

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を強化するための研究

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)
	森 嘉生	(国立感染症研究所ウイルス第三部)
	松井 真理	(国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)
	松岡 佐織	(国立感染症研究所エイズ研究センター)
	蒲地 一成	(国立感染症研究所細菌第二部)
	前田 健	(国立感染症研究所獣医科学部)
	渡邊 真治	(国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)
	前川純子	(国立感染症研究所細菌第一部)
	吉田 弘	(国立感染症研究所ウイルス第二部)
	永宗喜三郎	(国立感染症研究所寄生動物部)
	池辺忠義	(国立感染症研究所細菌第一部)
	林 昌宏	(国立感染症研究所ウイルス第一部)
	染谷 雄一	(国立感染症研究所ウイルス第二部)
	朝倉 宏	(国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)
	藤本 嗣人	(国立感染症研究所感染症危機管理研究センター)
	御手洗 聡	(公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部)
	安藤 秀二	(国立感染症研究所ウイルス第一部)
	梅山 隆	(国立感染症研究所真菌部)

研究要旨 国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所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とため、共同作業の障壁になっている。危機的感染症発生の迅速な察知、正確な疫学情報の把握を目的として、検査方法の標準化、および疫学調査を通じて感染研と地衛研の連携体制を構築する研究を実施した。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症、薬剤耐性菌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3年に開催が延期された東京オリンピック・パラリンピック競技大会に関連するインバウンド感染症発生リスクへの備えも必要である。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い検査機能の強化維持も課題となっている。

行政が関与する通常の感染症対策の初動フローは、①先ず病原体を特定、②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手順を遅滞なく実行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するラボネットワークを構築・維持することは国の感染症危機管理上、必須である。

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

具体的には、以下の共同作業を通じてラボネットワーク機能を強化し、危機的感染症発生に際して、全国で病原体検査が実施可能な体制を構築・維持する。①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、②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、③病原体診断用機器や試薬等の整備、④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、新型コロナウイルス感染症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導入可能になる。さらに、検査法の統一化によりえられる正確かつ共有可能な病原体情報は、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 18名の計 19 名によって行われた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が総括する形で遂行された。研究は、①各病原体レファレンスセンター活動、②病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立を中心に行った。具体的には、以下の方法で研究を遂行した。

■病原体マニュアルのアップデート: 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、9 疾患のアップデートおよび 3 疾患の追加を行った。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集: 2020 年 7 月下旬までに、地域保健総合推進事業及び地方衛生研究所全国協議会の予算により、全ての地衛研が参加して会議が可能となるよう web 環境を整備した。これを利用し、N501Y 変異株の検出法に関するセミナーを実施した。

■麻疹・風疹: 全国地衛研を対象に麻疹・風疹検査実績調査を行った。遺伝子検査用参照 RNA を管理保管し、配布希望に応じて配布を行う。

■薬剤耐性菌: Web 会議システムを用いたレファレンスセンター会議を実施し、活動方針を検討した。病原体検出マニュアルの改訂を行った。地衛研の検査技術維持向上のため、個別研修や検査実技動画及び音声付き講義スライド等を送付した。CRE 病原体サーベイランス報告データの精度管理を行い、検査実施状況を評価した。サーベイランスデータの活用のために、感染症疫学センターとの間で週 1 回の web 会議を行った。千葉県における CRE 感染症患者数の推計と感染対策の実施状況を評価した。

■HIV 関連感染症: 地方自治体が実施した

HIV 行政検査の実施数、陽性数を調査した。緊急事態宣言期間内に HIV 行政検査に関する技術サポートや相談があった施設に対し聞き取り調査を行った。地衛研を対象に HIV 核酸増幅検査に関する精度管理調査を実施した。HIV 診断薬の国内供給計画等を調査した。

■百日咳: 病原体検出マニュアルを改訂した。マクロライド耐性百日咳菌(MRBP)検査キットを作製し、百日咳レファレンスセンター 9 施設に送付した。

■動物由来感染症: DAS (dead animal surveillance) システムのデータを用いて、野生動物の死亡個体数変動を解析した。イヌおよびネコの SFTS 検査結果を登録および集計可能な電子カルテシステムを構築した。DAS システムに関するアンケート調査を行った。

■インフルエンザ: インフルエンザレファレンス(コア・サポート)地衛研と、地衛研の検査技術の維持・向上のための実態調査の実施を計画した。またインフルエンザサーベイランスにおける問題点・改良点に関する意見・質問を受ける計画をした。

■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。

■エンテロウイルス: 地方衛生研究所全国協議会が整備を行った web 環境を活用し、オンライン研修を企画した。下水沈殿物 RNA 精製方法、トウガラシ微班ウイルスを下水濃縮のプロセスコントロールとして用いる検出手法につき、パワーポイントによる教材を作成し、4-6 名からなる小グループで解説、質疑応答を行った。

■寄生虫: 1) ハマダラカからのマラリア原虫の検出・原虫種同定方法の改善を実施した。ハマダラカへのマラリア原虫感染モデルとして、ネズミマラリア原虫感染ハマダラカを用いて、ヒトマラリア原虫感染赤血球からの検出する PCR 手法を改変・最適化し検出を試みた。2) エキノコックス症: 愛知県動物保護管理センター知多支所および本所の知多半島隣接地域で捕獲・搬入された野犬等から採取された糞便検体を用い、遺伝子検査・虫卵検査を実施した。3) アメーバ赤痢: 抗体検査法の評価に関する研究を行った。

■レンサ球菌: T 型別を行った。

■アルボウイルス: アルボウイルスの流行状況について共有した。各ウイルス遺伝子の陽性対照を調製し、RNA stable にて真空乾燥・保存した。日本脳炎ウイルス遺伝子の抽出と RT-PCR および配列解析を行った。デングウイルス 1 型 TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照に実験室内汚染コントロール配列を挿入した。

■ノロウイルス: 1) ノロウイルス検出法: 既存の

プライマー・プローブを使用しながら、稀に検出される GIV も検出しつつ、検出されるノロウイルスの多数を占める GII の検出感度を改善させる方法を模索した。2) ロタウイルス検出法: NSP3 遺伝子をターゲットとした 2 種類のプライマー・プローブセットの性能について比較検証を行った。

■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・Penner-PCR 型別法を行った。

■アデノウイルス: 仙台市の性感染症クリニックと連携し、尿道炎症例について継続的に病原体探索した。検出されたアデノウイルス (human adenovirus: Ad) について全ゲノム配列を決定し系統樹解析した。患者について臨床的、疫学的に調査し、検出 Ad について分子疫学的に検討した。患者の臨床経過および感染経路について検討した。

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

■リケッチア: 日本紅斑熱が届出疾患となった 1999 年 4 月以降の届出データを解析し、国内での広がりについて検討した。リケッチアレファレンスセンターを中心に関連情報の提案を集め、情報提供を行った。COVID-19 の拡大の中、多くの感染症の発生が減少したこととは対極に、つつが虫病の届出数は例年と大きく変わらず、日本紅斑熱においては過去最高を示したことから、患者が増えている数か所の地衛研担当者にインタビューを行った。

■真菌: 感染研真菌部の真菌検査実験室内において、汚染防止対策として作業動線を重視したレイアウト変更を行った。今年度のレイアウト変更を反映させるべく、真菌検査についての標準作業手順書 (SOP) の改訂を行った。

C. 研究結果

■病原体マニュアルのアップデート: 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、新型コロナウイルス感染症、薬剤耐性菌感染症、レジオネラ症、百日咳、腸チフス、パラチフス、ジフテリア、破傷風、侵襲性髄膜炎菌感染症であった。追加した病原体検出マニュアルは、RSウイルス感染症、重症熱性血小板減少症候群 (病原体がフレボウイルス属 SFTSウイルスであるものに限る。)、ウイルス性肝炎 (E型肝炎及びA型肝炎を除く) であった。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集

1. 2020 年 1 月下旬、厚生労働省、国立感染症研究所 (感染研) と連携して、全国の地衛研におけるリアルタイム PCR 法による検査の立ち上げに貢献した。地衛研の感染症検査は、感染研と地衛研で作成される病原体検出マニュアルに基づいて実施されるが、COVID-19 についても感染研と連携してマニュアル ver.1 の作成に寄与した。

2. 2020 年 2 月・3 月には地方自治体における PCR 検査数が課題となり、厚生労働省の依頼により PCR 検査実施可能数の全国調査を数度にわたり実施した。

3. 新型コロナウイルス感染症検査の指針作成及び改訂に携わった。

4. 2021 年 2 月 2 日に全国の地衛研を対象に Web seminar を実施し、N501Y 変異検出法の普及に貢献した。

5. 厚生労働省の依頼により、次世代シーケンサーの保有状況、ゲノム解析状況について全地衛研を対象として調査を実施し報告した。

■麻疹・風疹

1. 麻疹・風疹検査実績調査では地衛研等 79 施設から回答を受けとった。ウイルス遺伝子検査実施数は全国施設合計で麻疹 658 件、風疹 722 件であった。2020 年は麻疹風疹の流行が沈静化したことから検査数が大幅に減少したものと考えられる。2020 年の検体接種後 5 日以内に検体が搬入された症例割合は麻疹および風疹共に約 95% であり、2018 年-2019 年の 97% と比較すると大きく減少している。COVID-19 流行に伴う対応の遅延化が起きている可能性があり、引き続き注視する必要がある。ウイルスが検出された症例においてはほぼ全てでウイルス遺伝子配列の解読が試みられていた。そのうち、麻疹 11%、風疹 20% で解読ができなかった。麻疹ウイルス 50%、風疹ウイルス 41% が未登録であった。

2. 地衛研で実施する麻疹ウイルス・風疹ウイルス遺伝子検査の陽性コントロールとして用いる参照 RNA を管理保管し、配布希望に応じて配布を行った。

■薬剤耐性菌

1. 2020 年 6 月と 12 月に約 1 時間ずつ、レファレンスセンター会議を開催した。それぞれ年度内の活動計画、病原体検出マニュアル改訂内容・次年度の研修計画について協議した。

2. 2020 年 6 月に、病原体検出マニュアル薬剤耐性菌 Ver2.0 を公開した。個別研修を 2 回開催した。3 つの表現型検査方法について実技動画を作成した。個別研修講義の音声付きスライドを作成し、その他の研修資料及び陽性コントロール DNA を、全国 77 の地衛研・保健所

に送付した。次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性菌ゲノム解析の個別研修を試行した。

3. 2019年にNESIDに報告されたCRE株について報告内容の精度管理を行った。2019年検体採取株の全国報告率は77%であった。都道府県別報告率は、中央値92%となったが、4都県では50%以下にとどまった。報告率が低い要因として、自治体独自の菌株収集方針や、一部の医療機関からの菌株提供が得られにくいなどの回答があった。

4. 46回のweb会議をIDSCと開催した。計71件の議題を取り上げ、48件は、会議でのリスク評価後に自治体に対応状況の問い合わせ等を実施した。2件はAMR-RC4室担当者が現地訪問し、対応の支援を行った。

5. 千葉県内の286医療機関に質問紙調査を依頼し、98施設から回答を得た。2015年～2018年の千葉県内でのCRE感染症発症患者数は年間80～110例と考えられた。カルバペネマーゼ遺伝子検査を実施している施設は6施設のみであった。

■HIV関連感染症

1. 令和2年度の国内HIV行政検査実施数は68,998件(令和元年142,260件、前年比48.5%)であった。新型コロナウイルスの感染拡大に伴いHIV無料匿名検査実施の一時縮小、地衛研におけるマンパワー、研究試薬の不足を理由に検査受付の中止していたことが判明した。

2. HIV核酸増幅検査精度管理調査に参加した13施設すべてにおいて陽性・陰性は正しく判定されていた。

3. 主に保健所等で1次スクリーニングに使用する診断薬1種、地衛研等で2次スクリーニングに活用される診断薬1種が新型コロナ診断薬の増産の影響を受け、国内で供給中止となり、その情報を関係学会、および地衛研、厚生労働省等と共有した。

■百日咳:病原体検出マニュアル第3.0版を公開した。MRBP検査キットの性能確認を行い、検査キットが一定の品質にあることを確認した。MRBP検査キットは百日咳レファレンスセンター9施設に整備された。

■動物由来感染症

1. 令和2年10月に、一過性のカラスの死亡個体数増加が報告された。この死亡個体数急増は、平成30年度から令和2年度までの3年間連続で秋に観察された現象であった。特定の自治体で観察された現象であることから、当該自治体と連携して原因解明が必要であると考えられた。

2. SFTSに関する血清学的診断やPCRの結果

を記入できる電子カルテシステムは、主にイヌやネコ由来の検体を採取した動物病院の情報、血清又はスワブの検体種類や採材日、発症動物の居住地や症状等の情報が入力可能となっている。DASシステム上でモジュール化されており、迅速および安価に他の病原体疫学調査に転用可能である。

3. DASシステムを試用した7か所の地衛研の担当者にアンケート調査を行い、感染症対策に有用としたのが6施設、操作性が分かりやすいとしたのが7施設、負担を感じるとしたのが5施設であった。

■インフルエンザ:2020年度は新型コロナウイルスの流行のため実態調査の実施を断念したが、次年度以降のための準備をした。また、インフルエンザウイルスの流行に備えて、病原体サーベイランスに関する情報をインフルエンザレファレンス(コア・サポート)地衛研を通して全国地衛研と共有した。

■大腸菌:2020年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全2,271株であった。コントロール株を配布し、問合せを受け付けた。O-/H-genotyping PCR法を用いてH抗原が陰性のHg型を解析し、重症例特異的なHg型が存在することを見出し、O5:H-/Hg9型、O55:H-/Hg7型などを同定した。

■レジオネラ:今年度41株が追加され平成2020年12月末現在で、合計796株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。外部精度管理サーベイを実施した。病原体検出マニュアルの改訂版を発出した。市販されていないレジオネラ免疫血清を配布した。

■エンテロウイルス:各施設が短期間で整備したインターネット環境は異なることを、事前にヒアリングを行い把握した。その上で参加人数を少数に制限し、音声、画像配信への負荷を減らすよう調整したにもかかわらず、音声、画像の不安定な場合があった。特にWi-Fi環境では顕著であり、事前の接続テスト等の必要性が認められた。少人数の研修とし、事前に研修資料を参加者へ配布することで効率よく研修は実施できたが、担当者は繰り返し説明を行うため、ビデオ配信などの工夫が必要である。また研修後、参加者からの照会事項については適宜メールベースのフォローアップを行った。

■寄生虫:1)ハマダラカからの原虫DNA抽出方法の最適化、PCRの温度設定などの最適化を行い、指摘条件を得ることができた。例年複数件依頼があるマラリアなどの輸入寄生虫疾患に関する鑑別診断依頼ならびに相談は、今年度依頼がなかった。コロナ渦の影響で、海外への渡航の停止と外国人の受け入れ制

限を反映していると考えられた。2) エキノコックス症遺伝子検査において 122 検体中 4 検体でエキノコックス陽性であった。虫卵検査では全検体陰性であった。3) In house で確立している抗赤痢アメーバ IgG 抗体の ELISA 検査系を用いて、遺伝子検査の結果が得られているアメーバ肝膿瘍症例の血清抗赤痢アメーバ IgG を調べた。定性 PCR 検査陽性 18 例、同陰性 10 例の計 28 例について解析した結果、感度は 94.4%、特異度は 90.0%であった。

■レンサ球菌:2019 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、883 株であり、劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)の報告が 236 症例あった。すべての株に対して T 型別を行った。

■アルボウイルス:アルボウイルス感染症レファレンスセンターを通して実験室診断法を共有した。各ウイルス遺伝子の陽性対照を調製し、RNAstable にて真空乾燥し、室温保存し、希望 2 施設に分与した。2020 年のデング熱輸入症例は 45 例、チクングニア熱は 3 例、ジカ熱は 1 例、日本脳炎患者は 4 例であった。日本脳炎症例のうち、岡山県の 1 症例について日本脳炎ウイルス遺伝子配列を解析した結果、日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型 (GI) であり、2019 年に広島県の日本脳炎患者検体より検出された日本脳炎ウイルス GI の塩基配列と 99.7%の相同性を示した。デングウイルス 1 型 TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照に実験室内汚染コントロール配列である Contamplicon 配列を挿入した。Contamplicon 配列の挿入はデングウイルスの実験室内汚染コントロール配列として使用可能であることが示唆された。

■ノロウイルス

1. ノロウイルス検出系: GIV も検出可能な RING2AL-TP および GII 特異的プローブ RING2-TP を用いて感度の検討を行った。

2. ロタウイルス検出系:リアルタイム qPCR 法として世界的に広く利用されている 2 種類のプライマー・プローブセットについて比較検討を行い、両者はほぼ同等であった。RNA 抽出方法の最適化を図るため、よく汎用されているキットとして Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) の抽出効率を比較検討した。ZYMO Research 社のキットの方が一貫して抽出効率が高かった。RNA 抽出時に DNase 処理を行ったところ、検出効率が 1/10 から 1/100 程度まで低下したため、DNase 処理によりロタウイルス遺伝子 (dsRNA) が分解されることが示された。

■カンピロバクター

1. 令和2年度に検出された *C. jejuni* 計 188 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 70 株 (37.2%)、テトラサイクリン耐性は 39 株 (20.7%)、エリスロマイシン耐性は 22 株 (11.7%) であった。3 剤に感受性を示した *C. jejuni* 株は 94 株 (50.0%) であった。*C. coli* 株については 16 株のみが確保され、シプロフロキサシン耐性株が 12 株 (75.0%)、テトラサイクリン耐性株が 19 株 (62.5%)、エリスロマイシン耐性株が 4 株 (31.3%) との割合でそれぞれ検出され、エリスロマイシン耐性が高率に認められる状況にあった

2. 主として散発事例由来の *C. jejuni* 計 90 株を対象に Penner-PCR 型別法及び Penner 血清型別を並行実施し、2 法間の相関性を評価した。90 株中 84 株は 2 法共に型別結果が得られたほか、5 株では血清型別不能となったものの、PCR 法による型別がなされた。残り 1 株については複数の遺伝子型で陽性反応が認められた。保存株のうち、血清型別不能と判定された *C. jejuni* 計 180 株を対象に PCR 型別試験に供したところ、12 株を除く 168 株 (93.3%) は何れかの遺伝子群に型別された。

■アデノウイルス:尿道炎患者 1 名の尿、うがい液、眼瞼擦過物から Ad が検出され Ad-7 と同定された。検出アデノウイルスは全ゲノム配列を決定し、系統樹解析の結果 Ad7 genotype 7d (Ad-B7d) であることが示された。当該患者から採取された尿、うがい液、眼瞼擦過物から分離された Ad は主要ウイルス構成タンパクである hexon, penton base, fiber をコードする領域の各 DNA 配列が同一であった。検出 Ad は Ad-B7d と DNA 塩基配列が完全に一致した。

■結核

1. 全国の 83 施設を対象に、内部精度管理用検体の配布及び外部精度評価 (EQA) 参加についての希望を調査した。56 施設より参加希望があり、期限までにすべての施設から分析結果が送付された。

2. 各施設の分析対象ローカセットを調査し、JATA 15、HV、Supply らのローサイがそれぞれ 48、45、34 であり、年々増加する傾向であった。

3. 各施設で 3 株の EQA 用検体を JATA 12 で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは 49 施設 (88%) であった。各分析法におけるローカセットの正答率、各ローカセットの正答率を評価した。

4. 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 (45%)。

5. 各分析法におけるローカセットの正答率をまとめ、各ローカセットの正答率を比較した。

■リケッチア:日本紅斑熱は、2006 年以降右肩上がりに報告数が増加し、2020 年は 420 例

(暫定)に達した。死亡例も 2019 年には年間 13 例になり、治療可能な疾患ながら、死亡率は 4%を越え、2020 年も暫定で 8 例の死亡が届けられている。また、発生地域も東北南部の福島県や新潟県にまで患者発生が拡大している。つつが虫病は、2000 年前後に年間 800 例ほどのピークがあったが、年間 400~500 例の届出で推移している。2020 年の日本紅斑熱は、年間の半ばからすでに 2019 年より患者数が多い傾向がみられた。そのため、届け出数が増えている自治体を中心に、検査状況などの聞き取りを行った。複数の自治体で、2019 年のマニュアル改訂に合わせて、検査 SOP の改訂をし、マニュアルのフローチャートに合わせた対応を新たに開始していた。

■真菌：感染研真菌部の実験室内の作業動線を検討し直し、遺伝子検査の試薬調製を行う場所と、遺伝子増幅産物の検出作業を行う場所を明確に分け、動線が逆戻りしないようにレイアウトの変更を行った。その変更を反映させるように、真菌検査を実施する上での統一ルールを記載した SOP の改訂を行った。

D. 考察

■病原体マニュアルのアップデート：継続的に病原体検出手順マニュアルを更新する必要があり、今年度もアップデートを行った。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。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体検出手順マニュアル編集：COVID-19 の検査診断、N501Y 変異検出法の普及、NGS 解析の実態把握を通して我が国の COVID-19 対策に貢献できたと考えている。今後も地衛研の機能強化に向けて検討する必要がある。

■麻疹・風疹：2020 年は麻疹風疹の患者発生数が少なく、地衛研における麻疹風疹検査数が減少した。検体接種後 5 日以内に検体が搬入された症例、ならびに搬入後 4 日以内に検査が実施された症例の割合が例年に比べて低下しており、COVID-19 流行による影響があった可能性がある。

■薬剤耐性菌：Web 会議システムを用いた薬剤耐性菌レファレンスセンター会議を実施し、活動方針を検討した。3 分程度の検査実技動画や音声入りの講義スライドを作成し、薬剤耐性菌検査を実施している全国 77 の地衛研・保健所に送付した。動画資料の利点として、繰り返し確認できる点や、複数の担当者で確認できる点が挙げられた。PFGE のプロトコール配布を望む意見があり、次年度以降、PFGE プロ

トコールの配布を検討する必要性が考えられた。CRE 病原体サーベイランス報告データの精度管理問い合わせ対象株のうち、実施すべき検査項目が未実施の株は 2018 年に比べ減少しており、検査方法の認識がさらに進んだと考えられた。ISDC との会議は、これまでに延べ 200 件以上の事例を取り上げてリスク評価を実施した。リスク評価ができなかった事例について検査状況を問い合わせたところ、新型コロナウイルス感染症対応のため、保健所による菌株収集体制に影響があった可能性が推察された。千葉県における CRE 感染症患者数の推計と感染対策の実施状況の調査では、non-CPE CRE に比べて CPE 検出時により厳重な感染対策を実施している医療機関が多い一方で、院内で CPE かどうかの判別のための遺伝子検査を実施している施設は 6%のみであった。

■HIV 関連感染症：令和 2 年度は日本国内での新型コロナウイルスの感染拡大による保健所、地衛研でのウイルス部門の業務の増大、また感染予防の観点からも検査実施日が減少し、結果として HIV 検査件数が前年の約半数にとどまった。行政検査における陽性件数は 290 件(前年比 63%)であり、必ずしも検査数の落ち込みに比例していない。すなわち受験者当たりの陽性率は高く推移し、ハイリスク層に対する診断の機会として効率よく機能していた可能性が考えられる。今後も緊急時を見据えた HIV 診断体制の整備を進めていくことが重要であることが示唆される。

■百日咳：中国では 2012 年に西安市で初めて MRBP が臨床分離され、その後急速に北京や上海などの都市部にまで拡大した。MRBP のアジア地域への拡散が指摘され、本研究では MRBP に対する国内監視体制を強化した。MRBP 検査キットの整備後、百日咳患者報告数が激減したため精度の高いサーベイランスは実施できていない。そのため、引き続き MRBP の監視体制を維持するとともに、アジア地域における MRBP の発生動向に注視していく必要がある。毎年 1 回レファレンスセンター会議が開催されていたが、2020 年は新型コロナウイルス感染症の影響により不開催となった。2021 年は Web 会議が開催される予定であり、同会議では MRBP の流行状況と検査に関する情報提供を予定している。また、同時に MRBP 検査の改良点、検査体制・検査データの情報共有について意見交換を行う予定である。

■動物由来感染症：DAS システムを用いれば、野生動物の死亡個体数変動を容易に把握できる可能性が示唆された。また、SFTS 疫学調査システムを用いれば、動物病院を介した特

定の人獣共通感染症の疫学調査に有用である可能性が示唆された。しかし、多くの自治体が DAS システムの有用性を認めるものの、調査に負担を感じる自治体が多かった。

■インフルエンザ: 全国地衛研を対象とした実態調査は、新型コロナウイルスの流行の影響を受けたが、インフルエンザウイルスの流行に備えて情報共有を行ったことは、サーベイランスを円滑に進める上で重要だったと思われる。

■大腸菌: EHEC の検査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。非運動性株の Hg 型についてさらに解析を進める必要がある。

■レジオネラ: 2018 年以來、毎年 2,000 症例を越え、死亡例も少なくないが、多くの場合感染源は不明である。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。外部精度管理サーベイの継続参加は検査精度の安定化が期待できる。

■エンテロウイルス: これまで地衛研担当者を対象とした技術研修は実技研修が主であったが、COVID-19 流行に伴い、対面の実技研修が困難な中、ウェブ研修を企画した。研修に関してはアンケート等の評価を行わなかったため効果について客観性に欠けるものの、研修後のフォローアップを加えることで、一転の技術移転を行うことができた。オンラインの研修にインターネット環境の整備、研修効果の評価方法、教材の開発、フォローアップ方法などが今後の課題である。

■寄生虫: 1) ハマダラカからのマラリア原虫の検出・原虫種同定方法の改善に関しては、モデル病原体であるネズミマラリア原虫感染ハマダラカを用いることで実施することができた。今後、よりヒトマラリア原虫に近いとされる、サルマラリア原虫などを感染させてハマダラカを用いた試験を実施することでより精度の高い最適化を試みる。2) 知多半島内の半田市および常滑市において計4件のエキノコックス陽性犬が発見され、知多半島内のエキノコックスの定着は確実な状況であると考えられた。今後も調査の継続が必要であると共に積極的な拡散防止策を検討する必要があると考えられた。3) 侵襲性の強いアメーバ肝膿瘍においては、血清抗体は原虫の感染と高く相関することが示され、低侵襲性の血清抗体検査は、アメーバ肝膿瘍症例においては有用性の高い方法と考えられた。有用な抗体検査ではあるが、現在国内での保険適用の抗体検査が不可能な状況にあり、感染研および地衛研での検査対応が求めら

れているところで、検査法自体を含む技術供与、検査協力の体制が重要である。

■レンサ球菌: T1 型の株は、2016 年から 2017 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減少していたが、2018、2019 年ともに増加しており、パラレルに推移している傾向にある。また、TB3264 型も 2012 年頃から急増し続けているおり、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。

■アルボウイルス: 2020 年はデング熱の輸入症例が前年の 1/10 以下に激減し、チクングニア熱も 1/15 に減少した。これはコロナ禍による入国制限により、人的交流が減少した影響が考えられる。しかしながら、2020 年の 3 月以降も 14 例の輸入症例が確認されており、コロナ禍が収束し、人的交流が再開した場合、デング熱等の輸入症例数は再び増加する可能性が否定できない。実験室検査用陽性対照の配布を希望した関係機関 3 件について陽性対照の配布を行った。デングウイルス I 型の陽性対照の改良を行い、陽性対照への Contamplicon 配列の挿入はデングウイルスに対しても陽性対照と陽性検体を区別する検査系の確立において有用であることが示唆された。日本脳炎の症例数は 2020 年も 4 例報告されており、近年の流行状況と比較して変化は認められず、引き続き警戒が求められる。デング熱等のアルボウイルス感染症の流行は世界的に引き続き継続しており、わが国においても日本脳炎およびダニ媒介脳炎が流行しているため、アルボウイルスネットワークの体制を引き続き維持・強化することが求められる。

■ノロウイルス: 1) ノロウイルス検出法: 世界的にも GII が主流であり、一方で GIV は稀にしか検出されていない現状であり、GII の感度改善による本系の安定化が期待される。また RING2-TP は、RING2AL-TP が開発される以前に使用されていたプローブであり、使用に対する障壁は低いように思われる。本年度は、プレートとして DNA を使用したが、実際の糞便検体を用いた検証が必要である。RING2AL-TP と RING2-TP の混合比の最適化を実施する必要がある。2) ロタウイルス検出法: 幅広い遺伝子型を確実に検出するためには、Freeman らのプライマー・プローブセットの方が優れていると考えられた。RNA 抽出に関しては、DNase 処理は RNA 抽出時に混入する DNA を分解除去して非特異反応を軽減させる効果が期待されるが、ロタウイルスのゲノムは 2 本鎖 RNA であるため、DNase による非特異的な分解を受けてしまうと考えられる。従って、ロ

タウウイルス遺伝子の検出を目的として RNA 抽出を行う場合には、DNase 処理は行うべきではない。

■カンピロバクター: *C. jejuni* の薬剤感受性は、これまでの動向とほぼ同様にシプロフロキサシンの耐性率が高いほか、テトラサイクリン耐性率も高い割合で維持されていた。本病原体の薬剤耐性関連モニタリング結果を継続的に収集できる本研究班の活動は貴重な体制であり、引き続きその実施にあたる必要がある。 *C. jejuni* のテトラサイクリン耐性判定基準については、E-test を用いた検証を行ったが、E-test では Agar dilution 法に比べ MIC 値が低く見積もられることも報告されており、その原因究明には寒天平板希釈法による MIC 値の算出や *tet* 遺伝子の検出も今後検討すべき事項の一つとして想定された。 *C. coli* の薬剤感受性については、菌株数が相対的に少なく、調査対象とするためには菌株の確保体制を確立した上で、議論することが可能となると思われる。 *C. jejuni* 株の Penner 血清型別法と Penner-PCR 法の相関性を確認するため、両法間での一致性を確認すると共に、血清型別不能株を対象に型別率を求め、概ね良好な結果を得た。今後、Penner-PCR 法の活用を通じて改善すべき点を抽出していくことが必要と思われる。また、 *C. coli* については現時点で同等となる型別法が存在しないことから、新たな検討に向けた協議も必要であろう。

■アデノウイルス: 一般的に Ad の D 種が目の粘膜や尿道炎に関連することが知られており、Ad-B7d による性感染症が疑われる本症例は稀な事例と考えられた。長期間の尿への Ad の排出はこれまでの報告と同様であった。感染可能な Ad-B7d が尿道炎、結膜炎、咽頭炎と関連し、尿やうがい液に長期間にわたって感染可能な状態で存在することを初めて明らかにした。Ad-B7d は病院や寮、合宿所等の閉鎖環境で集団感染を引き起こす。本報告はこの集団感染の要因の一つに、これまでに知られていない尿を媒介とした感染拡大の可能性を示唆した。

■結核: 各施設における内部精度管理の実施を支援するとともに、7 回目となる外部精度評価を実施した。主要な分子量測定法は従来と同様にアガロースゲル電気泳動法 (n=25) と自動シーケンサー (n=23) であった。内部精度管理用検体の配布と継続的な外部精度評価の実施が、分析精度の維持と向上に寄与していると考えられる。2020 年度については COVID-19 の影響で技術研修の開催を取りやめた。自動シーケンサー分析系を用いた結核

菌 VNTR 分析に関する標準作業手順書を作成し、近日中に結核研究所 HP にて公開する予定としている。今後、評価株数を増やすことに加え、日常分析業務で遭遇しうるイレギュラーな検体を評価対象に加えることを検討する必要がある。一部の施設においては、結核菌の全ゲノム配列比較法が実施されており、新しい手法に対応していくことも必要である。結核分子疫学調査では、VNTR 情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのためには VNTR 分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられる。

■リケッチア: COVID-19 の流行の中、日本国内のリケッチア症は、さらにその届出数が増加した。日本紅斑熱に至っては、2000 年の届出数 (38 例) に比較して、2020 年は暫定ながら 10 倍以上の患者報告 (420 例) になっている。前年に改訂した検査マニュアルを、現場の検査に導入したことが迅速な診断に繋がったプラス面にでていることが推測される。しかしながら、リケッチア症の初期症状は、発熱であるため、COVID-19 を疑った初期の受診対応などにより、迅速な治療への繋がりが遅れるケースもあったと言われている。医療関係者、公衆衛生関係者、一般住民に、それぞれ必要な情報とその適切な提供方法、情報の有機的な連続性を検討していく必要がある。近年、国内のダニ媒介感染症は多様化している。多様な紅斑熱群リケッチアが国内に分布していることも明らかになってきている。特定の疾患にとらわれ固執して、患者への適切な対応が遅れることのないよう、個々の疾患の正確な理解を広げることも求められる。

■真菌: 真菌症検査における遺伝子検査の汚染防止対策を反映させた SOP の改訂を行った。本研究で改訂した SOP は検査の関係者全員が閲覧可能で、各自の理解が前提とされており、定期的に見直して改訂する必要がある。病原体検査における品質・精度の向上のためにも SOP の作成は基本である。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され、遺伝子検査の精度管理基盤となることを期待する。

E. 結論

■病原体検出マニュアルのアップデート・追加を行い、感染研ホームページ上に反映させた。引き続き改訂を続けていく必要がある。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集: COVID-19 の検査体制に確立に関して、検出マニュアルの作成、PCR 検査数の調査、検査の指針の作成、N501Y 変異の

検出法の普及、NGSの導入、実施状況の把握を行い、COVID-19 対策に貢献できた。

■麻疹・風疹:地衛研における麻疹・風疹検査の状況についてアンケート調査を行い、WHO 西太平洋地域の麻疹風疹排除認定委員会に提出する年次報告書に利用した。地衛研で実施する麻疹ウイルス・風疹ウイルス遺伝子検査の陽性コントロールとして用いる参照RNAの配布を行った。

■薬剤耐性菌:令和元年度の厚生労働省外部精度管理事業の結果に基づき、病原体検出マニュアルを改訂した。今年度より開始したweb 会議ツールを使用したレファレンスセンター会議は、課題の協議や情報共有に大変有意義であり、次年度も引き続き実施することとした。薬剤耐性菌検査技術の維持向上のため、従来の研修会に代わり、実技動画や音声入りの講義スライドを作成配布した。今後 PFGE 手法やタイピング解析に関する動画資料作成の要望があったため検討したい。一方で、質問等の機会が減少するなどの理由で研修への参加を望む意見もあり、次年度の研修方法についても検討する必要があると考えられた。サーベイランスデータ活用のため実施しているリスク評価会議において、地衛研での VRE 病原体検査状況を問い合わせた6件のうち5件は検査が実施されていた。病原体サーベイランスとしての VRE 検査結果報告体制の整備が必要と考えられた。

■HIV 関連感染症:令和2年度はHIV 早期診断に重要な HIV 核酸増幅検査精度管理調査を実施した。また日本国内で新型コロナウイルスの急速な感染拡大に伴い HIV 行政検査の受付が中止・縮小されたこと、また承認診断薬および診断に必要な研究試薬の供給停滞などの影響を受け、HIV 行政検査実施数が前年比の48.5%に留まった。検査の実施数、陽性率、新規 HIV 診断数の関連性については今後更に検討が必要である。

■百日咳:マクロライド耐性百日咳菌の国内監視体制を強化するため、病原体検出マニュアルの改訂ならびに遺伝子検査の国内整備を進めた。遺伝子検査キットは地衛研の百日咳レファレンスセンター9 施設に配布・整備された。

■動物由来感染症:DAS システムを用いた野生動物死亡個体数調査および電子カルテシステムは有用である可能性が示唆されたが、調査にかかわる担当者の負担軽減処置が必要とされた。

■インフルエンザ:コア・サポート地衛研と連携し、情報共有・意見交換を行うことで、全国で

の実態調査やサーベイランスが円滑に実施されている。

■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。

■エンテロウイルス:COVID-19 流行に伴い対面に代わり、オンラインによる技術研修会を企画・実施した。その結果、通信インフラ環境の整備に加え、研修方法、効果の評価方法とも実技研修とは異なる角度で検討していく必要性が認められた。

■寄生虫:マラリアの検査診断法は、ヒト感染血液を用いた場合の診断と、感染ハマダラカからの検出では大きく異なり、最適化が必要とされる。またこれらの情報は検疫所などでの業務において非常に有益であり、今後、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、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。エキノコックスに関しては、知多半島内での陽性検出が定着しつつあり、半島外への拡散も懸念される事態に至っているため、積極的な拡散防止策を講ずる必要があると思われる。アメーバ肝膿瘍症例においては、血清抗赤痢アメーバ検査の有用性は高いものと考えられた。

■レンサ球菌:咽頭炎由来株、劇症型溶連菌感染症患者由来株の T 型は、ともに T1 型が多かった。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。

■アルボウイルス:これまでにアルボウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、検査用陽性対照の改良を進めた。また分与を希望した各地衛研に遺伝子検査用陽性対照を配布した。さらにアルボウイルス実験室診断医における陽性対照の再検討を行った。今後もアルボウイルス感染症レファレンスセンターを中心にアルボウイルス感染症の検査などについて情報共有を実施し、国内のアルボウイルスに対する検査体制の整備に努める。

■ノロウイルス:ノロウイルス検出マニュアルに記載されているリアルタイム PCR 法(ノロウイルス GII および GIV を検出するに対するプライマー(COG2F、ALPF、COG2R)およびプローブ(RING2AL-TP)を使用)において、GII 特異的プローブ(RING2-TP)を混合することで、GIV も検出しつつ、GII の検出感度を改善可能で

あることが示唆された。ロタウイルスのリアルタイム PCR による検出法としては、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットを用いるのが望ましい。また、RNA 抽出法としては Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) の効率が良好であるが、DNase 処理は行うべきではない。

■カンピロバクター: *C. jejuni* はシプロフロキサシン、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高い状態が維持されており、その動向を引き続きモニタリングする必要がある。また、テトラサイクリン感受性の判定基準については今後更に検討すべき課題として抽出された。*C. jejuni* 株の遺伝子型別法である Penner-PCR 法の検証を行い、型別率が高い手法であることが示された。今後、*C. jejuni* を対象とした更なる検証を蓄積することで、改善すべき点を抽出することが期待される。また、*C. coli* に対する型別法の設定も検討すべき課題であろう。

■アデノウイルス: アデノウイルスは全身様々な器官、組織に感染する DNA ウイルスである。Ad-B7d は病院や寮、合宿所等の閉鎖環境で集団感染を引き起こす。Ad-B7d が、尿中に排泄され尿道炎とも関連することが示された。これまでも知られていた飛沫や眼脂、涙液での感染拡大に加えて、尿を介する感染拡大の可能性を明らかにした。

■結核: 2020 年度は、56 施設を対象に VNTR 分析に関する外部精度評価を実施した。各施設で 3 株の外部精度評価用検体を JATA (12) で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは 49 施設 (88%, 49/56) であり、4 施設では 2 箇所以上の違いが認められた。VNTR 情報の蓄積と他施設との情報共有を推進するためには精度保証が重要であり、分析精度の維持と向上を支援する継続的な活動が必要と考えられた。

■リケッチア: COVID-19 の拡大の中、届出感染症を含む多種の感染症の発生が大幅に減少したにもかかわらず、リケッチア症はむしろ増加した。前年のマニュアル改定と、リケッチア・レファレンスセンターを中心とした地衛研の地道な努力の継続によることが大きい。いまだ死亡例が報告される。治療の開始の遅れは死に直結することから、医療への迅速なアプローチが可能な環境を整えるとともに、より体系的にスムーズな診断が行える医療体制の構築が必要である。

■真菌: 汚染防止対策のための実験室レイアウト変更を行い、真菌検査のための標準作業手順書 (SOP) に反映させた。

F. 健康危険情報

■薬剤耐性菌: 感染症法 5 類全数把握対象疾患である VRE 感染症の感染症発生動向調査における 2020 年の届出患者数は、これまでで最も多い 135 例 (2021 年 1 月 25 日現在) となった。特定の地域ではなく全国的に届出が増加しており、病原微生物検出情報 (IASR) 速報記事 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/vre-m/vre-iasrs/10264-495p01.html>) を作成し、注意喚起を行った。

■百日咳: マクロライド耐性百日咳菌はマクロライド系抗菌薬による除菌効果が有意に低下するため、二次感染による感染拡大のリスクが高くなる。そのため、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。

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

■リケッチア: COVID-19 のパンデミック下でも、日本紅斑熱の確定患者は過去最高になり、治療可能な疾患でありながら、暫定ながらも死亡者も過去 2 番目に多い状況であった。治療可能な感染症であるからこそ、迅速な対応が必要である。

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。