一室 今
Tel: 03-5283-
E-mail: [niid](mailto:niid@niid.go.jp)

以下、本手順書を遵守して実施すること。
実施にあわせて、逐次、各項目の (○) にチェックを入
(実施途中で、目付が変更する場合は左空白に記載する。)

検査材料の受け入れ
○ 検査内容を再度確認
○ 必要試薬、器具等の確認
○ 検査検体の受領： 検体受取日時 (年 月 日、
受領者氏名 ()
○ 梱包状態の確認： 良 不良 不良備考 ()

受領内容の確認： 普通郵便、クール便で送られてきた物の確認
○ 郵便： H29 ブルセラ症遺伝子検出PCR依頼書・送付内容 17003
H29 ブルセラ症検査実施手順書 171003
ブルセラ菌遺伝子検出PCR検査(簡便)
pUrTag Ready-To-Go PCR Beads (48assay) 常温保存

○ クール便：
□ 二次容器1 (合計7本)： プライマー 7種 各1本
□ 二次容器2 (合計6本)： 検体4種 各1本
陽性コントロール DNA 1本
不活性ブルセラ菌を含むウシ血
□ 二次容器3 (合計4本)： 凝集反応用検体3種 各1本
陽性コントロール1本
□ 検出感度検出用検体希釈液 (8連0.2ml チューブ 1個)
□ 凝集反応用菌液 1本+凝集反応用希釈液 2本
□ 凝集反応用試験管 (通常は常温輸送だが破損防止のため)

○ 不足、破損等あれば、上記問い合わせ先に連絡してください

○ 検査終了後、検体結果の写真も添付して、検査実施記録として、本手
続に添付してください。(こちらで確認・処理した後、実施手順書は返
却)

以下、実施手順書に従って実施をお願いします

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく
検査実施手順書をEQA用に一部改変

1. 血清抗体検査 (試験管凝集反応)

検査開始日
検査実施者

目的： 被検血清中のブルセラ菌特異的抗体を試験管凝集反応
必要な試薬・器具等： 確認し、該当する項目にチェックを記入

感染研より送付
□ *ブルセラ菌診断用菌液 (B. abortus 用・真菌・食品産業技術研
99もしくは125株 (B. melitensis biovar abortus strain 99 or 12
□ *0.5wt%フェノール加生理食塩水 (生理食塩水に0.5% (w
解したフェノールを加える) (B. abortus 用希釈液)
□ *B. abortus 用 陽性対照血清 (ウサギに標準菌液を免疫して
□ *透明なガラス製小試験管 (直径 12mm・長さ 75mm, Di
#9831-1207, IWAKI)

地研にて準備
□ *その他、一般的に血清反応に必要とされる器具類 (チップ
管立て、ラップなど)

1) B. abortus, B. melitensis, B. suis に対する抗体の検出
抗原：ブルセラ菌診断用菌液 (B. abortus 既菌液) (原液)
✓ **ロット番号 H28-1 ; 使用期限 H30年 10月**
希釈液：0.3wt%フェノール加生理食塩水 (B：希釈液)
□ *菌液と希釈液の必要量 (N= 検体数+陽性対象)

標準菌液管①	10倍希釈液 (A)
標準菌液管①	125 ml
1検体あたり (7本)	3.5 ml
検定検体数 (N=3) ②	14 ml (N×3.5)
必要量 (②+③)	15.25 ml ④

②は菌液 1：希釈液 9なので、菌液と希釈液の必要量は、
④は菌液 1：希釈液 9なので、菌液と希釈液の必要量は、
菌液 (原液)：② x 0.1ml = (15.25) ml、希釈液：② x 0.9 +
(実際にはロスを考えて上で計算された量よりも少し多
今回は、菌液 1.5ml + 希釈液 16.2ml → 計 18ml で調

検査手順 (今回は7段階希釈とする)
○ (1) 0.5wt%フェノール加生理食塩水 (B：希釈液) の必要
(菌液の9倍量) ml) を50ml チューブ
○ (2) 2ml チューブ内の10倍菌液全量(18ml)を上記50mlチ
○ (3) 10倍希釈液 (A) ができる

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく
検査実施手順書をEQA用に一部改変

○ (4) 下記要領で、標準菌液管 (#1-#5) を調整する。

	#1: 100%	#2: 75%	#3: 50%	#4: 25%	#5: 0%
10倍希釈液 (A)	0	0.125ml	0.25ml	0.375ml	0.5ml
希釈液 (B)	1ml	0.875ml	0.75ml	0.625ml	0.5ml

○ (5) 検体は5倍希釈血清から出発して2段階希釈で、各7段階の希釈系列を用意
(0.5ml / 試験管、希釈倍数 1:5~1:320)。

希釈液 (B)	0.8ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	捨て
検体血清	0.2ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml

最終希釈倍数 x10 | x20 | | | | |
菌液 (A) 0.5ml を加える | 3320 | 3640

*1 検体につき、7本の試験管をチューブスタンドに立てる
(試験管には、遊性ペンで検体番号とチューブ番号1-7を書いておく)
*1mlピペットマンを使って、番号1には0.8ml、番号2-7には0.5mlの希釈液 (B)
を入れる。
*番号1に、0.2mlの検体血清を入れる。
*試験管をボルテックスでよく攪拌する (こぼさないように注意する)。
*0.5mlをピペットマンでとって、番号2の試験管に移す。
*試験管をボルテックスでよく攪拌する (こぼさないように注意する)。
*ピペットチップはその都度新しい物に交換し、同様に番号7まで移していき、
最後に番号7から0.5mlをとって、捨てる。
*これで、各試験管に0.5mlずつの希釈系列ができあがる。
(血清希釈倍数は 1:5~1:320 となる)
○ (6) 同様に (力価が160倍以上の) 陽性対照血清 (PC) の希釈系列を作る。
○ (7) 10倍希釈液 (A) 0.5ml
(最終血清希釈倍数は 1:)
○ (8) 各試験管をボルテックスで
○ (9) 溶液が乾燥しないように、
○ (10) 37°Cの孵卵器に入れて、

反応開始時間： 5

○ (11) 試験管を揺らさないよう
○ (12) 判定は、検体試験管の白
濁度の標準菌液管の番号を
○ (13) #3の標準菌液管 (50%凝
として記録する。
○ (14) 血清の最終希釈倍数 40倍
(注：実際には、凝集抗体価が
異なることがあるため、必要)

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく
検査実施手順書をEQA用に一部改変

判定実施日時： 年 月 日、 時 分
判定者：

(1) 既読： B. abortus

検体番号	判定	判定理由	検体結果
10	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
20	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
30	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
40	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
50	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
60	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
70	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
80	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
90	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
100	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
110	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
120	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
130	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
140	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
150	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
160	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
170	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
180	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
190	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
200	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
210	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
220	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
230	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
240	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
250	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
260	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
270	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
280	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
290	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
300	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
310	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
320	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
330	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
340	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
350	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
360	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
370	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
380	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
390	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
400	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
410	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
420	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
430	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
440	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
450	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
460	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
470	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
480	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
490	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
500	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
510	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
520	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
530	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
540	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
550	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
560	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
570	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
580	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
590	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
600	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
610	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
620	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
630	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
640	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
650	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
660	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
670	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
680	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
690	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
700	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
710	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
720	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
730	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
740	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
750	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
760	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
770	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
780	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
790	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
800	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
810	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
820	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
830	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
840	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
850	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
860	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
870	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
880	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
890	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
900	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
910	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
920	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
930	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
940	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
950	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
960	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
970	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
980	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
990	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性
1000	陽性	標準菌液管番号1-7の白濁度	陽性

表3) 各地方衛生研究所における抗体検査結果

	1	2	3	PC
<10	1	20		
10		1		
20				
40			4	1
80			15	
160			2	14
320	3			5
640	9			
640<	8			1

表4) プライマーと標的遺伝子、増幅産物サイズ、陽性を示す菌種

Target gene	Primer pair	Product size	Positive
<i>bcs</i> 31	B4/B5	224 bp	BM, BA, BS, BC
<i>omp</i> 2	(abortus type) JPF/JPR-ab	186 bp	BM, BA, BS
	(canis type) JPF/JPR-ca	187 bp	BS, BC
<i>omp</i> 31	1S/1AS	249 bp	BM, BS, BC

BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

表5) 各地方衛生研究所におけるPCR検出感度検査結果

#	3	4	5	6	7
RTG	1	7	6	4	2
他*)	1	8	4	5	1

*) 1地研未実施

表6) 各地方衛生研究所における使用機器、試薬等

サーマルサイクラー	Applied Biosystems	Veriti (5)	GeneAmp9700 (3)	2720 (2)
		SimpliAmp	ProFlex	
	BioRad	C1000 Touch (2)	T100	MyCycler
	Takara	TP600	TP650	TP350
	Astek	GeneAtlasG02		
	日本ジェネティクス	G-Storm GS4		
アガロース	Nusieve3:1 (3)	Agarose LO3 (4)	AgaroseS (3)	AgaroseX
	AgaroseME	Agarose Typel	Agarose Typell	et.al.
	MultiNA (マイクロチップ電気泳動、島津)			
	QIAxcel (キャピラリー電気泳動、QIAGEN)			
染色試薬	EtBr (15)	GelRed (3)	ミドリグリーンDirect	

DNA polymerase *)

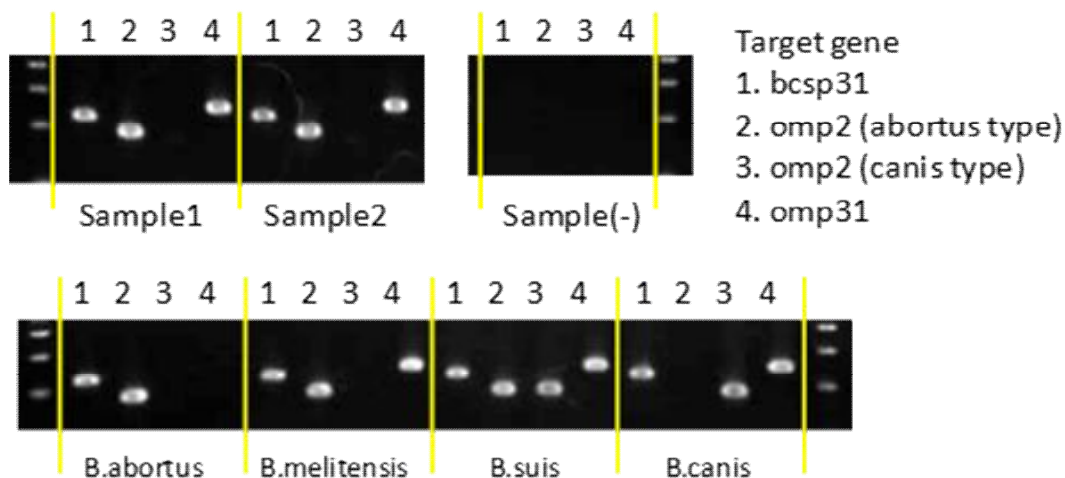
- Takara ExTaq (HotStart含む) (14)
- Promega GoTaqGreen Master Mix (3)
- puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (1)
- Takara EmeraldAmp PCR Master Mix (1)
- Takara Tks Gflex (1)

DNA抽出キット *)

- QIAamp DNA Mini Kit (17)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (2)
- Takara NucleoSpin Tissue (1)

*) 1地研未実施

図1) 遺伝子の基本検出パターンと *B. melitensis* 検出例



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
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・向上を目的に、地方衛生研究所間のネットワーク体制を構築し、HIV診断体制に関する実態を把握するための聴き取り調査を行うと共に、今後の改善すべき点に関して情報交換、討議を行った。その結果、感染急性期の受検者を正確に診断するための遺伝子検査の導入に向けた支援、HIV-2鑑別診断のための情報の共有が重要であることが示唆された。

A．研究目的

HIV 感染症は全数把握が義務付けされている5感染症である。日本国内で HIV が診断数はエイズ動向委員会に報告される。日本国内の新規 HIV 診断数は 2008 年をピークに横ばい傾向が続き、年間約 1500 件前後の新規 HIV 感染が報告されている。このうち約 3 割は AIDS 発症により HIV 感染が判明していることから、早期診断に結び付いていないことが予想される。

国内の HIV 感染拡大防止に向けて、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。先に述べたとおり、年間新規 HIV 診断者 1500 件の約 1000 件が AIDS 発症前に自発的検査により診断されている。さらに注目すべきは 1000 件中約 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。そこで保健所、

地方衛生研究所においても感染拡大のリスクが大きい感染急性期の受検者を正確に診断するための遺伝子診断など新たな診断技術の導入が重要である。

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 点を目的とし、平成29年度はHIV診断体制に関する実態を把握するための聴き取り調査を行うと共に、今後の改善すべき点に関して情報交換、討議を行った。

B．研究方法

1．HIV 診断体制に関する実態を把握するための聴き取り調査

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、中核市保健所等の HIV 検査担当者に抗

HIV 抗体検査実施・継続のための課題、遺伝子検査実施の有無、遺伝子導入に向けた課題に関して直接インタビューを行った。

2. 診断体制の維持、技術の向上に向けた情報共有

衛生微生物協議会にて国内承認診断薬、世界的な検査手法の改変の流れについて、情報共有を行うと共に、新たな検査手法を導入に向けた課題について討議した。更にコアメンバーで病原体検査マニュアル改訂に向け重点的に改定すべき点について討議した。

C . 研究結果

HIV 検査体制に関する個別の聴取調査から、遺伝子検査等の新たな診断アルゴリズムを導入する場合、各自治体の年間 HIV 陽性者数に応じて費用対効果の観点から有効となる手法、現実的に導入可能な検査法は異なることが明らかとなった。更に聞きとり調査から、実際に日本国内では HIV-2 の流行は確認されていないものの検査現場では HIV-1/HIV-2 の鑑別診断を要する検体が年間数例あることから、検査の進め方に関する情報を必要としている実態が明らかとなった。

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。また実態に即した病原体検査マニュアルの改定に向けて、遺伝子診断においては複数の手法を提示し導入のハードルを下げるということが重要であることが示唆された。以上の点を踏まえ、より実態に即した病原体検出マニュアルの作成にむけては遺伝子

検査、HIV-2 の鑑別診断の 2 項目を重点的に改変することが重要であることが示唆された。

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するとともに、現状の課題、改善案について情報共有、討議を行った。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yamamoto, H., Ishii, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Sato, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. *In vivo* virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts. *PLoS Pathog.* 13:e1006638, 2017.
2. 松岡佐織 . 日本国内 HIV/AIDS 発生動向 update . 病原微生物検出情報 (IASR). 38:179, 2017

学会発表

- 1) 松岡佐織 . 日本国内 HIV 発生動向に関する研究 . 第 31 回日本エイズ学会学術集会 . 2017 年 11 月 . 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

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

平成29年度アデノウイルスレファレンス活動と新たな流行性角結膜炎起因ウイルス

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

地区レファレンスセンター

青森県、新潟県、東京都、川崎市、福井県、大阪、広島市、宮崎県

全国地方衛生研究所

【研究要旨】 2017年度は、地方衛生研究所との連携により、日本での新たなアデノウイルス型の流行を明らかにした。特に85型は新たな流行性角結膜炎の起因病原体といえる。さらに57型の日本への侵入を地方衛生研究所とともに論文化し、英文公表した。また、48型変異株として既に論文報告した型が81型の新型とされた。これらは、世界に向けて地方衛生研究所と国立感染症の共同研究成果として発信されている。

A．研究目的

流行性角結膜炎（EKC）から検出されるヒトアデノウイルス(HAdV)は、従来、D種の8型、19型および37型等が主流であったが、近年、キャプシド蛋白であるPenton、Hexon およびFiberの構造遺伝子領域で組換えを起こした、新型HAdV(52型以降の型)である53型、54型および56型の検出報告が増加している。

このような中、熊本県で2015年11月以降、Penton領域/37型、Hexon領域/19型、Fiber領域/8型の新型と思われる組換えHAdVが複数検出された。そこで熊本県で、2008年度から2015年度間に眼科定点の検体から検出されたHAdVの流行型の推移を明らかにし、2015年11月以降に検出された新型と思われる組換えHAdVの詳細な性状を明らかにした。

その他の新型HAdVについても調査した。

B．研究方法

1. 熊本県保健環境科学研究所と共同で、2008年度から2015年度間に眼科定点の検体から検出されたHAdVの分離株等を解析した。

2. 島根県保健環境科学研究所と共同でHAdV-57の過去の分離株を調査した。抗HAdV-57は市販されておらず、市販されている他の型で反応性を調査した。

3. 千葉県衛生研究所との共同研究で新たに発見した組換え株(JJID 2014で論文報告済)を新型と判定されるか検討した。

4. 広島市衛生研究所との共同研究。HAdV-21は重症呼吸器を引き起こすことで知られているが、日本での検出報告はこ

れまでない。広島市での検出株で HAdV-21 とと思われる株を調べた。

C . 研究結果

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。結果を Journal of Medical Virology で公表した (地研と感染研の連名)。

2. 島根県保健環境科学研究所と共同で 57 型が 2005 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、結果を JJID で公表した(印刷中)。

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で、これまで日本で最初の HAdV-21 の検出であることを確認した。

D . 考察

日本において、新しい型として HAdV-81 および HAdV-85 を新しい型として論文報告した。日本においては、HAdV-54 が EKC の大規模流行を 2015 ~ 2016 年に引き起こし 2018 年 3 月現在も、EKC が過去 5 年と比較して 2SD を超えて報告されている。

地方衛生研究所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型として HAdV-85 を検出できた。HAdV-85 は、熊本県で 11 名から検出され、その他の都道府県からも検出され始めており、今後の流行が懸念される。流行が予測される理由は、1)EKC を引き起こす型の組換えによる型である、2)熊本のほか、他の自治体でも EKC から検出されはじめていることである。

島根県の EV-D57 は、これまでロシアと中国の実から報告がある型であり、呼吸器感染症を引き起こしていると考えられている。島根県との共同研究で、日本で市販されている HAdV-6 に対する抗血清が HAdV-57 と交叉反応性があることが示された。

千葉県との共同研究で既に P65H48F60 として論文報告していた株が HAdV-85 とされた。HAdV-65, HAdV-48 および HAdV-60 の日本での検出報告は過去にないので、海外からの侵入が示唆された。48 型はアフリカでは比較的多い型であることが既に報告されている。

広島市との共同研究で検出した HAdV-21 は国内初の検出であり、21 型は重症呼吸器感染症を引き起こすことが知られているので、今後の検出動向に注意が必要である。

これらを含め、IASR 7月号で「アデノウイルス感染症 2008~2017 年 6 月」として特集した。

E . 結論

新型アデノウイルス 3 種類の日本国内における検出を明らかにした。さらに、これまで検出されていなかった 21 型も検出され、地方衛生研究所と国立感染症研究所を含むラボネットワークによるアデノウイル

ス検出・同定は非常に有効に機能した。これらは、世界に向けて地方衛生研究所と国立感染症の共同研究成果として発信されている。

F . 健康危険情報

アデノウイルスが主要な起因病原体である咽頭結膜熱の過去10年間で最も患者数が多い状況が2017年に発生しHAdV-2およびHAdV-3によるものであることをメディアやIASRを通じて国民に向け報告した。

G . 研究発表

論文発表

1. Hashimoto S, Gonzalez G, Harada S, Oosako H, Hanaoka N, Hinokuma R, Fujimoto T. Recombinant type Human mastadenovirus D85 associated with epidemic keratoconjunctivitis since 2015 in Japan. *J Med Virol.* May;90(5):881-889, 2018.
2. Nakamura H, Fujisawa T, Suga S, Taniguchi K, Nagao M, Ito M, Ochiai H, Konagaya M, Hanaoka N, Fujimoto T. Species differences in circulation and inflammatory responses in children with common respiratory adenovirus infections. *J Med Virol.* May;90(5):873-880, 2018.
3. Suzuki S, Kawamura T, Saeki Y, Okubo M, Konagaya M, Hanaoka N, Arashiro T, Fujimoto T, Uchio E. A Case of Type 54 Human Mastadenovirus Keratoconjunctivitis Causing Severe Broad Epithelial Defect Ten Years after LASIK

Surgery. *Jpn J Infect Dis.* Sep25;70(5):597-598, 2017.

4. Fukuda S, Ito S, Fujiwara M, Abe J, Hanaoka N, Fujimoto T, Katsumori H. Simultaneous development of Kawasaki disease following acute human adenovirus infection in monozygotic twins: A case report. *Pediatr Rheumatol Online J.* May 16;15(1):39. doi: 10.1186/s12969-017-0169-x, 2017.
5. Uemura T, Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawamura T, Saeki Y, Fujimoto T, Uchio E. Clinical and virological analysis of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a regional ophthalmic clinic in Kyushu, Japan. *Clinical Ophthalmology*, 12, 511-517. 2018.
6. 藤本嗣人、小林正明. 手足口病と咽頭結膜熱について. *こころと体の健康* . 21巻8号 . 68 ~ 69, 2017 .
7. 藤本嗣人. アデノウイルスの迅速診断の現状(2017年). *臨床とウイルス*. 45巻3号. 105 ~ 109, 2017.
8. アデノウイルス特集号 . IASR . アデノウイルス感染症 2008 ~ 2017年6月 . 2017年 .

学会発表

1. 藤本嗣人、砂川富正、小長谷昌未、木下一美、花岡希、大石和徳 . 2013 ~ 2016年日本の流行性角結膜炎患者からの検出アデノウイルスの種別・型別 . 第54回日本眼感染症学会 . 7月14 ~ 16日、

2017年、大阪市

2. 橋本慎太郎、花岡希、藤本嗣人 . 8年間にわたる眼科定点調査で検出されたヒトアデノウイルス流行型の推移と新たに発見された流行性角結膜炎起因病原体 . 第58回日本臨床ウイルス学会 . 5月27~28日、2017年、長崎市

3. 藤本嗣人、花岡希 . 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38回研究会レファレンスセンター等報告 . 2017年6月26~27日、2017年、東京都

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

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および報告体制の整備

研究分担者 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 鈴木里和

研究協力者 大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課 河原 隆二
横浜市衛生研究所 検査研究課 松本裕子
国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 松井真理
国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 鹿住祐子
国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 川上小夜子

研究要旨 平成29年3月に結核感染症課長通知が発出され、CREなど全数届出対象の薬剤耐性菌については地方衛生研究所において試験検査を実施することとなった。今年度は、実施された試験検査結果の報告形式を整備し、感染症サーベイランスシステム（NESID）の病原体検出情報システムを通じて報告できる体制を整備した。一方、一部の報告項目および報告内容については今後追加で検討が必要と思われた。また、試験検査の精度を担保するためには、今後ディスク法等の画像データの蓄積が必要であり、その体制を整備することが今後の課題であると考えられた。

A．研究目的

地方衛生研究所（地研）における薬剤耐性菌の解析体制は、平成23年以降の通知や事務連絡、平成26年のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症の5類全数届出疾患への制定といった行政的枠組みの整備、平成27年の薬剤耐性菌レファレンスセンター発足などを経て段階的に整備が進められた。地研の解析担当者に対する技術研修も平成23年からの模索的な個別研修から始めることで研修内容の検討を進め、平成28年度からは20-30名を対象とした薬剤耐性菌解析研修コースとして整備した。これらの動きを経て、平成29年3月に結核感染症課長通知「CRE感染症等に係る試験検査の実施について」が発出され、CREなど全数届出対象の薬剤耐性菌については地方衛生研究所において耐性遺伝子の検査を実施するこ

ととなり、我が国における薬剤耐性菌ラボネットワーク構築の第一段階は終了したと考えられる。

今後は、検査結果の集計と国民への還元および精度管理体制構築が必要となる。今年度は、各地研で実施されている主にCREの検査結果を、感染症サーベイランスシステム（NESID）の病原体検出情報システムを通じて報告し、集計解析可能な体制を整備した。また、それらのデータの質を担保するための体制について検討を行った。

B．研究方法

1. 薬剤耐性菌検査結果報告体制の整備

NESID 病原体検出情報システムは、入力形式がある程度システムとして固定されているため、新規に対象となった薬剤耐性菌の検査結果については対応する入力フォームが存在しない。また入力システムの変更

はシステム改修を伴うため、NESID システム更新のタイミングに合わせる必要がある。そのため、現状のシステム内で、必要な情報を地研が間違いなく入力できる方法を検討するため、NESID 病原体サーベイランスシステムの確認を行った。

また、今年度は最初にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を対象とし地研が報告すべき検査内容および検査結果の入力方法について、各ブロックのレファレンスセンターと検討の上、統一した形式を作成し、一部の地研に検査結果の試験入力を依頼した。これらの過程により認識された問題点等を検討し、実際的な入力形式を作成した。

2. 試験検査の精度管理手法の検討

地研より受けた薬剤耐性菌の試験検査結果の問い合わせ内容およびその結果等を整理し、それらをデータベース化するためのテンプレートを検討した。

C. 研究結果

1. NESID 病原体検出情報システムの利用可能な領域として、テキストの自由入力が可能な型別結果の中の「特記すべき生化学的性状等」が考えられた。この項目内には、100byte まで入力可能で、カンマと半角カナ以外の文字は使用可能であった。

入力する試験検査項目については、前出の通知の別添の検査法において「原則として実施する試験項目」の入力を必須とした。通知別添において「推奨される検査項目」とされているものについては、カルバペネマーゼ産生もしくはカルバペネマーゼ遺伝子の検出に関わるものについての報告を行うこととした。入力文字数に制限があることから、カルバペネム耐性に関与しうるものの、カルバペネマーゼとして分類されない -ラクタマーゼ遺伝子の検出に関しては現時点では報告に含めないこととした。

試験結果については、陰性(-) 陽性(+)のほか、表現型判定では判定が困難であった場合の入力方法(?)を定め、未実施の場合(*)も入力するようにし、判別できるようにした。また、国内ですでに定着している IMP 型のカルバペネマーゼ遺伝子については、地域によって遺伝子型の分布が異なることから、シークエンスによる遺伝子型の入力方法も定めた。具体的には、IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子の PCR による検出のみであった場合は「IMP+」とし、遺伝子型まで判明していたら IMP6 (*bla*_{IMP-6}であった場合)と入力することとした。

各項目の区切りはセミコロンとし、必須入力項目のみのパターンと、推奨される検査項目も含まれるパターンの 2 パターンを作成し、入力項目についても指定した。

例：IMP+;NDM-;KPC-;OX48-;MB+;BA?

誤入力を防ぐため、エクセルファイルを用いてプルダウン形式で検査結果を選択すると、上記入力形式が作成させるツールを作成し、入力に際しこのエクセルツールからコピーペーストをしてもらうこととした。CRE については菌種名も重要な情報であるため、菌種名の登録についても統一した。CRE に含まれる多くの菌種は現在の NESID システムでは選択できないことから、菌種入力をする「検出病原体情報」は「その他の細菌」を選択し、菌種名はテキスト記載することとした。菌種名は綴りの誤入力や属名記載のばらつき(例：*E. coli* と *Escherichia coli*)を防ぐため、これも、前述のエクセルツールに腸内細菌科細菌の菌名リスト追記し、それらからコピー&ペーストでの入力を推奨した。

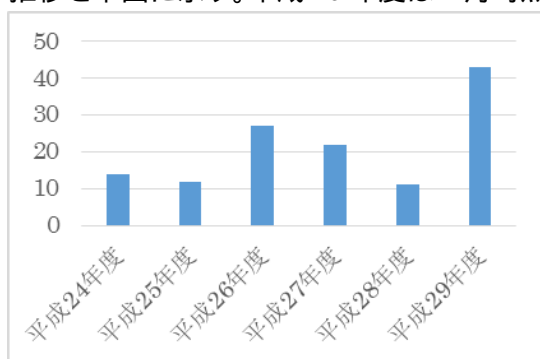
上記形式を作成後、協力が得られた地研において試験入力を実施した。試験入力の過程で、形式外の入力となる可能性の高い

項目を洗い出し、入力手順書に注意事項として明記することとした。また、NESIDシステム上必須入力項目であるものの集計には利用しない項目（例「検出方法」についても入力内容は統一することとした。

これらの内容を整理した入力手順書（別添）を各ブロックのレファレンスセンターを通じて地研に配布し、平成 29 年に実施した検査について入力を依頼した。

2. 試験検査の精度管理手法の検討

地方衛生研究所からの問い合わせ件数の推移を下図に示す。平成 29 年度は 2 月時点



での集計値であるが、すでに 40 件を超えており、過去 6 年間で最も多い。平成 28 年度末に発出された通知により、各地研での薬剤耐性菌の試験検査実施数が増加したためと思われる。

問い合わせ内容としては、非典型的なディスク法の結果の解釈に関するものが多かった。それらについては、ディスク法の画像をもとに、メール等で数回のやり取りと追加試験を依頼し、原因を確認した。また、原因が判明しない場合は、菌株もしくは DNA プラグを送付してもらい、全ゲノムシーケンスなどの追加解析を感染研で実施した。問い合わせにより判明した非典型的なディスク法の原因として、感性菌のコンタミネーションおよび、非腸内細菌科細菌の誤同定があった。

ディスク法の画像は、カルバペネム耐性

度のほか、コロニーの性状、阻止円の詳細（二重阻止円、阻止円内小コロニー、辺縁の形状）など多くの情報が得られ、試験結果の解釈の契機となるが多かった。

今後、各地研からの問い合わせに際しては解釈が困難となるデータの呈示のみでなく、定型的に実施しているディスク法の結果を貼り付けできる問い合わせ用のフォーマットを作成することが有用と考えられた。
D. 考察

平成28年3月の地研における薬剤耐性菌の試験検査の実施に関する通知により、今後は試験検査結果の集計と還元、および試験の精度管理がラボネットワークとして取り組む重要な課題になると思われる。

NESID病原体サーベイランスシステムはすでに各自治体や感染研の担当部署に端末が配備されており、セキュリティやヘルプデスクなど運営体制も整備されている。報告された結果は、一括してダウンロード可能で、集計解析もエクセルベースで柔軟に実施可能である。また他の病原体において運営実績もあるため、報告システムとしては十分である。しかし、薬剤耐性菌の試験検査結果を報告するためのシステム（報告項目や、病原体名称など）が整備されていない。加えて、今年度報告形式を統一する過程において、どのような試験検査項目を報告するのか、報告形式をどのように規定するか等の検討が不十分であることが明らかとなった。現時点では、入力文字数の制限もあることから、必要最小限の情報のみ報告できる形式としたが、今後はカルバペネマーゼ遺伝子以外の -ラクタマーゼ遺伝子の検出結果についても報告すべきか等の検討が必要になると思われる。また、特にカルバペネマーゼ産生菌の試験法は毎年のように新しい方法が提唱されるため、そ

の感度特異度、実施の推奨度についても毎年検討を続ける必要がある。

報告された試験検査結果は、地域別の検出状況を迅速に還元し、各地域での耐性菌の広まりを評価する必要がある。各地域の特性を把握するためには全国の集計結果も必要となる。平成29年の全国の試験検査実施分については、報告形式が定まるまで時間を要したため、1年分をまとめて集計解し、その結果を公表する予定であるが、今後は半年ごとといったより迅速な集計を試みる。

精度管理については、画像情報をデータベース化し、地研担当者と共有することが長期的にラボネットワークの試験検査精度の向上に重要と考えられた。ディスク法の阻止円径パターンの判読には、数多くの試験結果を経験することが重要である。自施設のデータ以外に、他施設の様々な試験検査結果を共有することで、継続的な研修効果とともに、新規薬剤耐性菌の迅速な把握にも有用であると考えられた。ただし画像データのデータベース化はテキストデータにくらべ煩雑であるため、その手法については今後検討が必要である。

また試験検査の精度を担保するためには、可能な限り統一した試験法が多くの施設で実施されることが望ましい。薬剤耐性菌、特にカルバペネマーゼ産生菌の検出方法は様々な試薬メーカーが独自の検査キット等を販売しており、中には十分な感度特異度が得られないものもある。海外で普及している試験法であっても、分離される耐性菌の性状が異なる我が国では検討が必要なものもある。そのため、可能なかぎり病原体検出マニュアルに準じた試験を実施してもらえるよう依頼し、また最新かつ最適な検査法を提案できるように常にマニュアルの改訂を進める必要があると思われる。

E．結論

地方衛生研究所における薬剤耐性菌の試験検査体制整備の第一段階は終了し、ほとんどの地研での試験の実施が可能となった。今後は実施された試験結果の集計と解析、結果の公表方法の検討および、試験精度の担保が主な課題になると考えられる。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

論文発表

なし

学会発表

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
古畑勝則、井上浩章、枝川亜希子、前川純子	第5章 レジオネラ属菌の検査法 他	レジオネラ症防止指針編集委員会 (委員長 館田一博)	第4版レジオネラ症防止指針	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	東京	2017	全 166 ページ
安藤秀二	リケッチア	中込治 監修、神谷茂・錫谷達夫編集	標準微生物学 第13版	医学書院	東京	2018	262 270

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
調 恒明	地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に必要な感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化	公衆衛生情報	47	10-12	2018
調 恒明	地域保健法と地方衛生研究所	公衆衛生	82	238-243	2018
Fujimoto Y, Hasegawa S, Matsushige T, Wakiguchi H, Nakamura T, Hasegawa H, Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsuta R, Morishima T, Ohga S.	Pulmonary inflammation and cytokine dynamics of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during A(H1N1)pdm09 influenza infection.	Sci Rep.	7	9128	2017

Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H	Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17.	Emerg Infect Dis.	24	144-148	2018
Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H.	Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017.	Front Microbiol.	9	1-9	2018
Ikebe T, Okuno R, Sasaki M, Ka nda Y, Otsuka H, Kawahara R, Oh ya H, Suzuki M, Uchida K, Niho matsu H, Ohnish i M, The Workin g Group for Beta -Hemolytic Strept ococci in Japan.	Molecular characterizati on and antibiotic resist ance of <i>Streptococcus d ysgalactiae</i> subspecies <i>e quisimilis</i> isolated from patients with streptoco ccal toxic shock syndro me.	J Infect Chem other.	24(2)	117-122	2018
Yamamura Y, Mi hara Y, Nakatani K, Nishiguchi T, Ikebe T.	Complication of Neonat al Meningitis Caused b y <i>Streptococcus gallolyt icus</i> Subsp. <i>pasteurianu s</i> : a Case Report.	Jpn J Infect Dis.	71(1)	68-71	2018
田島茂	ジカウイルス感染症	別冊 BIO Clinica 慢性 炎症と疾患	6	58-63	2017
田島茂	日本脳炎	化学療法領域	33	1635-1643	2017

Taira, M., Ogawa, T., Nishijima, H., Yamamoto, K., Hotta, C., Akita, M., <u>Tajima, S.</u> , Saijo, M.	The first isolation of Zika virus from a Japanese patient who returned to Japan from Fiji in 2016.	Japanese Journal of Infectious Diseases	70	586-589	2017
Katanami, Y., Kutsuna S., Tajniguchi, S, <u>Tajima, S.</u> , Takaya S., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Kato, Y., Ohmagari, N.	Detection of Zika virus in a traveler from Vietnam to Japan.	Journal of Travel Medicine	24	Tax031	2017
Hashimoto, T., Kutsuna, S., <u>Tajima, S.</u> , Nakayama, E., Maeki, T., Taniguchi, S., Lim, C-K., Katanami, Y., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kato, Y., Ohmagari, N.	Importation of Zika virus from Vietnam to Japan, November 2016.	Emerging Infectious Diseases	23	1223-1225	2017
Suzuki, T, Kutsuna, S., Taniguchi, S., <u>Tajima, S.</u> , Maeki, T., Kato, F., Lim, C-K., Saijo, M., Tsuboi, M., Yamamoto, K., Morioka, S., Ishikane, M., Hayakawa, K., Kato, Y., Ohmagari, N.	Dengue virus exported from Cote d'Ivoire to Japan, June 2017.	Emerging Infectious Diseases	23	1758-1760	2017
Tsuboi, M., Kutsuna, S., Maeki, T., Taniguchi, S., <u>Tajima, S.</u> , Kato, F., Lim, C.K., Saijo, M., Takaya, S., Katanami, Y., Kato, Y., Ohmagari, N.	Dengue virus type 2 in travelers returning to Japan from Sri Lanka, 2017.	Emerging infectious Diseases	23	1931-1933	2017

Hashimoto, T., Kutsuna, S., Maeki, T, <u>Tajima, S.</u> , Takaya, S., Katanami, Y., Yamamoto K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kato, Y., Kanagawa, S., Ohmagari, N.	A case of dengue fever imported from Burkina Faso to Japan in October 2016.	Japanese Journal of Infectious Diseases	70	675-677	2017
安藤秀二	発疹チフス	小児科臨床増刊号[グローバル化・温暖化と感染症対策]	70	2261-2266	2017
Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, Monma N, Ikegaya A, Yamamoto S, Fujita H, Morita H, Tamaki Y, Su H, Shimada M, Takamoto N, Shimamura Y, Masuda S, Ando S, Ohashi N	Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan	Japanese Journal of Infectious Diseases			In press
佐藤寛子, 村井博宜, 石田晋之介, 藤田博己, 安藤匡子, 安藤秀二	秋田県のマダニ刺咬3症例における紅斑熱群リケッチア感染の検索	衛生動物学雑誌			In press
Mori Y, Miyoshi M, Kikuchi M, Sekine M, Umezawa M, Saikusa M, Matsushima Y, Itamochi M, Yasui Y, Kanbayashi D, Miyoshi T, Akiyoshi K, Tatsumi C, Zaitu S, Kadoguchi M, Otsuki N, Okamoto K, Sakata M, Komase K, Takeda M.	Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012-2013 epidemic in Japan.	Frontiers in Microbiology	8	1513	2017
Moriuchi T, Vichit O, Vutthikol Y, Hossain MS, Samnang C, Toda K, Grabovac V, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K, Kamachi K	Molecular epidemiology of <i>Bordetella pertussis</i> in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens	Int J Infect Dis	62	56-58	2017

Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K	A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses	PLoS One	12(7)	e0181181	2017
Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K	Significant decrease in pertactin-deficient <i>Bordetella pertussis</i> isolates, Japan.	Emerg Infect Dis	23(4)	699-701	2017
Yamamoto K, Kato Y, Mutoh Y, Kutsuna S, Imaoka K, Ohmagari N	Photo Quiz: A Traveler from Africa with Fever and Aggravated Chronic Back Pain.	Clinical Infectious Diseases	66(5)	805-807	2018
Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yamamoto, H., Ishii, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Sato, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T	<i>In vivo</i> virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts	PLoS Pathogen	3	e1006638	2017
松岡佐織	日本国内 HIV/AIDS 発生病原微生物検出動向 update	病原微生物検出情報 (IASR)	38	179	2017
藤本嗣人、小林正明	手足口病と咽頭結膜熱について	心とからだの健康	21 巻 8 号	68 ~ 69	2017
藤本嗣人	アデノウイルスの迅速診断の現状(2017 年)	臨床とウイルス	45 巻 3 号	105 ~ 109	2017
Hashimoto S, Gonzalez G, Harada S, Oosako H, Hanaoka N, Hinokuma R, Fujimoto T.	Recombinant type Human mastadenovirus D85 associated with epidemic keratoconjunctivitis since 2015 in Japan.	Journal of Medical Virology	90(5)	881-889	2018
Nakamura H, Fujisawa T, Suga S, Taniguchi K, Nagao M, Ito M, Ochiai H, Konagaya M, Hanaoka N, Fujimoto T.	Species differences in circulation and inflammatory responses in children with common respiratory adenovirus infections.	Journal of Medical Virology	90(5)	873-880	2018
Suzuki S, Kawamura T, Saeki Y, Okubo M, Konagaya M, Hanaoka N, Arashiro T, Fujimoto T, Uchio E.	A Case of Type 54 Human Mastadenovirus Keratoconjunctivitis Causing Severe Broad Epithelial Defect Ten Years after LASIK Surgery.	Japanese Journal of Infectious Diseases	70(5)	597-598	2017

Fukuda S, Ito S, Fujiwara M, Abe J, Hanaoka N, Fujimoto T, Katsumori H.	Simultaneous development of Kawasaki disease following acute human adenovirus infection in monozygotic twins: A case report.	Pediatr Rheumatol Online J.	15(1)	doi: 10.1186/s12 969-017-016 9-x.	2017
Uemura T, Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawam ura T, Saeki Y, Fujimoto T, Uchio E	Clinical and virological analysis of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a regional ophthalmic clinic in Kyushu, Japan	Clinical Ophthalmology	12	511-517	2018