

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28年度～平成30年度 総合研究報告書

研究代表者 宮崎 義継

(国立感染症研究所)

令和元(2019)年5月

目 次

I. 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・・・・・・・・・・ 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と
播種性クリプトコックス症等のマニュアル作成・・・・・・・・ 14
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・・・・・・・・ 17
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20
研究分担者：前川 純子（国立感染症研究所 細菌第一部）
研究分担者：大西 真（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・・・・・・・・ 25
研究分担者：池辺 忠義（国立感染症研究所 細菌第一部）
研究分担者：大西 真（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・・・・・・・・ 29
研究分担者：永宗 喜三郎（国立感染症研究所 寄生動物部）
研究分担者：野崎 智義（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・・・・・・・・ 36
研究分担者：林 昌宏（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
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活動・・・・・・・・ 47
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	5 3
	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	6 2
	研究分担者：森 嘉生（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
	研究分担者：駒瀬 勝啓（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
10.	百日咳	7 4
	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	7 9
	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.	動物由来感染症レファレンスセンター 平成28-30年度活動報告	8 4
	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	9 4
	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.	アデノウイルスレファレンス活動状況 2017～2019年	9 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.	薬剤耐性菌病原体サーベイランス体制の整備と活用、および精度管理	1 0 3
	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）	
16.	カンピロバクター・レファレンス	1 0 9
	研究分担者：朝倉 宏（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	1 1 8

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

総括研究報告書

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

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

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

A. 研究目的

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

施する法的な義務を負っている。

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

機管理上、必須である。

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

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

病原体診断用機器や試薬等の整備、診断・検査法の精度管理基盤の構築。

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

大腸菌:血清型別・遺伝子型別を行った。

レジオネラ:SBT法による遺伝子型別を行った。

レンサ球菌:T型別を行った。

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

アルボウイルス:ジカウイルス病実験室診断法および遺伝子型V型日本脳炎ウイ

ルスゲノム検出法を確立し、黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法を改良した。

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

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

麻疹・風疹：毎年、麻疹・風疹レファレンスセンターを通じて、全国 74-76 地衛研にアンケートを実施し、麻疹風疹遺伝子検査の実施状況を調査した。平成 28 年 8 月におこった麻疹アウトブレイク時に、各地衛研にプライマー、標準品等の準備状況に関するアンケートを実施し、必要に応じてプライマー、標準品等を配布した。遺伝子検査に用いる参照 RNA を改良した。収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列を感染研が他の自治体へ提供することについて、検討を依頼し、その結果を踏まえて提供方法について検討を行った。

百日咳：百日咳菌 LAMP キットを評価し

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

結核：内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価への参加希望を募り、参加施設への検体送付および検査成績の集計・分析を行った。

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

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

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

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

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

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

C . 研究結果

レファレンスセンター再構成：希少疾患あるいは国内の患者発生が近年みられな

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

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

地方衛生研究所検査室の機能:

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

大腸菌:「腸管出血性大腸菌(EHEC)検査・診断マニュアル」の改訂版を作製し、感染研ホームページ上に掲載した。平成28-30年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全8,952株であった。参照株を配布し、問合せを受け付けた。O-/H-genotyping PCR法を大腸菌サーベイランスに導入した。下痢原性大腸菌EQAを実施した。

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

レンサ球菌:平成27-29年に全国の衛生研究所に収集された咽頭炎患者分離株

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

寄生虫

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

アルボウイルス

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

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

リケッチア：

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

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

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

3. 全国の地衛研の年報についてリケッチア関連情報を過去に遡って抽出した。レファレンスセンター会議、研究会、研修会を通じ、全国とそれぞれの地域の発生状況、他のダニ媒介性感染症との類症鑑別の問題点等の情報共有・交換を行い、臨床現場と直結する地衛研のリケッチア検査対応の情報更新の準備を行った。

エンテロウイルス：

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

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

麻疹・風疹

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

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

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

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

百日咳：百日咳菌 LAMP キットを評価す

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

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

動物由来感染症：

1. 野兔病菌検査：血清学的検査では、報告された SOP を確認したところ、不鮮明さにより、凝集の有無の判定の正確性が確認できない写真がいくつか確認された。遺伝子検査では、多くの機関が SOP に遺伝子増幅の有無を記載するのみであり、PCR の結果から想定される各疑似検体に含まれる菌種について記述していた機関は少なかった。

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

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

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

30 年度内に 14 施設の参加、および結果報告を受けている。

アデノウイルス

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

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

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

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

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

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

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

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

カンピロバクター

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

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

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

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

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

D. 考察

地方衛生研究所検査室の機能：

1.信頼性確保の在り方：感染症分野における検査機器、試薬、検査環境、手法及

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

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

大腸菌：平成 29 年 2 月に更新した「EHEC 検査マニュアル」の記載内容についてトラブルシューティング等を受け付けると共に、コントロール株(DNA)の配布等をさらに継続的に実施する必要がある。加えて、抗血清を用いた型別法と O-/H-genotyping PCR 法との整合性解析から重症例由来の新規 O 群および血清型(O:H 型)について明らかにする必要がある。

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

染源の解明につながることを期待される。

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

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

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

アルボウイルス：

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

リケッチア：日本紅斑熱、つつが虫病を中心とした国内のリケッチア症は、患

者数、発生地域ともに拡大している。臨床現場に近い、地衛研での実験室診断体制の維持・強化は重要性を増している。複数の地衛研による臨床検体への適用性の検討から、紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアのマルチプレックス・リアルタイム PCR は、従来法と比較して遜色ない検出感度を示すなど十分な結果が得られ、試薬の準備等の簡便さからも使いやすい系であることが示された。さらに、評価した系は地衛研でのスクリーニングに強力なツールとなり、迅速な情報発信につながることを期待される。リケッチア症の実験室診断系の体系を再構築、実施と情報交換の中で、診断系の問題、課題の抽出を試み、非特異と考えられるケースなど報告された。報告された問題や課題を共有し、あくまでもスクリーニング系という意味で、簡便性のメリットが勝ると考える。診断系の評価や情報交換から、機能が全国の横糸として機能しており、その維持の仕方についてもさらに検討していく必要がある。

エンテロウイルス：エンテロウイルス感染症には、5 類小児科定点把握疾患として手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、2 類感染症としてポリオが含まれる。定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスを維持し、一定数の検査を実施することで、ポリオウイルス検査に対応可能である。このためにレファレンス活動を通じて、必要な標準品(細胞、抗血清)の配布、実技研修等、検査体制の維持、結果の質を担保するために継続する必要がある。

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

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

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

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

アウトブレイクに備えて、感染研あるいはレファレンスセンター等に緊急用の試薬等を用意し、検査診断体制の機能を維持する必要がある。

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

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

百日咳：今回の検討により、百日咳菌 LAMP キットは *ptxP1* 株以外に *ptxP3* 株と *ptxP8* 株に対しても高い検出感度を持つことが判明した。さらに、*ptxP3* 株は LAMP プライマーの標的配列内に SNP が存在するにも関わらず、*ptxP1* 株と *ptxP8* 株よりも高い感度で検出されることが示された。世界の百日咳流行株の主要な *ptxP* アレルは *ptxP1* と *ptxP3* であり、臨床分離株の 99% 以上を占めている。百日咳菌 LAMP キットが *ptxP1* 株のみならず *ptxP3* 株も高

感度に検出したことから、本法は現在の百日咳流行株の検出に有用と判断された。ただし、新たな *ptxP* アレルを持つ流行株が今後増加する可能性は否定できないため、臨床分離株の *ptxP* アレル変化に関しては継続的な調査が必要である。

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

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

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

動物由来感染症：

1. 野兔病菌：EQA に際し回収した SOP と検査結果では、使用試薬などのメーカー名、品番、開封日などに記入不備が多かった。今後、EQA 実施時には SOP への記入例や結果報告方法についての説明書を配布する必要がある。野兔病の血清診断は全参加機関で適正に実施可能と考えられた。PCR の感度が施設間で 1,000 倍異なった事は、使用酵素やサーマルサイクラーの性能、検査者の手技の相異などに起因する可能性がある。本 EQA において、PCR の結果から検体の菌種判定を記述した機関は少なかったため、記入欄を追加するなどして改善するべきである。

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

3. 炭疽菌検査：各参加機関の間でみられた conventional PCR 検査系での検出限界の差は、使用したサーマルサイクラーの違い、低濃度 DNA での増幅に影響する要因（例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い）増幅産物の確認方法によるものと考えられる。今回、施設間で検出限界濃度の差が認められたものの、炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には非常に多くの炭疽菌（通常 10^6 CFU/ml 以上）が存在していることから考察すると、これらの検体からの検査においては、今回検証された検出限界の検査系で検出は可能であると考えられる。過去に生物テロで使

われた芽胞粉末（いわゆる白い粉）の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、PCR 検査系としてはどの機関も十分な検出限界を有していると考えられる。

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

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

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

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

必要不可欠である。

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

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

E . 結論

地方衛生研究所検査室の機能：

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

大腸菌・レジオネラ：病原細菌の病原体サーベイランスのための機能的なラボネットワークの強化には、各施設において実施可能な手法の共有と、技術的継承

が必要である。本研究の具体的実施項目を通じて各担当者間でのコミュニケーションが維持され、問題点、ニーズが明らかになることが期待できる。

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

寄生虫：

マラリアの検査診断法については、厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会などの機会を利用し、検疫所の職員に対し、定期的な技術研修や情報提供を実施する必要がある。

エキノコックス症に関しては、地衛研および医療機関等から発生情報を積極的に収集する必要がある。このために、終宿主動物・イヌと歩哨動物・ブタの簡易な検査方法を開発・利用する必要がある。食品寄生虫（寄生虫食中毒）に関する地衛研とのラボネットワークの強化も、感染症・食中毒の枠を超えて、継続的に取り組むべき課題である。これには情報交換と相互研修がまず重要となる。

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

アルボウイルス：黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立した。ジカウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 法を確立した。本法を用いて現在検査を行っており、またすでに各地の衛生研究所等の検査機関に情報提供されている。今回新たに抗ジカウイルス IgG 検出のための IFA 法を確立した。黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒

介性脳炎の実験室診断法を確立した。

日本脳炎ウイルス GV のゲノム検出系を確立したが、今後改善の余地がある。

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

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

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

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

有用な解析手段になることを確認した。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

F．健康危険情報

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

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

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

寄生虫

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

G．研究発表

各分担研究報告書を参照。

H．知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書を参照。

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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と
播種性クリプトコックス症等のマニュアル作成

研究分担者 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
中村茂樹 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（感染研）で公開している、1類～5類感染症その他の病原体検出マニュアルは、全国の地方衛生研究所等の自治体検査機関（地衛研等）と感染研の間で相互に補完協力して作成されている。これらのマニュアルは病原体検査を行う上で多くの地衛研等に参考にされているものであるが、精度の高い病原体診断を行うためには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、病原体検出マニュアルの新規作成とアップデート（改訂版への差し替え）を行い感染研のホームページで公開した。新規掲載は「播種性クリプトコックス症」、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」、「ニパウイルス感染症およびヘンドラウイルス感染症」、「A型肝炎」、「E型肝炎」であった。病原体検出マニュアルの不断の更新により、検査機関での病原体検査の精度の維持・向上への貢献が期待できる。さらに、衛生微生物技術協議会レファンセ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追記した。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

病原体検出マニュアルは、多くの地方衛生研究所等の自治体検査機関（地衛研等）が病原体検査を行う上で参考にしているものであり、感染症対策に係る自治体の行政検査の際に利用されている。感染症法に定められた感染症について、全国の地衛研等と国立感染症研究所（感染研）とが共同で作成しており、マニュアルの使用と評価を繰り返していく中で、新しい知見や科学の

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。

クリプトコックス症は健常者に発症し死亡に至る深在性真菌症としてわが国で最も頻度が高いとされている。その中でも致命的な「播種性クリプトコックス症」は、平成26年9月19日より感染症法の5類全数把握疾患と規定された。真菌症で感染症法に規定されるのは、4類感染症のкокシジオイデス症に続いて2番目となる。

本研究では、この播種性クリプトコックス症の病原体検出マニュアルをあらたに作成し、追加するとともに、その他各種病原体検出マニュアルのアップデート（改訂版への差し替え）を随時行い、全国の地衛研等における病原体検査の維持・向上に貢献することを目的とする。また、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、3年間で11疾患のアップデートおよび5疾患の追加を行った。また、ホームページに掲載している68疾患のマニュアルのpdfファイル、それぞれの最終更新年月を調査し、ホームページに反映させた。

播種性クリプトコックス症については、国立感染症研究所真菌部の真菌検査標準作業手順書を参考に、あらたに病原体検出マニュアルを作成し、ホームページに掲載した。

C．研究結果

平成28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、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、腸管出血性大腸菌感染症、咽頭結膜熱・流行性角結膜炎、麻しんであった。追加した病原体検出マニュアルは、カルバペ

ネム耐性腸内細菌科細菌感染症、ニパウイルス感染症およびヘンドラウイルス感染症であった。

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。

平成30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、後天性免疫不全症候群、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）であった。追加した病原体検出マニュアルは、A型肝炎、E型肝炎、後述の播種性クリプトコックス症であった。

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

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。

3類感染症	
• コレラ	2015年9月版
• 細菌性赤痢	2012年6月版
• 腸管出血性大腸菌感染症	2017年2月版
• 腸チフス・パラチフス	2012年5月版

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る、アップデートを行った。定期的な更新により、マニュアルの信頼性が増し、全国の地衛研等での病原体検査精度向上への貢献が期待できる。

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・追加を行った。播種性クリプトコックス症の病原体検出マニュアルを作成し、感染研ホームページ上に反映させた。ともに、引き続き改訂を続けて行く必要がある。

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

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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	江原 勇登	埼玉県衛生研究所
	大友 麗	鳥取県衛生環境研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター
	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
	竹内 道子	長野県環境保全研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	豊嶋 千俊	愛媛県立衛生環境研究所
	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	裕岡 由美子	熊本市環境総合センター
	横井 一	千葉市環境保健研究所
	吉田 弘	国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 地方衛生研究所が実施する病原体検査のための試薬の継続的確保、マニュアルの整備、感染症法改正により必要となった信頼性確保部門の研修の方法の確立、法改正後の病原体サーベイランスの現状把握を目的として研究を実施した。過去の新興感染症の発生時に国立感染症研究所から地方衛生研究所に送付された検査診断試薬を集約したリストを作成した。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、マニュアルの有無について調査を行った。感染症法改正後に必要となった信頼性確保部門について国が実施する研修のためのガイドライン及びチェックリストの案を作成した。また、改正前後の病原体サーベイランスの変化について全国調査を実施し、与えた影響について解析を行った。

A．研究目的

1. 地方衛生研究所が実施する病原体検査のための試薬の継続的確保、2. 病原体検出マニュアルの整備、3. 感染症法改正により必要となった信頼性確保部門の研修の方法の確立、4. 法改正後の病原体サーベイランスの現状把握を目的として研究を実施した。

B．研究方法

1. 過去に配布された検査試薬のリスト作成
2. 感染症法に基づく病原体等検査に係る信頼性確保部門を対象としたベースライン調査

3. 信頼性確保のために確認すべき要因（項目）の分析及びチェックリストの作成

4. 信頼性確保部門担当者向け研修ガイドラインの作成
5. 病原体検体数の調査

C．研究結果

1. 過去に配布された検査試薬のリスト作成

これまで、MERS, SFTS 等の新興感染症の発生時に国立感染症研究所から地方衛生研究所に検査診断試薬が配布されてきたが、いつ、どのような試薬が配布されたかを集約したリストは存在しない。そこで、

配布された検査試薬リストを作成した。

2. 感染症法に基づく病原体等検査に係る信頼性確保部門を対象としたベースライン調査

信頼性確保部門に対するアンケート調査を行い、改正感染症法施行後の業務状況と研修への要望を把握することとした。

3. 信頼性確保のために確認すべき要因(項目)の分析及びチェックリストの作成

アンケート調査結果に基づき研究協力者(検査担当者及び信頼性確保部門担当者)とワークショップ形式で信頼性確保のために確認すべき項目(チェックリスト)の内容を検討した。

4. 信頼性確保部門担当者向け研修ガイドラインの作成

信頼性確保部門担当者へのアンケート調査結果(要望事項)とワークショップにより国が行う研修に必要なガイドラインを作成した。

5. 病原体検査数の増減の検討

インフルエンザの検体数を法改正前後で比較したところ、14都道府県で検体数が改正前の2倍以上に増加していた。ところが、インフルエンザ病原体低点数と流行期毎週1検体、非流行期毎月1検体から計算した基準値(以下基準値と略)と実際の検査検体数を比較すると、5つの都道府県で基準値の半分以下の検体数であった。75%以下の都道府県は、半数以下の5都道府県を含めて12に上った。検体数が基準値の半数以下であった都道府県のうち、2つの都道府県では法改正前と比較して検体数が2倍以上となっており、改正前の検体数が少なく、改正後倍増しても半数に届かなかったと思われる。インフルエンザの検体数が増加した都道府県であっても、その他の五類感染症の検体数が減少していた自治体は見られなかった。

D. 考察

1. 信頼性確保の在り方

感染症分野における検査機器、試薬、検

査環境、手法及び研修内容等は、食品や水道分野と異なり、加えて検査の質の管理に用いる標準試薬や参照品、手法も異なる。

信頼性確保部門担当者に病原体等の検査経験がないこと及び人事異動による担当者の変更を考慮すると、研修内容は、検査技術の詳しい説明等ではなく、検査プロセスに存在する各種要因が検査結果の信頼性に与える影響を理解できるものにするのが重要である。

2. 病原体サーベイランスの変化

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

E. 結論

1. 過去に感染研から地研向けに配布された検査試薬のリストを作成し、厚生労働省健康局結核感染症課に提出し、今後の補充のための資料とした。

2. 平成28年の感染症法改正により、必要となった国が実施する信頼性確保部門の研修のための資料を作成した。

3. 病原体サーベイランスの変化について調査を実施し、その影響を評価した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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、2018, 47(12), 10-12

2. Kimura H, Shirabe K, Takeda M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Okayama K, Ryo A, Nagasawa K, Okabe N, Minagawa H,

Kozawa K. The Association Between Documentation of Koplik Spots and Laboratory Diagnosis of Measles and Other Rash Diseases in a National Measles Surveillance Program in Japan. *Front Microbiol.* 2019 Feb 18;10:269.

3 . Suzuki Y, Doan YH, Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting Directions of Changes in Genotype Proportions Between Norovirus Seasons in Japan. *Front Microbiol.* 2019 Feb 5;10:116.

4 . Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H. Dissemination and genetic analysis of the stealthy vanB gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. *BMC Microbiol.* 2018 Dec 13;18(1):213.

5 . Furuta T, Hasegawa S, Mizutani M, Iwai T, Ohbuchi N, Kawano S, Tashiro N, Uchida M, Hasegawa M, Motoyama M, Sekino T, Nakatsuka K, Ichihara K, Shirabe K, Ohga S. Burden of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus Infections in Asthmatic Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2018Nov;37(11):1107-1111

6 . 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.* 2018 Jan 18;9:1.

7 . Furuta T, Hasegawa S, Mizutani M, Iwai T, Ohbuchi N, Kawano S, Tashiro N, Uchida M, Hasegawa M, Motoyama M, Sekino T, Nakatsuka K, Ichihara K, Shirabe K, Ohga S. Burden of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus Infections in Asthmatic Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2018

May 4.

学会発表

1) 調 恒明、感染症危機管理における地方衛生研究所の役割と課題、地方衛生研究所研修フォーラム、第 77 回日本公衆衛生学会総会 平成 30 年 10 月 24 日 郡山市

2) 松岡由美子、吉田弘 熊本市環境総合センターにおける検査の質確保について 第 77 回日本公衆衛生学会総会 平成 30 年 10 月 24-26 日 郡山市

3) 松岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、小畑裕子、西澤香織、近藤芳樹、芦塚由紀、濱崎光宏、丸山浩幸、橘実里、堤陽子、林徹、島崎裕子、松本一俊、八尋俊輔、酒井崇、深澤未来、松本文昭、松浦裕、濱田結花、御供田睦代、久場由真仁、大友麗、吉田弘 地方衛生研究所全国協議会九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について 第 32 回公衆衛生情報研究協議会研究会 平成 31 年 1 月 24-25 日 岡山市

4) 大友麗、吉田弘 地方衛生研究所全国協議会中国四国ブロック内における信頼性確保に関する取組について 第 32 回公衆衛生情報研究協議会研究会 平成 31 年 1 月 24-25 日 岡山市

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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 大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部(平成29-30年度) 国立感染症研究所 細菌第一部(平成28年度)
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。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。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レジオネラ培養法および迅速検査法の状況把握を行った。多施設における検査の品質保証を的確に行なうことは必ずしも容易ではない。今後も、問題点の把握とそれを解決するための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

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 (Statens 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 ; J Clin Microbiol. 56(6). pii: e00190-18. 2018) 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 検査マニュアルの改訂

「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル」の改訂版を作製し、感染研ホームページ上にアップロードした (2017 年 2 月)。

1.2 EHEC のサーベイランス

2016-2018 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 8,952 株であり、その分布は、血清群 O157 (56.5%)、O26 (23.5%)、O103 (4.7%)、O111 (3.5%)、O121 (3.2%)、O145 (1.6%)、その他 (6.9%) であった。

1.3 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 [enteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌]) のコントロール株、EHEC のマーカー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) の配布を地方衛生研究所または保健所等へ行った。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。

1.4 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。

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

デンマーク血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) がヨーロッパ各国間で実施している下痢原性大腸菌の EQA 用菌株 (2016 年用) 10 株を用いた。感染研以外で EHEC タイピング用自家抗血清の準備がある大阪府立公衆衛生研究所 (2016 年当時) へ上記の菌株を送付し、EQA を行

ったところ、すべての菌株において生化学的性状（ソルビトール発酵性、 β グルクロニダーゼ活性、ヘモリシン活性）血清型（O:H型）および病原性遺伝子型の解析結果が感染研と大阪府ですべて一致し、これらの結果は SSI から得られた解答と完全に一致した。

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、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。年度毎の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た2018年3月までの3年間に収集されたレジオネラ属菌臨床分離株は207株であった。2018年3月末現在で、合計614株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。*L. pneumophila*が603株(98.2%)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1)。*L. pneumophila*の603株は、ST1からST2593まで235種類の遺伝子型に分けられ、多様であった。

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は、3年間継続実施され、70-71地衛研が参加し(参加機関は一部入れ替わりがある)、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。

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

地衛研の98%で環境水のレジオネラ培養検査が実施されていた。地衛研をもたない保健

所設置市の一部は環境水のレジオネラ培養検査を他機関に委託していた。また、46%の地衛研で環境水のレジオネラ迅速検査を導入していた。全検体で実施している機関、患者発生時に実施する機関、再検査に限っている機関、調査研究としてのみ行っている機関などレジオネラ迅速検査実施状況はさまざまであった。

D. 考察

2017年2月に更新した「EHEC検査マニュアル」の記載内容についてトラブルシューティング等を受け付けると共に、コントロール株(DNA)の配布等をさらに継続的に実施する必要がある。加えて、抗血清を用いた型別法とO-/H-genotyping PCR法との整合性解析から重症例由来の新規O群および血清型(O:H型)について明らかにする必要がある。

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

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
特記事項なし

G . 研究発表

論文発表

1. Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F. Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. *Emerg Infect Dis.* 23 : 349-351, 2017.
2. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani JI, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M; Working Group for *Legionella* in Japan. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan

between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018. e00721-18.

学会発表

1. Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani J, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.
2. 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.
3. Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

表1 収集臨床分離株の内訳

2018年3月末日現在

<i>L. pneumophila</i> 603株 (98.2%)		<i>L. bozemanae</i> 1株 (0.2%)
SG1 533株 (86.8%)	SG9 8株 (1.3%)	<i>L. dumoffii</i> 1株 (0.2%)
SG2 11株 (1.8%)	SG10 3株 (0.5%)	<i>L. feeleii</i> 1株 (0.2%)
SG3 17株 (2.8%)	SG12 2株 (0.3%)	<i>L. londiniensis</i> 1株 (0.2%)
SG4 4株 (0.7%)	SG13 2株 (0.3%)	<i>L. longbeachae</i> 6株 (1.0%)
SG5 11株 (1.8%)	SG14 1株 (0.2%)	<i>L. rubrilucens</i> 1株 (0.2%)
SG6 8株 (1.3%)	SG15 1株 (0.2%)	
SG8 1株 (0.2%)	Untypable* 1株 (0.2%)	
計 614株 (100%)		

*デンカ生研レジオネラ免疫血清ニューモフィラ1-15群のいずれにも反応しなかった。

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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 大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部（平成29-30年度） 国立感染症研究所 細菌第一部（平成28年度）
研究協力者	賀澤 優 内田 薫 大屋日登美 山口貴弘 大塚 仁 神田由子 奥野ルミ	福島県衛生研究所 微生物課 富山県衛生研究所 細菌部 神奈川県衛生研究所 微生物部 大阪健康安全基盤研究所 微生物部 山口県環境保健センター 保健科学部 大分県衛生環境研究センター 微生物担当 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。2015-2017年において咽頭炎由来株のT型は、2015年と2017年はT12型、2016年はT1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型は2015-2017年全てにおいて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 TE (pH8.0) に懸たく後、mutanolysin (Sigma) を添加し、37 $^{\circ}$ C 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

2015-2017 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌の菌株総数は、2693 株 (2015 年 1013 株、2016 年 837 株、2017 年 843 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 (519/2693, 19.3%)、T12 (500/2693, 18.6%)、TB3264 (384/2693, 14.3%)、T4 (377/2693, 14.0%) であった。T12 型の分離比率は、2016 年以降、増加傾向であった (2015 年, 15.5%、2016 年, 19.2%、2017 年, 21.6%)。T1 型の分離比率は、2015 年以降、増加傾向であったが (2014 年, 11.9%、2015 年, 14.4%、2016 年, 23.5%)、2017 年減少した (2017 年, 20.9%)。TB3264 型の分離比率は、減少傾向にあったが (2014 年, 27.1%、2015 年 15.8%、2016 年, 11.6%)、2017 年増加した (2017 年, 15.1%)。T4 型は、2015 年以降ほとんど同じ分離頻度を示した (2015 年, 4.0%、2016 年 14.0%、2017 年, 14.0%) (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

2015-2017 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) 患者から分離された菌株が 397 株収集された。最も分離された型は、T1 型であり、分離比率が毎年 30% 以上であった (2015 年, 38.7%; 2016 年, 49.7%; 2017 年, 35.8%)。また、咽頭炎由来株の分離比率 (19.3%) に比べ、高い分離比率を示していた。次いで、TB3264 型が多く、その分離比率は 30% 前後を推移している (2015 年, 25.5%; 2016 年, 16.1%; 2017 年, 21.6%)。次いで T12, T3 型が多かった。この 2 つの型で全体の 50% 以上を占めていた。

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いたが、2017 年ともに減少しており、パラレルに推移している傾向にある。また、TB3264 型も 2012 年頃から急増していることや、2016 年から 2017 年にかけて増加しており、パラレルに推移している。今後どの型が増加傾向にあるか傾向を注視する必要がある。

E. 結論

咽頭炎由来株の T 型は、T1 型と T12 型の分離頻度が高かった。一方、劇症型溶連菌感染症患者由来株の T 型は T1 型が最も多かった。咽頭炎由来株の T1 型と劇症型溶連菌感染症患者由来株の T1、TB3264 型は、近年パラレルに推移している傾向にあった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H,

- Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. *Sci Rep* 6:28761, 2016.
2. 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.
 3. 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.
 4. Imai T, Matsumura T, Mayer-Lambertz S, Wells CA, Ishikawa E, Butcher SK, Barnett TC, Walker MJ, Imamura A, Ishida H, Ikebe T, Miyamoto T, Ato M, Ohga S, Lepenies B, van Sorge NM, Yamasaki S. Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A *Streptococcus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 in press
 5. Yoshizawa S, Matsumura T, Ikebe T, Ichibayashi R, Fukui Y, Satoh T, Tsubota T, Honda M, Ishii Y, Tateda K, Ato M. Streptococcal toxic shock syndrome caused by β -hemolytic streptococci: clinical features and cytokine and chemokine analyses of 15 cases. *J Infect Chemother.* 2019 in press
- 学会発表
1. 池辺忠義. 連鎖球菌感染症の疫学 (シンポジウム: 食品媒介連鎖球菌感染症の疫学・食品微生物学・病原機構). 第 39 回日本食品微生物学会学術総会. 9 月 27-28 日, 2018 年, 大阪
 2. 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌について. 2018 年東海北陸ブロック地域レファレンスセンター連絡会議. 11 月 16 日, 2018 年, 愛知
 3. 渡辺美絵, 池辺忠義, 岡村暢大. 劇的な経過を辿った G 群溶血性連鎖球菌感染症の一例. 第 88 回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 11 月 16-18 日, 2018 年, 鹿児島
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

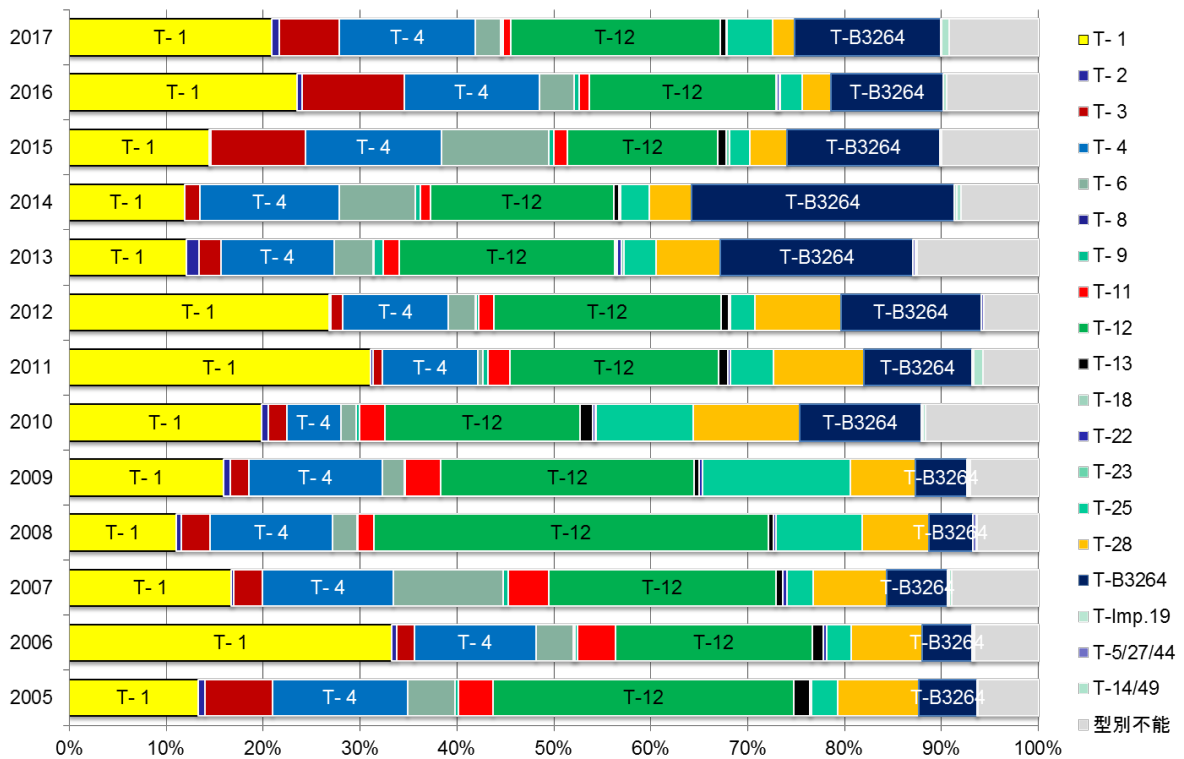


図1. 咽頭炎由来株（A群レンサ球菌）のT型別

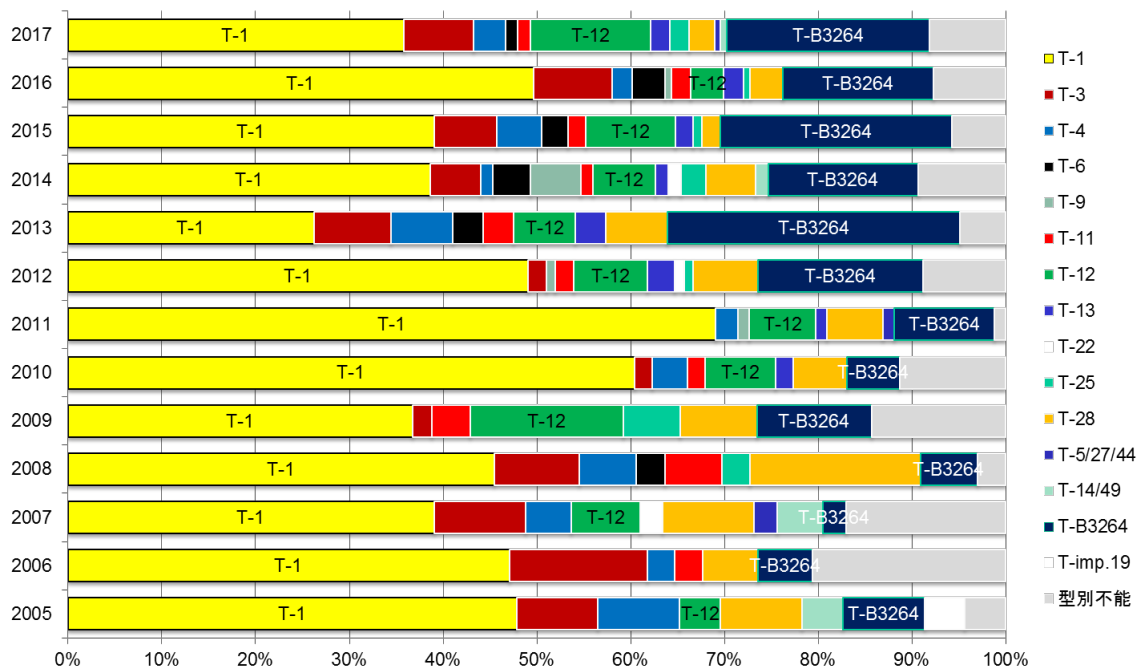


図2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株のT型別

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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 野崎智義	国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部	第1室長（平成29-30年度） 部長（平成28年度）
研究協力者	八木田健司 泉山信司 森嶋康之 杉山 広 中野由美子 案浦 健 長谷川晶子 海野友梨	国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所寄生動物部 愛知県衛生研究所生物学部医動物研究室 茨城県衛生研究所細菌部	主任研究官 主任研究官 主任研究官 主任研究官 主任研究官 主任研究官 主任研究員 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孢子虫に関しては、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。H28年度からH30年度にかけて毎年技術研修を行った。

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、感染症法では4類に分類され、ヒトおよび

ヒトへの感染源となるイヌの感染例について、それぞれ診断した医師もしくは獣医師に届出を義務付けている。国内土着のエキノコックスは、多包性の原因種である多包条虫であるが、これまで北海道に局限分布すると考えられてきた。しかし、2005年の埼玉県の例に続き、2014年には愛知県でイヌの感染例が発見され、全国的な拡散が懸念されている。そのため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（以下、地研と略）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、愛知県については衛生研究所へ新規に遺伝子検査法を導入し、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研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。本研究班では、国内では35年ぶりに集団食中毒事例が発生した旋毛虫症について、発生自治体である茨城県とともに検討に取り組んだ。また、滋賀県、茨城県、和歌山県で発生したシカ肉を原因とする住肉胞子虫による有症事例の原因究明に取り組んだ。

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を行った。H29年度以降は研修者参加型のクイズ形式でのトレーニングを実施した。

2. エキノコックス症

当部では全国各地の地研または国内外の医療機関からエキノコックス症をはじめとする寄生虫症の依頼検査を受け付けている。平成28-30年度は計184件の依頼があり、このうちエキノコックス症を疑う新規の検査依頼はヒトで23件、動物(イヌ・フェネックギツネ)で12件の計35件であった。ヒト由来材料に関しては、血清を材料とするウェスタンブロット法による免疫学的検査、または組織を材料とする遺伝子検査を行った。動物の疑い例の場合は、糞便または組織を材料として虫卵検査や遺伝子検査を適宜実施した。また、2014年にイヌの感染例が報告され、定着が懸念される愛知県においては、衛研が実施しているエキノコッ

クス調査に糞便内DNAを標的とした検査法を新規に導入し、監視体制の強化を図った。

3. 旋毛虫症

旋毛虫症は極めて重要な人獣共通食品媒介寄生蠕虫症であるが、我が国では欧米で多いブタ肉を介した感染はなく、野生獣肉(クマ肉)を介した集団感染事例が合計3度発生している。2016年12月、茨城県内の飲食店にて提供されたヒグマ肉を原因食品とする旋毛虫症が発生した。これは国内では35年ぶりとなる集団感染事例であった。本研究では、原因食品からの病原体検出を試み、原因種の特定を行った。また、原因食品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事例と異なり、本事例は原因食品に冷凍のほか、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. 住肉胞子虫

滋賀県における2回の有症事例(2011および2017年)、茨城県における有症事例(2017年)および和歌山県における食中毒事例(2018年)より、事例に関わる残品(シカ肉あるいは肝臓)を検体として、厚労省の通知法に基づくDNA抽出を行い、DNA試料を調整した。

市販シカ肉(エゾシカおよびホンシュウジカ)より形態的に異なるサルコシストを単離し、個別にDNAを抽出し、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イス特異的プライマーを設計し、これを用いた定性および定量 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、検疫所職員が毎年 20 名前後の参加があった。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。

H28 年 4 月から H31 年 2 月末までの 2 年 11 ヶ月の間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 15 例であり、そのうち 10 件がマラリア陽性、5 件は陰性であった。陽性検体の 10 例は 8 件が三日熱マラリア陽性、1 件は卵型マラリア陽性、1 件は熱帯熱マラリアと卵型マラリアの混合感染例であった。また 12 件の診断に関する相談を受入れ、14 箇所の地方衛生研究所 / 検疫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

ヒト疑診例の陽性例は、血清 2 例と組織材料 1 例であった。血清陽性例は外国人(ペルー人およびイラク人)の単包性エキノコックス症、組織陽性例は北海道居住歴がある日本人の多包性エキノコックス症で、いずれも流行地での感染が考えられた。なお、北海道の症例は遺伝子検査確定後、血清の提供を受け免疫学的検査を追加実施したが、抗体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 2 例が多包条虫陽性であった。動物はともに北米産イヌで、1 例は

成虫ではなく幼虫の感染例であった。愛知県では 2015 年 10 月から 2019 年 3 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 265 検体(内訳:イヌ 249、キツネ 12、タヌキ 4)について従来の MGL 変法による虫卵検査のほか、新規導入した遺伝子検査を行ったところ、虫卵検査で陰性判定された 3 検体から遺伝子陽性が得られ、ダイレクトシーケンスの結果、3 検体ともに塩基配列は多包条虫と一致した。

3. 旋毛虫症

茨城衛研から提供された原因食品(ヒグマ肉)を人工消化法により処理したところ、スティコソーム構造を持つ線虫幼虫が回収され、遺伝子解析の結果、旋毛虫の一種である *Trichinella* T9 と同定された。我が国で発生した旋毛虫症例で初めて原因種が分子同定された事例となった。旋毛虫類では *T. spiralis* の温度抵抗性は十分調べられているが、本事例の *Trichinella* T9 は分布が日本国内に限定することから温度抵抗性などは十分調べられていない。そこで冷凍や加熱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り、処理による不活化の可能性が示された。今後、各処理の影響を単独で評価するため、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。

4. 住肉孢子虫

市販エゾシカ肉から 2 つのサルコシストのタイプを明らかにした。小型のタイプ A(図 1)はホンシュウジカで報告のある *S. pilosa*(99%) と、一方大型のタイプ B(図

2)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。またホンシュウジカからエゾシカのタイプとは異なるタイプ C が見られ、これ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。

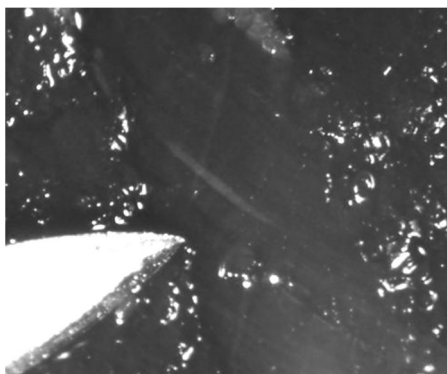


図 1、シカ肉中のタイプ A のサルコシスト

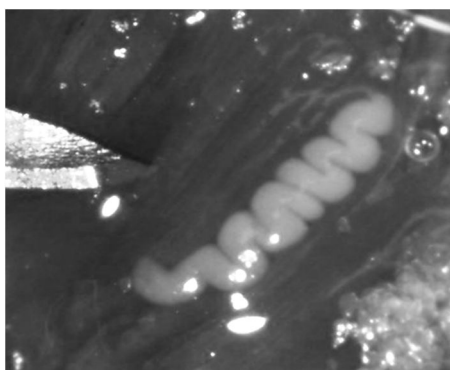


図 2、シカ肉中のタイプ B のサルコシスト

タイプ特異的 PCR プライマーを用いた PCR 系を構築し、有症/食中毒事例のシカ肉等抽出 DNA を調べた結果、タイプ A は全例より、またタイプ B は滋賀第 2 例と茨城第 1 例、和歌山第 1 例より検出された。タイプ C は今回の有症事例からは検出されなかった (表 1)。

表 1、有症/食中毒事例で検出されたサルコシスティスの遺伝子型タイプ

報告年	報告地	遺伝子型タイプ
2011	滋賀県	A
2015	滋賀県	A、B

2017	茨城県	A、B
2018	和歌山県	A、B

滋賀県内の 2 回の有症事例について定量 PCR 解析した結果では、両事例とも小型シストを形成するタイプ A が全体量のほとんどを占めることが示され、顕微鏡下における同タイプシストの高密度な分布の所見と一致した。大型のタイプ B シストは 2011 年と 2017 年でかなり差が見られた。シスト数は両者ともかなり少ない印象であったが、シストあたりの原虫数が多いため (推定 10^5 - 10^6 プラディゾイト/シスト)、シスト密度のわずかな違いが定量 PCR では大きな差として表れたものと考えられた。同時に調べた市販シカ (野生シカ) 肉では、有症事例の汚染レベルに近い汚染が認められた (図 3)。

感染原虫数/g筋肉

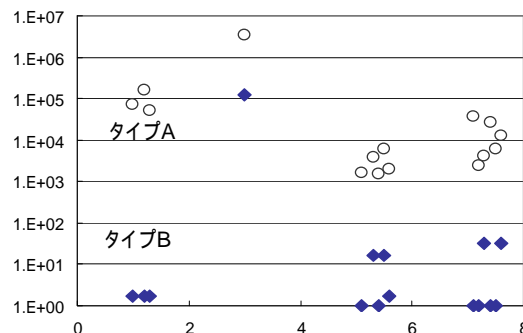


図 3、シカ肉サルコシスティスの定量 PCR 解析

D. 考察

各検疫所におけるマラリアの検査方法に関しては、概ねコンセンサスが得られており、迅速診断キットを所有する検疫所が講習を重ねる毎に増加し、改善は認められるが、所有しない検疫所も散見された。H29 年度より導入を試みた「迅速診断キットのデモと研修者参加型のクイズ形式トレーニング」は、大変好評なフィードバックを得てお

り、今後はこれを更に発展させた「デジタル資料によるバーチャル診断」を実施する予定である。また今後、検査診断法に関する技術研修を定期的実施することで、状況の改善を試みる予定である。

国内で発生するエキノコックス症は、北海道に常在する多包条虫を原因とする多包性エキノコックス症が主である。しかし期間中、我々が依頼を受けたヒトのエキノコックス症疑い例 23 件の国籍をみると、外国 4 件(アメリカ・イラク・ネパール・ペルー各 1、インド 2)は単包性エキノコックス症を疑い、さらに日本人疑診例でも渡航歴から単包性エキノコックス症を疑う症例が 5 例含まれた。日本人の海外渡航一般化に加え、訪日外国人も増加の一方であることから、多包性エキノコックス症だけでなく、単包性エキノコックス症にも対応可能な体制を整備する必要がある。愛知県では新規に遺伝子検査を導入し、監視体制の強化を図ったところ、2017 年度遺伝子検査実施検体で、顕微鏡検査で陰性であった検体から 3 検体のエキノコックス陽性が発見された。これは、直ちに遺伝子検査の方が顕微鏡検査よりも検出感度が高いことを示すものではないが、複数の検査法を組み合わせることにより検出感度は向上しており、本研究の目的である「検出方法の構築ならびに改良」は達せられたと考えられる。2017 年度の成果に基づき、2018 年度からは虫卵検査と遺伝子検査を同時に実施することとし、監視体制の強化を図った。

35 年ぶりの国内発生となった旋毛虫症では、原因種は *Trichinella* T9 と分子同定された。本種は我が国固有種であるが、これまでの感染事例で分子同定が行われたことがなく、人体感染例のあることが初めて明らかにされた。昨今のジビエブームにより

野生獣肉を介した食中毒事例の発生の可能性は高まっているが、残念ながら食品寄生虫に関する情報は、その検査法も含め、周知されているとは言い難い。したがって野生獣肉を介した寄生性食中毒の発生予防に関する啓発活動に全国レベルで至急に取り組む必要がある。このような食品寄生虫に関する地研とのラボネットワークの強化は、感染研と地方衛研とが共同して継続的に取り組むべき重要課題である。

2011 年より報告が始まったシカ肉寄生のサルコシスティスによる有症事例および食中毒事例におけるサルコシスティスの遺伝子解析により、有症あるいは食中毒事例と原因種との関係を調べた。シカでは感染率の高さに加え、複数種の重複感染が認められることから、本研究では明確な形態差に基づくサルコシストの単離を行い、少なくとも 3 つの種類(遺伝子型)を区別できる遺伝子解析法を確立した。これにより当該の遺伝子型に関しては、シカ個体の感染率やシカ肉内の感染量の推定が可能になった。

事例に関与するシカのサルコシスティスに関しては、現状でタイプ A や B が健康被害に関与することが明らかとなり、その汚染レベルも定量的にみて馬肉の *S. fayeri* の食中毒レベルに相当するものであることが分かった。野生の個体中にも食中毒レベルに近い汚染が認められることから、ジビエとして野生シカ肉を利用するにあたっては、加熱あるいは冷凍によるサルコシスティス不活化を徹底する必要がある。ジビエの活用には安全性の確保が最重要課題である。今後のシカ肉の安全な利用という意味で、サルコシスティスの種類や遺伝子型ならびにその感染量データを地研と共有し、シカ肉による食中毒のリスク管理につなげる。

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。

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

F . 健康危険情報

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

G . 研究発表

論文発表

1. 案浦健, マラリアワクチン開発の現状と展望. 日生研たより 64(4): 59-64, 2018

学会発表

1. 案浦健. 「マラリア概論(本邦と近隣諸

国の感染状況・診断・最新のワクチン情報)」.平成28年度感染症検査技術研修会, 6月10日, 2016年, 武蔵村山.

2. 案浦健. 「マラリア原虫弱毒生ワクチン開発の現状と展望」バイオロジクスフォーラム 第14回学術集会. 1月12日, 2017年. 東京
3. 案浦健. 「マラリア概論(本邦と近隣諸国の感染状況・診断・最新情報)」.平成29年度感染症検査技術研修会, 6月2日, 2017年, 武蔵村山.
4. 案浦健. 「マラリアとワクチン開発;最新情報と今後の展望」.一般財団法人日本生物科学研究所第二研究会, 4月26日, 2018年, 日本生物科学研究所.
5. 案浦健. 「マラリア概論(本邦と近隣諸国の感染状況・診断・最新情報)」.平成30年度感染症検査技術研修会, 6月8日, 2018年, 武蔵村山.
6. 森嶋康之, 八木欣平, 登丸優子, 山崎浩, 杉山広, 福本真一郎, 吉川泰弘. 愛知県における野犬のエキノコックス陽性例の再検出. 第76回日本寄生虫学会東日本支部大会. 10月18日, 2016年, 東京.
7. 森嶋康之, 杉山広, 山崎浩, 八木欣平. エキノコックス(多包条虫)流行地拡大におけるイヌの役割. 第10回蠕虫研究会. 11月18日, 2016年, 熱海.
8. 森嶋康之, 杉山広, 山崎浩, 八木田健司, 佐藤要介, 綿引一裕, 土井幹雄, 坂本陽, 武藤和広, 本多めぐみ, 海野友梨, 深谷節子, 小林雅枝. 2016年に発生した旋毛虫による集団食中毒事例について. 第86回日本寄生虫学会大会. 5月28-29日, 2017年, 札幌.
9. 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, 坂本陽. 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, 東京.

10. 森嶋康之. エキノコックス症. 平成 30 年度感染症予防指導者セミナー. 8 月 24 日, 2018 年, 名古屋.

11. 森嶋康之. 愛知県における犬のエキノコックスについて. 平成 30 年度動物由来感染症対策技術研修会. 10 月 30 日, 2018 年, 東京.

12. 森嶋康之, 八木欣平. 愛知県におけるエキノコックスについて. 第 12 回蠕虫研究会. 11 月 17 日, 2018 年, 熱海.

13. 森嶋康之. 動物由来寄生虫症に関する最近の話題 ~ エキノコックス症を中心に ~. 平成 30 年度狂犬病及び動物愛護管理研修会. 3 月 1 日, 2019 年, 津.

14. 森嶋康之, 八木欣平, 杉山広, 山崎浩. 愛知県における多包条虫定着の可能性. 第 88 回日本寄生虫学会大会. 3 月 15-16 日, 2019 年, 長崎.

15. 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イス感染. 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。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成28-30年度

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

「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

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 林 昌宏

研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス第一部 田島 茂

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 谷口 怜

研究要旨 ジカウイルス感染症は今世紀に入ってから太平洋地域で流行が発生するようになり、2015-16年には中南米で大流行した。また妊娠期のジカウイルス感染が小頭症などの先天性異常の原因となることが確認され、公衆衛生上の重大な問題となった。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。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。日本脳炎は近年、韓国でこれまでと異なるタイプのウイルスが拡大し、日本国内への侵入が危惧される。これらのアルボウイルス感染症は、国内での患者発生がないあるいは非常に少ないため、国内での実験室検査体制が十分とは言えない。本研究では、これらのアルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立・改良を進めた。確立したプロトコールは、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。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。

東南アジアやアフリカで生息するジカウイルスは、比較的軽度の発熱および発疹を主症状とするジカ熱の原因として以前から知られていたが、症状が軽いことや患者数が少ないことなどからこれまであまり注目されてこなかった。しかし今世紀に入ってからたびたび流行が確認されるようになり、2015年には南米大陸に上陸するなど急速に生息域を拡大した。しかしそれ以上に注目された理由は、このウイルスが胎児に経胎盤感染し小頭症など先天性中枢神経系発育不良を引き起こすことが明らかとなったためである。ジカウイルスは急激に生息地域が拡大し、患者数も急増したため、輸入感染

症例の増加と国内への侵入が危惧されるようになった。

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。

日本脳炎は1960年代までは国内患者数が千人を超える大流行がたびたび発生していたものの、以降はワクチンの品質向上や定期接種化により患者数は激減し、近年では10例を超えることはまれな状況にある。しかし韓国では、2010年以降これまでと異なる遺伝子型V型(GV)のウイルスが検出されるようになり、この遺伝子型のウイルスによる日本脳炎患者も発生している。

本研究では、ジカウイルス感染症、黄熱、ダニ媒介性脳炎、および日本脳炎の実験室診断法の改良・確立を目的とし研究を進めた。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. 「ジカウイルス病実験室診断法の確立と情報提供」

ジカウイルスの遺伝子検出法としてはTaqMan法によるリアルタイムRT-PCR法を採用した。プライマー・プローブ情報は米国CDCからの論文(Lanciotti et al. Emerging Infectious Diseases 14: 1232-1239, 2008)を参考に作製した(表1)。検体からのRNA抽出にはRoche社のHigh Pure Viral RNA purification kitを使用した。ワンステップリアルタイムRT-PCR反応キットとしては、Thermo社のTaqMan Fast Virus 1-step Master mixとToyobo社のRNA-direct Realtime PCR Master mixを使用した。検出感度の算出には、Thermo社から分与された2種類の合成RNA(アフリカ型MR766株由来およびアジア型SPH2015株由来)を使用した。

抗体検査法については、抗ジカウイルスIgM捕捉ELISA法はデングIgMキットであるFocus社のDengue Virus IgM Capture DxSelectを利用する方法を採用した。本キットは、2次抗体(検出用抗体)が広範のフラビウイルスに対する反応性を有している。デングウイルス抗原をジカウイルス抗原に変えることで利用可能であることはすでに検証済みである。抗ジカウイルスIgG検出のための間接蛍光抗体法(IFA法)の確立を試みた。IFA用スライド作製のため、Vero細胞にジカウイルスMR766株あるいはPRVABC59株を感染させ、4日後に専用スライドに塗布しアセトンにより固定した。血清との反応は37℃で1時間行った。PBS(-)で洗浄後、希釈した2次抗体(Alexa 488 anti-human IgGあるいはanti-mouse IgG)を添加し37℃で1時間反応させた。PBS(-)で洗浄

後、蛍光顕微鏡で観察した。方法を検討するため、ddY 系統マウスに 2~3 週間隔でジカウイルス MR766 株あるいは PRVABC59 株を 4 回接種することにより得られた高度免疫マウス血清を使用した(別の研究費で作製された抗血清の一部を使用)。

2. 「黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良」

黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan プローブ・プライマー Set A から Set C までは米国 CDC からの情報に従い作製した(表2)。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 のみを使用した。

ダニ媒介性ウイルスゲノム検出のための TaqMan プローブ・プライマーは、文献(Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003)より引用した(表3)。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。

3. 「遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスのゲノム検出法の確立」

これまで検査用に使ってきた日本脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・プローブ 3 セット(GI-III common, GI-specific, GIII-specific)、に加え、広範日本脳炎ウイルスゲノム検出用 3NCR セット、広範ウエストナイルウイルスゲノム検出用 WNV com セットを使用し、TaqMan 法により各種日本脳炎ウイルスに対する検出感度を検討した(表4)。また、鋳型 RNA としては、当室で所有する日本脳炎ウイルスから精製したウイルスゲノムを使用した。

C. 研究結果

1. 「ジカウイルス病実験室診断法の確立と情報提供」

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

抗ジカウイルス IgM-ELISA 法については検討済であったが、感染後数か月経過した後の検体については抗ジカウイルス IgG の検出が必要となる。そこで間接蛍光抗体法による抗ジカウイルス IgG 検出法を検討した。はじめに高度免疫マウス血清を用いて作製したスライドが使用可能であることを確認した。このスライドを使用し、実際に患者血清で抗体が検出できることを確認した(図1)。

2. 「黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良」

米国 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(表2)。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。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。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。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。

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(表3)。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。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 社の抗ダニ媒介性ウイルス 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。

3. 「遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスのゲノム検出法の確立」

はじめに、現在使用している、遺伝子型 I 型(GI)および III 型(GIII)の各々および両方のゲノムを検出可能な TaqMan プライマー・プローブセット 3 セットを用いて、GI, GIII および GV の日本脳炎ウイルス株ゲノムに対する反応性を調べた。3 セットいずれも GV ウイルスを検出することが出来なかった(表5)。次に上記とは異なるセット 3NCR を作製し、同様に反応性を調べたところ、3NCR は GI, GIII, GV いずれのウイルスゲノムも検出可能であることが明らかとなった(表5)。また、3NCR はデングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスゲノムには反応しないことが確かめられた。一方で、日本脳炎ウイルスに近縁なウエストナイルウイルスゲノムに反応することがわかった。この交差反応性による誤審を回避する方法として、広範なウエストナイルウイルスゲノム検出用セット WNV com を用いることを考えた。そこで、WNV com の日本脳炎ウイルスゲノムに対する反応性を調べた。WNV com も日本脳炎ウイルスゲノムに反応するが、その検出感度はウエストナイルウイルスゲノムに比べ顕著に低いことがわかった。

D. 考察

2015 年から 2016 年に中南米で大きな流行を引き起こしたジカウイルスの遺伝子を検出する方法を確立した。デング熱に比べ、ジカウイルス感染症では患者血中のウイルス量は低く、検出が困難な場合が多い。一方、尿で血中よりも多くのウイルスゲノムが検出される場合が多い。実際我々が検査した検体で比較すると、すべてで尿の方が、ゲノム量が多かった。ジカウイルス感染症を疑う場合は、必ず尿検体を依頼すべきである。血清に比べ全血の方が、

ウイルスゲノムが多いとの報告もあるが、我々が調べた検体では、多い場合もあるが少ない場合もあり、一概に全血の方が血清よりも検査に適しているとは言えない。我々は唾液からも遺伝子を検出しているが、この場合も血清では検出されなかった。患者負担が多くなるとの問題もあるが、なるべく多くの箇所から検体を採取できれば検査の確実性が増すであろう。

すでに多くの報告があるが、抗体検査を行う場合、他のフラビウイルスとの交差反応が起こることを我々も経験した。遺伝子検査もそうであるが、他のウイルスとの鑑別は非常に重要である。さらに中和試験まで行っても判別が困難な場合もある。そのような場合、米国 CDC では「最近にフラビウイルスに感染した」との判断に留めている場合もある。このように判定困難な場合もあることを認識し検査する必要がある。

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。

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。

2010 年以降、韓国では、それまで主に検出されていた遺伝子型とは異なる型の日本脳炎ウイルスが検出されるようになり、さらにこの遺伝子型 (GV) に感染した日本脳炎患者も発生している。GV については、これまで大きな流行もなく、生息地が限られていること、分離株も少ないなどから、その性状も不明な点が多い。現在までに日本国内で、GV のウイルスは確認されていないが、侵入する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、国内への GV 侵入に備え、GV ウイルス検出法の確立を目指した。GV は他の遺伝子型とは進化的にやや遠い関係にあり、従来のゲノム検出系で検出可能かはわからなかった。しかし本研究により、従来の GI、GIII ゲノム検出系では GV ゲノムは検出できないことが明らかとなった。そこで新たなプライマー・プローブセット 3NCR を作製し、検討したところ、GI、GIII だけでなく、GV も検出可能であった。しかし一方で、近縁ウイルスであるウエストナイルウイルスのゲノムとも交差反応することが分かった。そこで、3NCR 単独で用いるのではなく、ウエストナイルウイルスゲノム用のセット WNV com も共用することにより、同定することとした。これにより日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスを識別することは可能と考えるが、WNV com も弱いながら日本脳炎ウイルスに交差反応を示すことから、今後より特異性の高いセットの構築が望まれる。

E. 結論

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

黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立した。

日本脳炎ウイルス GV のゲノム検出系を確立したが、今後改善の余地がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuboi, M., Kutsuna, S., Kato, Y., Nakayama, E., Shibasaki, K., Tajima, S., Takasaki, T., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N. Autochthonous Chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba. *Emerging Infectious Diseases* 22:1683-1685, 2016.
2. Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, Tajima S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. Chikungunya fever in traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23:156-158, 2016.
3. 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.
4. 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.
5. Katanami Y, Kutsuna 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

該当なし

3. その他

該当なし

9. Maeki T, Tajima S, Kyaw AK, Matsumoto F, Miura K, Yamashita A, Yoshikawa A, Negishi K, Noguchi Y, Tadokoro K, Abe K, Taruya J, Koh J, Ito H, Ikegaya A, Abe F, Wada M, Nishigata T, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Morita K, Lim C.K., Saijo M. Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain with Those against Genotype I and III Strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016. Jpn J Infect Dis 71:360-364,2018.
10. Tadokoro K, Ohta Y, Sato K, Maeki T, Sasaki R, Takahashi Y, Shang J, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Lim C.K., Tajima S, Abe K. A Japanese Encephalitis Patient Presenting with Parkinsonism with Corresponding Laterality of Magnetic Resonance and Dopamine Transporter Imaging Findings. Internal Med. 57: 2243-2246,2018

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

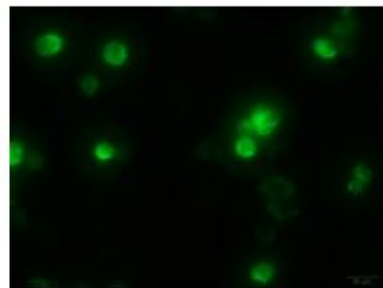
2. 実用新案登録

表1 ジカウイルスゲノム検出用TaqManプライマー・プローブセット

Set	Primer	Sequence	Probe	Sequence
Set 1	ZIKV835	TTGGTCATGATACT GCTGATTGC	ZIKV 860-FAM	FAM- CGGCATACAGCATCAGGTGCAT AGGAG-TAMRA
	ZIKV911c	CCTTCCACAAAGT CCCTATTGC		
Set 2	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACA CAAG	ZIKV 1107-FAM	FAM- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAG ACACTCAA-TAMRA
	ZIKV1162 c	CCACTAACGTTCTT TTGCAGACAT		



患者14-89 急性期血清
(320倍希釈)



患者14-89 回復期血清
(320倍希釈)

図1 間接蛍光抗体法(IFA)による抗ジカウイルスIgG抗体の検出

表2 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

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

表3 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 TCC	TBE-Probe- WT	FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA
R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT		

表4 日本脳炎ウイルスゲノムおよびウエストナイルウイルスゲノム検出用
TaqManプライマー・プローブセット

Set	Primer	Probe
GI	JE1.3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE1en1082pb: FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB
	JE1.3en1119c-1082: GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA	
GIII	JE1.3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE3en1082pb: FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB
	JE3en1119c-1082 AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA	
GI-III	JEen562-585: CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	JEen585pb: FAM-ACT RAA CAC TG A AGC GT-MGB
	JEen623-585: GAH CCC ACG GTC ATG A	
3NCR	JENS5s269: GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	JENS5p294: FAM-CTG CCT GCG TC T CA-MGB
	JENS5r330.2: TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
WNV com	WNVcommon.3451f: GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV3538p: FAM-ATG ATT GAY CC T TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA
	WNVcommon.3590r: TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表5 日本脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの検討結果

Virus/ genotype	Strain	Primer-probe set			
		GI	GIII	GI-GIII	3NCR
JEV/GI	Hiroshima/46 /1998	+	-	+	+
	Mie/41/2002	+	-	+	+
	Mie/51/2005	+	-	+	+
JEV/GIII	JaTH160	-	+	+	+
	JaTAn1/75	-	+	+	+
	JaTAn1/90	-	+	+	+
JEV/GV	Muar	-	-	-	+
	rJEV-E ^{XZ0934} - M41	-	-	-	+
DENV1,2,3,4		NT	NT	NT	-
ZIKV		NT	NT	NT	-
WNV		NT	NT	NT	+
CHIKV		NT	NT	NT	-

+: 検出可、 -: 検出不能、NT: 未試験

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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, 福田 現 青森県環境保健センター
平良雅克 千葉県衛生研究所
山本徳栄 埼玉県衛生研究所
長嶋真美, 新開敬行 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
寺杉文男 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, 松本道明 高知県衛生研究所
御供田睦代, 山本真美, 中堂園文子 鹿児島県環境保健センター
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：増え続ける日本紅斑熱をはじめリケッチア症の強い地域特性，国内外の多様性を考慮し，本研究では全国ブロックの横系となる地方衛生研究所のリケッチア・レファレンスセンターを中心とした全国共通基盤の構築を目指している。レファレンスセンター会議等において，リケッチア症の疫学，診断法の情報のアップデートによる全国の担当施設を中心に情報・技術の普及をおこなった。

ネットワークで評価検討したマルチプレックス・リアルタイムPCRは，紅斑熱群とつつが虫病の臨床材料による評価でも良好な結果を得た。多施設間評価を実施後，成果を学術誌に公開，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ている。既存の検査系とともにリケッチア関連実験室診断の体系化し，情報発信，情報共有とともに課題の洗い出しを行い，遺伝子診断のスクリーニング系に関しては非特異的な偽陽性などの課題情報が収集された。次の課題として検討を開始している。

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。つつが虫病は発生時期や地域が血清型によって異なり，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。またリケッチア性病原体は，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が行い難い。地方衛生研究所（以下，地衛研）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となる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

平成28年

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マルチプレックス・リアルタイム PCR の地衛研での検討

開発した地衛研(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。ブロックレファレンスエンターを中心とした患者報告が多い複数の地衛研の協力のものと、臨床検体への適用性について検討した。

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

検討したマルチプレックス・リアルタイム PCR は一組のプライマーに紅斑熱群用とつつが虫病用それぞれのプローブを加えただけで、国内のリケッチア症への汎用性が高いことが期待された。ここに新たに発疹チフス群用のプローブを加えることにより、すべてのリケッチア科病原体を網羅できるシステムができるようプローブの設計と評価を試みた。

平成29年

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 の地衛研での検討

開発評価中のリアルタイム PCR (Duplex) と既報の conventional nested

PCR の感度比較を精査するとともに、ブロックレファレンスエ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を検討した。

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した情報が多い。施設間情報共有のための資料収集とリスト化を試みた。

平成 30 年

1. リケッチア症実験室診断の体系化

平成 29 年度までに開発、評価を行ってきた紅斑熱群リケッチア症とつつが虫の Duplex Real time PCR をスクリーニング系とし、既報の遺伝子検出法、血清診断法等を組み合わせた体系的なリケッチア症の実験室診断法の構築を行った。さらに、レファレンスセンター担当者との情報交換の中で、診断系の問題、課題の抽出を試みた。

平成 28~30 年

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、各施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱いによって行った。

C. 研究結果

平成 28 年

1. マルチプレックス・リアルタイム PCR の地衛研での検討

6 施設の協力を得、既法の conventional PCR，日本紅斑熱を標的としたリアルタイム PCR，血清診断等の結果と比較し，ほぼ同等以上の検出率の結果が得られた。

2. 発疹チフス群リケッチア用 Probe の検討

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

平成 29 年

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 の地衛研での検討

既報の conventional nested PCR と比較し，臨床検体を用いた Duplex Real time PCR は，同等以上の検出結果を示し，供試した検出機器と試薬の組み合わせにおいても同等の結果を示した。さらに，感染細胞の希釈列を用いた比較においても同等の検出感度を示した。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，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一部認められた。

2. リケッチア症に関する国内情報収集

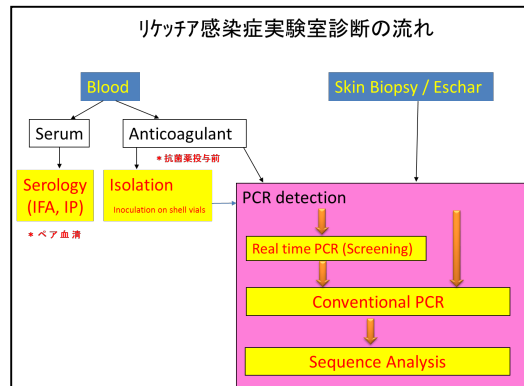
地衛研の年報等は，地域性の強いリケッチア症に関連の情報が多ことから，全国の地衛研の年報についてリケッチア関連情報を過去に遡って抽出した。現在では国内で認められない発疹チフスに関する情報を含め，一般の学術誌では認められない情報，また，ライム病をはじめ，リケッチアと同様に節足動物によ

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。

平成 30 年

1. リケッチア症実験室診断の体系化

図に示すように，遺伝子検出系におけるスクリーニング系ならび確定方法，既存の血清診断法のフローを示し，各所の地衛研において実施が始められた。あわせて，一部の地衛研で実施された評価段階よりさらに多数の臨床検体に適用することにより課題の洗い出しを進め，各検出系の非特異等と考えられるケースや，表在菌との反応などいくつかの課題もスクリーニング系において報告された。



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(平成 28～30 年)

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地衛研のリケッチア検査対応の情報更新の準備を行った。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(平成 29 年 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

日本紅斑熱，つつが虫病を中心とした国内のリケッチア症は，患者数，発生地域ともに拡大している。臨床現場に近い，地衛研での実験室診断体制の維持・強化は重要性を増している。紅斑熱群リケッチアでは，*R. heilongjiangensis* による極東紅斑熱，*R. tamurae* 感染症例，*R. helvetica* 感染疑似症例等の発生，つつが虫病では標準株 Karp，Kato，Gilliam，Kawasaki，Kuroki に加え，地域が限定されていた Shimokoshi 株の患者発生地域の広がりなどが報告されるようになった。

複数の地衛研による臨床検体への適用性の検討から，紅斑熱群リケッチアとつつが虫病リケッチアのマルチプレックス・リアルタイム PCR は，従来法と比較して遜色ない検出感度を示すなど十分な結果が得られ，試薬の準備等の簡便さからも使いやすい系であることが示された。さらに，輸入リケッチア症への対応の必要性から，*O. tsutsugamushi*，*R. africae*，*R. conorii*，*R. australis*，*Cand. R. indica* 等も検出可能であることから，評価した系は地衛研でのスクリーニングに強力なツールとなり，迅速な情報発信につながる事が期待される。

リケッチア症の実験室診断系の体系を再構築，実施と情報交換の中で，診断系の問題，課題の抽出を試み，非特異と考えられるケースなどいくつかの課題もスクリーニング系において報告されたが，スクリーニング系で使用した 16S rRNA を標的とした検出系の場合，一般に非特異が出やすいともされている。急性期検体を検査材料としたリケッチア症の遺伝子検出系では，検体中のリケッチア遺伝子が極めて少ないこと，抗菌薬投与前でも血液中では極めて短期間しか検出しえないことが従来より分かって

いる。報告された問題や課題を共有し，あくまでもスクリーニング系という意味で，簡便性のメリットが勝ると考える。多様なリケッチア症をとりこぼしなく診断し，適切な治療につながるような情報を現場に提供するうえでもメリットがあると考えている。実際，海外でも症例が少なく，症例として明確に確立しておらずまだ十分な検討が難しい紅斑熱群リケッチア症の可能性を示す症例もスクリーニング系から浮かび上がってきており，現在詳細な検討が進められている。

ブロック地衛研によるリケッチア・レファレンスセンターの目的は，標準株，分離株の維持（リスク分散），診断用抗原並びに PCR 陽性コントロールの分担作製と供給，実験室診断技術の相互評価（技術の維持），新規診断法等の相互評価（標準化），疫学情報，診断情報の収集・分析と共有，緊急時のバックアップ体制，検査マニュアルの作成，改訂，検査技術の研修，地域ごとの課題対応（調査，特定ツールの検討），その他（個々の担当者のスキルアップ）等が挙げられ，診断系の評価や情報交換から，機能が全国の横系として機能しており，その維持の仕方についてもさらに検討していく必要がある。

E．結論

リケッチア・レファレンスセンターは，患者数の増加とともに多様な鑑別対象疾患からも重要性がさらに増している。近年，国内でも SFTS をはじめ複数のダニ媒介感染症が報告され，輸入症例でもデング熱をはじめとする様々な節足動物媒介感染症が報告される。リケッチア症はこれらの疾患との鑑別も重要であり，特定の疾患にとらわれず適切な診断が遅滞なく行われるよう

より網羅的な診断体制が現場で構築できる
よう情報発信においても一層の検討が求め
られている。

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
難しさが示されている。

G . 研究発表

論文発表

1. Satoh M, Akashi S, Ogawa M, Wakeyama T, Ogawa H, Fukuma A, Taniguchi S, Tani H, Kurosu T, Fukushi S, Shimojima M, Ando S, Saijo M: Retrospective survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome in patients with suspected rickettsiosis in Japan. *J. Infect. Chemother.*, 23: 34-50, 2017
2. 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子, 斎藤博之, 齊藤志保子, 門馬直太, 東海林彰, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二: 秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査 (2011年~2014年), 衛生動物学会誌, 67(3): 167-175, 2016
3. 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
4. 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
5. 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. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Jul 24; 71(4): 267-273.

6. 安藤秀二: つつが虫病とは . 新薬と臨床, 67(10):70-74(1246-1250) , 2018年
7. 安藤秀二: マダニ媒介性の日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症 . 人と動物の共通感染症研究会ニューズレター , 17: 9-12 , 2018年
8. 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 . 69(2) : 49-54 , 2018年
9. 佐藤(大久保)梢, 高野愛, 高娃, 安藤秀二, 川端寛樹: ダニ媒介性感染症-国内に常在する感染症を主に-. 衛生動物学会誌 (in press)

学会発表

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

4. 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
5. 佐藤優貴子, Putu Eka Sudaryatma, 桐野有美, 山本正悟, 安藤秀二, 後藤義孝, 岡林環樹:「宮崎県で採集されたマダニと野生動物からの重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分離」第67回九州地区獣医師大会並びに平成30年度獣医学術九州地区学会, 2018年10月14日, 福岡
6. 桐野有美, 野町太朗, 山本正悟, 安藤秀二, 岡林環樹:「宮崎県の野生動物における重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染状況調査」第1回SFTS研究会, 2018年9月8-9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

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

エンテロウイルスのレファレンスに関する研究

研究分担者 吉田弘 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究協力者 榎岡由美子 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
地方衛生研究所全国協議会
九州支部、東海北陸支部、
関東甲信静支部、中国四国支部他、地方衛生研究所各位

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

A. 研究目的

改正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(以下改正感染症法)は平成28年4月1日に完全施行された。改正感染症法では病原体検査に法的な根拠が付与されるとともに、検査結果に一定の信頼性が求められている。

具体的な内容に関しては、厚生労働省健康局結核感染症課長通知「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」(平成27年11月17日付、健感発1117第2号)の中で、各検査施設の実情に併せた標準作業書(SOP)、質マネジメントシステム(quality management system: QMS)関連文書等の各種技術管理文書の作成が規定されている。しかし地方衛生

研究所(地衛研)には、これまで技術管理のノウハウは十分に蓄積されていない実情がある。

他方、全国の地衛研と国立感染症研究所の間には4半世紀以上にわたる検査技術に関する各病原体検査のレファレンスネットワーク活動が存在する。このように既存のインフラストラクチャーを活用し、検査の質を確保すべく、実技研修、内部精度管理(internal quality control: IQC)手法、外部精度評価(external quality assessment: EQA)、といった管理技術の検討、情報共有を促進し、地衛研間で検査技術の均てん化を図ることが適当と考えられる。

本研究では1年目はエンテロウイルスレファレンスセンターのコアキャパシティとして、レフ

ファレンス標準品の分与法、2 類感染症であるポリオウイルス検査の信頼性確保のための実技研修、エンテロウイルスレファレンスセンターを活用し、ポリオにも応用可能な手足口病検査の EQA 導入の検討を行った。

2 年目はエンテロウイルスレファレンスセンター6カ所を含む12カ所の地衛研の協力を得て EQA の実施（エンテロウイルス PCR 検査法の検出感度と同定に用いる塩基配列解析結果の施設間比較調査）、技術管理研修ツールとして活用する目的で検査のトラブルシューティングを取りまとめた事例集の作成を行った。

手足口病検査にかかわる EQA の結果より、標準品を用いて塩基配列解析装置（DNA シークエンサー）の稼働状況をベースラインとして把握した上で施設間の塩基配列データを比較する必要があること、かつ配列データの評価のために客観的な指標が必要なこと、そして配列解析時のヒューマンエラー等を予防するために技術管理研修の必要性が認められた。

感染症検査における従来の研修は実技研修を主体としているが、ヒューマンエラーの低減等、検査プロセスの改善を目的とした技術管理手法の導入には、研修メソッド、資料等ツール、講師の確保等、新たに開発・検討していくことが課題である。

3 年目の研究では病原体検査における共通の基盤技術として、DNA シークエンサーを用いる塩基配列解析について技術管理研修のメソッド開発を最終目標とした。メソッド開発にあたり地方衛生研究所全国協議会（地全協）九州支部の協力を得て、DNA シークエンサーの稼働状況についてベースライン調査を実施し、塩基配列の質評価指標を検討した。そして、配列解析時に起こりうるヒューマンエラーを予防するための技術管理研修について実証的検討を行った。

この様に、ヒューマンエラー予防のため検査プロセスの改善し、信頼性を確保するために、エンテロウイルスレファレンスネットワークなど既存の各種活動を活用した信頼性確保の介入法を検討した結果を報告する。

B. 研究方法

1 年目

1. エンテロウイルスレファレンス標準品の分与、及び実技研修の検討

- 平成 28 年度衛生微生物技術協議会エンテロウイルスレファレンスセンター会議、ウイルスコース(保健医療科学院)等で、エンテロウイルス抗血清、ポリオウイルスへの感受性を確認済みの分離用細胞 (RD-A と L20B) の配布を周知した。
- 平成 28 年度短期研修ウイルスコース(国立保健医療科学院主催)において、ポリオウイルス検査の中和試験の信頼性確認法の実技研修を行った。
- ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業感染源調査)研修のため 2 か所の地衛研担当者を対象に岩手県環境保健センターの協力を得て採水からウイルス分離までの実技研修を行った。

2. 外部精度評価試料の送付・保管条件検討

- 平成 28 年度厚労科研費「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」との連携のもと、手足口病 EQA 用の RNA 試料送付のため、エンテロウイルスレファレンスセンターを中心とした担当者の協力を得てワークショップ(2回)を通じて、温度保管条件など安定性の検討を行った。

2 年目

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

- エンテロウイルスレファレンスセンター6カ所を含む12地衛所に手足口病検査用EQA試料(RNA)を配布し、PCR法によるEQA試料の検出感度と同定に用いる塩基配列の施設間比較を行った

2. 技術管理研修用教材の作成

- 検査の質管理のためのワークショップを平成28年6月に開催し、教材作成のために課題を整理することとした。

3. 病原体検査の信頼性確保に向けた技術文書の整備支援

- 平成29年度地域保健総合推進事業との連携の下、関東甲信静、東海北陸、中国四国、九州支部の協力により、改正感染症法施行後の標準作業書の整備状況をアンケートで把握することとした。

3年目

1. 塩基配列解析について質評価指標の検討

- 平成30年度地域保健総合推進事業との連携の下、病原体検査における共通の基盤技術として、DNAシーケンサーを用いる塩基配列解析について質評価指標の検討を行うこととした。

2. 技術管理研修の実証的検討

- 塩基配列の質に与える要因を分析し、重点的に管理項目を明らかにするとともに、必要な技術管理研修のメソッド開発を行った。

C. 研究結果

1年目

1. エンテロウイルスレファレンス標準品の分与、及び実技研修の検討

- エンテロウイルス、ポリオウイルス検査では患者由来病原体サーベイランス及びポリオ環境水サーベイランスとも共通の検査技術を含むことから、標準品の分与、研修の活動は横断的な対応が適当と考えら

れた。また世界的なポリオウイルス封じ込め強化を踏まえ、ウイルスを保有する感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが有用であると考えられた。

2. 外部精度評価試料の送付・保管条件検討

- ポリオを含むエンテロウイルス検査の質評価を目的とした外部精度評価用試料の保管条件を設定することができた(詳細は平成28年度「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」分担研究報告書を参照)

2年目

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

- EQA実施にあたり、送付条件検討等行うため、エンテロウイルスレファレンスセンターに関わるネットワーク維持が重要であることを確認された。(詳細は平成29年度「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」分担研究報告書を参照)

2. 技術管理研修用教材の作成

- 病原体検査のプロセス改善のため、ヒューマンエラー予防に焦点を絞り、過去の検査上の事例を管理用特性要因図で分析した教材を研究協力者と作成。また研修はブレインストーミングによる少人数のグループワークが有用であることを確認できた。

3. 病原体検査の信頼性確保に向けた技術文書の整備支援

- 信頼性確保の取り組み状況についてアンケート調査を行ったところ、標準作業書等の技術文書作成支援の必要性が認められたため、各支部で必要とされる文書を

同定し、供覧会の開催を企画し整備促進を図った。(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)。

3年目:

1. 塩基配列解析について質評価指標の検討

- 前年度に実施した手足口病検査の EQA では送付試料の塩基配列(波形データ)を定性的に評価するため、施設間の機器稼働状況あるいは解析技術を客観的に比較評価することが困難であった。
- メーカーによる機器の validation は、標準品(sequencing standards)を測定し、あらかじめ定められた指標(QV 値、CRL、トレーススコア、シグナル値等)により評価を行う。これらの指標を活用すれば、異なる機種、動作環境でも、ランモジュール、キャピラリー、ポリマー等の組み合わせにより、評価指標を設定可能である(図 1)。このため、あらかじめ安定性を確認した同一ロット標準品を送付し各施設の測定結果を比較することで、多施設間の機器の稼働状況を客観的に把握可能であることを示した。

2. 技術管理研修メソッドの実証的検討

- 塩基配列データの分析の結果、単独あるいは複数の要因が解析結果の信頼性に影響を与えていることが明らかになった(図 2)。このため DNA シークエンサーの日常の精度管理にも評価指標を用いることが適当であると考えられた。
- 多施設間のデータ比較の結果、消耗品の質、方法の選択がヒューマンエラー予防のために重点的に管理すべき事項とし

て明らかになった。これらの共通因子を含む演習用課題を作成し、グループワークによる研修に用い実証的検討を行った(図 3)。

- アンケートにより、DNA シークエンサーの操作方法は施設内 OJT による習得していることが多数であることを示した。しかし事前のベースライン調査の結果より、機器の操作方法のみならず、データ評価の方法、解決法など技術管理の知識、手法を更にブラッシュアップする必要性が認められた。

D. 考察

- エンテロウイルス感染症には 5 類小児科定点把握疾患として手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、2 類感染症としてポリオが含まれる。全国レベルの流行状況を把握するための定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスを維持し、一定数の検査を実施することで、ポリオウイルス検査に対応可能である。
- このためにレファレンス活動を通じて、必要な標準品(細胞、抗血清)の配布、実技研修等、検査体制の維持、結果の質を担保するために継続する必要がある。
- ポリオウイルス封じ込め強化に伴い、感染性ウイルス保有施設が限定されることから、検査体制を維持するためには、ポリオウイルスを保有する感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが効果的である。
- エンテロウイルスレファレンスネットワークのみならず、既存の各種ネットワーク活動を cross-cutting に活用することにより、利用可能な各種リソース(人、物、金、情報)を集約し、信頼性確保の取り組みに投入することが有用である。

- 横断的な基盤技術として塩基配列解析に焦点を当て、解析結果の質評価法の検討、塩基配列解析時に起こりうるヒューマンエラー予防に対する技術管理研修の実証的検討を行い、一定の効果を認めた。地衛研では、経験豊富な職員の退職、異動などの事由により施設内OJTの実施状況、施設毎で状況は大きく異なる。九州支部の事例で示したように、共通の基盤技術(塩基配列解析、PCR手法等)については、地域支部単位で様々な機会を活用しつつ、ヒューマンエラー予防に向けた技術管理研修等の取り組みを行うことが望まれる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 板持雅恵、滝澤剛則、伊東愛梨、三浦美穂、伊藤雅、小澤広規、北川和寛、葛口剛、後藤明子、島あかり、下野尚悦、高橋雅輝、筒井理華、中田恵子、中野守、西澤佳奈子、濱崎光宏、吉富秀亮、堀田千恵美、松岡保博、三好龍也、吉田弘 平成27年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて病原体検出情報. 37(10);208-209; 2016
2. 濱崎光宏, 吉田弘:エンテロウイルスのウイルス学的検査診断 小児科 57, 949-956, 2016.
3. Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Sci. Rep. 6,31474;doi:10.1038/srep31474. 2016.
4. 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てくる予防医学に関わる知見. 東京小児科医会報 36(1): 26-30,2017
5. 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.
6. 吉田弘 ポリオ根絶計画の最終段階と環境水サーベイランスの意義 日本小児科医会会報.55:124-127, 2018
7. 後藤明子、筒井理華、高橋雅輝、北川和寛、堀田千恵美、小澤広規、板持雅恵、大沼正行、西澤佳奈子、葛口剛、伊藤雅、中田恵子、三好龍也、中野守、濱島洋介、磯田美穂子、吉富秀亮、諸石早苗、吉田弘. 平成28年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルス

スについて.病原体検出情報. 39:67-69、
2018

8. 吉田弘. 海外における無菌性髄膜炎等を対象とした病原体サーベイランスの動向. 病原体検出情報.39:101-102,2018

学会発表

1. 吉田弘.環境水ウイルスサーベイランスとは」第57回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー-平成28年6月19日郡山市
2. 吉田弘.感染症法改正にかかわる病原体サーベイランスと信頼性確保について.平成28年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域専門家会議2016年10月20-21日、佐賀市
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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動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
10. 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
11. 裕岡由美子、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.
12. 吉田弘. 手足口病に関する外部精度管理調査結果について. 平成 30 年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域レファレンスセンター連絡会議.10月2-3日、2018年、熊本市
13. 吉田弘、後藤明子、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、西澤佳奈子、濱島洋介. わが国の環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルス(2013-16年). 第77回日本公衆衛生学会総会. 10月24-26日、2018年、郡山
14. 後藤明子、吉田弘. 北海道における抗ポリオウイルス中和抗体保有状況調査(2011

- 年～2017年)第77回日本公衆衛生学会
総会. 10月24-26日、2018年、郡山
15. 小澤広規、吉田弘. 横浜市における環境
サーベイランスで分離されたエンテロウイ
ルスの動向. 第77回日本公衆衛生学会
総会. 10月24-26日、2018年、郡山
 16. 西澤佳奈子、吉田弘. 長野県における環
境水のエンテロウイルスサーベイランス.
第77回日本公衆衛生学会総会. 10月
24-26日、2018年、郡山
 17. 濱島洋介、寺嶋文男、吉田弘. 和歌山県
における環境水サーベイランスで 検出さ
れた腸管系ウイルスについて. 第77回日
本公衆衛生学会総会. 10月24-26日、
2018年、郡山
 18. 堀田千恵美、吉田弘. 環境水サーベイラ
ンスと感染症発生動向調査事業における
エンテロウイルス属の検出状況. 第77回
日本公衆衛生学会総会. 10月24-26日、
2018年、郡山
 19. 松岡由美子、吉田弘. 熊本市環境総合
センターにおける検査の質確保について.
第77回日本公衆衛生学会総会. 10月
24-26日、2018年、郡山
 20. 吉田弘. 手足口病に関する外部精度管理
調査結果について. 平成30年度地域保
健総合推進事業地全協中国四国支部地
域レファレンスセンター連絡会議. 11月
15日、2018年、岡山市
 21. 松岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、小
畑裕子、西澤香織、近藤芳樹、芦塚由紀、
濱崎光宏、丸山浩幸、橘実里、堤陽子、
林徹、島崎裕子、松本一俊、八尋俊輔、
酒井崇、深澤未来、松本文昭、松浦裕、
濱田結花、御供田睦代、久場由真仁、大
友麗、吉田弘. 地方衛生研究所全国協議
会九州ブロック内における遺伝子解析装
置に関する技術管理研修について. 第32
回公衆衛生情報研究協議会研究会、1月
24-25日、2019年、岡山市
 22. 大友麗、吉田弘. 地方衛生研究所全国協
議会地方衛生研究所全国協議会中国四
国ブロック内における信頼性確保に関する
取組について 第32回公衆衛生情報研
究協議会研究会、1月24-25日、2019年、
岡山市
- 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
技術管理研修用資料作成
1. 金成篤子、濱崎光宏、松岡由美子、吉田弘
「病原体等検査における信頼性確保の事例
集」(平成30年6月)
分担研究報告書
 2. 調恒明、江原勇登、大友麗、貞升健志、高
橋雅輝、竹内道子、筒井理華、豊嶋千俊、濱
崎光宏、松岡由美子、横井一、吉田弘 「感染
症法に基づく病原体等検査に関わる信頼性
確保部門担当者向け研修ガイドラインの検討」
(平成31年3月)

図 1 塩基配列の質評価の指標

Sequencing standardを各モジュール/装置で測定したときメーカーが推奨する評価の基準

QV20			
参加施設の装置とモジュールの組み合わせ	3500/3500xl (KB 1.4.1.8)	3130/3130xl (KB 1.4.0)	その他 (KB 1.2) (KB 1.4.2.4)
RapidSeq36_POP7_1		600bp	
FastSeq50_POP7_1		700bp	
StdSeq50_POP7	≧ 850bp		
BDxStdSeq50_POP7	≧ 850bp		
LongSeq			800bp
Standard sequencing			600bp

- QV20値が各機種、ランモジュールにより上記を満たすこと
- シグナル強度が推奨強度
- 波形が**単一ピークでかつキャピラリー間でトレイススコア、QV20+、CRLまたはLORのばらつきが少ないこと**

図 2 塩基配列解析結果に影響を及ぼした主な要因

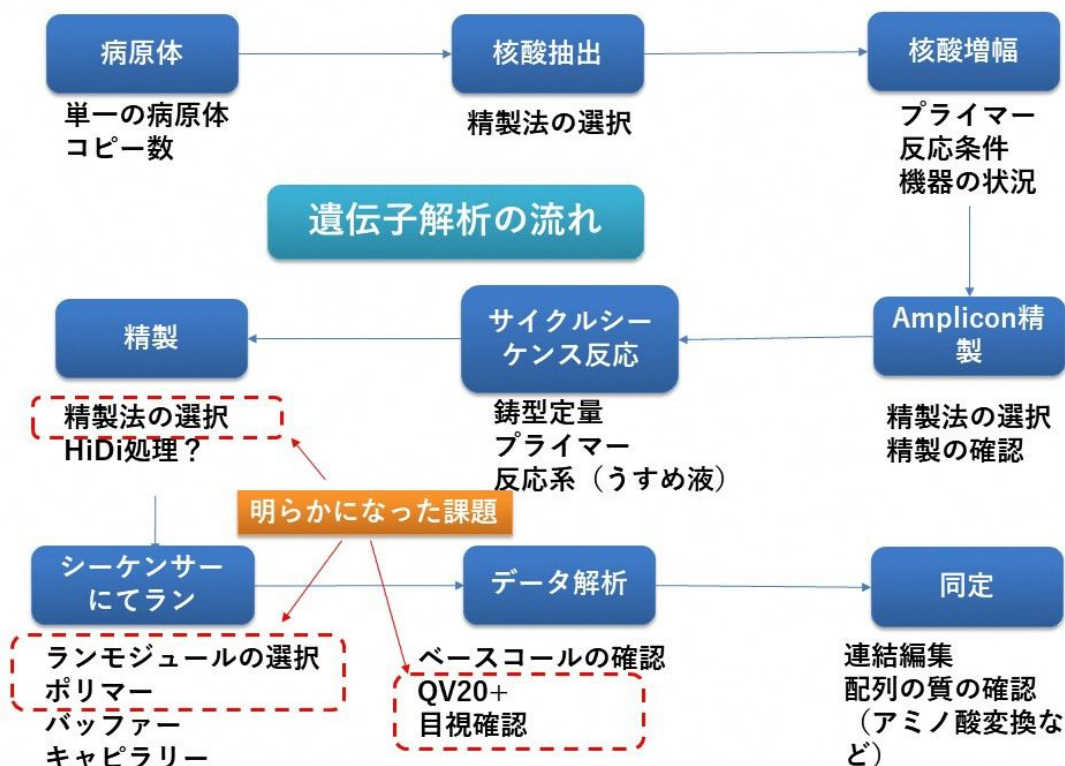


図3 技術管理研修メソッドの検討

技術管理研修メソッドの検討

H29-30年度地域保健総合推進事業と連携
熊本市環境総合センターとの共同研究

DNAシーケンサーの適正利用を目的とした技術管理研修の試行（平成30年10月）



検査上の問題点について特性要因分析（管理用）をグループワークで実施

問題点の洗い出し（粗→細）、解決法、実施方法、検証方法をブレインストーミング
方式で討議

各種SOP、QMS関連文書（施行規則7条の三第8項関連）に含めるべき項目の検討

事後アンケート結果

課題、問題点、解決法を共有する点で一定の効果→業務管理要領との紐づけ

実施上の考慮点

進行役（ファシリテーター）の育成と確保

運営と教材開発

討議用教材の開発（事例集）

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

麻疹検査診断ラボラトリーネットワークの維持、改善に関する研究

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第三部第一室長
(平成28年度)
森 嘉生 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室長
(平成29-30年度)

研究協力者 關 文緒 国立感染症研究所 ウイルス第三部 主任研究官

研究要旨 麻疹および風疹は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、毎年アンケートにより検査実績を調査した。2016年度には民間検査センターにおいて麻疹IgM抗体検査を行い、約1.1%がIgM陽性値を示した。感染研が試行した民間検査センターに対する習熟度試験の結果から、参加したすべての民間検査センターの検査精度は良好であると判断された。またアウトブレイク時の試薬等の配布について検討した。これらは麻疹検査診断体制の維持、改善に対して有用な情報となると考えられた。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。また、収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列の他の自治体への提供に関する検討を行った。その結果、多くの自治体において条件付きで開示を求める意見が多かったため、地方衛生研究所全国協議会ならびに厚生労働省結核感染症課の了承のもと麻疹ウイルス遺伝子配列の情報開示の運用を開始した。

A. 研究目的

麻疹および風疹は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「麻しん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「風しん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抗体検査等の血清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るようになった。

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、配布を行なっている。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。

地方衛生研究所からNESIDを介して国立感染症研究所に麻疹および風疹ウイルス遺伝子配列情報が収集され、国内でのウイルスの伝播状況の解析が行われる。遺伝子型情報等は病原微生物検出情報(IASR)の速報、月報等で公開されるが、遺伝子配列情報については登録した自治体以外に公開されることはなかった。しかし、広域の流行状況を即座に把握するために、他の自治体が解析した遺伝子配列情報の提供を希望する声が増えてきた。そのため地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会での検討を元に検討を行った。

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を毎年行なった。また、平成28年度には民間検査センターへの検査情報の提供の依頼、並びに、習熟度試験(Proficiency test; 以下PT)の試行を実施した。

B. 研究方法

1. 地衛研の麻疹風疹遺伝子検査実施状況

毎年、麻疹・風疹レファレンスセンターを通じて、全国74-76地衛研にアンケート

を実施し、麻疹風疹遺伝子検査の実施状況を調査した。調査内容は検査症例数、検査陽性症例数、遺伝子解析を実施した症例数、遺伝子型解析の結果等である。

2. 麻疹アウトブレイク時の検査体制維持の検討

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

3. 民間検査センターにおける麻疹IgM抗体検査状況の調査

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

4. 民間検査センターへの麻疹、風疹IgM抗体測定PTの試み

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

5. 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。

6. 収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列の他の自治体への提供に関する検討

地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会において、収集された麻疹風疹ウイルスの

遺伝子配列を感染研が他の自治体への提供を行うことについて、検討を行っていただき、その結果を踏まえて提供方法について検討を行った。

C . 研究結果

1. 地衛研の麻疹風疹遺伝子検査実施状況
2016年に全国74の地衛研うち麻疹の検査診断を行った地衛研は72カ所、検査された症例数は1865症例であった(表1)。また、麻疹の検査を実施した72カ所の地衛研のうち、2015年から導入されたリアルタイムPCR法を検査に使用した地衛研は61カ所であった。1865症例中1592症例の診断にはリアルタイムPCR法が使用されていた。検査された1865症例のうち、麻疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は171症例であった(検査陽性)。171症例のうち、139症例で遺伝子型解析が行われ、65症例から遺伝子型D8の麻疹ウイルスが、58症例から遺伝子型H1の麻疹ウイルスが、一症例から遺伝子型B3の麻疹ウイルスが検出された。
2017年に全国74の地衛研のうち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2)。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3)

2018年に全国76の地衛研において麻疹の検査が行われた症例数は6,251症例であった。そのうち、麻疹検査が陽性であった症例数は328症例(5.2%)であった。269症例で遺伝子型解析が試みられ、228症例(84.8%)で遺伝子型の決定ができた。そのうち、遺伝子型D4の麻疹ウイルスが26症例から、遺伝子型D8の麻疹ウイルスが119症例から、遺伝子型B3の麻疹ウイルスが32症例から検出された。またワクチン株である遺伝子型Aが52症例から検出された(表4)。同様に風疹の検査が行われた症例数は6,110症例であった。そのうち、風疹検査が陽性であった症例数は1,859症例(30.4%)であった。1,616症例で遺伝子型解析が試みられ、1,339症例(82.9%)で遺伝子型の決定ができた。そのうち、遺伝子型2Bの風疹ウイルスは7症例から、遺伝子型1Eの風疹ウイルスは1,309症例から検出された。またワクチン株である遺伝子型1aは21症例から検出された(表5)。

2018年の検査症例数は麻疹風疹ともに2017年の検査症例数(麻疹1,516症例、風疹706症例。ただし遺伝子検査のみを集計)より大幅に増加していた。

2. 麻疹アウトブレイク時の検査体制維持の検討

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

3. 民間検査センターによるIgM抗体検査の状況

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

4. 民間検査センターへの麻疹、風疹IgM抗体測定習熟度検査(PT)の試み

PTを実施するためには麻疹IgM抗体陽性血清、風疹IgM抗体陽性血清が必要である。陽性血清を確保するために、民間検査センターから検査済み、廃棄予定の麻疹、並びに風疹IgM抗体陽性血清の提供を受けた。これらの血清を使用するにあたり、事前に倫理委員会の承認を得た。収集した血清の抗体価を測定し、抗体価の近い血清を混合して、麻疹、並びに風疹のプール血清(2~3ml)をそれぞれ5種類作製した。感染研においてこれらのプール血清の抗体価を測定し、抗体価が陽性値にある事を確定した。麻疹、風疹IgM陽性抗体各4種類、陰性血清2種類を含む10本の血清からなるパ

ネル血清を作製し、民間検査センターに配布、各社の通常の方法による測定を依頼し、検査結果を回収した。すべての民間検査センターの結果は感染研の定めた適合条件に合致した。

5. 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、通常の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。さらに既存風疹参照RNAは全国配布の際、凍結状態で送付していたが、これをRNastable試薬により、乾燥状態で常温輸送が可能にさせた。これを一部のリファレンスセンターに送付し、常温輸送による劣化が起きないことを確認した。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。

6. 収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列の他の自治体への提供に関する検討

地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会において全国地方衛生研究所を対象に意見照会をおこなった。66%の地方衛生研究所が「広域の流行状況を即座に把握するために、他の自治体が解析した麻疹風疹ウイルス遺伝子配列情報の開示を希望」していることが明らかになった。他自治体に麻疹風疹ウイルス遺伝子配列情報を提供できるかについては67%が提供可能と回答し、「提供できない」とした地方衛生研究所はなかった。提供の条件案として提示した「他自治体からの共有情報は、貴自治体内で発生した麻疹・風疹の流行(伝播経路)調査・把握の目的のために貴自治体内でのみ使用できる。貴施設が、一般に公開されるウェブサイト、冊子(報告書)、学会・論文発表等に使用する場合には、情報提供元の自治体(地衛研)の承諾が必要である」については、69%が同意した。これらの意見を踏まえ、感染研に収集された麻疹ウイルス遺伝子配列情報について、1)自治体内の使用に限って使用する、2)一般公開する場合には遺伝子配列情報を提供した地衛研の承諾が必要であることを条件に、求めに応じてウイルス株の「遺伝子配列」、「検体採取日」、「検出自治体名」、「(依頼があれば)系統樹」を提供することとした。本件は厚生労働省結核感染症課の承諾を受けたのち、地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会を通じて、全国の地方衛生研究所に連絡された。

D. 考察

1. 地衛研の麻疹風疹遺伝子検査実施状況

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。2015

年より麻疹および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。2016 および 2017 年の調査では地衛研で実施された症例の検査のうち、麻疹 79.5%-85.4%で、風疹は 76.3%でリアルタイム PCR が使用されており、リアルタイム PCR 法の普及が進んでいると思われた。2018 年は 2016 年、2017 年の調査と比較して麻疹、風疹共に検査数が大幅に増加していることが明らかとなった。風疹については特定感染症予防指針で地方衛生研究所において遺伝子検査を原則として全症例に実施することになったこと、ならびに大規模な風疹流行や局地的な麻疹流行が発生したことが原因と考えられる。検査症例数の増大に対し、人的ならびに経済的に十分に対応できているか検討が必要かもしれない。ウイルス遺伝子が検出されたにも関わらず遺伝子配列の解析を試みられなかった症例が多くあったが、どのような症例で解析が行われなかったか今後調査していく必要があるものと考えられた。

2. 麻疹アウトブレイク時の検査体制維持の検討

関西国際空港(関空)を中心に患者 50 名をこすアウトブレイクが発生した。また患者の中には九州や関東まで移動した者がおり、広域に麻疹が拡散する可能性が懸念され、検査に必要なプライマー、標準品等が不足する事態が想定された。そこで地衛研における試薬の準備状況の調査を実施し、必要

に応じてプライマー、標準品の配布を行った。日本は麻疹排除にあるので、地衛研によっては十分量の試薬等が準備されていない場合もある。アウトブレイクに備えて、感染研、あるいはレファレンスセンター等に緊急用の試薬等を用意しておく事は、検査診断体制の機能を維持する上で重要であると思われた。

3.民間検査センターによるIgM抗体検査の状況

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

4.民間検査センターへの麻疹、風疹IgM抗体測定習熟度検査(PT)の試み

大手民間検査センター、5社ではISO 151809や“College of American Pathologist”の外部精度管理を受けて、適合している。一方、WHOはNLによる精度管理の実施を求めている事から、PT試験の試行を実施した。各施設にはPT用パネルを配布し、通常用いている検査機器、検査方法で抗体価の測定し、診断を依頼した。

診断結果はほぼ感染研での診断結果と一致した。今回のPTに参加した民間検査センターにおける麻疹の検査診断の精度は良好と判断した。

5.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が期待される。

6.収集された麻疹風疹ウイルスの遺伝子配列の他の自治体への提供に関する検討

麻疹風疹症例が1例でも発生したら積極的疫学調査を行うことが各特定感染症予防指針において求められている。麻疹風疹は感染性が高く、しばしば複数の自治体に渡って流行が拡大することがある。ウイルスの遺伝子配列情報はウイルス伝播を追跡する上で非常に有用な情報であるが、これまで収集された情報の開示は行われてこなかった。今回の研究により、麻疹ウイルスの遺伝子情報を自治体間で共有する方法を構築でき、より迅速に麻疹の疫学調査が可能になったと考えられる。現在、麻疹についてのみ運用を開始しているが、今後は風疹にも拡大していきたい。

E. 結論

麻疹風疹の検査には、血清学的検査法、または病原体検査法のいずれか、あるいは両方が行われている。今後もこの検査診断

体制、検査診断精度を評価し、維持、改善していく事が求められる。また、流行時の危機管理体制や自治体間での情報共有が可能な仕組みを今後も構築していく必要があると考えられる。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Do Phuong Loan, Nguyen Minh Hang, Trieu Thi Thanh Van, Thi Mai Duyen, Katsuhiko Komase, Nguyen Tran Hien, Comparison of laboratory methods for measles diagnosis in Northern Vietnam, 2014. (2016) Vietnam Journal of Preventive Medicine. 12 (185) 24-9.
2. Seki F, Someya K, Komase K, Takeda M. A chicken homologue of nectin-4 functions as a measles virus receptor. Vaccine. 2016 Jan 2;34(1):7-12.
3. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. (2016) TMRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. Sci Rep. 6:29430.
4. Okamoto K, Mori Y, Komagome R, Nagano H, Miyoshi M, Okano M, Aoki Y, Ogura A, Hotta C, Ogawa T, Saikusa M, Kodama H, Yasui Y, Minagawa H, Kurata T, Kanbayashi D, Kase T, Murata S, Shirabe K, Hamasaki M, Kato T, Otsuki N, Sakata M, Komase K, Takeda M. (2016) Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens. J. Clin. Virol. 80: 98-101.
5. 駒瀬勝啓、竹田誠、(2016)インドネシアにおける麻疹の状況、病原微生物検出情報 37:67-68.
6. 駒瀬勝啓 (2016) わが国における麻疹対策の現状と課題、検査と技術、医学書院 44(11); 1046-48.
7. 森嘉生、坂田真史、竹田誠、海外での風疹対策の現状、病原微生物検出情報 37:76-77, 2016
8. Matsushima Y, Shimizu T, Doi I, Mizukoshi F, Nagasawa K, Ryo A, Shimizu H, Kobayashi M, Funatogawa K, Nagata N, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Mori Y, Takeda M, Kimura H. A detection method for the rash and fever illness-associated viruses using multiplex RT-PCR. Microbiol. Immunol. 61(8), 337-344. (2017)
9. 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, Zaitzu S, Kadoguchi M, Otsuki N, Okamoto K, Sakata M, Komase K, Takeda M. Molecular Epidemiology of Rubella Virus Strains Detected Around the Tome of the 2012-2013 Epidemic in Japan. Front. Microbiol. 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.01513 (2017)
10. 佐藤弘、多屋馨子、大石和徳、森嘉生、竹田誠、2017 年度風疹予防接種状況お

よび抗体保有状況 2017 年度感染症
流行予測調査（暫定結果）、2017 年度
風疹感受性調査実施都道府県、病原微生物
検出情報 39:40-41, 2018

2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

11. 森嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、
坂田真史、竹田誠、風疹の検査法、病
原微生物検出情報 39:35-36, 2018
12. 金井瑞恵、砂川富正、神谷元、奥
野英雄、多屋馨子、大石和徳、森嘉生、
竹田誠、倉田貴子、上林大起、加瀬哲
男、駒野淳、北島博之、2012-2014 年
に出生した先天性風疹症候群 45 例の
フォローアップ調査結果報告、病原微
生物検出情報 39:33-34, 2018
13. 森 嘉生、風疹、ウイルス検査法 臨
床と検査室のための手引き、春恒社、
2018
14. 森 嘉生、風疹、グローバル時代
のウイルス感染症、日本医事新報社、
2019
15. 寺田喜平、森嘉生、風しんワクチン、
ワクチン 基礎から臨床まで、朝倉書店、
2018
16. 森 嘉生、風疹ウイルスに関する最
新情報・風しん含有ワクチンの製造方法、
臨床とウイルス、2018

学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

表 1

地方衛生研究所における麻疹検査実績(2016年)

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

NT: Not typed

2016年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

表 2

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3

表2 地方衛生研究所における風しん検査実績（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

表 4

表 1 地方衛生研究所における麻しん検査実績（2018年）

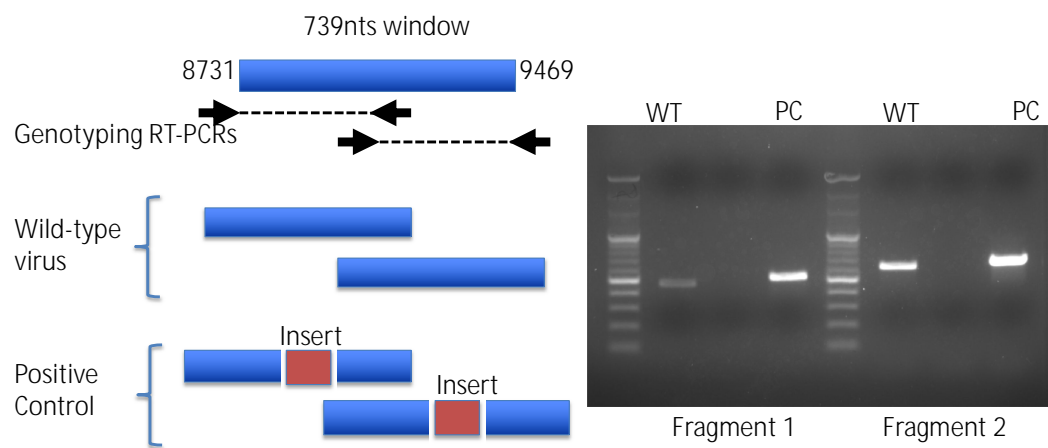
ブロック	調査施設数	検査症例数	陽性症例数	Genotype				
				D4	D8	B3	A	未決定
北海道	2	70	1	0	1	0	0	0
東北新潟	9	221	22	6	0	9	4	3
北関東	11	2691	73	0	33	17	15	12
南関東 甲信静	11	673	39	20	10	1	6	2
中部	5	597	41	0	31	3	2	5
北陸	3	151	1	0	1	0	0	0
近畿	13	502	21	0	14	2	4	1
中四国	10	298	6	0	2	0	3	1
九州	11	410	25	0	11	0	4	12
沖縄	1	638	99	0	16	0	14	5
合計	76	6251	328	26	119	32	52	41

表 5

表 2 地方衛生研究所における風しん検査実績（2018年）

ブロック	調査施設数	検査症例数	陽性症例数	Genotype			
				1E	2B	1a	未決定
北海道	2	74	21	11	0	0	0
東北新潟	9	215	41	34	0	3	4
北関東	11	2692	987	639	1	8	120
南関東 甲信静	11	922	345	292	0	2	30
中部	5	599	97	72	1	2	23
北陸	3	169	32	30	1	1	1
近畿	13	561	135	87	2	2	3
中四国	10	370	81	67	2	1	5
九州	11	424	108	70	0	2	25
沖縄	1	84	12	7	0	0	1
合計	76	6110	1859	1309	7	21	212

図 風疹ウイルス検出試験 新規ポジティブコントロール



平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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
百日咳

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
	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部
	平松征洋	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 百日咳感染症の新規検査法である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の性能評価ならびにパラ百日咳菌の遺伝子型別法の開発を行なった。2016 年に健康保険適用となった百日咳菌検出試薬キットは世界の流行株である *ptxP1* 株と *ptxP3* 株を高感度に検出し、本法の有用性が確認された。また、開発したパラ百日咳菌の反復配列多型解析法（MLVA 法）は、病原体サーベイランスやアウトブレイク解析において有用な解析手段となることが示された。

A．研究目的

2016 年にわが国では百日咳感染症の遺伝子検査として新たに Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D（以下、百日咳菌 LAMP キット）が健康保険適用となり、百日咳の診断精度に大きく貢献することが期待されている。百日咳菌 LAMP キットは百日咳毒素プロモーター（*ptxP1* アレル）を標的遺伝子とするが、この *ptxP1* 遺伝子には複数の一塩基多型（SNP）が認められている。近年の流行株には *ptxP1* から *ptxP3* アレルへの変化が認められ、*ptxP3* 株の増加は百日咳菌 LAMP キットの診断精度を低下させる恐れがある。また、国内では *ptxP3* 株以外に *ptxP8* 株が少数ながら臨床分離されており、*ptxP8* 株に対する感度評価も必要となっている。

近年米国では百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌（*Bordetella parapertussis*）の感染症例の増加が認められ、2016 年以降わが国でも 5 例の菌分離症例が発生している。これ

らの分離症例はすべて東京都文京区内で発生したものであるが、これまで本菌の遺伝子型別法は開発されていないため分離株の分子疫学的な関連性は不明であった。

以上の背景を踏まえ、本研究では百日咳病原サーベイランスの精度向上を目的に、1) 百日咳菌 LAMP キットの性能評価、2) パラ百日咳菌の新規遺伝子型別法（MLVA 法）の開発、を行なった。

B．研究方法

1. 百日咳菌 LAMP キットの評価

LAMP キットの標的遺伝子である *ptxP* 遺伝子（*ptxP1*、*ptxP3*、*ptxP8*）を PCR により増幅した。また、臨床分離株の *ptxP1* 株（n=20）、*ptxP3* 株（n=20）、*ptxP8* 株（n=1）から、それぞれゲノム DNA を精製した。*ptxP* 遺伝子を連続希釈し、 10^5 コピーから 10^2 コピーの鋳型 DNA 溶液を調製した。同様にゲノム DNA を希釈し、100 pg と 1 pg の DNA 溶液を調製した。希釈した DNA 溶

液を百日咳菌 LAMP キット (LMP542, 栄研化学) に供試し, 濁度測定装置 (LA-320C, 栄研化学) を用いて *ptxP* 遺伝子の増幅を行った (66°C, 40 分間)。Tt 値は濁度 (OD₆₅₀) が 0.1 を超えた時間 (min) とした。

2. パラ百日咳菌の新規 MLVA 法の開発

パラ百日咳菌のゲノム情報を用いて 4 箇所の VNTR (VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15) を選択し, マルチプレックス PCR により遺伝子増幅を行なった。PCR には異なる蛍光色素 (NED, PET, VIC, FAM) でラベルされたプライマーセットを使用した。PCR 産物のフラグメントサイズはキャピラリーシーケンサー (ABI 3130xl) により解析し, 検量線は GeneScan 600 LIZ standard を用いて作成した。各 VNTR の繰返し数の組合せから遺伝子型 (MLVA type, MT) を決定した。

国内臨床分離株 31 株 (<1970s~2018 年分離), 台湾株 3 株 (2010~2015 年), カンボジア株 1 株 (2005 年), フランス株 10 株 (1997~2001 年), オーストラリア株 5 株 (1998~2003 年), 実験室株 3 株 (12822, ATCC 15311, ATCC 15237) を MLVA 法に供試し, 各菌株の遺伝子型を決定した。多様性指数 (Simpson's diversity index) は Hunter & Gaston の方法に従って計算し, 系統樹は FDQ ソフトウェアを用いて最小全域木 (minimum spanning tree, MST) を作成した。

C. 研究結果

1. 百日咳菌 LAMP キットの評価

PCR により増幅した 3 種類の *ptxP* 遺伝子 (*ptxP1*, *ptxP3*, *ptxP8*) は, すべて 10² から 10⁵ コピーで増幅が認められた。*ptxP1* と *ptxP8* は同様な Tt 値を示したが, *ptxP3* は *ptxP1* と *ptxP8* に比べ有意に低い Tt 値

を示した ($p < 0.05$, 10³~10⁵ コピー), *ptxP3* に対する検出感度は *ptxP1* と *ptxP8* よりも約 100 倍高いことが判明した。

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

2. パラ百日咳菌の新規 MLVA 法の評価

解析菌株 53 株は 25 種類の遺伝子型 (MT1~MT25) に分類され, 本法の多様性指数は 0.91 (95%信頼区間 0.86~0.97) と計算された。MT19 は全菌株の 26% (n=14), MT21 は 11% (n=6), MT18 は 9% (n=5) を占め, その他はすべてマイナーな遺伝子型 (n=1~3) であった (図 1)。

国別に見ると日本株は主に MT19 (39%) と MT18 (16%) に分類され, その他はマイナーな遺伝子型に分類された。フランス株は MT17 に 2 株, MT4, MT12, MT13, MT15, MT19, MT20, MT22, MT25 に各 1 株が分類された。台湾株は MT4, MT5, MT6 に各 1 株, カンボジア株は MT1 に 1 株, 5 株のオーストラリア株はすべて MT21 に分類された。一方, 実験室株である 12822 株は MT13, ATCC 15311 は MT19, ATCC 15237 は MT18 に分類された。なお, 家族内感染事例から分離された 2 株の日本株は同じ遺伝子型 (MT18) を示した。

D. 考察

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

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

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

E . 結論

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

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, Poolman J, Geurtsen J. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom.* 4(5): e000180, 2018.
2. 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.
3. 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.
4. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. *Emerg Infect Dis.* 23(4):699-701, 2017
5. Kamachi K, Moriuchi T, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Microbiol Methods.* 133:20-22, 2017.

学会発表

1. 砂川富正, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 上月愛留, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2018年, 福岡.
2. 上月愛留, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳, 砂川富正. 全数把握疾患への変更により明らかになった日本の乳児百日咳の疫学. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2018年, 福岡.
3. 文元礼, 大塚菜緒, 神谷元, 蒲地一成. 健常人における抗百日咳菌IgA抗体と抗IgM抗体の保有調査. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2018年, 福岡.
4. 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.

5. 森内巧, 文元礼, 品川文乃, 新谷亮, 宮地悠輔, 勝田友博, 大塚菜緒, 平松征洋, 柴山恵吾, 蒲地一成. わが国の小児と成人における百日咳抗体の量的・質的解析. 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会. 11月19-20日, 2016年, 岡山.

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

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

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

^a Genomic DNA sample prepared from *B. pertussis* clinical isolate.

^b Threshold time when the turbidity value reached OD₆₅₀ of 0.1.

^c Genomic DNA/reaction tube.

^d Average Tt values from two separate measurements.

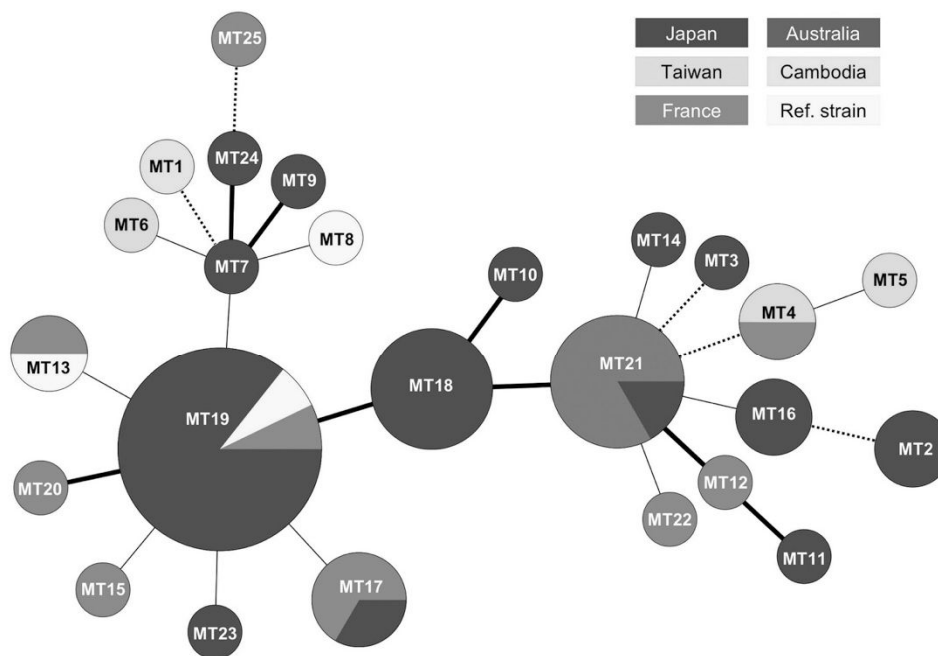


Fig. 1. Minimum spanning tree revealing the genetic diversity of the *Bordetella parapertussis* population. Each circle within a tree represents a unique MT type with the type number in the circle. The sizes of circles are representative of the number of strains in each group. The colour codes indicate country of origin or reference strain. Solid lines separate single-locus variants, whereas dotted lines separate double-locus variants. Thick lines represent differences of one repeat at one VNTR.

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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 結核予防会結核研究所抗酸菌部

研究協力者 村瀬良朗 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科
有川健太郎 神戸市環境保健研究所

研究要旨 精度保証は現在ではあらゆる検査の基本である。精度保証法自体には、内部精度管理、外部精度評価、トレーニングの三要素があるが、比較的大規模な精度保証にはパネルテスト等の外部精度評価が実施される。地方衛生研究所では結核菌の分子疫学解析を目的として Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)型別が一般に行われるが、全てのローカスの検査精度は同一ではない。施設間のデータ比較を正確化するため、地方衛生研究所を対象として2016～2018年の三年間連続して外部精度評価を実施した。総体としての検査精度そのものは年度毎に異なるが、施設ごとに検査者の交代や方法の違いなどがあり、各々の施設で継続的に外部精度評価を実施することで検査精度の継続的向上あるいは維持が可能となる。外部精度評価を始めとする精度保証活動は継続して実施されるべきである。

A．研究目的

日本国内における 2017 年 1 月 1 日～12 月 31 日間の結核罹患率（人口 10 万対の新規登録患者数）は 13.3 で、年々低下傾向である。患者年齢構成は、70 歳以上の高齢者が全結核患者の 59.0%を占めている。従来高齢者の結核は潜在結核感染症からの再燃例が多いと考えられていたが、近年の分子疫学解析により高齢者でも新規感染による結核の発病があることが示されている。一方若年者では外国出生結核患者の割合が年々増加しており、平成 29 年には結核患者全体の 9.1%に達した。これらの外国出生者は薬剤耐性結核を発病している確率が高く、感染の拡大は大きな社会的問題となる。結核の感染経路の解析については、従来の実地疫学解析が想定しない場合も多くなって

おり、実地疫学を支援する検査データとして遺伝子型別技術が利用され、集団感染の同定や Social Network Analysis の基礎情報として応用されている。

結核菌の型別分析は、診療・診断に直接結びつかないため保険点数もなく衛生検査所(検査センター)等では行われていない。病院検査室にも実施能力がなく、そのため、各都道府県・政令市の衛生研究所で分析することが期待され、環境も整いつつある。これまで、結核研究所では北京型結核菌を効率よく型別できる VNTR システムである Justified Analytical Tool Application (JATA) (12)を樹立して報告している。また、反復配列多型 (variable number of tandem repeat: VNTR)分析用のプライマーセット(18 loci)を希望する衛生研究所に送付している。

JATA (12)-VNTR システムは、北京型結核菌の識別能は若干低いが生型別結果は集団感染事例か否かの判断に利用可能である。また、本分析システムは、特別な装置は必要なく各 PCR 産物の分析にアガロースゲルを用いた電気泳動が利用できるという利点がある。

VNTR は結果が一連の数値（デジタル）であり、自治体間でデータを容易に共有・比較できることが大きな利点である。しかしながら、そのためには信頼性の確保が必要であり、全国的な精度保証の実施が必要である。

そこで本分担研究では地方衛生研究所を対象とした VNTR 型別法に関する外部精度評価を実施し、さらに各施設における内部精度管理の実施を支援する取り組みを行う。

B . 研究方法

1. 用語の定義

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。

2. 外部精度評価への参加施設募集

衛生微生物技術協議会時に実施内容を検討し、同協議会結核部会における各ブロックのリファレンス施設を通じて VNTR に関する内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価への参加希望を募った。

3. 外部精度評価検体

外部精度評価用結核菌 DNA（ ）
精製した結核菌の DNA 3 検体（3 株）を

外部精度評価用検体として使用した。

内部精度管理用結核菌 DNA（ ）

コピー数既知の結核菌 4 株（臨床分離株 3 株+H37Rv 1 株）の DNA を内部精度管理用 DNA として希望施設に配布した。これらコピー数を同定するための汎用コントロール検体とした。

（ ）送付する菌株 DNA は結核予防会結核研究所抗酸菌部及び神戸市環境保健研究所で実施した VNTR 解析において、一致した VNTR プロファイルを示した菌株であり、その一致した評価を基準として解析した。また、PCR 増幅反応が良好であることを両機関で確認した。

4. 試験領域（対象ローカス）

JATA 12、JATA 15、Supply 15 に含まれるローサイ、および HV（超過変領域: 3232, 3820, 4120）を評価対象とした。基本的に JATA (12)を最小実施単位とし、その他をオプションとした。

5. 外部精度評価結果解析

参加各施設は VNTR 分析結果報告シートを用い、施設名、PCR 産物の分析法、VNTR 分析結果を世話人（結核研究所抗酸菌部細菌科・村瀬良朗）へ電子メールにて送付し、結核研究所内で集計・分析を実施した。

C . 研究結果

1. 外部精度評価の実施

2016 年～2018 年の三年間で、それぞれ 56 施設、57 施設、59 施設に対して外部精度評価を実施した。

2. VNTR 解析に用いられるローカスセット
VNTR 分析システムには、JATA (12)、JATA

(15)、Hyper variable (HV)及びその他のローカスがある。外部精度評価では最低限 JATA (12)での分析を依頼した。その他に JATA (15) (JATA[12]に追加 3 ローサイ)、HV は 3 ローサイ、他に Supply らの 6 ローサイなどが分析対象ローサイとして想定されるため対応した報告様式を準備した。

2016 年度は各分析システムを利用していた施設数は、JATA (15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 41、33、19 であり、2017 年度はそれぞれ 46、41、28 となった。2018 年度にはそれぞれ 47、43、30 であり年度毎に解析対象とするローカスが増加していた。

3. JATA (12)必須解析に関する精度

2016 年に全株 12 ローサイ完全正答したのは 48 施設 (87%, 48/55)、1 ローカス違いは 5 施設 (9.1%, 5/55)、2 箇所以上違いは 2 施設 (3.6%, 2/55)であった。翌 2017 年に全株で 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)であり、2018 年に全株 12 ローサイ完全正答したのは 55 施設 (93%, 55/59)、1 ローカス違いは 3 施設 (5.1%, 3/59)、2 箇所以上違いは 1 施設 (1.7%, 1/55)であった。

4. 増幅産物の解析法

2016 年の調査では 2015 年度と同様に、アガロースゲル電気泳動による分析を行っている施設が最も多かった (66%, 36/55)。次いで自動シーケンサーを用いたフラグメント解析が 10 施設 (18%, 10/55)、マルチナ 5 施設 (9%, 5/55)、QIAxcel 2 施設 (4%, 2/55)、コスモアイおよび Agilent 2100 Bioanalyzer が 1 施設 (2%, 1/55)であった。

2017 年の調査では 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)、MultiNA 6 施設 (10.5%, 6/57)、QIAxcel 3 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。

2018 年度の調査では、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 (53%, 31/59)。次いで自動シーケンサーを用いたフラグメント解析 (アガロースゲル併用 2 施設含む)が 18 施設 (31%, 18/59)、MultiNA (アガロースゲル併用 4 施設含む)6 施設 (10%, 6/59)、QIAxcel 3 施設 (5.1%, 3/59)、LabChip (PE)が 1 施設 (1.7%, 1/59)であった。

5. 分析法別正答率

JATA (12)に関し、最も多く使用されているアガロースゲル電気泳動での正答率は、2016 年は 99.8%、2017 年は 97.6%、2018 年は 99.7%であった。JATA (12)以外のローカセットでは、HV に関して QIAxcel の正答率が全体に低い傾向があった (66.7-77.8%)。自動シーケンサーの利用が年々増加しているが、正答率が必ずしも 100%ではなかった。

6. ローカス毎の正答率

JATA (12)及び(15)におけるローカス毎の正答率を年度別にみると、2016 年と 2018 年は何れのローカスでも 98%以上であったが、2017 年は 3 つのローサイ (2163b, 4052 [QUB26], 1982 [QUB18]) の正答率 (範囲: 92.9-94.7%) が低い傾向であった。

D．考察

2016～2018年にかけて結核菌遺伝子型別解析法としてのVNTRの外部精度評価を実施した。実施年によって複数のローカスで精度が上下しているものの、平均的には高い精度が保たれており、適切な検査精度が維持されているものと考えられた。

外部精度評価の実施に当たっては適切な検体を適切な数、適切に送付して適切な期間内で実施することが求められる。検体の適切性という観点では、一連の外部精度評価パネルテストでは既に抽出し精製したDNAを検体として使用している。これは検体の均質性と再現性、あるいは安定性を確保することが主な目的である。しかしながら実際の検査では結核菌から核酸を抽出して精製するプロセスが必須であり、このプロセスは検査精度に影響を与える。この点を考慮すると、外部精度評価に使用する検体は本来結核菌そのものであるべきであり、今後の外部精度評価パネル作成に当たっては、感染性を除去した結核菌を調製して送付することを考えるべきである。次に検体数としては毎回3検体送付しているが、最大24ローカスを解析する施設と12ローカスのみ実施する施設とでは物理的な作業量が2倍異なる。精度評価上も全ての施設が同じ領域を検査した方が母数が大きくなるため、対象領域は標準化した方が良いと考えられた。さらにこれまでの外部精度評価において常に安定して高精度な結果が得られるローカスと、不安定なローカスに関する知見が蓄積されてきており、特に安定しているローカスについては対象領域外とし、領域を少数に絞って検体数を増やした方が精度評価的には有効性が高いと思われる。今後は、全ての参加施設が同じ領域を検査し、相互比較が容易になるよう方法の変更

を考えたい。また現在の外部精度評価パネルは郵便により配布しているが、検体の安定性を考慮し、さらに不活化処理した結核菌そのものを使用することを考慮すると、低温状態による配布が望ましい。検体作成法の改良とともに注意すべき点と思われる。最後にパネルテストの実施期間（受領から結果報告までの時間：Turn Around Time/TAT）であるが、現在は11月～12月頃に検体を配布し、翌年1月末までの期間で実施している。ルーティーンのパフォーマンスを評価するのであれば、通常の検体を処理するのと同様のTATを設定すべきであり、1ヶ月以上という期間は実際的には長すぎるものと思われる。ただし各地衛研がどの程度のTATでVNTR情報を提供しているのかが不明であるため、次回外部精度評価を実施するに当たってはTAT情報を収集して適切に期間を設定したいと考える。

外部精度評価の主要な目的は、看過できないほどの低精度な状況を早期に検出し、これを改善することである。然るに、現在の外部精度評価活動では実施後の改善に関するフォローアップを行っておらず、外部精度評価でエラーが発生したローカスの精度が実際に改善されているかどうか不明である。今後は、エラーの発生したローカスに関しては各施設に再検と結果報告を求めたいと考える。

外部精度評価は、精度保証活動の一部に過ぎない。本質的には内部精度管理の補完であり、内部精度活動が円滑に実施できるよう標準手順書の整備や標準物質・基準結核菌株の分与等を進める必要がある。

E．結論

結核菌遺伝子型別法としてのVNTRに関して外部精度評価を連続して実施した。施

設あるいは使用している解析方法によって差異はあるものの、概ね適切な検査精度が維持されているものと考えられた。今後は検体の性状、数、対象領域数などに改良を加え、さらに評価後の改善の有無をフォローするところまで内容を拡大するべきと思われた。

F．健康危険情報

結核菌は感染症法の指定する特定病原体に相当するため、全ての結核菌の取扱（核酸検体の準備）は感染症法の基準を満たした BSL3 の実験室で実施した。バイオセーフティ上の問題点は報告されていない。

G．研究発表

論文発表

1. 御手洗聡. 病原体サーベイランスガイドラインの概要 特集 1 病原体サーベイランスの活用 保健師・看護師の結核展望 2017; 55(1): 2-7.
2. 御手洗聡. 結核菌サーベイランスの構築. 公衆衛生 2018; 82: 28-33.

学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

動物由来感染症レファレンスセンター 平成28-30年度活動報告

研究分担者	森川 茂	獣医科学部長
研究協力者	今岡 浩一	獣医科学部 第一室長
	井上 智	獣医科学部 第二室長
	奥谷 晶子	獣医科学部 主任研究官
	堀田 明豊	獣医科学部 主任研究官
	藤田 修	獣医科学部 主任研究官

研究要旨

平成28年度から30年度において、動物由来感染症レファレンスセンターでは下記の項目について

- (1)野兔病菌の抗体検査・PCR検査のEQA
- (2)ブルセラ症の抗体検査・PCR検査のEQA
- (3)炭疽菌のPCR検査のEQA

を地方衛生研究所等で実施し、成績をまとめ問題点を確認した。

各年度においての検査における検出感度は全参加機関において概ね良好であり、地方衛生研究所等において野兔病菌、ブルセラ症、炭疽菌の検査が可能であることが明らかとなった。

A．研究目的

本研究班の目的は、衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属する7地方衛生研究所(山形県、東京都、愛知県、京都府、広島県、徳島県および長崎県)において、重要な動物由来感染症に関して検査法、検出法等の標準化を行うことである。

対象とする疾病は複数該当するが、平成28年度から平成30年度においては、

- 野兔病について凝集反応試験による抗体検査および16S rRNA領域と野兔病菌特異的領域を標的とした遺伝子検査
- ブルセラ症について凝集反応試験による抗体検査および遺伝子検査による菌種同定

- 炭疽菌について炭疽菌特異的病原性遺伝子である *pag*、*cap* 遺伝子の検出

を目的とした外部品質保証を行い、地方衛生研究所等における検査成績の評価および信頼性の向上について検証した。

B．研究方法

1. 野兔病菌検査

1. 血清学的検査（微量凝集反応）

フォルマリン不活化野兔病菌（Yama株）抗原液、抗原染色液（サフラン溶液）、陽性対照ウサギ血清、陰性対照ウサギ血清および擬似3検体をEQA参加地方衛生研究所に冷蔵送付した。また野兔病の行政検査に使用している検査手順書（SOP）も配布した。擬似3検体No.1、2および3の内容

はそれぞれ陽性対照ウサギ血清とウマ血清を、1:33、1:3、1:15の比で混合した。各機関にて送付した陽性対照ウサギ血清を陽性対照(強)、陽性対照ウサギ血清と陰性対照ウサギ血清の7:1の混合液を陽性対照(弱)として供試した。ピペット、チップ、96穴プレート、インキュベーターなどは各機関所有の物品を供試した。各機関はSOP通りに必要事項を記入しながら対照3検体と共に、模擬3検体の凝集力価を測定し、反応像を写真撮影した。これら試験結果は国立感染症研究所獣医科学部に集計された。

2. 遺伝子検査 (conventional PCR)

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

2. ブルセラ症検査

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同性が高いことから、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。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。

3.炭疽菌検査

1.遺伝子検査

1-1. 供試菌株について。

炭疽菌は臨床分離株 BA103 株を、陰性対照(明示しない)用のセレウス菌は GTC2903 株を使用した。BA103 株は、病原性プラスミド pXO1(*pag* 遺伝子をコード)および pXO2(*cap* 遺伝子をコード)の保持を確認済みである。- 80 芽胞液ストックを LB ブロスに懸濁して、37℃一晩好気培養した。芽胞数を計測するために培養液から 10 倍階段希釈液(10^{-1} から 10^{-5})を作成し LB 寒天培地に塗沫 37℃一晩好気培養後、コロニー数を計測した。同じ培養液を 50ml × 2 本の LB ブロスに 100 分の 1 量(500uL)添加し、37℃一晩好気培養を行い DNA 抽出した。

DNA 抽出は培養液 50ml × 2 本の遠心後のペレットに Lysis Buffer (0.2% SDS、1.2% Triton、2mM EDTA pH 8.0、20mM Tris HCl pH8.0)、lysozyme 処理、proteinase K 処理後、フェノール・クロロフォルム処理を 2 回行

い、エタノール沈殿で精製した。抽出した DNA は TE buffer に懸濁した。処理後の DNA 溶液に感染性の芽胞が混入していないことを確認するため DNA 溶液 10uL を羊血液寒天培地にスポットして 37℃で 7 日間培養し、コロニーが発育しないことを確認した。

DNA 溶液の 10^{-1} から 10^{-7} 階段希釈液を作成して検査用 DNA とした。また、明示しない陰性対照としてのセレウス菌 DNA も同方法で抽出し、DNA 溶液原液を同様に検査用 DNA として配布した。

低濃度の DNA の分解を防ぐため、キャリア DNA として断片化鮭精子 DNA(10ug/uL 相当)を加えて - 20℃で 7 日間保管後の DNA を用意した。DNA を template とした *pag* 遺伝子および *cap* 遺伝子の検出 PCR を病原性検出マニュアルのプロトコール通りに行い、各 DNA の安定性を事前に確認した。

2. 粉検体を想定した閉鎖系(グローブボックス)を用いた検査マニュアルの配布および意見聴取

炭疽菌芽胞の混入した粉検体からの DNA 調製、培養試験を安全に行うための検査マニュアル試案を作成した。安全キャビネット内で簡易グローブボックスを使用した方法を提案し、参加機関からの質問や要望を受け付けた。また疑似芽胞検体として市販の枯草菌芽胞液(栄研化学)を配布し、各機関での模擬訓練用の検体としての使用(任意)を依頼した。

C . 研究結果

1. 野兎病菌検査

1.血清学的検査(微量凝集反応)

配布した抗原液の OD₅₆₀ 値は測定機器を有す 11 地方衛生研究所において 0.94~1.3 であった。全 24 機関で使用された 96 穴ブ

レートは品番不明も含め 16 種以上であった。各機関における凝集力価は陽性対照(強)が 320 または 640 倍、陽性対照(弱)が 40 または 80 倍、陰性対照は全てで 10 倍未満であった(図 1)。擬似検体 No.1 は 10 倍未満が 1 機関、10 倍が 12 機関、20 倍が 10 機関、40 倍が 1 機関と異なった。擬似検体 No.2 は 80 倍が 18 機関、160 倍が 6 機関、擬似検体 No.3 は 20 倍が 13 機関、40 倍が 11 機関であった(図 2)。報告された SOP を確認したところ、不鮮明さにより、凝集の有無の判定の正確性が確認できない写真がいくつか確認された。

2. 遺伝子検査 (conventional PCR)

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

2. ブルセラ症検査

2. 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 1)

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 2)。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。

3. 炭疽菌遺伝子検査

1. 遺伝子検査 参加衛生研究所の検査成績

各施設での成績は一覧にまとめた(表 1)。使用したサーマルサイクラーおよび DNA ポリメラーゼも複数の組み合わせが報告された。検出限界の濃度は施設間で差がみられた。*pag* 遺伝子、*cap* 遺伝子ともに施設により芽胞数に換算すると 1 個から 100 個の検出限界を示した。また、*pag* 遺伝子をコードする pXO1 と *cap* 遺伝子をコードする pXO2 で検出限界に差がみられた。また、*pag* 遺伝子の増幅では、陰性対照であるセレウス菌で非特異的なサイズでの PCR 増幅が一部の機関で確認された。

2. グローブボックスによる粉検体からの検査試料調製について

参加機関からは

- グローブボックスの使用場所の選定基準について、安全キャビネットが使用できない場合の個人防護衣(PPE) について
- 粉検体の静電気防止用器具の選定基準、

入手方法について

- 試料調製後の残余検体の取り扱い方法について

質問があった。

また、試案マニュアルによる模擬訓練の実施の要望があった。

D. 考察

1. 野兎病菌について

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

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

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

Francisella 属菌に最も近縁とされる *Wolbachia* の核酸 (擬似検体 No.3) から *fopA* 領域を増幅させる PCR にて野兎病菌と同程度の分子量の PCR 産物が増幅された原因は不明だが、当該機関のみが Fast PCR 用の酵素を使用し、一般の酵素用のプログラムで反応させていたことが一因と考えられる。今後、擬似検体 No.3 から増幅された遺伝子産物のシーケンス解読などの検証を試みたい。いずれにしる 16srRNA と *fopA* を標的とした PCR では、+/+の場合、*F. tularensis* または *F. novicida*、+/-の場合、*F. tularensis* と *F. novicida* 以外の *Francisella* 属菌、-/-の場合、*Francisella* 属菌以外の菌と判定され、-/+の場合は判定不能となり、再検査を要する。本 EQA において、PCR の結果から検体の菌種判定を記述した機関は少なかった。このため各検査者に検査の目的と結果の意味について十分理解してもらう必要がある。今後、病原体検出マニュアルや SOP の改変時には、明快な説明や、PCR の結果からの菌種の判定の記入欄を追加するなどして改善するべきである。

近年、血液培養機器などにより野兎病菌以外の *Francisella* 属菌など、病原性や増殖性が乏しい環境菌が臨床検体から偶発的に分離されることがある。本 EQA の実施により多数の自治体において病院検査室などで

認められた野兎病菌疑い菌のスムーズな確認検査が可能となるだろう。

2. ブルセラ症について

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ので、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。

3.炭疽菌検査について

各参加機関の間でみられた conventional PCR 検査系での検出限界の差は、使用したサーマルサイクラーの違い、低濃度 DNA での増幅に影響する要因（例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い）、増幅産物の確認方法によるものと考えられる。

今回、施設間で検出限界濃度の差が認められたものの、炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には非常に多くの炭疽菌(通常 10^6 CFU/ml 以上)が存在していることから考察すると、これらの検体からの検査においては、今回検証された検出限界の検査系で検出は可能であると考え。過去に生物テロで使われた芽胞粉末（いわゆる白い粉）の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、First screening としての PCR 検査系としてはどの機関も十分な検出限界を有していると考え。

E . 結論

平成 28 年度から 30 年度にかけて行った野兔病、ブルセラ症、炭疽の EQA の結果、各地方衛生研究所においては、各病原体で必要な血清学的検査および遺伝子検査のいずれも実施可能であり、検査成績についても問題なく評価可能であることが示された。

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

1. 野兔病検査結果

表1 遺伝子検査における疑似検体の結果分布と解釈

疑似検体 No.	PCRの結果		回答 地衛研数	結果の解釈
	16srRNA	fop A		
1	+	+	24	<i>F. tularensis</i> または <i>F. nvicida</i>
2	+	-	24	<i>F. tularensis</i> 、 <i>F. nvicida</i> 以外の <i>Franseilla</i> 属
3	-	-	23	<i>Franseilla</i> 属以外
	-	+	1	判定不能、再検査

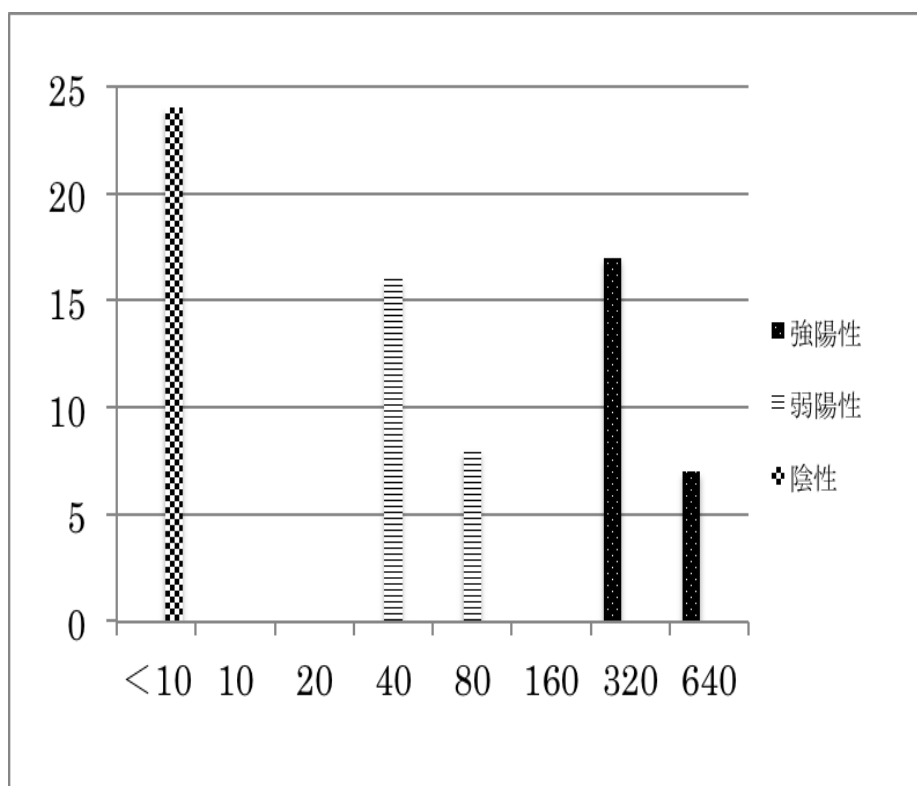


図1 抗野兔病菌対照血清の凝集力価の差（縦軸：地方衛生研究所数、横軸：凝集力価）
陰性対照は全機関が10倍未満と判定し、陽性対照（強および弱）の凝集力価は1管の差であった。

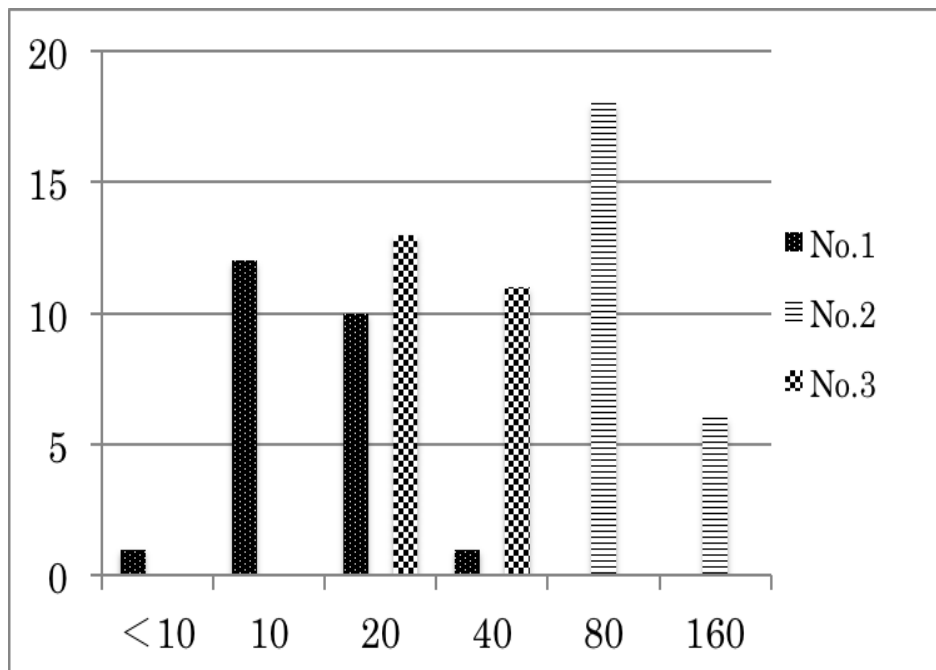


図2 血清学的検査用擬似3検体の凝集力価(縦軸:地方衛生研究所数、横軸:凝集力価)
 低力価の擬似検体No.1は機関間で差があったが、擬似検体No.2および3では差は1管であった。

2. ブルセラ症検査結果

表1.) 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2.) 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

3. 炭疽菌検査結果

表1) 参加37機関における炭疽菌*pag*遺伝子/*cap*遺伝子のconventional PCRにおける検出限界濃度

参加機関数別の検出限界 (DNA 希釈濃度)

標的遺伝子	10 ⁻⁵ 希釈	10 ⁻⁶ 希釈	10 ⁻⁷ 希釈
<i>pag</i> 遺伝子	3	17	17
<i>cap</i> 遺伝子	3	15	19

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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
	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 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を目的とした。H28および29年度（3カ年計画1、2年目）に地方衛生研究所における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った。その結果を踏まえ、遺伝子検査、HIV-2の鑑別診断の2項目を重点的に改訂・加筆し、H30年度にマニュアルを改訂、改訂した。改訂後はマニュアルに従い、希望する施設に対し技術導入支援を行った。

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、早期診断に結びつ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情報提供、診断技術に関する技術連携の強化を目的とした。

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。

3. コアメンバー（東京都健康安全研究センター、神奈川県衛生研究所、独立行政法人大阪健康安全基盤研究所、および国立感染症研究所エイズ研究センター）にて病原体検出マニュアル改訂案を作成した。

4. HIV 診断技術維持、向上のための技術支援

マニュアル公開後、地方衛生研究所 HIV 検査担当者を対象とした検査技術講習会（厚生労働科学研究費補助金「HIV 検査受験勧奨に関する研究」班への協力）にて、講義を担当し、マニュアル改訂の背景、重点的に改正した点、すなわち HIV-1 と HIV-2 の鑑別診断、および感染急性期受験者に対する遺伝子検査の重要性とその方法論に関して講義した。さらに希望があった施設に対しては、遺伝子診断の導入を中心に技術供与をした。

C . 研究結果

HIV 遺伝子検査法に関しては、未導入の施設に関しては施設の希望に応じて、コントロール検体、参照品の配布など個別に対応した。またすでに遺伝子検査導入済みの施設を含め、国際標準参照品を用いて HIV-RNA コピー数に関して精度管理調査を行った。平成 30 年度内に 14 施設の参加、および結果報告を受けている。結果は平成 31 年度衛生微生物協議回・レファレンスセンターにて広く公開することを予定している。

D . 考察

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

E . 結論

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

F . 健康危険情報

特記事項なし

G . 研究発表

論文発表

1. Takahashi N, Matsuoka S, Thi Minh TT, Naruse TK, Kimura A, SHiino T, Kawana-Tachikawa A, Ishikawa K, Matano T, Ngyyen Thi LA. Human lucoyto-antigen associated gag and nef polymorphisms in HIV-1 subtype A/E-infected individuals in Vietnam. *Microbes and Infection*. 2018. S1286-4579(18):30163-30171.
2. Kato H, Kanou K, Arima Y, Ando F, Matsuoka S, Yoshimura K, Matano T, Matsui T, Sunagawa T, Oishi K. The importance of accounting for testing and positivity in surveillance by time and place: an illustration from HIV

surveillance in Japan. *Epidemiol Infect.* 2018. 12:1-7

3. 松岡佐織 . 2015 年以降の日本国内の HIV 感染発生動向 . 病原微生物体検出情報 (IASR) . 39:151, 2018
4. 中村麻子、吉富秀亮、小林孝行、芦塚由紀、梶原淳睦、松岡佐織. 福岡県の HIV/AIDS 発生動向および保健所 HIV 検査陽性検体の解析 .
5. 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.
6. 松岡佐織 . 日本国内 HIV/AIDS 発生動向 . 病原微生物体検出情報 (IASR) . 38:179, 2017
7. Ishii H, Matsuoka S, Nomura T, Nakamura M, Shiino T, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. *Sci. Report.* 6: 30153. 2016.
8. 松岡佐織 . 都道府県別 HIV 感染発生動向 . 病原微生物体検出情報 (IASR) . 37:169, 2016 .

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

3 . その他
該当なし

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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

アデノウイルスレファレンス活動状況 2017～2019年

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
	高橋健一郎	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	川村朋子	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	小長谷 昌未	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	砂川 富正	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	Gabriel Gonzalez	北海道大学	人獣共通リサーチセンター
		アデノウイルス地区レファレンスセンター、 全国地方衛生研究所	

研究要旨 アデノウイルスの90を超える型が論文報告され、日本においても53、54、56、64、85型が流行性角結膜炎の主要な病原体となっている。この3年の期間においてレファレンス活動の成果として79型、81型および85型を新型として世界に向けて発信し、いずれも論文報告された。日本からは90のうち7つの型が報告されており、レファレンス活動は行政的・学術的に役立っている。

A．研究目的

アデノウイルス(Ad)は日本において年間に100万人をこえる患者の発生がある。感染症法における定点把握疾患において、流行性角結膜炎(EKC)、咽頭結膜熱(PCF)がAdにより発生し、感染性胃腸炎(下痢症)等の約10%はAdによる。Adの正確な型別を実施して新型であれば新しい型として明確化することを目的とした。

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にない。広島市での検出株でHAdV-21と思われる株を調べた。
5. 横浜市衛生研究所との共同研究により既に日本で報告されている2種類の新型株を検出した(HAdV-82およびHAdV-85)。フルゲノムの配列を決定した。
6. 福岡県衛生研究所との共同研究によりHAdV-79を発見して、フルゲノム配列を決

定した。

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。
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(地研との連名にて *JJID* で論文報告済)。
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。
5. **横浜市衛生研究所**との共同研究で、HAdV-82 および HAdV-85 が全国規模で流行していることが示唆された。フルゲノムを決定することが出来た。
6. **福岡県衛生研究所**との共同研究により HAdV-79 を発見し *Journal of Medical Virology* で公表した(地研と感染研の連名)。

D . 考察

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

日本においては、HAdV-54 が EKC の大規模流行を 2015～2018 年に引き起こし 4 年連続で大規模な流行がみられた。このように単一の型が複数年にわたって全国流行をしたことは珍しく、HAdV-54 は流行しやすく、かつ重症の EKC を引き起こしやすい型であることが明らかになった。日本以外において HAdV-54 の検出報告がない状況が続いていたが、ギリシャにおいて検出したとの報告がみられ世界的な流行が懸念される。

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 4 種類の型を地方衛生研究所と連名で論文報告することができた。

E . 結論

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

F . 健康危険情報

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

G . 研究発表

論文発表

- 1:** Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawamura T, Saeki Y, Hanaoka N, Fujimoto T, Uchio E. Evaluation of adenovirus amplified detection of immunochromatographic test using tears including conjunctival exudate in patients with adenoviral keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019 Apr;257(4):815-820.
- 2:** Hanaoka N, Ito S, Konagaya M, Nojiri N, Yasuda M, Fujimoto T, Deguchi T. Infectious human adenoviruses are shed in urine even after disappearance of urethral symptoms. *PLoS One.* 2019 Mar 6;14(3):e0212434.
- 3:** Fujimoto T, Hanaoka N, Konagaya M, Kobayashi M, Nakagawa H, Hatano H, Tsukahara-Kawamura T, Uchio E, Kaneko H. Evaluation of a silver-amplified immunochromatography kit for adenoviral conjunctivitis. *J Med Virol.* 2019 Jan 19.
- 4:** Matsuura K, Terasaka Y, Uchio E, Saeki Y, Fujimoto T, Hanaoka N, Miyazaki D, Inoue Y. Human adenoviral type 54 keratoconjunctivitis accompanied by stellate keratitis and keratic precipitates: two cases. *BMC Ophthalmol.* 2019 Jan 7;19(1):7.
- 5:** Okumura A, Mori H, Fee Chong P, Kira R, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Tanaka-Taya K; Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study Investigators. Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan. *Brain Dev.* 2018 Dec 26.
- 6:** Takahashi S, Metcalf CJE, Arima Y, Fujimoto T, Shimizu H, Rogier van Doorn H, Le Van T, Chan YF, Farrar JJ, Oishi K, Grenfell BT. Epidemic dynamics, interactions and predictability of enteroviruses associated with hand, foot and mouth disease in Japan. *J R Soc Interface.* 2018 Sep 12;15(146).
- 7:** Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, Saito H, Okitsu S, Shimizu H, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect Genet Evol.* 2018 Sep;63:17-23.
- 8:** Tsukahara-Kawamura T, Fujimoto T, Gonzalez G, Hanaoka N, Konagaya M, Arashiro T, Saeki Y, Uchio E. Epidemic Keratoconjunctivitis Cases Resulting from Adenovirus Types 8 and 54 Detected at Fukuoka University Hospital between 2014 and 2015. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Jul 24;71(4):322-324.
- 9:** Tatsumi C, Iizuka S, Mita T, Wada M, Hanaoka N, Fujimoto T. First Identification of Human Adenovirus 57 (HAdV-57) in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Jul 24;71(4):259-263.
- 10:** 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.* 2018 May;90(5):881-889.
- 11:** 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.* 2018 May; 90(5):873-880.
- 12:** 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. *Clin Ophthalmol.* 2018 Mar 19; 12:511-517.
- 13:** Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K; Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study Investigators . Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. *Clin Infect Dis.* 2018 Feb 10;66(5):653-664.
- 14:** Kimura K, Fukushima T, Katada N, Shimizu H, Nakamura T, Fujimoto T, Hanaoka N, Tanaka-Taya K, Makino K. Adult case of acute flaccid paralysis with enterovirus D68 detected in the CSF. *Neurol Clin Pract.* 2017 Oct;7(5):390-393.
- 15:** 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.* 2017 Sep 25;70(5):597-598.
- 16:** Kaneko M, Takanashi S, Thongprachum A, Hanaoka N, Fujimoto T, Nagasawa K, Kimura H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Identification of vaccine-derived rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Japan, 2012-2015. *PLoS One.* 2017 Sep 13;12(9):e0184067.
- 17:** Ogi M, Yano Y, Chikahira M, Takai D, Oshibe T, Arashiro T, Hanaoka N, Fujimoto T, Hayashi Y. Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013. *J Med Virol.* 2017 Aug;89(8):1395-1403.
- 18:** Yoshitomi H, Sera N, Gonzalez G, Hanaoka N, Fujimoto T. First isolation of a new type of human adenovirus (genotype 79), species Human mastadenovirus B (B2) from sewage water in Japan. *J Med Virol.* 2017 Jul;89(7):1192-1200.
- 19:** 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.* 2017 May 16;15(1):39.
- 20:** Hai le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7

Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):687-90.

学会発表

1. 藤本嗣人、高橋健一郎、花岡希、田村まり子、鈴木葉子、杉原茂孝、渡邊日出海 . Simultaneous diagnosis of group A Streptococcus and Adenovirus of pharyngitis patients were useful for judicious antibiotic use . 第66回日本ウイルス学会学術集会 . 10月28 - 30日 , 2018年 , 京都市 .
2. THONGPRACHUM Aksara, NOMURA Akiko, TAKANASHI Sayaka, FUJIMOTO Tsuguto, OKITSU Shoko, HAYAKAWA Satoshi, USHIJIMA Hiroshi . Further study of detection of enteric viruses in raw sewage in Japan. 第66回日本ウイルス学会学術集会 . 10月28 - 30日 , 2018年 , 京都市 .
3. 藤本嗣人 . アデノウイルスの型と疾患・流行 . 第59回 日本臨床ウイルス学会 . 6月9 - 10日 , 2018年 , 大宮市 .
4. Kazuhiro Yoshida, Tsuguto Fujimoto, Masamichi Muramatsu, Hiroyuki Shimizu . 深層学習を用いた手足口病症例報告数の予測 . 10月28 - 30日 , 2018年 , 京都市 .
5. 川村朋子、花岡希、藤本嗣人、小長谷昌未、内尾英一 . 新型アデノウイルス(53, 54, 56型)に対する米国イムノクロマトキットの評価 . 角膜カンファレンス2019. 2月7 - 9日 , 2019年 , 京都市 .
6. 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 .
7. 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 .
8. 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 .
9. Hanaoka N. Adenovirus Infection as STI; adenoviral urethritis. 19th IUSTI Asia-Pacific Conference. Dec-2, 2016, Okayama city .
10. 藤本嗣人、小長谷昌未、花岡希 . 日本におけるアデノウイルスサーベイランスの実施状況(2014年) . 第53回日本眼感染症学会 . 7月2日、2016年、東京 .
11. 藤本嗣人 . 日本におけるアデノウイルスレファレンス体制に関するアンケート結果からみえた課題とその解決のための取組. 第17回日本アデノウイルス研究会 . 7月2日、2016年、東京 .
12. 藤本嗣人 . アデノウイルスレファレンスセンター報告 . 衛生微生物技術協議会第37回研究会 . 7月22日、2016年、広島市 (学会でないが本研究に関連するため記載) .
13. 花岡希、木下一美、砂川富正、大石和徳、藤本嗣人 . 新型アデノウイルス 53、54および 56 型の日本における検出状況および臨床診断 (2000 ~ 2015年) の疫学解析 . 第90回日本感染症学会総会 .

- 学術講演 . 4 月 15 日、2016 年、仙台市 .
14. 高橋健一郎、花岡希、田村まり子、志田洋子、安田菜穂子、渡邊日出海、鈴木葉子、藤本嗣人、杉原茂孝 . アデノウイルス咽頭扁桃炎の迅速検査による後方視的検討 . 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演 . 4 月 16 日、2016 年、仙台市 .
15. Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima. A variety of virus commonly causing diarrhea detected in untreated sewage. The 64th annual meeting of the Japanese Society of Virology. October 25th, 2016, Sapporo city.
16. 中村晴奈、落合仁、花岡希、藤本嗣人、長尾みづほ、菅 秀、谷口清州、伊藤正寛 . アデノウイルス感染における血清サイトカインの特徴 . 第 48 回日本小児感染症学会総会・学術集会 . 11 月 19 日、2016 年、岡山市 .
17. 金子明依、高梨さやか、Thongprachum Aksara、井上茉南、花岡希、藤本嗣人、沖津祥子、早川智、水口雅、牛島廣治 . ロタウイルスワクチン株に起因する急性胃腸炎の実態調査 . 第 48 回日本小児感染症学会総会・学術集会 . 11 月 20 日、2016 年、岡山市 .

該当なし

3 . その他

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

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

平成28-30年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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

薬剤耐性菌病原体サーベイランス体制の整備と活用、および精度管理

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
研究協力者	松井真理	国立感染症研究所	薬剤耐性研究センター
	菅井基行	国立感染症研究所	薬剤耐性研究センター
	川上千晶	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	柿本健作	国立感染症研究所	感染症疫学センター

研究要旨

平成23（2011）年に発出された医政局指導課長通知で、地方衛生研究所（地研）における薬剤耐性菌検査体制の充実強化が明記された。これを受け、各地研でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の検査が開始され、平成28（2016）年には約6割の施設で実施可能となった。平成29（2017）年3月には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、病原体サーベイランスが開始した。通知に記載された検査項目をNESIDの病原体サーベイランスシステムに登録するための形式の制定、登録のための支援ツールの作成と配布を経て実質的なCRE病原体サーベイランス開始された。平成29年（2017年）は届出症例(n=1660)の約半数にあたる865件の検査結果が登録され、その集計解析結果を公開された。また、サーベイランデータ活用のため、感染症疫学センターと薬剤耐性研究センターが共同してリスク評価を定期的に行い、薬剤耐性菌の地域的流行等を迅速に把握する手法についても検討を行った。

A．研究目的

平成23（2011）年に発出された医政局指導課長通知において、地方衛生研究所（地研）においても薬剤耐性菌などの院内感染起因微生物を検査できるよう、体制を充実強化することが明記された。さらに2010年代以降、世界的なカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の急速な蔓延により、薬剤耐性菌対策の公衆衛生学的対応面からも地研における薬剤耐性菌検査体制の整備が急務となった。

平成26（2014）年9月よりCRE感染症

が感染症法に基づく5類全数把握対象疾患となり、またそれまで定点把握だった薬剤耐性アシネトバクター（MDRA）感染症が全数把握疾患に変更となり、発症者の情報のみであるが、世界的に問題となっている薬剤耐性菌の動向を把握するための基本的な行政の枠組みが整備された。

薬剤耐性菌感染症の動向を把握し、評価と対策を実施するには、発症者の臨床情報に加え、分離された菌の薬剤感受性や薬剤耐性遺伝子の有無といった病原体の試験解析結果が必要不可欠である。全国の地研が

これらの必要な試験検査を同水準で実施できる体制を整備し、それらのデータを薬剤耐性菌対策のために収集活用すべく、平成 27 (2015) 年の衛生微生物協議会をもって薬剤耐性菌レファレンスセンターが設立された。

本研究では、CRE 病原体サーベイランス体制確立を目的とし、すべての地研で実施可能な試験検査項目および報告方法の検討を行った。また、これらの検討をもとに、平成 29 (2017) 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」が発出された。病原体サーベイランスが開始後は、サーベイランスデータの公衆衛生学的活用方法および精度管理手法に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 試験検査項目の検討

全国の地研で実施可能な薬剤耐性菌の検査項目を把握するため、平成 28 (2016) 年に全国の地研に対し薬剤耐性菌検査の実施状況および必要な研修に関するアンケート調査を実施した。

2. 報告体制の整備

平成 29 年 3 月の結核感染症課長通知では、CRE の検査結果は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、厚生労働省に報告することとなっている。しかし、現行の病原体検出情報システムには CRE の検査結果を入力するシステムは装備されていないため、システム内の自由入力可能な項目を活用して集計可能な形式での報告方法を検討した。

3. 精度管理手法

サーベイランスデータの精度およびデータの可用性を担保するため、以下の項目を対象として登録した自治体に内容の確認も

しくは修正を依頼した。

1. 異なる入力形式
 2. 原則実施すべき検査項目の未実施
 3. 遺伝子検査と表現型検査の不一致
 4. 海外型カルバペネマーゼ遺伝子陽性例で、海外渡航歴無しまたは不明のもの
なお、4. については、誤入力ではなかった場合、PCR 産物のシーケンス解析による確認を依頼し、地研において実施が困難な場合は国立感染症研究所薬剤耐性研究センター (AMR-RC) において実施した
- ### 4. サーベイランスデータの活用

2017 年の CRE 菌株の病原体サーベイランスデータについては、カルバペネマーゼ遺伝子の保有状況を中心に集計し公開した。また、サーベイランスであることから、継続的かつ迅速にそのデータを確認し対策に活用していく必要がある。NESID 患者報告のデータについては、感染研感染症疫学センター (IDSC) が毎週確認し、患者報告が同一地域や同一病院において集積してないか等のリスク評価を行い、必要に応じては保健所等の自治体に対応の有無を確認している。病原体サーベイランスのデータも同様のリスク評価を行うため、定期的 (週 1 回) に IDSC と AMR-RC とでテレカンファレンスを実施した。

C. 研究結果

1. 試験検査項目の検討

アンケートは依頼した 81 施設のうち 80 施設より回答が得られた。何らかの薬剤耐性菌検査を実施していたのは 47 施設 (59%) であった。実施対象の薬剤耐性菌は CRE が最も多く次いでバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) であった。

CRE の検査で重要となる薬剤耐性遺伝子 (カルバペネマーゼ遺伝子) の PCR 法に

よる検出はほぼ 6 割の施設で実施可能であった。CRE の表現型の検査として重要な抗菌薬含有ディスクと阻害剤を用いたラクタマーゼ鑑別試験を実施可能と回答した施設はやや少なく、試験頻度の高いメタロ-ラクタマーゼについては 44 施設 (55%)、国内では稀な KPC 型カルバペネマーゼについては 23 施設 (29%) にとどまっていた。当時臨床現場などに導入されて間もない CarbaNP は 11 施設 (14%) が実施可能と回答した。

レファレンスセンターへの要望としては 6-7 割の施設が感染研での継続的な研修の開催、検出法マニュアルの整備、陽性コントロールの配布を希望していた。この中で最も多かったのが陽性コントロール菌株の配布で 58 施設 (73%) であった。

2. 報告体制の整備

NESID 病原体検出情報システムには、テキストの自由入力可能な領域として、型別結果の中の「特記すべき生化学的性状等」があった。この項目には、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は、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」を必須とした。「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限定した。

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?

なお陽性 (+) 陰性 (-) のほか、表現型判定では判定が困難であった場合 (?)、未実施の場合 (*) を入力することとした。IMP

などのカルバペネマーゼ遺伝子については数字を入力することでシークエンスによる遺伝子型も報告可能とした。

また各試験結果をプルダウンで選択することで入力形式通りのテキストが作成されるエクセルファイルを作成し、配布した。

3. 精度管理手法

平成 29 (2017) 年の NESID システムに報告された検体のうち、精度管理対象となった検体数と自治体数を表 1 に示す。

表 1 2017 年 CRE 病原体サーベイランス精度管理対象検体数

	検体数 (自治体数)
入力形式の誤り	137 (22)
原則実施すべき検査項目の未実施	71 (9)
遺伝子検査と表現型検査の不一致	11 (7)
渡航歴の無い海外型カルバペネマーゼ遺伝子陽性例	10 (6)

サーベイランス開始年であったため、入力形式の誤りに対する修正依頼が最も多かった。それらは 2018 年 (平成 30 年) を通じて著減した。必須検査の未実施 (9 自治体 71 件) については、予算の関係で検査項目を限定しているなど、特定の自治体に偏る傾向があった。海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出例についてはシークエンスで確定されていた例がほとんどであったが 2 自治体の 2 検体では、シークエンス解析から PCR による非特異バンドであったことが確認されたため、修正対応した。

4. サーベイランスデータの活用

2017 年の 865 名由来 865 株の検査結果について集計解析を行い病原微生物情報 (IASR) 2018 年 9 月号で公表した。病原体サーベイランスとして報告されたのは同期間の患者報告数 (1660 名) の約半数であ

ったが、分離検体、菌種の内訳は患者報告とほぼ同様であり一定の代表性は担保できていると考えられた。対象 865 株のうち、少なくとも一つのカルバペネマーゼ遺伝子が検出された株の割合は 239 株（28%）であり、うち 227 株(95%)が IMP 型であった。

CRE 菌株における IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の割合については地域差があり、全国が 26%であるのに対し、近畿ブロックは 163 株中 66 株（40%）と高く、一方で北海道東北新潟ブロックは 91 株中 16 株（18%）、東海北陸ブロックは 45 株中 6 株（13%）と低かった。しかしブロックによっては報告率が低く、地域の特性が十分にデータに反映されていない可能性が危惧された。海外型カルバペネマーゼ遺伝子は 13 株より検出されうち 3 自治体 8 株は分離元患者に海外渡航歴のない国内例と考えられた。8 株のうち 5 株が NDM 型であり、残り 3 株は KPC 型であった。

サーベイランスとしては年単位の集計結果公表だけではなく、より迅速に報告内容を確認し対策に活用する必要がある。そのため、病原体情報システムに報告された CRE の結果は毎週 AMR-RC においてその内容を確認し、精度管理の問い合わせおよび集積の有無を確認することとした。また NESID 患者報告のデータについては、以前より IDSC が CRE 以外薬剤耐性菌も含め、特定の地域や医療機関に集積が見られないかを確認している。両センターの確認結果を統合しサーベイランスデータをより有効活用できるよう、2018 年 10 月 10 日より毎週 IDSC と AMR-RC との間でテレカンファレンスを実施することとし、平成 30 年度中は計 22 回を開催した。このカンファレンスではサーベイランスの結果だけではなく AMR-RC は地研、IDSC は保健所などから

寄せられたアウトブレイク事例の相談などについても情報共有した。

2018 年 10 月 30 日から 12 月 25 日までの 8 回のテレカンファレンスでは IDSC が 33 件、AMR-RC が 11 件の計 44 件の事例を取り上げておりうち 35 件（80%）がサーベイランスデータに基づく探知であった。44 件のうち、リスク評価後に自治体に対応を確認した事例は 26 件（60%）であった。

D. 考察

平成 23（2011）年の医政局指導課長通知において明記された地研における薬剤耐性菌の検査体制の充実強化は、平成 27（2015）年の薬剤耐性菌レファレンスセンターの設置、平成 29（2017）の結核感染症課長通知に基づく CRE 病原体サーベイランスの開始によりおおむね達成したと考えられる。

薬剤耐性菌検査の主なものは PCR 法による耐性遺伝子の検出と、抗菌薬含有ディスクおよび阻害剤を用いた β -ラクタマーゼ産生確認試験である。PCR 法による遺伝子検査は、他の病原体検査でも行われているため、すべての地研で実施可能であった。また β -ラクタマーゼ産生確認試験も、ディスク拡散法による薬剤感受性試験が一般的な細菌の検査で実施されてきたことや、試薬が安価であり機器等を必要としないことから、導入が比較的容易な検査法である。このことが、病原体サーベイランス開始前、すなわち行政的な枠組みが整備される前のアンケート調査においてすでに約 6 割の施設で薬剤耐性菌の検査が実施可能となっていた要因であると思われる。

CRE 病原体サーベイランスの開始にあたり問題となったのは結果の報告方法である。NESID の病原体検出情報システムは定期的にシステムの更新がなされているが、

その内容は数年前より検討されるため、新たにサーベイランスに追加となった病原体への対応は困難である。そのため、暫定的に自由入力可能な項目を活用し運用することとした。

入力形式を厳密に定義し、そのための入力支援ツールを配布することにより、当面のサーベイランス実施は可能となった。しかし、エクセルからコピーペーストする必要があることや、入力段階で入力形式のエラーを確認できないなど非効率的である。次のシステム更新時には CRE 病原体サーベイランスの入力項目を含めることが安定的にサーベイランスを継続するためには必要不可欠であると考えられた。

CRE 病原体サーベイランスデータは 2017 年から開始され、その最初の集計結果を IASR に公表することができた。しかし、CRE 患者報告の件数と比較すると必ずしもすべての届出患者の病原体が検査はされているとは限らない。サーベイランス開始年の報告数が患者報告の約半数にとどまったのは地研における予算や人員配置、病原体確保のため保健所や医療機関への周知といった問題があったため許容せざるを得ないと思われる。しかし、今後は全数報告である患者報告とほぼ同数の病原体サーベイランス報告件数が全国の自治体から偏りなくなることが、サーベイランスの代表性担保のうえで重要である。患者報告数と比較して病原体サーベイランスの報告件数が低い自治体に対しては今後その要因を調査し、改善を試みる必要があると考えられた。

患者報告は発症後 7 日以内の届け出が義務付けられている一方で、病原体サーベイランスについては報告期限に関する明確な取り決めなどはない。地研によっては効率

化のため、一定の検体数が集まってからまとめて検査を実施することもありうる。しかしサーベイランスである以上、本来は患者報告の都度、検査を実施し報告するのが望ましい。CRE 検査結果が患者報告の 1 か月後、遅くとも 3 か月以内には報告されることが、サーベイランスデータを実際の対策に活用するうえで必要と考えられる。今後各自治体に迅速な検査の実施とその報告を依頼する一方で、報告されたデータについては AMR-RC において随時確認し、必要に応じて問い合わせを行うことでそれを促していくことが必要と思われる。

CRE 検査の精度管理体制とし、現在は遺伝子検査に加えて表現型検査も実施し、その整合性を確認できるようになっている。また両方の検査結果が NESID に報告されていることから、AMR-RC においても再度確認することで精度を担保している。検査実施者が整合性を判断するためには薬剤耐性機序に関する基本的な知識が必要である。地研では異動などにより検査担当者が定期的に変更となることがあるため、感染研における継続的な研修の実施は今後も必要不可欠と思われる。一方、表現型検査では鑑別が不可能なカルバペネマーゼ型も存在するため、検査精度を評価・確認するためには実際の菌株を用いた精度管理事業の実施も必要である。

E . 結論

地研における基本的な薬剤耐性菌検査体制が整備され、感染症発生動向調査にもとづく CRE 病原体サーベイランスが開始された。サーベイランス情報はその集計結果が公表され還元されるとともに、個々の報告についてもリスク評価を行い対策に活用した。今後はさらなるサーベイランスデー

夕の有効活用と精度管理体制の向上に向け、
枠組みの整備と運用方法の検討が必要と思
われる。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

論文発表

1．Kubota H, Uwamino Y, Matsui M, Sekizuka T, Suzuki Y, Okuno R, Uchitani Y, Ariyoshi T, Aoki W, Suzuki S, Kuroda M, Shinkai T, Yokoyama K, S adamasu K, Funakoshi T, Murata M, Hasegawa N, Iwata S.FRI-4 carbapene mase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolated in Tokyo, Japan. *J Anti microb Chemother.*73(11),2969-2972. 2018

2．国立感染症研究所薬剤耐性研究センター,同 感染症疫学センター, 全国地方衛生研究所. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE)病原体サーベイランス, 2017年. *IASR Vol. 39 p162-163*: 2018年9月号.

3．松井真理、鈴木里和、菅井基行. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス報告状況. *IASR Vol. 40 p19-20*: 2019年2月号.

4．柿本健作、川上千晶、山岸拓也、島田智恵、砂川富正、松井玉乃、大石和徳、松井真理、鈴木里和、菅井基行.カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症サーベイランス情報の活用. *IASR .Vol. 40 p20-21*: 2019年2月号

学会発表

1．鈴木里和、松井真理、柴山恵吾．地方衛生研究所を対象とした耐性菌研修の実施状況．第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会．2017年1月20-22日．長崎

2．綿引正則、松本裕子、鈴木匡弘、河原隆二、増田加奈子、福田千恵美、四宮博人、調恒明、鈴木里和、松井真理、柴山恵吾．地方衛生研究所における薬剤耐性菌レファレンスセンターの発足とその役割と現状．

第28回日本臨床微生物学会総会・学術集会．
2017年1月20-22日．長崎

3．松井真理、川上千晶、鈴木里和、松井珠乃、大石和徳、菅井基行. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス、2017年. 第47回薬剤耐性菌研究会.11月16日 17日.2019年、長野市.

4．川上千晶、松井真理、鈴木里和、松井珠乃、大石和徳、四宮博人、調恒明、菅井基行. 感染症発生動向調査と病原体検出情報システム報告に基づくカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症の疫学.第93回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月4日-6日.2019年、名古屋

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

平成 28-30 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

「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」

分担研究報告書

カンピロバクター・レファレンス

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本章治	国立感染症研究所
研究協力者	今野貴之	秋田県健康環境センター
研究協力者	赤瀬悟	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山田和弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	坂田淳子	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	尾羽根紀子	山口県環境保健センター
研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所

研究要旨：カンピロバクターによる感染症の発生動向の探知に資するため、6 レファレンスセンターの協力を得て、1) 散发事例由来株を主な対象に薬剤耐性プロファイル及び Penner 血清型別を調査した。2) また、Penner-PCR 法による型別試験を行い、Penner 血清型別との整合性について検討を行った。3) 検査法についてアンケート調査を行い、全国統一的な検査方法を進めるための課題について考察した。1) については、平成 29 年度～30 年度にかけて収集された *C. jejuni* 計 292 株について薬剤感受性試験を実施したところ、各薬剤に対する耐性率は、シプロフロキサシンが 49% (N=142)、テトラサイクリンが 32% (N=94)、エリスロマイシンが 2% (N=7) であった。Penner 血清型別試験では、70.5% (129/183) の菌株が型別不能となり、型別可能株では D 群が最も多かった。2) については、Penner 血清型別法による低い型別率の向上に資するため、同形質を遺伝学的に型別する Penner-PCR 法により Penner 血清型別不能株を対象に実施したところ、120 株中 113 株 (94.1%) が型別された。また、Penner 血清型別可能であった 142 株については 136 株 (95.8%) が一致した型に分類され、高い同等性が示された。今後 Penner-PCR 法における陽性対照を確保し同法の普及を進めた上で、国際動向を踏まえた型別法の平準化が必要となるものと思われる。3) については、レファレンスセンターを通じて全国の試験検査機関にカンピロバクター検査法に関するアンケート調査を実施し、今後平準化すべき課題の抽出を行うことができた。

A. 研究目的

主として食品が媒介する細菌性感染症のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによるものは最も高頻度に発生している。本分担研究では、6 レファレンスセンターの協力の下、主として感染症病原体監視並びに健康危機対

応の観点から、カンピロバクター感染症の発生動向、並びに原因物質の危害性とその検査法に関する問題点と改善措置について検討を行うことを目的として、検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 活動体制

本分担研究では、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所を含む、全国6地方衛生研究所により構成されるカンピロバクター・レファレンスセンターの活動成績をまとめ、報告することとした。

2. 薬剤感受性試験及び Penner 血清型別

1) 薬剤感受性試験

カンピロバクター・ジェジュニ散発事例由来株を対象として、平成29年度には、これまでのレファレンスセンター活動において実施されてきた方法に基づき、試験を実施した。平成30年度には、EU-CAST法に準拠したディスク拡散法を用いて統一的な試験方法とした。その概要は以下のとおりである。

試薬及び器具・器材等

- ①薬剤感受性用寒天平板：5%馬脱繊維血及び20mg/mL β -NAD 加 MH-F 寒天培地
- ②菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ③薬剤ディスク：BD センシディスク エリスロマイシン (EM)，テトラサイクリン (TC)，シプロフロキサシン (CPFX)
- ④白金線，白金耳
- ⑤滅菌済綿棒
- ⑥滅菌済ピンセット
- ⑦ふ卵器：通常のみ卵器の場合は、市販の微好気用ガスパック等を利用する。微好気環境を維持できるふ卵器も使用可能とする。

操作上の注意について

- ①菌株：前日に供試菌株を非選択分離培地に分離培養し、1種類の菌であることを確認した上で使用する。
- ②試薬は室温に戻してから使用すること。
- ③MH-F 平板は、接種菌の滑走を抑制するため、十分に乾燥させてから使用すること。20-25℃で一夜自然乾燥、または35℃で蓋を開けた状

態で15分乾燥を目安とする。

試薬等の調整方法

- ① β -NAD：滅菌蒸留水を用いて終濃度20mg/mLに調整し、0.2 μ m径フィルターを用いて濾過滅菌したものをストック溶液とする。長期保存は、-20℃で凍結するが、再凍結を繰り返さないこと。
- ②MH-F 平板：MH 寒天培地を指示書に従い、計量後、蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌する。約42~45℃に冷却後、培地1Lに対し50mLの馬脱繊維血と1mLの β -NADストック溶液(上述)を加え、速やかに混和させる。シャーレに厚さ4±0.5mmとなるよう(90mm径の場合には約25mL)、混合培地溶液を平らな場所で無菌的に注ぎ入れ、静置して固化させる。保存する場合には、冷蔵保存して差し支えない。なお、保存期間は各所が定める規則に準じること。

測定(操作)方法

- ①接種菌液の調整：MH 寒天平板に分離した菌株(37±1℃・24~48時間または42℃・24時間培養)を滅菌生理食塩水またはMHブロスに懸濁し、McFarland 0.5に調整する。
- ②接種・培養
調整菌液に滅菌綿棒を浸し、余液を試験管壁で取り除く。ただし、本菌は乾燥に弱いため、固く絞り過ぎないこと。
- ③MH-F 平板に塗抹する。平板を約60°ずつ回転させた位置から、3回塗抹する。綿棒に菌液をつけるのは最初に行った1回でよい。
- ④滅菌ピンセットを用いてディスクを置く。寒天培地に密着させるため、ピンセットでディスクを適度に押さえる。42℃(24時間)で微好気培養する。
注意：上記の操作は、出来るだけ迅速に行う。特に、菌を塗抹した寒天平板培地を長時間大気中に置かないようにし、15分以内を目安とする。

判定

培養後、シャーレの蓋を取って、約 30 cm離れた位置から目視観察し、ディスク周囲に形成された阻止円直径を測定・記録する。耐性・感受性の判定基準は以下のとおりである。

薬剤	EUCAST	
	耐性 (R) ($<$ mm)	感受性 (S) (\geq mm)
EM	<i>C. jejuni</i> 20, <i>C. coli</i> 24	
CPF	26	
TC	30	

2) Penner 血清型別

上記の分離株を対象として、カンピロバクターLA「生研」及びカンピロバクター免疫血清を指示書に従って用い、Penner 血清型別を行った。

3. Penner-PCR 法

Poly らの報告 (PLoS One. 2015; 10(12): e0144349.) に従い、多糖莢膜 (CPS) 遺伝子領域を標的とするマルチプレックス PCR 法により、平成 29 年度には血清型別判定不能株を、平成 30 年度には血清型別判定可能株をそれぞれ対象として、PCR 型別法の成績を評価した。なお、同法の陽性対照 DNA については全てを調整可能な状況にはないため、限定的な配布とした。

4. アンケート調査

各レファレンスセンターを通じ、各ブロックの試験検査機関を対象に検査法に関するアンケート調査への協力を求め、その結果を取り纏めた。

C. 結果

1. *C. jejuni* 株の薬剤感受性に関する動向

平成 29~30 年度に検出された *C. jejuni* 計 292 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、シプロフロキサシン耐性は 142 株 (48.6%)、テトラサイクリン耐性は 94 株 (32.2%) と高い頻度で認められた (表 1)。エリスロマイシン耐性は 7 株 (2.4%) であった (表 1)。また、ナリジクス酸については平成 29 年度に収集された計 170 株のみを対象としたが、うち 69 株 (40.6%) と同様に高い耐性率を認めた (表 1)。

なお、*C. coli* 株については 10 株のみが対象として確保され、薬剤感受性についてはエリスロマイシン耐性が 4 株 (40%)、テトラサイクリン耐性またはシプロフロキサシン耐性がそれぞれ 5 株 (50%) 認められた。

2. Penner 血清型別

平成 29 年度に収集された *C. jejuni* 計 183 株について Penner 血清型別試験を行ったところ、型別不能株は 129 株と約 70.5%を占めた (表 2)。型別された菌株の内訳としては、D 群が 15 株 (8.2%) と最も多く、A 群 (5 株、2.7%)、B 群・C 群・J 群 (各 4 株、2.2%) がこれに続いた (表 2)。

平成 30 年度には Penner 血清型別が可能となった計 142 株のみの構成について報告を求めた。全体の傾向としては、前年度と同じく D 群が最も高い占有率を示し、30 株 (21.1%) であった (表 2)。また、これに続く型としては O 群 (22 株、15.5%)、C 群 (14 株、9.9%)、B 群 (13 株、9.2%)、F 群 (12 株、8.5%) があげられた (表 2)。

3. Penner-PCR 法による遺伝子型別

平成 29 年度に実施した Penner 血清型別試験において型別不能と判定された 120 株について、Penner-PCR 法による遺伝子型別を行ったところ、113 株 (94.1%) については型別化

が可能であった（表 3）。平成 30 年度には、Penner 血清型別が可能であった計 142 株を対象に同遺伝子型別法を実施し、結果の同等性を評価したところ、136 株が同一の型別結果を示し、一致率は 95.8%であった（表 3）。二法間で不一致となった菌株の血清型は、A 群、D 群、F 群、I 群であった（表 3）。

4. 検査法に関するアンケート調査

臨床検査については、項目の別に最大で 50 機関から有効回答が得られた。年間検体数について、100 検体以上の検査実績があるとした機関は 0~100 検体とする機関と同数であり、多検体を処理する機関が多い状況が示された。検体からのカンピロバクター検出にあたっては、増菌培養を行うとする機関が全体の 80%を占め、このうち 93%の機関ではプレストンが増菌培地として用いられていた。その後の選択分離培地については、mCCDA、CCDA(SEL)等が 6 割を占めたが、バツラーまたはスキロー培地を使用する施設も 2 割存在した。このほか、分離株の保存については、スキムミルクを使用する機関が最も多く（約 42%、18/43）、グリセロールを使用する機関が約 35%（15/43）、マイクロバンクを使用する機関が約 23%（10/43）との回答が得られた。

食品検査については、項目の別に最大 47 機関から有効回答が得られた。年間検体数について、100 検体以上の検査実績があるとした機関は 46 機関中 18 機関（約 39%）であり、残り 28 機関（約 61%）では 0~100 検体の検査実績であった。受入時の検体の状態としては冷蔵が多いとする機関が 45 機関中 36 機関であった。増菌培養にあたっては、プレストン培地を用いるとする機関が臨床検査と同様に最も多く（約 81%、39/48）、他の培地を用いる機関の割合は相対的に少ない状況にあった。一方で、増菌培養を実施しないとする機関も含まれた

（2 機関）。食品等からの対象菌検出にあたっての迅速簡便法の利用実績については、6 機関から回答が得られ、リアルタイム PCR 法、PCR 法、イムノクロマト法、miniVIDAS の利用が挙げられた。

D. 考察

C. jejuni の薬剤感受性については、これまでと同様にフルオロキノロン耐性率が高い状況にあること、テトラサイクリン耐性率は徐々に上昇傾向にあることが明らかとなった。国際的に AMR 対策が求められる状況の中、本病原体の成績に関する収集・報告体制を維持管理する意味において、本研究班の役割は今後も継続発展的に大きなものと位置付けられよう。また、*C. coli* については、試験方法のバイアスを受けて、確保され難い状況となっているとも予想されるため、調査対象とする上では試験段階でのスクリーニングの導入も一手と目される。

同様に、薬剤感受性試験法についても統一化が今後求められる課題といえる。これに関連して、平成 30 年度にはディスク拡散法の判定基準として阻止円直径が明示される EU-CAST 法を試行的に採用し、その評価と課題等について意見を求めた。同法の利点は判定基準の明確性が複数のセンターから意見として挙げられた一方、欠点としては β -NAD の添加が労力・費用面から挙げられた。

血清型別の動向としては、型別不能株がおおよそ 7 割を占め、同法の改善が現行の体制を大きく変えないという前提の下では急務の課題であった。遺伝子検査法については血清型別成績と高い一致率を認めたことから、同法は選択肢の一つとなる可能性が示唆されたと考えられる。一方で、カンピロバクター菌株の分類には詳細な型別化が有効とされ、そもそも血清型別は *C. jejuni*/*C. coli* の同一性判定やモニタリング・サーベイランスには適さないとする国際的

認識についても踏まえる必要がある。また、Penner 血清型及び同 PCR 法における標的分子（遺伝子）は菌体表層のギランバレー症候群やミラーフィッシャー症候群の誘発分子と目される多糖構造体（LOS）であり、LOS 型別法は別途開発評価されている状況にある。従って、LOS 型別法と Penner 血清型・遺伝子型別型との互換性を今後検討することは、前者の使用目的用途を明確化する上で有益な知見が得られると期待される。

検査法に関するアンケート調査においては、臨床・食品検体の別を問わず、Preston-mCCDA を用いた増菌培養が最も多く採用されており、この傾向は国際動向に合致したものと見える。過去には、スキロー培地やボルトン培地が好まれて用いられた時期もあったが、現在、培地は夾雑菌や対象菌の多少により選択すべきものと整理されている。この点では、対象菌が少ないことの多い食品検体からの検出効率の向上が求められる。実際に国際標準化機構

（ISO）では対象食品の性質（対象菌と夾雑菌の多少、または食品マトリックスが鶏肉か否か）により 3 種の方法を選択できるよう、2017 年に改訂が行われ、EU では鶏肉のカンピロバクターに対して同法を用いた規格基準値が設定され、2018 年 1 月より運用されている。原因食品が殆ど特定されていないわが国におけるカンピロバクター食中毒の発生動向を踏まえると、今後適切な検査方法について国内においても検証をふまえた改訂を検討する必要があると思われる。また、本年度に入り、複数の迅速簡易法が ISO 法等との同等性が国際的な第三者認証機関（AFNOR、AOAC 等）により確認され、国内にも上市されつつある。こうした手法の有効利用についても評価を行い、その結果を検査機関に還元することも有用と思われる。

E. 結論

C. jejuni はシプロフロキサシン、ナリジクス酸、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高く、これらの動向を引き続きモニタリングする必要がある。分離菌株の型別・分類法として、以前より国内で汎用される Penner 血清型別法の型別率低下は顕著であり、Penner-PCR 法によりこれらの多くを補える可能性が示唆された。一方で国際的には血清型別法そのものが低い識別能であるため、モニタリングやサーベイランスへの適用は望ましくないとする考え方が主流となっており、今後、国内での分離株の特性を探知するための手法については慎重に検討を進める必要がある。

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 平成 29～30 年度の *C. jejuni* 分離株における薬剤耐性状況

薬剤	平成29年度		平成30年度		平成29～30年度	
	耐性株数	耐性率%	耐性株数	耐性率%	耐性株数	耐性率%
シプロフロキサシン	73	42.9	69	56.6	142	48.6
テトラサイクリン	57	33.5	37	30.3	94	32.2
ナリジクス酸	69	40.6	NT	-	69	-
エリスロマイシン	2	1.2	5	4.1	7	2.4
感受性	80	47.1	48	39.3	128	43.8
供試株数	170	-	122	-	292	-

表 2. 平成 29～30 年度の *C. jejuni* 分離株における Penner 血清型別

血清型	平成29年度	平成30年度
A 群	5	7
B 群	4	13
C 群	4	14
D 群	15	30
E 群	0	1
F 群	3	12
G 群	1	5
I 群	1	4
J 群	4	2
K 群	2	6
L 群	3	4
N 群	0	4
O 群	1	22
P 群	2	2
R 群	2	6
S 群	0	0
U 群	0	1
V 群	0	0
Y 群	4	7
Z 群	3	0
Z 2 群	0	0
Z 4 群	0	0
Z 5 群	0	0
Z 6 群	0	2
Z 7 群	0	0
型別不能	129	-
計	183	142

*平成 30 年度は、型別不能株数は計上せず。

表 3. Penner-PCR 法の Penner 血清型別との一致性

血清型	菌株数	Penner-PCR法*		
		一致株数	不一致株数	一致率 (%)
A群	7	6	1	85.7
B群	13	13	0	100
C群	14	14	0	100
D群	30	28	2	93.3
E群	1	1	0	100
F群	12	11	1	91.7
G群	5	5	0	100
I群	4	2	2	50
J群	2	2	0	100
K群	6	6	0	100
L群	4	4	0	100
N群	4	4	0	100
O群	22	22	0	100
P群	2	2	0	100
R群	6	6	0	100
S群	0	0	0	-
U群	1	1	0	100
V群	0	0	0	-
Y群	7	7	0	100
Z群	0	0	0	-
Z 2 群	0	0	0	-
Z 4 群	0	0	0	-
Z 5 群	0	0	0	-
Z 6 群	2	2	0	100
Z 7 群	0	0	0	-
計	142	136	6	95.8

図 1.血清型別不能株に対する Penner-PCR 法の型別判定性評価

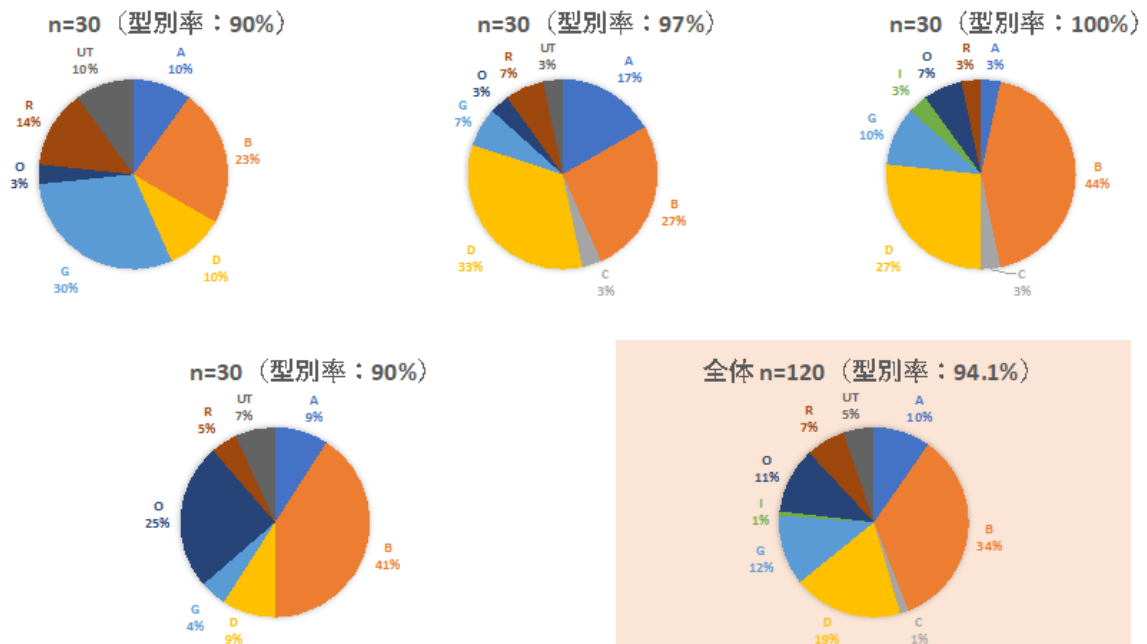
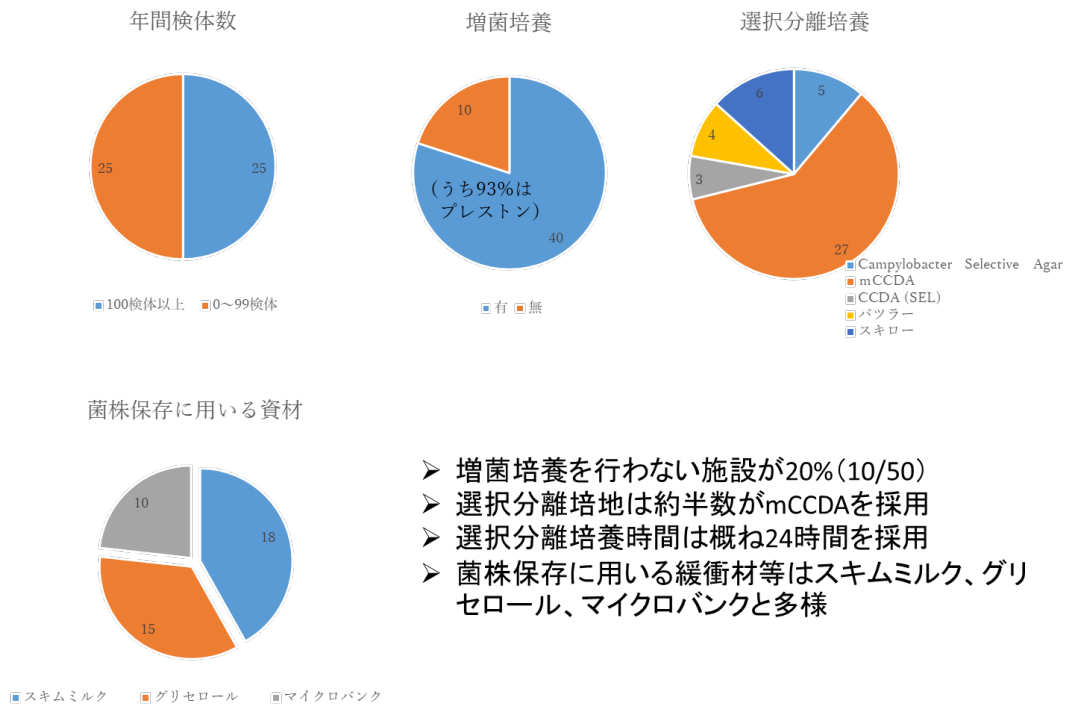
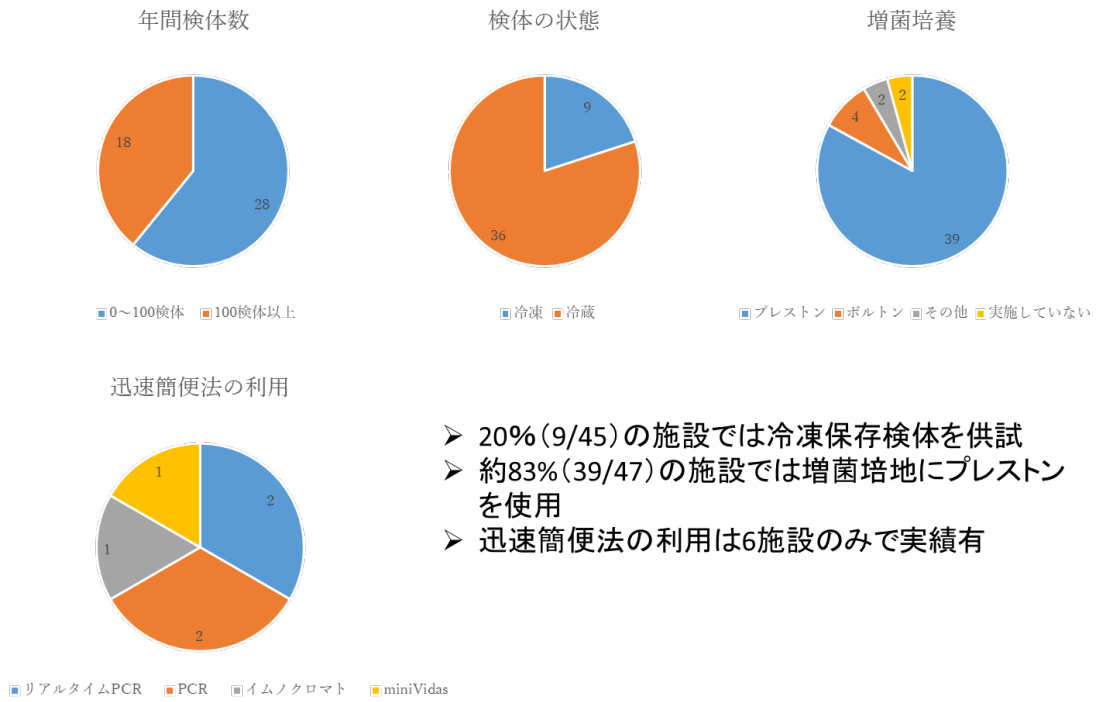


図 2. 検査法に関するアンケート調査（臨床検体）



- 増菌培養を行わない施設が20% (10/50)
- 選択分離培地は約半数がmCCDAを採用
- 選択分離培養時間は概ね24時間を採用
- 菌株保存に用いる緩衝材等はスキムミルク、グリセロール、マイクロバンクと多様

図 3. 検査法に関するアンケート調査（食品検体）



研究成果の刊行に関する一覧表

平成28年度
書籍

なし

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Doan YH, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon N, Katayama K.	Genetic analysis of human rotavirus C: The appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries.	Infect Genet Evol.	41	160-73.	2016
Suzuki Y, Doan YH, Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K.	Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan.	Microbiol Immunol.	60	418-26.	2016
Okamoto K, Mori Y, Komagome R, Nagano H, Miyoshi M, Okano M, Aoki Y, Ogura A, Hotta C, Ogawa T, Saikusa M, Kodama H, Yasui Y, Minagawa H, Kurata T, Kanbayashi D, Kase T, Murata S, Shirabe K, Hamasaki M, Kato T, Otsuki N, Sakata M, Komase K, Takeda M.	Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens.	J Clin Virol.	80	98-101	2016
Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nagasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H.	Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II.	Sci Rep.	6	29400	2016
調 恒明	地方衛生研究所によるエンテロウイルス D68 感染症流行の把握	臨床とウイルス	44	156-159	2016
松井真理、調 恒明	AMR対策における国立感染症研究所と地方衛生研究所の役割	公衆衛生情報	46	10-11	2017

Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R, Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Aoto M, Ohnishi M.	Spontaneous mutations in <i>Streptococcus pyogenes</i> isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence.	Sci Rep	6	28761	2016
Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee KI, Ohnishi M, Kura F.	Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by <i>Legionella pneumophila</i> Serogroups 1 and 13.	Emerg Infect Dis	23	349-351	2017
Morishima Y, Tomaru Y, Fukumoto S, Sugiyama H, Yamasaki H, Hashimoto C & Harada K.	Canine echinococcosis due to <i>Echinococcus multilocularis</i> : a second notifiable case from mainland Japan.	Jpn J Inf Dis.	69	448-449	2016
Tsuboi, M., Kutsuna, S., Kato, Y., Nakayama, E., Shibasaki, K., <u>Tajima, S.</u> , Takasaki, T., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N.	Autochthonous Chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba.	Emerging Infectious Diseases	22	1683-1685	2016
Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, <u>Tajima S</u> , Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N.	Chikungunya fever in traveler from Angola to Japan, 2016.	Emerging Infectious Diseases	23	156-158	2016
Satoh M, Akashi S, Ogawa M, Wakeyama T, Ogawa H, Fukuma A, Taniguchi S, Tani H, Kurosu T, Fukushima S, Shimojima M, <u>Ando S</u> , Saijo M	Retrospective survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome in patients with suspected rickettsiosis in Japan	J. Infect. Chemother.	23	34-50	2017
佐藤寛子, 柴田ちひろ, 秋野和華子, 斎藤博之, 齊藤志保子, 門馬直太, 東海林彰, 高橋守, 藤田博己, 角坂照貴, 高田伸弘, 川端寛樹, 安藤秀二	秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息調査 (2011年~2014年)	衛生動物学会誌	67	167-175	2016
濱崎光宏, 吉田弘	エンテロウイルスのウイルス学的検査診断	小児科	57	649-956	2016
板持雅恵, 滝澤剛則, 伊東愛梨, 三浦美穂, 伊藤雅, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 後藤明子, 島あかり, 下野尚悦, 高橋雅輝, 筒井理華, 中田恵子, 中野守, 西澤佳奈子, 濱崎光宏, 吉富秀亮, 堀田千恵美, 松岡保博, 三好龍也, 吉田弘	平成 27 年度ポリオ環境水サーベイランス (感染症流行予測調査事業および調査研究) にて検出されたエンテロウイルスについて	病原体検出情報	37	208-209	2016

Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y	One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids.	Sci. Rep	6	31474	2016
Do Phuong Loan, Nguyen Minh Hang, Trieu Thi Thanh Van, Thi Mai Duyen, Katsuhiko Komase, Nguyen Tran Hien	Comparison of laboratory methods for measles diagnosis in Northern Vietnam, 2014.	Vietnam Journal of Preventive Medicine.	12(185)	24-9	2016
Seki F, Someya K, Komase K, Takeda M.	A chicken homologue of nectin-4 functions as a measles virus receptor. Vaccine.	Vaccine.	34(1)	7-12	2016
Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M.	TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus.	Sci Rep.	6	29430	2016
Okamoto K, Mori Y, Komagome R, Nagano H, Miyoshi M, Okano M, Aoki Y, Ogura A, Hotta C, Ogawa T, Saikusa M, Kodama H, Yasui Y, Minagawa H, Kurata T, Kanbayashi D, Kase T, Murata S, Shirabe K, Hamasaki M, Kato T, Otsuki N, Sakata M, Komase K, Takeda M.	Evaluation of sensitivity of TaqMan RT-PCR for rubella virus detection in clinical specimens.	J. Clin. Virol.	80	98-101	2016
駒瀬勝啓、竹田誠	インドネシアにおける麻疹の状況、	病原微生物検出情報	37	67-68	2016
駒瀬勝啓	わが国における麻疹対策の現状と課題、検査と技術	検査と技術	44(11)	1046-48	2016
Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K	Significant decrease in pertactin-deficient <i>Bordetella pertussis</i> isolates, Japan	Emrg Infect Dis	23(4)	in press	2017
Kamachi K, Moriuchi T, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K.	Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of <i>Bordetella pertussis</i> infection	J Microbiol Methods	133	20-22	2017
松岡佐織	都道府県別 HIV 感染発生動向	病原微生物検出情報	37	169	2016
花岡希、小長谷昌未、藤本嗣人	日本におけるアデノウイルス病原体サーベイランスの実施状況-2014年-	感染症学雑誌	90 巻 4号	507 ~ 511	2016

Yoshitomi H, Sera N, Gonzalez G, Hanaoka N, Fujimoto T	First isolation of a new type of human adenovirus (genotype 79), species Human mastadenovirus B (B2) from sewage water in Japan.	Journal of Medical Virology	Feb 22. doi: 10.1002/jmv.24798.	Epub ahead of print	2016
花岡希、萬田和志、草刈栄治、伊藤晋、藤本嗣人	郵送検査残渣を用いた尿道炎起因微生物の探索	日本性感染症学会誌	Vol27(1)	69 ~ 73	2016
藤本嗣人、小林正明	咽頭結膜熱に関する現状	健康づくり	460 巻	11	2016
藤本嗣人、小林正明	咽頭結膜熱の予防法・診断法	健康づくり	461 巻	11	2016
藤本嗣人、内尾英一	流行性角結膜炎とその対策	健康づくり	462 巻	11	2016
Hai le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N.	Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles- Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014.	Emerging Infectious Diseases	Vol22(4),	687-90	2016
藤本嗣人	新型アデノウイルスの流行	日本の眼科	87(6)	748 ~ 750	2016

平成29年度
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 舘田一博)	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, Ohnishi 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	化学療法の領 域	33	1635-1643	2017
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.	Japanese Journal of Infectious Diseases	70	586-589	2017
Katanami, Y., Kutsuna S., Tajiniguchi, 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.	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, Zaitsumi 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

平成30年度

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
永宗喜三郎、矢吹彬憲	アメーバとは何か	永宗喜三郎、島野智之、矢吹彬憲	アメーバのはなし	朝倉書店	東京	2018	1-24
永宗喜三郎	食物に潜み「ヒトに害をなす」原生生物	永宗喜三郎、島野智之、矢吹彬憲	アメーバのはなし	朝倉書店	東京	2018	1-24
森 嘉生	風疹	日本臨床ウイルス学会	ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き	春恒社	東京	2018	91-97
森 嘉生	風疹	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	215-219
寺田喜平、森嘉生	風しんワクチン	日本ワクチン学会	ワクチン 基礎から臨床まで	朝倉書店	東京	2018	138-146
蒲地一成、岡田賢司	百日せきワクチン	日本ワクチン学会	ワクチン 基礎から応用まで	朝倉書店	東京	2018	58-68
藤本嗣人	アデノウイルス	日本臨床ウイルス学会	ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き	春恒社	東京	2018	206～211
金子久俊、藤本嗣人	眼科領域感染症 アデノウイルス、ヘルペスウイルス	日本臨床ウイルス学会	ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き	春恒社	東京	2018	291～297
藤本嗣人	ヒトアデノウイルス	日本食品衛生協会	食品衛生検査指針	日本食品衛生協会	東京	2018	711～719
朝倉宏	カンピロバクター	岸本満	Visual 栄養学テキスト「食品衛生学」	中山書店	日本(東京)	2019年1月	45-47

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

Kimura H, Shirabe K, Takeda M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Okayama K, Ryo A, Nagasawa K, Okabe N, Minagawa H, Kozawa K.	The Association Between Documentation of Koplik Spots and Laboratory Diagnosis of Measles and Other Rash Diseases in a National Measles Surveillance Program in Japan.	<i>Front Microbiol.</i>	10	269	2019
Suzuki Y, Doan YH, Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K.	Predicting Directions of Changes in Genotype Proportions Between Norovirus Seasons in Japan.	<i>Front Microbiol.</i>	10	116	2019
Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H.	Dissemination and genetic analysis of the stealthy vanB gene clusters of Enterococcus faecium clinical isolates in Japan.	<i>BMC Microbiol.</i>	18	213	2018
Furuta T, Hasegawa S, Mizutani M, Iwai T, Ohbuchi N, Kawano S, Tashiro N, Uchida M, Hasegawa M, Motoyama M, Sekino T, Nakatsuka K, Ichihara K, Shirabe K, Ohga S.	Burden of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus Infections in Asthmatic Children.	<i>Pediatr Infect Dis J.</i>	37	1107	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.	<i>Front Microbiol.</i>	18	1	2018

Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani JI, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M; Working Group for Legionella in Japan	<i>Legionella pneumophila</i> and other <i>Legionella</i> species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016.	Appl Environ Microbiol	84	e00721-18	2018
Imai T, Matsumura T, Mayer-Lambertz S, Wells CA, Ishikawa E, Butcher SK, Barnett TC, Walker MJ, Imamura A, Ishida H, Ikebe T, Miyamoto T, Ato M, Ohga S, Lepenies B, van Sorge NM, Yamasaki S.	Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A <i>Streptococcus</i> infection.	Proc Natl Acad Sci USA			In press
Yoshizawa S, Matsumura T, Ikebe T, Ichibayashi R, Fukui Y, Satoh T, Tsubota T, Honda M, Ishii Y, Tateda K, Ato M.	Streptococcal toxic shock syndrome caused by β -hemolytic streptococci: clinical features and cytokine and chemokine analyses of 15 cases.	J Infect Chemother.			In press
案浦健	マラリアワクチン開発の現状と展望	日生研たより	64	59-64	2018
Tsuboi, M., Kutsuna, S., Kato, Y., Nakayama, E., Shibasaki, K., Tajima, S., Takasaki, T., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N.	Autochthonous Chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba.	Emerging Infectious Diseases	22	1683-1685	2016
Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, Tajima S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N.	Chikungunya fever in traveler from Angola to Japan, 2016.	Emerging Infectious Diseases	23	156-158	2016

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, 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.	Japanese Journal of Infectious Diseases	70	675-677	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.	Jpn J Infect Dis.	71	267-273	2018
安藤秀二	つつが虫病とは.	新薬と臨床	67	70-74(1246-1250)	2018
安藤秀二	マダニ媒介性の日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症	人と動物の共通感染症研究会ニュースレター	17	9-12	2018
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症例における紅斑熱群リケッチア感染の検索.	3. 衛生動物学雑誌	69	49-54	2018
佐藤(大久保)梢、高野愛、高娃、安藤秀二、川端寛樹	ダニ媒介性感染症-国内に常在する感染症を主に-	衛生動物学会誌			(in press)
後藤明子,筒井理華,高橋雅輝,北川和寛,堀田千恵美,小澤広規,板持雅恵,大沼正行,西澤佳奈子,葛口剛,伊藤雅,中田恵子,三好龍也,,中野守,濱島洋介,磯田美穂子,吉富秀亮,諸石早苗,吉田弘	平成 28 年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて	病原体検出情報	39	67-69	2018
吉田弘	海外における無菌性髄膜炎等を対象とした病原体サーベイランスの動向	病原体検出情報	39	101-102	2018
吉田弘	ポリオ根絶計画の最終段階と環境水サーベイランスの意義	日本小児科医学会会報	55	124-127	2018
森 嘉生	風疹ウイルスに関する最新情報・風しん含有ワクチンの製造方法	臨床とウイルス	46	346-352	2018

Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, Poolman J, Geurtsen J.	<i>Bordetella pertussis</i> population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines	Microbial Genomics	4(5)	e000180	2018
御手洗聡	結核菌サーベイランスの構築	公衆衛生	82	28-33	2018
Takahashi N, Matsuoka S, Thi Minh TT, Naruse TK, Kimura A, SHiino T, Kawana-Tachikawa A, Ishikawa K, Matano T, Ngyyen Thi LA	Human lucoyto-antigen associated gag and nef polymorphisms in HIV-1 subtype A/E-infected individuals in Vietnam.	Microbes and Infection	(In press)		2018
Kato H, Kanou K, Arima Y, Ando F, Matsuoka S, Yoshimura K, Matano T, Matsui T, Sunagawa T, Oishi K	The importance of accounting for testing and positivity in surveillance by time and place: an illustration from HIV surveillance in Japan	Epidemiol Infect	146	2072-2078	2018
松岡佐織	2015年以降の日本国内HIV感染発生動向	病原微生物体検出情報(IASR)	29	151	2018
中村麻子、吉富秀亮、小林孝行、芦塚由紀、梶原淳睦、松岡佐織	福岡県のHIV/AIDS発生動向および保健所HIV検査陽性検体の解析	病原微生物体検出情報(IASR)	29	151-153	2018
藤本嗣人	【迅速診断キットの現状-その長所・改良すべき点-】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(3)	105 ~ 109	2017
藤本 嗣人、花岡希	【腎と透析ベッドサイド検査事典】(第10章)感染マーカー、感染症検査アデノウイルス	腎と透析84(増刊)	84増刊	287 ~ 289	2018
藤本嗣人、小林正明	手足口病と咽頭結膜熱について	こころとからだの健康	234(8)	68 ~ 69	2017
Kubota H, Uwamino Y, Matsui M, Sekizuka T, Suzuki Y, Okuno R, Uchitani Y, Ariyoshi T, Aoki W, Suzuki S, Kuroda M, Shinkai T, Yokoyama K, Sadamasu K, Funakoshi T, Murata M, Hasegawa N, Iwata S.	FRI-4 carbapenemase-producing Enterobacter cloacae complex isolated in Tokyo, Japan	J Antimicrob Chemother.	73(11)	2969-2972	2018

国立感染症研究所薬剤耐性研究センター,同感染症疫学センター,全国地方衛生研究所.	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE)病原体サーベイランス, 2017 年.	IASR	Vol. 39	p162-163	2018 年
松井真理、鈴木里和、菅井基行.	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス報告状況.	IASR	Vol.40	p19-20	2019 年
柿本健作、川上千晶、山岸拓也、島田智恵、砂川富正、松井玉乃、大石和徳、松井真理、鈴木里和、菅井基行.	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症サーベイランス情報の活用.	IASR	Vol.40	p20-21	2019 年