

腸管ウイルス感染症（下痢症ウイルス、エンテロウイルス等）のレファレンス

研究分担者 清水博之 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 吉田弘 国立感染症研究所ウイルス第二部
福島県衛生研究所（北海道・東北・新潟）
神奈川県衛生研究所（関東・甲信・静）
愛知県衛生研究所（東海・北陸）
神戸市環境保健研究所（近畿）
愛媛県立衛生環境研究所（中国・四国）
福岡県保健環境研究所（九州・沖縄）

研究要旨 エンテロウイルスレファレンスセンター(全国6ブロック)との協力のもと地方衛生研究所で実施している検査の現状把握を行った。その結果、①エンテロウイルス検査に関する基盤の技術研修コースの企画、関連するマニュアル整備、次いで、②遺伝子解析法支援のためのデータ整備につき、次年度実施可能性について検討して行くこととした。

A. 研究目的

各ブロックレファレンスセンター(九州沖縄：福岡県衛研、中国四国：愛媛衛研、近畿：神戸市衛研、北陸中部：愛知衛研、関東甲信静：神奈川県衛研、北海道東北新潟：福島衛研)との協力の下、地方衛生研究所で実施しているエンテロウイルス検査の状況を把握し、検査の質の向上のため具体的な方法について検討を行う。

初年度はアンケートによる現状調査、次年度以降はアンケート結果を踏まえた、マニュアル作成、及び研修などを企画実施する。

B. 研究方法

1. エンテロウイルス検査に関するアンケート調査

エンテロウイルス検査に関する調査項目（人員、検体数、搬入法、検査材料、分離法、同定法、遺伝子解析による同定法、検査の品質管理）を整理し、6ブロックレファレンスセンターを通じて2013年12月2

日にアンケートを発出した。なお、回答期限は12月27日とした。

C. 結果

1. アンケート回答機関

九州沖縄(12)、中国四国(10)、近畿(14)、北陸中部(7)、関東甲信静(23)、北海道東北新潟(12)合計78衛生研究所のうちエンテロウイルス検査を行っている67機関から回答を得た。

2. エンテロウイルス検査を担当する人員数(表1)

2-3名以上と回答を得たのは55機関を占めたが1-1.5名のみというは12機関あった。

3. エンテロウイルスに関連する年間検体数(表1)

年間の検体数(概数)が500以上は11機関であり、100-500が32機関、100以下が24機関であった。

4. 検体搬入について(表2)

搬入状況について毎週搬入があると回答のあったのは30機関であり、次いで随時と

回答があったのは18機関であった。

5. 臨床診断名による検査材料(表3, 4)

①無菌性髄膜炎、②ヘルパンギーナ/手足口病、③ポリオ、④その他エンテロウイルス感染が疑われる場合について、複数回答ありとして検査材料を集計したところ、ポリオを除き咽頭ぬぐい液を検査材料として用いる傾向が見られた。

6. ウイルス分離について

ア. ウイルス分離に用いる細胞(表5)

エンテロウイルスに対して感受性の異なる細胞を複数用いているが、多様である。WHO標準法である分離用細胞であるRD-A, L20BのうちRD-A細胞を使用しているのは20機関であった。

イ. 細胞の継代数(表6)

継代の頻度も多様であるが、適宜切り替えと回答のあった機関が多数を占めた。

ウ. ウイルス分離時の培養温度(表6)

33度から37度まで異なる温度で分離が行われている。

エ. 培地の種類(表7, 8)

培地には多くはイーグルMEMが用いられているが、細胞種によって培地を使い分けている機関も見られた。

オ. ポリオウイルス分離用L20B細胞利用状況(表9)

WHO標準法であるRD-A、L20B細胞のうちL20Bは13機関がポリオ分離のため使用しているが、使用していない、保有していないと回答しているのは52機関であった。

カ. 乳のみマウスの利用状況(表9)

乳のみマウスを用いた分離につきルーチン検査、時折実施していると回答のあったのは12機関であった。

7. ウイルス同定法(表10)

ウイルス同定には中和法と塩基配列による方法の併用が51機関と多数を占めた。

8. 塩基配列による同定法

ア. 血清型の同定に用いる方法(表11)

多くの機関が2種類以上の方法/領域を適宜組み合わせ塩基配列解析を行い、同定を行っている。

イ. 塩基配列解析法(表12.13)

エンテロウイルスの塩基配列解析に基づき同定を行う際にBLAST検索を用いるとした機関がほとんどを占め、標準株との相同性(RIVMタイピングサービス含む)に基づき判定していると回答した機関はエンテロウイルス検査を行っている機関の1/3程度であった。

9. 品質管理(表14.15.16)

ウイルス分離・同定検査は約1/4程度、PCR-シーケンスについては約1/3程度の機関が検査に関して何らかの品質管理を行っているという回答を得た。

10. 研修等レファレンスセンターに対する要望(表17, 18)

基盤的な技術(細胞培養、分離同定)への研修要望が多く、次いで遺伝子解析による同定検査に関する研修要望が多い傾向が見られた。

D. 考察

1. 人事異動により十分な技術継承が行なわれていない現状を踏まえ、習得に時間を要するエンテロウイルス検査に関する基盤的な研修(細胞の維持管理、ウイルス分離・同定検査)の実施、及び当該マニュアル整備の必要性が認められた。

2. 遺伝子診断法の研修に関する要望が多いが、技術の質管理(特にPCR、シーケンス)について多くの機関で実施できない状況から、研修を実施する場合は十分考慮する必要がある。

3. VP4-VP2部分領域に基づく遺伝子検査法を実施している機関が多いことから、

VP1 配列データと統合した情報を整備して行く必要性が認められた。

E. 結論

アンケート結果に基づき、①エンテロウイルス検査に関する基盤的技術研修コースの企画、関連するマニュアル整備、次いで、②遺伝子解析法支援のためのデータ整備につき、次年度実施可能性について検討して行く。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 児玉弘美 小菅裕也 山田香織
鈴木智之 小嶋美穂子 石川和彦
井上剛彦 谷口秀美 吉田弘 無
菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出状況 (2013 年) —
滋賀県 IASR Vol. 34 p. 309-310:
2013 年 10 月号

学会発表

国際学会

なし

国内学会

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表1

1. 人員について

①貴研究所でウイルス検査に従事する職員数

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計	57	17	1		回答辞退(3)

②貴研究所でエンテロウイルス検査に従事する職員数について、お答えください。

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計(78)	33	22	9	11	1.5人が3機関

2. 検体数について

貴研究所で年間搬入される大まかな検体数(エンテロウイルスに関連する)について、お答えください。

	検体数					検査を行っていない
	2000以上	2000-1000	1000-500	500-100	100以下	
計(78)	1	3	7	32	24	11

表2

3. 検体搬入について

①検体搬入状況について伺います。

	毎週	隔週	毎月	随時	毎日	その他
計	30	5	5	18	3	

- ・概ね毎週2回
- ・主に6～11月の患者発生時に搬入
- ・4～9月は隔週、10～3月は毎週
- ・季節によって異なり、毎週のときと毎月のときがある
- ・発生動向調査の検体についてエンテロウイルス検査体制を整えており、検体は毎週受け付けていますが、現状無菌性髄膜炎や手足口病、ヘルパンギーナ等の疾患の検体搬入がほぼありません

②検体搬入までの検体保管方法について伺います(複数回答あり)

	冷蔵	冷凍	その他
計	46	31	

- ・搬入までの期間が、1週間以内は冷蔵、1週間以上の場合は冷凍。
- ・病院での保管状態を保つ状態で搬入
- ・使用培地と保存期間により異なる
- ・保健所、病院における保存状態による
- ・咽頭拭い液は冷凍、糞便は冷蔵

表3

4. 検査材料について

①無菌性髄膜炎の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計	66	43		54
				<ul style="list-style-type: none"> ・鼻腔ぬぐい液 ・鼻汁 ・鼻汁、尿 ・記載なし(1) ・この数年のあいだ経験がない ・上記3つを材料としているが、最近無菌性髄膜炎の検体は搬入されていない

②ヘルパンギーナ、手足口病の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	水疱	その他
計	8	24		66	12
					<ul style="list-style-type: none"> ・鼻腔ぬぐい液 ・鼻汁 ・皮膚病巣 ・具体的に依頼なし ・検体が搬入されたことはありません ・うがい液、鼻汁

表4

③ポリオの場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	当所では数年無し
計		8	26	17
				40

④その他エンテロウイルス感染が疑われる場合(発疹、上気道炎、下気道炎、脳炎/脳症など)

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計		44	41	65
				<ul style="list-style-type: none"> ・死亡例において剖検があった場合、関連臓器組織片 ・鼻腔ぬぐい液 ・うがい液、鼻汁、血清 ・血液(2か所) ・具体的に依頼なし ・検体が搬入されたことはありません 鼻汁 血清(2か所) 気管吸引液、血清、直腸ぬぐい液、尿、鼻汁

表5

5. ウイルス分離について

① 分離に用いている細胞について伺います(複数回答可)

	FL	Vero	RD-18s	RD-A	HEp-2	LLC-MK2	Caco-2	Vero E6	Hela	A549	RD	MRC-5	その他
計	12	44	46	20	45	9	18	19	10	6	4	2	
													HEF L20B, Hela229 Vero9013 (2か所) L20B PCRを実施し、ポリオウイルスや脳症からエンテロウイルスが検出された場合に実施 RD-Aについては検討中 HEA1 KB HEF, GMK, LLC-MK2, HMV-II

*検査に分離を行っていないところは無回答

表6

② 分離に用いる細胞の継代数(凍結保存している細胞との入れ替え頻度)について伺います。

	15代	15-30代	適宜切り替え	年に1度	その他
計	1	14	41	5	
					・100代程度 ・MRC-5→10代で切り替えている、その他の細胞→適宜切り替えている ・40代前後

③ 分離の際の培養温度について伺います

	33度	34度	35度	36度	37度	その他
計	8	20	13	11	13	
						・33度(HRVs)及び37度(その他) ・35.5度 ・FL→34度、その他の細胞→37度

表7

④分離に用いる培地について伺います

	イーグル MEM	ダルベッ コMEM	種類で使い分け	
計	44	11		11
			<ul style="list-style-type: none"> ・DMEM: RD-AとVeroE6, イーグルMEM: HEp-2とMRC-5 ・イーグルMEM: Vero, RD-18S, DMEM: VeroE6 ・イーグルMEM: FLとVero, DMEM: RD-18S ・イーグルMEM: FLとRD-18S, DMEM: VeroE6 ・イーグルMEM: Vero, DMEM: RD18s ・DMEM: VeroとRD-18s, イーグルMEM: HEp-2 ・イーグルMEM: HEp-2とHela, DMEM: RD-18S ・DMEM: RD-18S, イーグルMEM: その他の細胞(2か所) ・DMEM: RD-18s, VeroE6, A549, イーグルMEM: HEp-2 ・RD-A, HEp-2, RD, HeLa: イーグルMEM, VeroE6: DMEM 	

表8

⑤培地調製について伺います

	液体培地を 購入	粉末培地を 購入し、調 整している	その他	
計	19	49		
				<ul style="list-style-type: none"> ・基本的に粉末培地だが、MRC-5のみ液体培地を購入 ・HEFのみ粉末 ・液体培地を使用していたが、現在は粉末培地を使用している ・Caco2細胞のみ市販の液体培地を使用

表9

⑥ウイルス分離に用いる資材(プレート、ガラスチューブなど)について伺います

チューブ法 により分離	24穴プ レートを使用	48穴プ レートを使用	96穴プ レートを使用	その他
計	6	42	14	10

・6穴プレートを使用する場合もあり
・スクリーニングは96穴、分離ウイルスを増やす際は24穴使用

⑦ポリオウイルス分離に用いるL20B細胞について伺います

ポリオウイルスの有無を調べるため 使用している	ストックしているが使 用していない	保有していない	
計	13	24	28

⑧乳のみマウスの使用について伺います

ルーチン検査で使用	時折実施	乳のみマウスは用いていない	
計	5	7	51

表10

6. ウイルス同定について(複数回答可)

分離株、臨床材料を用いた場合の同定法について伺います

抗血清によ る中和法の み実施	塩基配列に よる同定の み	中和法と塩 基配列によ る同定の適 宜組み合わせ	乳のみマウス エンテロウイル ス特異的リア ルタイムPCR にてスクリーニ ングし、塩基配 列により同定	その他	
計	1	16	51	6	5

・エンテロウイルスのコンベンショナルRT-PCR法にてスクリーニングのみ実施している(型別不明(NT)で報告)
・CF+中和+シーケンス

表11

7. 塩基配列による同定について

①塩基配列による同定法について伺います(複数回答可)

	CODEHOP- snPCR法	VP4-VP2部分領域をVP1領域を増幅するRT-PCR	VP1領域を増幅するRT-PCR	その他	②CODEHOP法以外にVP1領域を増幅するプライマーをお使いの場合、プライマーの名称(例040,012,011など)について以下列挙ください。
計	38	46	30	1*	<ul style="list-style-type: none"> *187,188,189,011(8か所) *011,012,187,188,040,222(1か所) *187,188,189,222(1か所) *012,040/011,187,188,189/222(3か所) *040,012,011(2か所) *490/492(1か所) 記載なし(4か所) *187,188,189,222,011(2か所) *187,188,189,012,040,011,490,492,222(1か所) *040,012,011(1か所) *040,012,187,188,189,011(2か所) *486,487,488,489,490,492,71/2757F,71/2780R,71/2349,71/3393,UG1,UG11,P1S-VP1S,P1S-VP1A,P2S-VP1S,P2S-VP1A,P3S-VP1S,P3S-VP1A(1か所) *011,012,040,187,188,189,222,490,491,492,493,494(1か所) *189,011(1か所) *012,040,011,187,188,189,222,292,488~497(1か所)

*シーケンサーを保有していないためPCRのみ

表12

8.塩基配列解析法について

①得られた塩基配列を用いてどのように血清型を同定するか伺います(複数回答可)

	BLAST検索でオランダRIV 標準株との相同性 上位に現れた Mのエンテロ (VP1領域の塩基 ものを血清型 ウイルスタイプ配列で75%以上— その他 として報告してングサービス 致)に基づいて同定 いる を用いている している		
計	58	18	14
			<ul style="list-style-type: none"> ・VP4-VP2部分領域について標準株との相同性に基づき同定 ・FASTA検索で上位に現れたものを血清型として報告している。 The European Bioinformatics Instituteのサービスを利用 ・標準株を使用した系統樹解析による分類

表13

②塩基配列解析に用いるソフトウェアについて伺います(複数回答可)

	DNASIS	MEGA	BioEdit	Genetyx	その他
計	4	35	3	14	Clustal X, SeqConv 外注しているため不明 Finch Sequencher (2か所) DNA Dynamo CEQ8000(BECKMAN COULTER) BioNumerics チュートリアルVer6.5 イン フォコム株式会社 ChromasPro

表14

9. 品質管理について

③ウイルス分離・同定検査に関する品質管理

	特に実施していない	実施している (具体的な事項についてお答えください。細胞、試薬等)
計	57	10
具体例		<ul style="list-style-type: none"> ・コンタミネーションのチェック ・細胞、培地添加用牛胎児血清、対照ウイルス標準株 ・細胞台帳の作成 ・培養細胞は15代継代後、廃棄している ・ロット毎に非感染細胞(陰性対照)を置いている。 ・ウイルス分離の際に、同一プレート上に陰性コントロールをおき併せて観察する ・保存細胞を使用する際には必ずマイコプラズマのチェックを行っている。 ・温度・湿度・期間の管理 ・細胞の維持継代は定期的実施する。 ・GLPに基づき管理している。(例: 試薬及び試液管理簿による使用期限等の管理、ウイルス分離台帳による保管状況の確認)

表15

④PCR、シーケンスに関する品質管理

	特に実施していない	実施している(具体的な事項についてお答えください)(機器、コントロール等)
計	42	26

- ・機器については、シーケンサーは、業者との保守点検契約により、年1回の定期点検を実施。PCRについては、点検等は行っていない。また、コントロールや試薬に関する品質管理は特に行っていない。
- ・コンタミネーションのチェック
- ・機器、コントロール
- ・検査ごとに1点ずつ陽性・陰性コントロールを置いている。
- ・定期的な保守点検(シーケンサー)
- ・PCR時 陰性・陽性コントロールを置いている。
- ・機器は業者による保守点検を実施
- ・PCR実施時は陰性・陽性コントロールをおいている
- ・PCR検査等において使用する試薬等の使用期限の確認。リアルタイムPCRについて試薬キットによるキャリブレーションを年2回実施
- ・PCRに関して内在コントロールを置くようにしたところである。
- ・PCRでは、反応毎に陽性対照、陰性対照を設置している。
- ・陽性および陰性コントロールを併せて実施する
- ・サーマルサイクラーの定期点検、実施時の陽性、陰性コントロールの検出
- ・サーマルサイクラー、DNAシーケンサーについては年1回の保守点検を行っている
- ・PCRについては、ポジティブコントロールを使用
- ・機器の保守点検、検査毎にコントロールを同時測定
- ・検査毎にコントロールを置いている。機器については定期的に洗浄等をしている
- ・定期的な点検及びメンテナンス
- ・機器の保守点検
- ・機器類の定期点検、陽性及び陰性コントロールの同時検査
- ・シーケンサーのみ実施(年1回の業者による保守点検)
- ・GLPに基づき管理している。(例: 機器類の日常及び定期点検等)
- ・シーケンサーについては、年1回の定期点検を実施
- ・保守点検
- ・機器
- ・シーケンサーのみ行っている(年1回、メーカー標準品を用いたキャリブレーション)

表16

⑤SOP(標準作業手順書)の有無

	独自に作成している	特に作成していない
計	16	52

⑥検査手順を記載したものの有無(検査ごとの実験ノート等、方法・結果等記載したもの)

	独自に作成している	特に作成していない
計	60	3

表16

10.研修に関する要望(原文のまま)

<ul style="list-style-type: none"> ・PCR,シーケンス,ウイルス分離+中和法 ・細胞培養における基本的操作法と、当センターはシーケンサーを保有していませんが、その使用法や解析方法の研修があれば幸いです。また、エンテロウイルス検査法として、きちんと研修を受けた経験もないので、せめて検査法全般(基本的操作も含め)に対するスタンダードマニュアルがあれば、と常々感じております。現在はかなり以前の担当者が独自に作成したマニュアルをもとに検査を実施しているのが現状です。 ・抗血清による中和法による分離株同定やヒト血清中抗体検出法など、エンテロウイルスの血清学的検査法 ・塩基配列からのウイルス同定の際の注意点、解析方法等 ・細胞の継代方法、それぞれのウイルスに特徴的なCPEの形態と判定について ・ウイルス分離及び中和法による同定 ・いろいろな細胞を使用した、ウイルス分離・同定をしてほしい。 ・細胞培養法、中和血清による同定法 ・CODEHOP法 ・ウイルス分離株の中和による同定法 ・ポリオウイルスの野生株とワクチン株を識別するための手法の習得 ・検査法(細胞培養、PCR等)に関する技術的研修 ・ウイルス分離の技術研修を実施していただきたい。 ・古典的な中和試験による同定法 ・中和法と塩基配列による同定結果の解釈について ・細胞培養、CPEの確認、同定方法(中和試験、PCR、シーケンス、解析など) ・中和法の経験者が少ないので、中和法の実習をして欲しい

- ・若い人が急増しているので分離、同定特に中和などの研修を実施していただくと大変ありがたいです。
- ・中和反応、遺伝子解析の手順
- ・ウイルス分離、同定方法などの研修を数年毎にでも行っていただくと、職員が代わりた際など非常に助かる。
- ・Rhinovirusの検査意義および重要性について
- ・新しい知見に関する研修の実施を希望します
- ・エンテロウイルスは型ごとに細胞感受性が異なるため、無菌操作、ウイルス分離同定作業を行うためには慣れが必要であると考えます。また、無菌性髄膜炎や脳炎、麻痺については、エンテロウイルス以外の病原体が原因となることもあるため、鑑別診断する必要のある病原体(ムンプスウイルスやヘルペスウイルス、日本脳炎ウイルスなど)の検査についても、研修が必要であると思います。
- ・現在、マンパワーを理由に検査を実施していませんが、どのような過程があるのか一通り研修できる機会があればありがたいです
- ・CODEHOP法がよくわからないので研修していただきたいです。
- ・マニュアルに基づいたスタンダードな分離培養及び遺伝子検出法と検出率を上げるための工夫等について
- ・CODEHOP-snpPCR法、系統樹解析の実習
- ・塩基配列による同定法について、どの部位を解析するのがよいか、血清型の同定についてなど研修の機会があればと思います
- ・細胞培養法、ウイルス分離法、及び中和・塩基配列による同定法に関する基礎研修
- ・分離試験、中和検査、PCR法、遺伝子解析
- ・エンテロウイルスに限らず、分離培養に関する基礎的手技、知識
- ・シークエンス及び系統樹作成に関すること

表16

11. エンテロレファレンスセンターへの要望、或いは日常の検査で困っていることを自由に記入願います(以下原文のまま)。

- ・当所に異動してくる職員のほとんどは、ウイルス検査等の知識や経験、技術を持たないこと、3~5年で異動をしてしまうことから、稀な事例(例えば、エンテロウイルスの場合のポリオ)については、全く経験者がいない状況に陥る可能性があります。また、通常ルーチンで行っている検査と比較して高度な内容が要求される場合、単独で解決困難なこともあると思われます。そのような状況があったとき、検査技術等で気軽にご相談させていただいたり、場合によっては職員の研修を受け入れていただく等が可能であれば、大変心強く思います。
- ・当センターはシークエンスを保有しておりませんので、ウイルス型別同定を中和試験に頼っており、細胞の維持と抗血清の入手がネックになっております。ですので、エンテロウイルス培養においてよく用いられる細胞の分与の機会、あるいはその案内があると、大変ありがたいです。また、中和試験用抗血清につきましても同様に思います。こちらも当センターの事情ということで大変申し訳ないのですが、人事異動が頻繁ということもあり、レファレンスセンターや感染研にどういった抗血清を分与していただけるのか分からないのが現状です。例えば、ヒトノロウイルス1-3の抗血清なども分与いただけるのでしょうか？基本的な質問になり、申し訳ありません。
- ・VP4領域とVP1領域の塩基配列による同定を行い、それぞれ異なるエンテロウイルスと同定された場合の評価。重複感染と考えるべきか、VP1領域の結果のみを採用するべきか。
- ・各地衛研では、どのようにエンテロウイルスの同定を行っているのか教えていただきたい。
- ・中和抗血清の将来にわたり持続的に供給されるかが不安である。
- ・分離培養と遺伝子検査の棲み分けについて
- ・エンテロウイルスの同定は、ほとんどを遺伝子検査で実施しており、一部を中和で実施している状況です。ウイルス分離同定はウイルスによっては難しいものもあり、苦勞しています。ウイルス分離に関する情報を迅速にいただけたらと思います。

- コクサッキーA群に感受性の高い細胞を分与して欲しい
- 当所は現在エンテロウイルス検査を実施しておりませんが、保健所が行政検査が必要と判断した場合にウイルスのPCR検査・シーケンス検査の依頼がありますので、もしエンテロウイルスを検査してなくても研修参加が可能であれば参加したいです。
- エンテロウイルスに限ったことではないのですが、この病原体は、〇〇先生、といった感染研の担当者の一覧表みたいなものがあるとよいのではと常日願っています。
- 抗ポリオウイルス抗体価の低い職員へのIPV接種要否に関する情報がほしい。
抗HPeV-3血清について、感染研で分与できるシステムを作ってほしい。
- 近隣県でどのようなウイルス種が分離・検出されているか相互に共有できると、同定がよりスムーズに行えるのではと思います。
- 手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等について、感染症発生動向調査病原体検査の検体がなかなか集まらず、地域におけるウイルスの流行状況の把握が難しいため、困っています。
- ここ数か月で、シーケンスで型別ができないエンテロウイルスが何検体分か出てきているので、的確な型別法をご教授願いたいです。
VP4-VP2領域の参照株配列を集めたものがあるようでしたらいただけたいでしょうか。
- 頻繁に人事異動があり、検査技術の引継ぎが100%できるか不安である
- CODEHOP-snpPCR法での感度が低い為、型別不明になってしまう事例が多い。
- 分離ができなかった検体について、PCRでもVP1領域の増幅が困難です
- 当所では、臨床検体から抽出した遺伝子についてCODEHOP法を用いています。本来、370bpを読めるところ、300bp程度しか読めていません。370bp読むには、テクニックが必要であると聞きましたので、是非、御指導ください。
- 臨床検体からVP1遺伝子全長を検出できる高感度PCR法が構築されるとありがたいです
- エンテロの血清型により、プライマーによって反応性の良いもの、悪いものがあるというが、分かる範囲でその情報提供して欲しい

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」
班
分担研究報告書
麻疹・風疹

研究分担者	竹田 誠	国立感染症研究所	ウイルス第三部
研究協力者	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
	麻疹風疹レファレンスセンター		
	長野秀樹	北海道立衛生研究所	
	青木洋子	山形県衛生研究所	
	小川知子	千葉県衛生研究所	
	七種美和子	横浜市衛生研究所	
	児玉洋江	石川県保健環境センター	
	皆川洋子	愛知県衛生研究所	
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	
	村田祥子	山口県環境保健センター	
	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所	
	加藤峰史	沖縄県衛生環境研究所	

研究要旨 麻疹や風疹を確実に診断するためには、臨床症状、血液生化学検査、疫学情報などの他に、ウイルス学的実験室検査が重要である。麻疹・風疹に関しては、ウイルスに対する抗体を検出する血清学的検査、ならびにウイルスを検出する核酸増幅法が主に利用されている。これまで核酸増幅法では、主に逆転写（RT）反応とnested PCRを組み合わせた方法（コンベンショナルRT-nested PCR法）が用いられてきたが、クロスコンタミネーションの回避や、手技の簡素化のためにリアルタイムRT-PCR法の導入が求められてきた。そこで、本研究では、麻疹・風疹それぞれのリアルタイムRT-PCR法の開発と評価を行った。麻疹・風疹レファレンスセンター10施設の協力のもとで研究を実施し、麻疹用・風疹用リアルタイムRT-PCR法ともに概ね良好な結果を得た。従来の、コンベンショナルRT-nested PCR法との特性の違いを理解した上で、本法を今後、麻疹・風疹の検査診断に活用できると考えられる。

A. 研究目的

麻疹・風疹それぞれのリアルタイム RT-PCR 法の開発

B. 研究方法

リアルタイム RT-PCR 法の詳細については、資料 1 ならびに資料 2 に示した。

C. 研究結果

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR について

10 カ所の麻疹・風疹レファレンスセンターで実施した計 33 回の検量線解析の結果を分析した。「slope が -3.1 から -3.8 の間であること」、「 R^2 値が 0.98 以上であること」および「 5×10^2 コピー/反応が $Ct=40$ 以内で検出されること」の 3 つの基準のうち、「 R^2 値が 0.98 以上であること」、「 5×10^2 コピー/反応が $Ct=40$ 以内で検出されること」は全ての試験で満たしていた。「slope が -3.1 から -3.8 の間であること」も、 $32/33 = 97.0\%$ で満たしていた。以上の結果より、ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であると判断できた。手順書と同様の機器・試薬で試験を行った 4 施設（12 回の検量線解析）とその他の 7 施設（21 回の検量線解析）を比較したところ、前者の方が感度および特異度が高い可能性が示唆された（表 1）。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR について

段階希釈した参照 RNA を各麻疹風疹レファレンスセンターにおいて 3 回の測定を実施した（試験数 $n=33$ ）。 Ct 値 40 以下で検出された最大希釈液の濃度を検出限界コピー数として集計したところ、5～

500 コピー/反応の範囲であった（図 1）

（注：1 試験において、5 コピーと 0.5 コピー間で容量依存性が認められなかったため、0.5 コピーの結果を除外した）。そのうち、5 コピー/反応が 33 試験中 24 件と最多であった。検出限界コピー数の平均 Ct 値は 37.6 ± 1.8 であった。

レファレンスセンター C では ABI Taqman Fast Virus 1-step master mix と QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit を使用して感度の比較が行われたが、両者で感度の差は認めなかった。レファレンスセンター A でも 4 種類の試薬（上記 ABI と QIAGEN キットに加え、Invitrogen 社 SuperScript III platinum One-step Quantitative RT-PCR system および Roche 社 LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes）を使用して比較が行われたが、感度の差はなかった。全施設の集計結果においても使用試薬による明らかな感度の差は認められなかった（検討に使用された機器と試薬を表 2 に示した）。

参照 RNA の検出限界コピー数までの希釈段階の測定結果（試験数 $n=33$ ）から作成した検量線の slope は、平均 -3.431 ± 0.222 であり、理想的な PCR 反応で得られる slope -3.32 と同等であった。検量線の R^2 値の平均は 0.994 ± 0.005 であり、基準となる 0.98 を十分に満たしていた。

各レファレンスセンターにおいて、安定して Ct 値 40 未満で検出可能な風疹参照 RNA の希釈段階の一点を陽性コントロールとして設定して頂いた。設定された陽性コントロールの濃度は、5 コピー/反応（3 施設）、50 コピー/反応（5 施設）、500 コピー/反応（2 施設）であった。平

均 Ct 値は、5 コピー／反応で 38.1 ± 1.2 、50 コピー／反応で 34.6 ± 1.8 、500 コピー／反応で 35.2 ± 0.5 であった。

D. 考察

麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法において、陰性対照でも $Ct \leq 40$ で検出される場合が存在した。試験系を比較した結果、この問題は試薬と機器の組み合わせにより起こった可能性が高いと推測できた。今後、本評価の際に各施設で用いられた試薬や機器、反応条件等の情報を共有することで、この問題は解決しうると考えられる（表 3 および表 4）。

麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法による検出限界コピー数は、麻疹参照 RNA（遺伝子型 1a ウイルス由来）を用いた検討によって、概ね 5～50 コピー／反応であることが分かった。この値は、コンベンショナル RT-nested PCR 導入前にレファレンスセンターにおいて同一の麻疹参照 RNA を用いて検討して頂いた検出限界 2～20 コピー／反応（麻疹共通法の場合）と大きな差はなかった。今後、臨床検体を用いた検証が必要である。

E. 結論

本麻疹風疹リアルタイム RT-PCR 法はコンベンショナル RT-nested PCR と比較して感度が低い可能性があるものの、簡便性、迅速性、実験室コンタミネーションの危険性回避の観点から考えるとその導入は必要且つ有益であると考えられる。今後、臨床検体を用いた解析を進めて行く。いずれにせよ、従来のコンベンショナル RT-nested PCR との特性の違いを理解しつつ、レファレンス活動の現場で積極的に活用していくことが望ましい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009-2011、病原体検出情報 34(2);36-7. (2013)
2. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠、2012 年の海外の麻疹情報、病原体検出情報 34(2);24-5. (2013)

学会発表

1. 駒瀬勝啓（シンポジウム）、麻疹、風疹ウイルスと検査診断について、第 26 回公衆衛生情報研究協議会、研究会 沖縄 2013 年 1 月 24 日～25 日
2. 竹田誠、栃木県小児科医会、小山地区医師会講演会 わが国の麻疹風疹対策-麻疹風疹検査診断と注意点 世界の麻疹風疹事情と日本の取り組み 2013 年 2 月 19 日
3. 竹田誠、第 33 回広島小児アレルギー研究会 麻疹の国内、世界最新事情-流行、ワクチン、研究 2013 年 2 月 21 日
4. 竹田誠、国立感染症研究所 FETP 講義 ウイルス感染症（麻しん風しんを中心に）2013 年 4 月 8 日
5. 竹田誠（監修）知ってほしい麻しん、風しん Q & A （改訂版）2013 年 3 月 25 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1：試験法の違いによる、試験の感度および特異度の比較（麻疹検出用リアルタイム RT-PCR）

	手順書と同じ 4 施設	その他の 7 施設
5 コピーが検出不可 (Ct>40)	0/12=0%	9/21=42.9%
水でも検出 (Ct<40)	0/12=0%	4/21=19%
0.5 コピー以下が検出可能 (Ct<40)	1/12=8.3%	9/21=42.9%

表 2：検討に使用された機器、試薬（風疹検出用リアルタイム RT-PCR）

使用機器

機器名	使用研究所数
ABI 7500 Fast Real-time PCR system	5
ABI 7500 Real-time PCR system	1
ABI Step One Plus	1
ABI Step One	1
Roche Light Cycler 480 system II	1
Roche Light Cycler 480	1

使用試薬

機器名	使用研究所数
ABI Taqman Fast Virus 1-step master mix	6*
QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit	4*
TakaraBio One Step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)	1

*1 施設では参照品を用いた感度解析には両キットが使用されたが、検体の解析にはABI Taqman Fast Virus 1-step master mix のみを用いている。

表 3: 良好な結果が得られた試薬・機器の組み合わせ (麻疹検出用リアルタイム RT-PCR)

機器	試薬
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI 7500 Fast	One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)
Roche LightCycler 480 system II	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI stepOne Plus	QuantiTect Probe RT-PCR kit

表 4: 今回、問題があると考えられた試薬・機器の組み合わせ (麻疹検出用リアルタイム RT-PCR)

機器	試薬
Roche LightCycler 480	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI stepOne Plus	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix

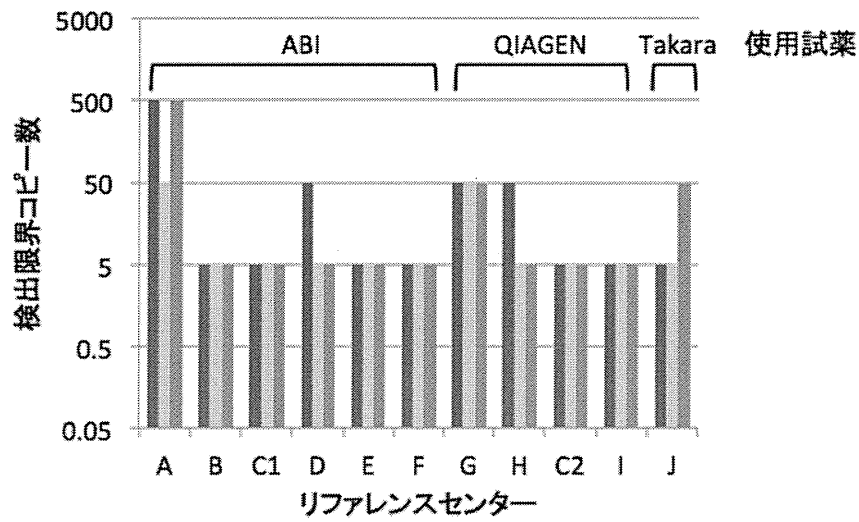


図1 風疹検出用リアルタイム RT-PCR の検出限界

段階希釈された風疹参照 RNA を用いて、風疹ウイルス遺伝子検出リアルタイム PCR を実施し、Ct 値 40 未満で検出された最高希釈濃度を検出限界とした。

Real-time RT-PCR 法による麻疹ウイルス N 遺伝子の検出

1. 概要

TaqMan プローブを用いた Real-time RT-PCR による麻疹ウイルス N 遺伝子の検出法について述べる。本方法を行う際は、陽性コントロールとして *in vitro* 転写により作製されたスタンダード RNA を用いる。陰性コントロールとして水および水を検体として RNA 抽出を行ったサンプル (RNA 抽出の陰性コントロール) を用いる。ここでは、クロスコンタミネーションの起こる可能性を最小限にするために、RT 反応と Real-time PCR 反応を同ウェル上で行う 1-step Real-time RT-PCR 法について記載するが、RNA 抽出後、先に RT 反応を行い合成した cDNA を用いて同様の試薬・手順で Real-time PCR のみを行う事も可能である。ここでは、アプライドバイオシステムズ社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。

2. 主な試薬・機器

ウイルス RNA 抽出キット (例: Qiagen Viral RNA mini kit ; キアゲン社)

Real-time RT-PCR 用マスターミックス (例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix ; アプライドバイオシステムズ社)

マイクロピペット (各容量のもの)

フィルター付きピペットチップ (上記のマイクロピペットに対応したもの)

1.5ml エッペンドルフチューブ

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate (例: Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL); アプライドバイオシステムズ社)

プレートシール (例: Optical Adhesive Covers; アプライドバイオシステムズ社)

遺伝子増幅装置 (例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム; アプライドバイオシステムズ社)

RNase free 水

N 遺伝子増幅用プライマーおよび検出用プローブ

• Forward Primer (MVN1139F): 5' TGGCATCTGAACTCGGTATCAC 3' (10 μ M)

• Reverse Primer (MVN1213R): 5' TGTCTCAGTAGTATGCATTGCAA 3' (10 μ M)

• Probe (MVNP1163P): 5' FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGA-TAMRA 3' (6.25 μ M)

陽性コントロール

・スタンダード RNA (乾燥状態; 12 μ l に溶かして 10^7 コピー/ μ l) (RNA 保護剤として RNastable™ 添加)

3. 手順

3-1 スタンダード RNA を用いた試験の最適化

3-1-1 スタンダード RNA の希釈

- ① 乾燥状態のスタンダード RNA に、12 μ l の RNase free 水を加え、 10^7 コピー/ μ l の溶液を作製する。
RNase free 水を加えた後、15 分間ほど室温に放置してから、泡立てないようにマイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングを行い、溶解する。spin down して 4°C におく。
- ② チューブ 9 本に 90 μ l の水を分注し、「 5×10^6 」「 5×10^5 」「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」とラベルする。
- ③ 10^7 コピー/ μ l のスタンダード RNA 10 μ l を、「 5×10^6 」チューブに加え、マイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングで攪拌し、spin down する (5×10^6 コピー/ 5μ l となる)。
- ④ 「 5×10^6 」チューブの 10 μ l を「 5×10^5 」チューブに加え、軽く攪拌し spin down する。
- ⑤ ④と同様に、「 5×10^5 」から「 5×10^4 」、「 5×10^4 」から「 5×10^3 」と移していき、「 5×10^{-2} 」までの 10 倍段階希釈を作製する。
- ⑥ 「 5×10^6 」、「 5×10^5 」チューブは今回の最適化には使用しない。「 5×10^6 」は 10 μ l ずつに分注後、-70°C 以下で保存し、「スタンダード RNA (5×10^6 コピー/ 5μ l)」として、次回以降の最適化に用いる。その際は、上記の④以降の希釈を行う。

3-1-2 反応液の調製 (以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

- ① プライマー 2 種類、プローブ、4 \times TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。
- ② 氷上にチューブを置き、別紙 1 に従って、9 ウェル分の反応液を調製する。(プライマーの終濃度が 400nM、プローブの終濃度が 250nM となる。)
- ③ 96well reaction plate の 8 ウェルに、② を 15 μ l ずつ分注する。(配置は別紙 2 を参照)
- ④ 別紙 2 に従い、水および 3-1-1 で作製したスタンダード RNA (« 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」の 7 種類) を 5 μ l ずつ対応するウェルに加える。
- ⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- ⑥ Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

Assay: 「Absolute Quantification (Standard Curve)」

Run Mode: 「Standard 7500」

Reporter: FAM、Quencher: TAMRA

50°C で 5 分、95°C で 20 秒インキュベートした後、95° C 15 秒、60° C 1 分を 50 サイクル

3-1-3 データ解析

独立した3回の試験を実施し、以下の4つの基準を満たしていることを確認する。

- ① 段階希釈したスタンダードRNAで作製した検量線のslopeが-3.1から-3.8の間であること。
(1 サイクルで2 倍の DNA 断片に増幅する理想的な PCR 反応の場合、slope は-3.32 になる。)
- ② 段階希釈したスタンダード RNA で作製した検量線の R^2 値が 0.98 以上であること。
- ③ 5×10^1 コピー/反応のスタンダード RNA が $Ct \leq 40$ で検出されること。
- ④ 陰性コントロールである水が陰性 ($Ct > 40$) であること。

ただし、検量線は $Ct \leq 40$ で検出できた希釈までで作製する(通常、 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応)。これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。

3-2 検査の実施

3-2-1 ウイルスRNA抽出

ウイルスRNA(vRNA)の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体としてRNA抽出を行い、RNA抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出RNAは、 -80°C (-70°C 以下が望ましい)で保存する。

3-2-2 陽性コントロールの調整

5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の二点を陽性コントロールとして使用する。 5×10^0 コピー/反応が $Ct \leq 40$ の場合は 5×10^0 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に使用し、 5×10^0 コピー/反応が $Ct > 40$ の場合のみ 5×10^1 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に用いる。コンタミを避けるため、高濃度のスタンダードRNAを希釈する作業は3-2-3とは別の場所で行う。

3-2-3 Real-time RT-PCR 法による N 遺伝子の検出

まず、別紙 3~4 に必要事項を記入の上、必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール(水)、②RNA 抽出の陰性コントロール(水を検体として RNA 抽出したもの)、③陽性コントロール(スタンダード RNA、 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応)の3種類(4 サンプル)である。反応液の調整および反応条件は 3-1-2 と同様に行う。ただし、判定には $Ct=40$ までしか使用しないので、サイクル数を 50 サイクルから 40 サイクルに変更可能とする。

4. 試験成立条件

陰性コントロール(水、水を検体として RNA 抽出したもの)が陰性であり、陽性コントロール(5×10^1 コピー/反応)が $Ct \leq 40$ となった場合に試験が成立する。

5. 判定

3-2-2 に従って、判定に用いる陽性コントロールを選択する。検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」、Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断する。ただし、Real-time RT-PCR では PCR 産物のサイズ等を確認できないことから、判定には十分注意する。特に陽性と判断した場合は、従来の nested-PCR 法による増幅および増幅産物のシーケンスを必ず行う。陰性と判断する場合も 2 回以上の独立した Real-time RT-PCR を行う事が望ましい。判定保留の場合には、従来の nested-PCR 法等を行い、判定を行う。

6. トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は 3-1 を参照して試験系の再評価を行う。

別紙 1

スタンダード RNA を用いた試験系の最適化

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
スタンダード RNA (7 段階希釈)	7	
合計	8	
合計+1(反応数)	9	

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.6	68.4	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5	45	1 ×
MVN1139F (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVN1213R (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVNP1163P (6.25μM)	0.8	7.2	250nM
	15	(15 × 8 ウェル)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

Reporter: FAM, Quencher: TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50 cycle	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

別紙 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	水											
B	5×10^4 RNA	5×10^3 RNA	5×10^2 RNA	5×10^1 RNA	5×10^0 RNA	5×10^{-1} RNA	5×10^{-2} RNA					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

別紙 3

麻疹 N 遺伝子 Real-time RT-PCR 法

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
	1	水から RNA 抽出したもの
陽性コントロール	1	スタンダード RNA 5×10^0 コピー/反応
	1	スタンダード RNA 5×10^1 コピー/反応
検体数		
合計		
合計+1(反応数)		

	1 反応あたり(μ l)	必要量(\times 反応数)	終濃度
水	7.6		
4 \times TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5		1 \times
MVN1139F (10 μ M)	0.8		400nM
MVN1213R (10 μ M)	0.8		400nM
MVNP1163P (6.25 μ M)	0.8		250nM
	15	(15 \times 合計)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

Reporter: FAM, Quencher:

TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	40 (or 50) cycle	95 °C	15sec
		60 °C	1min

別紙 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Real-time RT-PCR 法による風疹ウイルスゲノムの検出

1. 概要

TaqMan プローブを用いた Real-time RT-PCR による風疹ウイルスゲノムの検出法について述べる。本方法を行う際は、陽性コントロールとして in vitro 転写により作製された風疹参照 RNA を用いる。陰性コントロールとして水および水を検体として RNA 抽出を行ったサンプル (RNA 抽出の陰性コントロール) を用いる。ここでは、アプライドバイオシステムズ社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。他の試薬および機器を用いる場合には各施設で条件設定を行う必要がある。

本 Real-time RT-PCR 法は、麻疹ウイルス N 遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法と同じ反応条件 (温度および反応時間) であることから、同一のプレートで並行して実施することが可能である。

2. 主な試薬・機器

ウイルス RNA 抽出キット (例: Qiagen Viral RNA mini kit ; キアゲン社)

Real-time RT-PCR 用マスターミックス (例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix ; アプライドバイオシステムズ社)

マイクロピペット (各容量のもの)

フィルター付きピペットチップ (上記のマイクロピペットに対応したもの)

1.5ml エッペンドルフチューブ

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate (例: Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL); アプライドバイオシステムズ社)

プレートシール (例: Optical Adhesive Covers; アプライドバイオシステムズ社)

遺伝子増幅装置 (例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム; アプライドバイオシステムズ社)

RNase free 水

プライマーおよび検出用プローブ

プライマーミックス^{注1}

NS(32-54)Fwd: 5' - CCTAHYCCCATGGAGAACTCCT -3' (10 μ M)

NS(143-160)Rev: 5' - AACATCGCGCACTTCCCA -3' (10 μ M)

注1 : Fwd と Rev の 10 μ M Mix を RNase-free の滅菌チューブ等に分注し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。

プローブ^{注2}

NS (93-106) Probe: 5' FAM-CCGTCGGCAGTTGG-MGB 3' (10 μ M)

注2：10 μ M に調製したものを RNase-free の滅菌チューブ等に分注し、凍結融解を数回以内に抑えて使用する。麻疹ウイルス N 遺伝子検出用プローブとはクエンチャーの種類が異なることに注意。

陽性コントロール

・風疹参照 RNA (従来の nested PCR に用いているもの)^{注3}

注3：以前配布した風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) を使用し、以下の試験の最適化および使用濃度の決定を行う。充分量がない場合には国立感染症研究所ウイルス第三部 森までご連絡下さい。

3. 手順

3-1 風疹参照 RNA を用いた試験の最適化

遺伝子増幅装置の機種や Lot. によって検出感度がわずかに異なることがあるので、各施設において試験系を設定する前に必ず行う。

3-1-1 風疹参照 RNA の希釈

- ① 風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) を氷上で溶解した後 vortex し spin down しておく。
- ② チューブ 1 本に 95 μ L の水 (あるいは RNA 希釈用バッファー: 例タカラバイオ EASY Dilution for Real Time PCR) を分注し、「5 \times 10⁴」とラベルする。
- ③ チューブ 6 本に 90 μ L の水 (あるいは RNA 希釈用バッファー: 例タカラバイオ EASY Dilution for Real Time PCR) を分注し、「5 \times 10³」「5 \times 10²」「5 \times 10¹」「5 \times 10⁰」「5 \times 10⁻¹」「5 \times 10⁻²」とそれぞれラベルする。
- ④ 風疹参照 RNA の原液 (1 \times 10⁶ コピー/5 μ L) 5 μ L を、「5 \times 10⁴」チューブに加え、vortex し spin down する (5 \times 10⁴ コピー/5 μ L となる)。
- ⑤ 「5 \times 10⁴」チューブの 10 μ L を「5 \times 10³」チューブに加え、vortex し spin down する。
- ⑥ ⑤と同様に、「5 \times 10³」から「5 \times 10²」、「5 \times 10²」から「5 \times 10¹」と移していき、「5 \times 10⁻²」までの 10 倍段階希釈を作製する。
- ⑦ 「5 \times 10⁴」は 20 μ L ずつに分注後、-70 $^{\circ}$ C 以下で保存し、「風疹参照 RNA (5 \times 10⁴ コピー/5 μ L)」として、次回以降の最適化に用いる。その際は、上記の⑤以降の希釈を行う。

3-1-2 反応液の調製 (以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

- ① プライマーミックス、プローブ、4 \times TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。
- ② 氷上にチューブを置き、別紙 1<風疹>に従って、9 ウェル分の反応液を調製する^{注4}。

注4：プライマーの終濃度が 900nM、プローブの終濃度が 250nM となる。プライマー濃度は麻疹 Real-Time

RT-PCR と異なる。

- ③ 96well reaction plate の 8 ウェルに、② を 15 μ l ずつ分注する。(配置は別紙 2<風疹>を参照)
- ④ 別紙 2<風疹>に従い、水および 3-1-1 で作製した風疹参照 RNA (「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」の 7 種類) を 5 μ l ずつ対応するウェルに加える。(5 $\times 10^4$ ~ 5 $\times 10^{-2}$ コピー/反応となる)
- ⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- ⑥ Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

Assay: 「Absolute Quantification (Standard Curve)」

Run Mode: 「Standard 7500」

Reporter: FAM、Quencher: none ^{注5}

50°C で 5 分、95°C で 20 秒インキュベートした後、95° C 15 秒、60° C 1 分を 50 サイクル

注 5: 風疹ウイルスゲノム検出用プローブは非蛍光クエンチャーを標識しているため、TAMRA を標識した麻疹ウイルス N 遺伝子検出用プローブとは設定が異なる。Reporter および Quencher はウェル毎に設定できる。

3-1-3 データ解析

独立した3回の試験を実施し、以下の3つの基準を満たしていることを確認する。

- ① 段階希釈した風疹参照RNAで作製した検量線のslopeが-3.1から-3.8の間であること。
(1 サイクルで 2 倍の DNA 断片に増幅する理想的な PCR 反応の場合、slope は-3.32 になる。)
- ② 段階希釈した風疹参照 RNA で作製した検量線の R^2 値が 0.98 以上であること。
- ③ 5×10^1 コピー/反応の風疹参照 RNA が $Ct \leq 40$ で検出されること。
- ④ 陰性コントロールである水が陰性 ($Ct > 40$) であること。

ただし、検量線は $Ct = 40$ 以内で検出できた希釈までで作製する(通常、 5×10^1 ~ 5 コピー/反応)。

これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。それでも問題が解決されない場合には国立感染症研究所ウイルス第三部第二室 森 嘉生 (yoshiom@nih.go.jp) にご連絡下さい。

3-2 検査の実施

3-2-1 ウイルスRNA抽出

ウイルスRNA (vRNA) の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体としてRNA抽出を行い、RNA抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出RNAは、-80°C (-70°C以下が望ましい) で保存する。

3-2-2. 風疹参照RNAの調整

5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の参照RNA希釈液二点を陽性コントロールとして使用する。 5×10^0 コピー/反応が $Ct \leq 40$ の場合は 5×10^0 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に使用し、 5×10^0 コピー/反応が $Ct > 40$ の場合のみ 5×10^1 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に用いる。状況に応じて濃度を変更できるが、高濃度参照RNAは 5×10^1 コピー/反応を越えないようにする。コンタミを避けるため、高濃度の風疹参照RNAを希釈する作業は3-4とは別の場所で行い、分注して -70°C 以下で保存する。

3-2-3 Real-time RT-PCR 法による風疹ウイルスゲノムの検出

まず、別紙 3~4<風疹>に必要事項を記入の上、必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール(水)、②RNA抽出の陰性コントロール(水を検体としてRNA抽出したもの)、③陽性コントロール二点(原則として 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応の風疹参照RNA)の4つである。反応液の調整および反応条件は3-1-2と同様に行うが、判定には $Ct=40$ までしか使用しないので、PCR反応サイクル数は40-50の範囲で変更が可能とする。

4. 試験成立条件

陰性コントロール(水、水を検体としてRNA抽出したもの)が陰性であり、陽性コントロール(5×10^1 コピー/反応)が $Ct \leq 40$ となった場合に試験が成立する。

5. 判定

3-2-2に従って、判定に用いる陽性コントロールを選択する。検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が40以下の場合に「判定保留」、 Ct 値が40より大きい場合に「陰性」と判断する。判定保留の場合には、従来の nested-PCR法(NS領域増幅 RT-PCR)等を行い、判定を行う。

6. トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は3-1を参照して試験系の再評価を行う。

別紙 1<風疹>

風疹参照 RNA を用いた試験系の最適化

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
風疹参照 RNA (7段階希釈)	7	
合計	8	
合計+1(反応数)	9	

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.7	69.3	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5	45	1 ×
プライマーミックス (10μM)	1.8	16.2	900nM
NS (93-106) Probe (10μM)	0.5	4.5	250nM
	15	(15 × 8 ウェル)に分注	
サンプル	5		
	20		

Reporter: FAM、Quencher: None

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50cycle	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

別紙 2<風疹>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	水											
B	5×10^4 RNA	5×10^3 RNA	5×10^2 RNA	5×10^1 RNA	5×10^0 RNA	5×10^{-1} RNA	5×10^{-2} RNA					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

別紙 3<風疹>

風疹ウイルスゲノム検出 Real-time RT-PCR 法

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	2	水 水から RNA 抽出したもの
陽性コントロール(高濃度および低濃度)	2	至適濃度の風疹参照 RNA
検体数		
合計		
合計+1(反応数)		

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.7		
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5		1 ×
プライマーミックス (10μM)	1.8		900nM
NS (93-106) Probe (10μM)	0.5		250nM
	15	(15 × 合計)に分注	
サンプル	5		
	20		

Reporter: FAM、Quencher: None

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50cycle*	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

*40cycle まで減少させても良い

別紙4<風疹>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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

百日咳レファレンスセンターにおける病原体サーベイランス活動

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	宮地悠輔	国立感染症研究所	細菌第二部
	大塚菜緒	国立感染症研究所	細菌第二部
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所	微生物部
	勝川千尋	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部
	梅田 薫	大阪市立環境科学研究所	微生物保健グループ

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、レファレンス関係の国内配布ならびに遺伝子検査の整備・拡充を行った。平成25年度は遺伝子検査キットを含むレファレンスの配布を21件行い、地方衛生研究所とともに新規検査法である4PlexリアルタイムPCR法の臨床評価を開始した。また、ワクチン抗原パータクチン (Prn) を欠損する百日咳流行株について調査を行い、わが国でも欧米と同様にPrn欠損株が流行していることを確認した。現在Prn欠損株の出現理由が不明のため、平成26年度も引き続き調査を実施する予定である。

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症であるが、近年多くの先進国で青年・成人患者の増加が認められている。百日咳の起原菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) であり、同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌 (パラ百日咳菌, *B. holmesii*), *Mycoplasma pneumoniae*, その他ライノウイルスなどの呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、現在の報告患者数には多くの紛れ込みを含むことが指摘される。

百日咳は米国, オーストラリア, 英国で大きな流行が認められ, わが国でも2008-2010年に大規模な流行が発生した。病原体解析から定着因子パータクチン (Prn) を欠損する流行株の存在が確認され,

Prn がワクチン抗原であることからワクチン有効性との関係が議論されている。わが国でも Prn 欠損株が出現し, その出現理由が不明なことから本菌の発生動向には監視が必要である。

本研究は百日咳レファレンスセンター活動として, 1) 病原体鑑別に有用な遺伝子検査ならびにレファレンスの整備・配布, 2) 国内における Prn 欠損株の流行調査, を地方衛生研究所とともに実施した。

B. 研究方法

1. レファレンス関係

百日咳類縁菌 *B. holmesii* の遺伝子検査として, LAMP 法を用いたキットを作製した。プライマー類は既法 (Otsuka et al., *Microbiol Immunol*, 2012) に従って調製し, 48 試験分を 1 キットとした。4Plex リアル

タイム PCR は百日咳菌, *B. holmesii*, パラ百日咳菌, *M. pneumoniae* を標的とし, リアルタイム PCR 装置 ABI7500 および 7500Fast 用にキットを構築した。なお, 本キットは臨床評価を目的に配布を行った。陽性コントロール DNA は百日咳菌, パラ百日咳菌, *B. holmesii* からそれぞれ DNA を精製し, conventional PCR およびリアルタイム PCR 用に濃度を調整したものを作製した。

2. Prn 欠損株の流行調査

地方衛生研究所および国内医療機関に百日咳臨床分離株の分与を依頼し, 2013 年の臨床分離株 9 株を収集した。菌株は Bordet-Gengou 培地を用いて培養し, SDS-lysis buffer により全蛋白質を抽出後, イムノブロット法により Prn 蛋白質を検出した (Otsuka et al., PLOS ONE, 2012)。なお, 本解析には疫学的な関連性を持たない菌株, 例えば兄弟 2 名から分離された場合は 1 株のみを供試した。

C. 研究結果

1. レファレンス関係

百日咳レファレンスセンターは 6 ブロックの 9 地方衛生研究所および感染研細菌第二部の計 10 施設で構成されている (表 1)。平成 25 年度のレファレンスセンターへの配布は *B. holmesii*-LAMP キットが 2 件, 4Plex リアルタイム PCR キットが 1 件であり, 陽性コントロール DNA の配布実績は 0 件であった (表 2)。一方, センター以外の地研には *B. holmesii*-LAMP キット 6 件, 4Plex リアルタイム PCR キット 3 件, 陽性コントロール DNA 9 件を配布した。

宮崎衛研では 4Plex リアルタイム PCR の臨床評価が実施され, *M. pneumoniae* の患者検体 1 件で LAMP 法との検査不一致が認

められた。また, パラ百日咳菌の患者検体で *B. holmesii* (*recA*) の偽陽性が認められ, 非特異反応に関し問題点が指摘された。

2. Prn 欠損株の流行状況

国内臨床分離株 (184 株) における Prn 欠損株の出現状況を図 1 に示した。Prn 欠損株は 1997 年に初めて出現し, その後増加傾向を示し, 2006 年には臨床分離株の 73% (8/11) を占めた。2008-10 年の百日咳流行では分離率が 27% (3 年間の平均分離率) に低下したが, 2011 年には 41% に上昇した。2012 年の分離率は 14% であり, 2013 年の分離株については現在解析中である。

D. 考察

百日咳レファレンスセンターでは病原体サーベイランスの精度向上を目的に, 国内における遺伝子検査の配布・拡充を進めている。平成 25 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キットを配布し, 本法の臨床評価を地研とともに開始した。これまでの評価により, 本法に非特異的反応が確認され, パラ百日咳菌 DNA の存在下で非特異的反応が生じることが指摘された。現在, 非特異的反応を解消する条件について検討を進めている。

平成 25 年度はレファレンスセンターへのレファレンス配布は前年度より減少した。平成 23 年度は 8 施設 18 件, 平成 24 年度は 5 施設 10 件であったが, 平成 25 年度は 3 件にまで減少した。この原因は *B. holmesii*-LAMP キットの国内整備が前年度までにほぼ終了したこととあり, 国内では *B. holmesii* の検査体制が整ったと考えられる。

Prn 欠損株の流行調査により, わが国でも欧米と同様に欠損株の流行が継続していることが確認された。わが国では 2008-10

年の百日咳流行時に Prn 欠損株が減少したが、この流行時には Prn を発現する MT27d 株の一時的な増加が認められている (Miyaji et al., PLOS ONE, 2013)。米国では Prn 欠損株が増加傾向にあり、2012 年のワシントン州の流行では臨床分離株の 73%を占めた。Prn は百日せきワクチンの防御抗原であること、さらに欧米では精製百日せきワクチン導入後に欠損株が出現したことから、Prn 欠損株はワクチンを回避するために出現した可能性が論議されている。ただし、Prn 欠損とワクチンの関係はいまだ不明であり、Prn 欠損株の出現理由は明らかとなっていない。Prn 欠損株については継続した監視が必要であり、平成 26 年度も引き続き調査を行う予定である。

E. 結論

百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、遺伝子検査キットを始めとするレファレンス関係の配布・整備を行った。さらに、百日咳流行株における Prn 欠損状況を調査し、わが国でも欧米と同様に Prn 欠損株が流行していることを確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. PLOS ONE. 8(10):e77165, 2013.
2. 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 新興・

再興感染症 up to date. 化学療法の領域 2013 年増刊号. p71-79, 医薬ジャーナル社, 大阪.

3. 蒲地一成. 百日咳検査の使い方. SRL 宝函. p41-43, vol. 34, No. 3, 2013, エスアールエル, 東京.

学会発表

国際学会

1. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.

国内学会

1. 勝川千尋, 梅田薫, 河原隆二, 蒲地一成. 百日咳の診断における培養検査と遺伝子検査の有用性の検討. 第 87 回日本細菌学会総会. 3 月 26-28 日, 2014 年, 東京
2. 勝川千尋, 榎引千恵子, 西戸温美, 蒲地一成. 百日咳の細菌学的検査精度向上に関する多方面からの検討. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 2 月 1-2 日, 2014 年, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

百日咳の血清診断法 (特願2013-77138, 平成25年4月出願)

実用新案登録

該当なし

その他

特記事項なし

表 1. 百日咳レファレンスセンター（平成25年度）

北海道・東北・新潟ブロック	秋田県健康環境センター
関東・甲・信・静ブロック	東京都健康安全研究センター 千葉県衛生研究所
東海・北陸ブロック	三重県保健環境研究所
近畿ブロック	大阪市立環境科学研究所
中国・四国ブロック	愛媛県立衛生環境研究所 岡山県環境保健センター 山口県環境保健センター
九州ブロック	福岡県保健環境研究所 熊本県保健環境科学研究所

表 2. 平成25年度のレファレンス関係の配布実績（平成26年1月現在）

レファレンス	地方衛生研究所		計
	レファレンスセンター	その他	
<i>Bordetella holmesii</i> LAMPキット	2	6	8
4PlexリアルタイムPCRキット	1	3	4
陽性コント ロールDNA			
百日咳菌	0	1	1
百日咳類縁菌	0	8	8
計	3	18	21

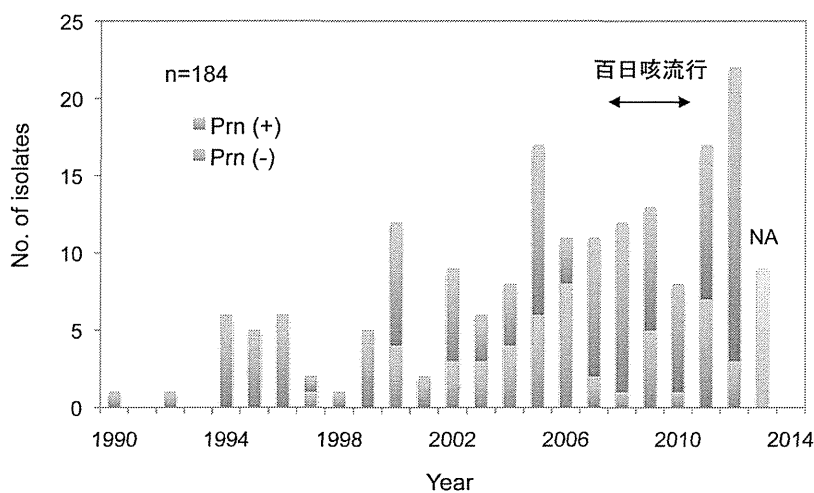


図 1. 日本におけるPrn欠損株の分離状況（1990-2014年）
2008-2010年に百日咳流行が発生し、Prn欠損株は一時的に減少傾向を示した。
なお、2013年の臨床分離株（9株）は現在解析中である

結核菌型別分析における精度保証

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 抗酸菌部部長
研究協力者 前田 伸司 公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌結核菌情報科

研究要旨

結核菌の型別標準法は、IS6110 制限酵素断片長多型（RFLP）分析法から反復配列多型（VNTR）分析法に変わりつつある。アンケート調査の結果、日本国内では 41 箇所の衛生研究所が結核の型別分析を行っており、その内の 92%の施設が型別法として VNTR 法を利用している。これまで結核菌検査に関するサポートとして、希望する施設に VNTR 分析用のプライマーセットと 4 種類の VNTR 分析精度管理用ゲノム DNA の配布を行ってきた。この方法では、DNA 送付の際、各ローカスの分析結果リストを同封して自己確認を行ってもらい、結果の報告は求めていなかった。本研究では、新たに複数種類の結核菌ゲノム DNA を準備して型別分析のための精度保証用パネルを作成した。このパネルを希望施設に配布し、結果を報告してもらうことで客観的に分析精度の確認を行う予定である。同じ方法やルールで解析を行い、それを確認することで多施設間の正確なデータ比較が直接可能となる。将来的に分離結核菌の全数型別分析ができれば、結核感染実態の把握等対策に利用できると思われる。

A. 研究目的

日本国内における平成 24 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 16.7 で、年々低下傾向である。しかし、米国（3.4）の 4.9 倍という現状である。患者年齢構成は、再発例が多いと考えられる 70 歳以上の高齢者が全結核患者の 55.6%を占めている。また、登録された患者についての保健所等の接触者調査が精力的に行われており、結核感染の広がりを防止するための対策が進められている。しかし、毎年、集団感染事例の報告があり平成 24 年は、事業所（24 例）、病院（院内感染 9 例）、社会福祉施設（5 例）、学校（3 例）など合計 49 件が報告されている。接触者検診で大きな集団感染が発見されることがある。このような例では、分離された結核菌の遺伝子型別分析で同一クローンかどうかを調べることで接触者調査の結果を確認することができる。

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等では行われていない。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 システムの Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)を樹立して報告している。また、レファレンスの費用で反復配列多型（variable number of tandem repeat : VNTR）分析用のプライマーセット（18 座位）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った利点がある。

本研究では、希望する施設にパネルとなる結核菌ゲノム DNA を送付することで JATA(12)だけでなく、VNTR-1982、ETR-A の 2 か所、さらに高識

別能が必要な場合に分析するハイパーバリアブル (HV) の VNTRs-2163a、3232、3820、4120 の 4 か所などの各研究所で実際に利用している座位を分析し報告して頂く予定である。このような方法で VNTR 法による型別分析に関する精度保証を行うことを研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 結核菌株の選択

今まで研究所の VNTR 分析で得られている結果を参考に、特にコピー数に換算することが難しい高分子 PCR 産物が得られる株を含めた結核菌 5 株を選択してゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA はアイソプラント (ニッポンジーン) を用いて既報の結核菌精製プロトコールに従い精製を行った。

2. VNTR 分析によるコピー数の確認

送付する結核菌株各ローカスのコピー数の確認を行った。各 PCR 産物は、DNA genetic analyzer (ABI3130) を用いたフラグメント解析あるいはコスモアイ (日立化成株式会社) を用いたキャピラリー電気泳動で分析し、換算表に従ってコピー数に換算し確認を行った。

C. 結果

1. 結核菌 VNTR 分析普及のための活動

結核菌型別法ひとつである VNTR 分析を各地域の衛生研究所に普及するために平成 22 年度に VNTR 分析用の 18 座位 (36 種類) のプライマーセットを希望する施設に送付した。その後も、各施設の自主的な分析精度管理のために 4 種類のゲノム DNA の配布を行っている。平成 25 年度は、2 か所に送付した。また、本年度はなかったが、VNTR 法の陽性コントロールとして使用する H37Rv 株 DNA の分与も行っている。

2. 結核菌遺伝子解析 (タイピング) に関するアンケート調査

アンケート調査により、結核菌型別 (タイピング) を実施しているか尋ねたところ、回答のあった 79 施設 (100%) の内、41 施設では結核菌を扱っており遺伝子型別等が可能、8 施設は現在扱っていないが予定はある (6 施設は 2013 年度中に開

始、2 施設は準備中)、30 施設は扱っていないという回答だった。利用している型別法としては、92%が VNTR 法による型別法で、ついで 26%が IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法だった。

3. 精度保証用ゲノム DNA パネルの準備

本精度保証のパネルテストでは、コピー数を調べるローサイとして JATA(12)の 12 か所、それ以外にも Supply(24)対応ローサイ、HV ローサイなどもあり、30 か所にもなる。分析ローサイはそれぞれの施設に任せるが、最低でも JATA(12)の 12 か所なので、10 株送ると施設での負担が大きくなる、そのため、今回は 5 株の送付とした。また、日本国内では、北京型結核菌が全結核菌の 70~80%を占めていることが報告されている。そのため、各衛生研究所で分析を依頼される株は、ほとんどの例が北京型と考えられる。このことから北京型結核菌を多く含むパネルとした。今後、希望施設に配布して結果の比較を行う予定である。

D. 考察

扱いが難しい菌であるにも関わらず、79 箇所の衛生研究所の中で 41 か所の施設で扱うことが可能で型別も行われていることが明らかになった。また、遺伝子型別法としては、41 施設のうち 92%が VNTR 法による型別法が採用されていることから、VNTR 法についての精度保証パネルを作成して配布すべきということが確認できた。

共通のルールでミニサテライト DNA のコピー数の算出することで異なる施設間での結核菌型別結果比較が容易に実施できる。さらに、実際にパネルテストで同じ結果が得られることが確認できれば、離れた地域間でもデータの比較が直接可能になる。

今後、新規登録患者数が低下することで結核菌の全数型別も可能となれば、これらの手法で感染経路の推定もできるようになると考えられる。

E. 結論

結核菌 VNTR 分析用の精度保証用パネルを作成して実際に分析を行っている衛生研究所に配布することで、これまで独自に行われている VNTR 分析に関する精度保証を進める。異なる施

設間で型別結果を直接比較することができるようになり、結核感染動態の把握等、結核対策に利用できる。

F. 健康危惧情報

本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌（生菌）の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従ってBSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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25年度活動報告

炭疽菌DNAのPCR検査における検出限界の算定

研究分担者 森川 茂 獣医科学部長

研究協力者 奥谷晶子 獣医科学部 主任研究官
井上 智 獣医科学部 第二室長

研究要旨

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している 7 カ所の地方衛生研究所の参加協力のもと、平成 25 年度は炭疽菌遺伝子検査で用いる PCR 検査系の検出限界の算定を行った。これは平成 24 年度に「炭疽菌および近縁菌を用いたブラインド・テスト」を行い、参加衛生研究所での PCR 検査系が稼働することを確認した上で、次のステップとして各施設で使用する機器における当該検査系の検出限界の算定を検証する必要性があげられたため、本年度において実施したものである。本年度は 6 カ所の地方衛生研究所に検査系の検証の協力をいただき、全ての施設において炭疽菌芽胞換算で 1 から 100 個あたりの検出限界を保持していることが明らかとなった。また、狂犬病のレファレンス機能を向上させるために 17 地方衛生研究所とレファレンスネットワークを構築して狂犬病の検査手法に対するブラインドテストを準備している。

A. 研究目的

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している 7 カ所の地方衛生研究所において、平成 24 年度に「炭疽菌および近縁菌を用いたブラインド・テスト」を行い、全ての参加衛生研究所において PCR 検査系が稼働することを確認した。今年度は、各施設で使用する機器における当該 PCR 検査系の検出限界の算定を検証する必要性があげられたため、炭疽菌芽胞液から抽出した DNA 溶液の 10 倍階段希釈液を送付し各施設での検出限界を調査し、検査成績のまとめを行った。

B. 研究方法

1. 炭疽菌芽胞液からの DNA 調整

供試菌株について。臨床分離株 (BA103)

を使用した。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 寒天培地に塗抹 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 回を行い、エタノール沈殿

で精製した。

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 10 μ L を羊血液寒天培地にスポットして 37°C で 7 日間培養し、コロニーが発育しないことを確認した。

2. 低濃度 DNA 溶液の安定性の検証

抽出した DNA は TE buffer に懸濁した。これを元液として 10⁻¹ から 10⁻⁸ 階段希釈液を作成して検査用 DNA とした。低濃度の DNA の分解あるいはチューブへの吸着による減衰を防ぐため、キャリア DNA として断片化鮭精子 DNA (10 μ g/ μ L 相当) を加えて -20°C で 7 日間保管後の DNA を用意した。DNA を template として 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 の安定性を確認した。

3. 参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめ

参加衛生研究所へは各希釈 DNA 溶液、PCR 用プライマー、および陽性対照 DNA を梱包し、冷蔵宅急便にて送付した。各施設で行った PCR の結果については成績を記載したワードファイルの作成とメール送信を依頼した。

C. 研究結果

1. 炭疽菌芽胞液からの DNA 調整

元液 DNA 10 μ L あたりの想定芽胞数は、10⁷ 個相当となった。よって、10⁶ 個から 0.1 個相当の DNA 溶液希釈列 (10⁻¹ から 10⁻⁸ 階段希釈) が作成された。

2. 低濃度 DNA 溶液の安定性の検証

断片化鮭精子 DNA を加えた DNA 希釈列

の方が、加えないものより 7 日間後の PCR 増幅結果が安定しており、pag 遺伝子では 10⁻⁷ 希釈 (芽胞 1 個相当)、cap 遺伝子では 10⁻⁶ 希釈 (芽胞 10 個相当) まで検出できることを確認した。

3. 参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめ

各施設での成績は一覧にまとめた (表 1)。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 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。

D. 考察

pag 遺伝子をコードする pXO1 と cap 遺伝子をコードする pXO2 では一細胞あたりのプラスミド・コピー数が異なり、pXO1 の方が 3 から 30 倍多いという報告がある。遺伝子間の検出感度の差はこれらのコピー数に由来することが考えられる。しかしながら、conventional PCR 検査系では低濃度 DNA での増幅に影響する他の要因 (例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い) も考えられる。

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 10⁶ CFU/ml 以上) が存在していることからこれらの検体に関しては、今回検証された検出限界の検査系で検査は可能であると考える。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、First screening としての PCR 検査系としては十分な検出限界を有していると考え

える。

E. 結論

今回参加した各地方衛生研究所の PCR 検査系で示された検出限界は、現在想定される炭疽菌検体の検出に有効な範囲であることが示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

衛生微生物協議会 レファレンスセンター報告「動物由来感染症」。平成 24 年 7 月。名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表1 炭疽菌pag遺伝子およびcap遺伝子 検出限界算定のためのPCR増幅結果一覧

(山形県衛生研究所、愛知県衛生研究所、京都府保健環境研究所、広島県立総合技術研究所保健環境センター、徳島県立保健製薬環境センター、長崎県環境保健研究センターの参加)

		pag遺伝子増幅結果						
		山形	愛知	徳島	京都		広島	長崎
		50℃	55℃	55℃	52℃	55℃	55℃	55℃
1	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12ng/uL	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2ng/uL	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
5	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
6	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120fg/uL	+	+	-	+	+	+	+
7	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12fg/uL	+	-	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2fg/uL	-	-	-	-	-	-	-
7	陽性対照DNA	+	+	+	+	+	+	+
8	陰性対照	-	-	-	-	-	-	-
		cap遺伝子増幅結果						
		山形	愛知	徳島	京都		広島	長崎
		50℃	55℃	55℃	52℃	55℃	55℃	55℃
1	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12ng/uL	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2ng/uL	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
5	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2pg/uL	+	+	+	+	+	+	+
6	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120fg/uL	+	+	-	+	+	+	+
7	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12fg/uL	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2fg/uL	-	-	-	-	-	-	-
7	陽性対照DNA	+	+	+	+	+	+	+
8	陰性対照	-	-	-	-	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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	俣野哲朗	国立感染症研究所	エイズ研究センター長
研究協力者	吉村和久	国立感染症研究所	エイズ研究センター室長
	草川 茂	国立感染症研究所	エイズ研究センター主任研究官
	西澤雅子	国立感染症研究所	エイズ研究センター研究員
	松岡佐織	国立感染症研究所	エイズ研究センター研究員

研究要旨 地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を進め、国内HIV感染動向・検査状況についての情報共有およびHIV検査技術・体制の維持・強化に向けた取組みを推進した。

A. 研究目的

本邦のHIV感染者数とエイズ患者数を合わせた年間新規報告件数は、2007年以降約1500件で推移しており、2012年には累積報告件数が2万件を超えた（エイズ動向委員会）。新規報告件数の約30%はエイズ患者としての報告、つまりエイズ発症によりHIV感染が判明した例であることから、実際のHIV感染者数は報告件数を大きく上回っていると推察され、早期発見が十分になされている状況ではないと考えられる。したがってHIV検査推進は重要課題である。

HIV検査推進にあたっては、検査技術の維持・向上および検査体制の強化が必要となる。特にHIVでは、その多様性・変化に対応した検査技術の更新が重要である。そこで本研究では、本邦のHIV検査状況を把握するとともに、検査技術・体制の強化に結びつけることを目的とし、地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を進めた。

B. 研究方法

2013年7月の衛生微生物技術協議会第34回研究会（名古屋）におけるHIV関連感染症に関する会議で、地方衛生研究所等との協議・議論を進め、その後も適宜、情報交換を行った。また、2013年10月の名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とするHIV技術研修会に協力した。

C. 研究結果

国立病院機構名古屋医療センターおよび神奈川衛生研究所と共同でネットワーク体制を推進し、北海道立衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、横浜市衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、広島市衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所等の情報交換を行った。特に、HIV感染者・エイズ患者の報告件数、地域・年齢・

感染経路等の分布、疫学的解析結果、薬剤耐性変異株動向、保健所等における検査状況・体制、献血における HIV 陽性者数、検査技術等に関する情報を共有した。これらの情報共有は、病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2012 および特集関連情報作成においても有用であった。名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力し、検査技術の維持・向上に努めた。

D. 考察

HIV の多様性は大きく、ウイルスゲノム変化に持続的に対応した検査技術の更新は重要である。本ネットワーク体制に基づく情報共有ならびに技術研修等による検査体制の維持・強化は、検査技術の維持・向上に極めて重要な役割を担っていると考えられる。なお、本ネットワーク体制構築において、国立病院機構名古屋医療センターおよび神奈川衛生研究所等の貢献は大きい。

E. 結論

地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を推進し、国内 HIV 感染動向・検査状況・技術についての情報共有および HIV 検査技術強化に貢献した。このネットワーク体制は、病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2012 および特集関連情報作成にも貢献した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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

「新しい48型関連組換え型アデノウイルスの結膜炎患者からの検出・同定」

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	山根翔太郎	北海道大学 大学院情報研究科
	小川知子	千葉県衛生研究所
	花岡 希	国立感染症研究所 感染症疫学センター
	小倉 惇	千葉県衛生研究所
	堀田千恵美	〃
	仁和 岳史	〃
	千葉 彌幸	永吉の眼科
	Gabriel Gonzalez	北海道大学 大学院情報研究科
	青木 功喜	〃
	小柳 香奈子	〃
	渡邊 日出海	〃

研究要旨

2007年以降に53型以降の新しいヒトアデノウイルス (HAdV) ジェノタイプ(型)が報告され(それ以前の51型までは中和反応による血清型であった)流行している所以我々はレファレンス活動を強化している。特にD種アデノウイルス (HAdV-D) においては新しい型の報告が多い。本研究で我々は日本で検出されたことがないHAdV-48関連ウイルス (HAdV_Chiba_E086/2012) の進化的特徴を報告する。HAdV_Chiba_E086/2012は日本の結膜炎患者の結膜ぬぐい液から分離された。ウイルス遺伝子を抽出してサンガー法で完全長の塩基配列を決定して既知のD種アデノウイルスとシークエンスアライメントした。HAdV_Chiba_E086/2012のペントンベース(P)、ヘキソン(H)、ファイバー(F)遺伝子および領域について系統樹を作成して解析した。その結果、P、H、FおよびE3についてそれぞれ65型、48型、60型および22型とそれぞれ98%、95%および98%の相同性を持っていた。このことからHAdV_Chiba_E086/2012はP65H48F60と定義できるものと考えられた。系統樹解析および組換え解析の結果から、このウイルスは59、65、48、60、22型およびその近縁と思われる型のネステッド組換えにより生じたものと考えられた。

これらの結果からHAdV_Chiba_E086/2012は、日本における初の48型関連ウイルスであり、これまで報告されたHAdVの中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。

A. 研究目的

ヒトアデノウイルス D 種 (HAdV-D) はヒト特異的な唯一の種であり最も多様性がある種であり重症の流行性角結膜炎 (EKC) を引き起こすことで知られる。近年、新しい EKC を引き起こす新しい HAdV-D が検出され、全ゲノム配列による genomotype として報告されている。それまでの中和反応による 51 型までの serotype に加え 52 型以降が全遺伝子配列の決定により定義されてきている。その中で HAdV-53、54 および 56 は日本で EKC の流行を引き起こしている。我々はこれまで日本で報告されたことがない 48 型関連ウイルスを結膜炎患者の結膜ぬぐい液から分離したので、その全ゲノムを解析した。

B. 研究方法

1. 材料

眼科定点医療機関を受診した 63 歳の結膜炎患者の左眼から 2012 年 4 月 24 日に採取した結膜ぬぐい液から CaCo2 細胞により分離され、A549 細胞を使用して増殖した HAdV_Chiba_E086/2012 を用いた。

2. 塩基配列の決定

International Nucleotide Sequence Database (INSD) で入手可能な 21 種類の HAdV-D の塩基配列をもとにデザインしたプライマーを用いてサンガー法により完全長の塩基配列を決定した。最初に全塩基を重複してカバーする 23 のセグメントを PCR により増幅した。PCR 増幅産物を Exonuclease I およびアルカリフォスファターゼにより精製したのち、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems) を用いて AB3130xl Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。

我々はシーケンスで得られた波形を調べ、異なったゲノムの混入を示唆する多形がないことを確認した。ゲノムの両端は 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) により決定したすべての波形を phred Phrap により塩基配列の決定 (ベースコール) およびアセンブルした。

3. 塩基配列の解析、アノテーション、登録

HAdV_Chiba_E086/2012 の塩基配列を HAdV-8 (アクセッション番号 AB448767) と比較してアノテーション (注釈) をつけて DDBJ を通じて INSD にサブミットした。

得られた完全長の塩基配列を 45 種類の HAdV-D ゲノムと比較した。得られた配列を MAFFT version 6 の Iterative Refinement Method algorithm (FFT-NS-I) で解析してマルチプルゲノムアライメント (MGA) を得た。HAdV_Chiba_E086/2012 の配列を AB765926 として登録した。

4. 組換え解析

得られた MGA を Recombination Detection Program (RDP) (RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 26, 2462-2463) を使用して p 値 < 0.001 で RDP, Chimaera, BootScan, GENECONV, MaxChi, SiScan および 3Seq のうち 3 以上のアルゴリズムで支持されるという条件で解析した。“Reference sequence selection” で “Internal and External Reference” とし

た以外は、デフォルト値をパラメーターとして用いた。

HAdV_Chiba_E086/2012 の型別のため penton base, hexon and fiber 遺伝子の塩基相同性を既知の HAdV-D の型と比較した。系統樹解析を MEGA5.1 (www.megasoftware.net) の Tamura Nei モデルにより進化距離を計算して近隣結合法により作成した。

C. 研究結果

1. 分離株

得られた分離株が単一であることは、既報の手法 (Yamane et al., JV, 2013) により確認した。本分離株は、A549 での増殖性が良くウイルス分離は比較的容易と考えられた。アセンブルされたコンティグ配列は phred-q value ≥ 20 であることが確認されたことも単一株であることを支持していた。

2. ゲノム

HAdV_Chiba_E086/2012 のゲノム (AB765926) の塩基長は 35,198 bp であり、塩基組成は A (22.5%), T (20.3%), G (28.6%) and C (28.6%) であった。

3. 系統樹解析

penton base, hexon and fiber 遺伝子はそれぞれ HAdV-65, HAdV-48 および HAdV-60 とそれぞれ 98%, 99% および 95% の相同性を持っていた。このことから HAdV_Chiba_E086/2012 は P65H48F60 と要約できる組換え株と考えられた。

4. 組換え解析

入手可能であった 45 種類の HAdV-D の塩基配列とともに組換え解析をしたところ、

HAdV-48, 65, 29, 22 および 60 およびそれらの近縁と 3 種類の未知または祖先の HAdV-D の組換えが確認された。

D. 考察

日本において、組換え型の HAdV-D が EKC の流行を引き起こしている。HAdV のうち D 種は重症の EKC を引き起こすことで知られている。HAdV-48 はこれまで日本において検出されたことがなく、本研究は日本における HAdV-48 関連ウイルスの最初の報告である。HAdV-48 は最初にエイズ患者から検出されたウイルスであるが、健康人も感染していることが過去の研究で確認されている。

HAdV_Chiba_E086/2012 は P65H48F60 と定義できるものと考えられた。系統解析および組換え解析の結果から、このウイルスは 59, 65, 48, 60, 22 型およびその近縁と思われる型のネステッド組換えにより生じたものと考えられる。

このような株は、HAdV-53, 54 および 56 が EKC の流行を引き起こしているのと同様に今後にも流行する可能性がある。また、その全塩基配列からユニークな株であり、新しい genotype とされるべきものとする。

E. 結論

HAdV_Chiba_E086/2012 は、日本における初の 48 型関連ウイルスであり、これまで報告された HAdV の中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。EKC の病原体として流行する可能性を持つので、今後も継続的な監視が必要である。レファレンス活動をさらに強化している。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T. Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(3):260-1.
2. Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A case of atypical hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6: differential diagnosis from varicella in a pediatric intensive care unit. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(6):564-6.
3. Miyata I, Hanaoka N, Okabe N, Fujimoto T, Sakamoto S, Kasahara M, Saitoh A. Echovirus 3 as another enterovirus causing life-threatening neonatal fulminant hepatitis. *J Clin Virol.* 2013 Dec 7. pii: S1386-6532(13)00511-8.
4. Fujimoto T, Yamane S, Ogawa T, Hanaoka N, Ogura A, Hotta C, Niwa T, Yakou C, Gonzalez G, Aoki K, Koyanagi KO, Watanabe H: A novel complex recombinant form of human adenovirus species D, the first type 48-associated isolate in Japan, JJID, in press.

5. 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 日本臨牀別冊. 2013; No24. 373~376.

学会発表

国際学会

1. Fujimoto T, Enomoto M, Kanou K, Hanaoka N, Adhikary AK, Yoshida S, Kobayashi M. Hand Foot and Mouth Disease in Japan, 1st conference on Asian pediatric infectious diseases. August 24-25, 2013, Tokyo, Japan.
2. Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T. Updated restriction endonuclease analysis based genome typing method of HAdV: application in pediatric infectious diseases caused by HAdV, 1st conference on Asian pediatric infectious diseases. August 24-25, 2013, Tokyo, Japan.
3. Oishi K, Ohkusa Y, Fujimoto T. Surveillance of hand foot and mouth disease in Japan, 1st ASEAN Hand Foot and Mouth Disease Workshop. April 11-12, 2013, Singapore.

国内学会

1. 藤本嗣人, 小川知子, 花岡希, 小倉惇, 堀田千恵美, 仁和岳史, Gabriel G, 渡邊日出海. 結膜炎患者の眼から分離されたアデノウイルスD種48, 60および65型(候補株)のリコンビナント型の新しいアデノウイルス. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
2. 加納和彦, 牧野友彦, 藤本嗣人. コクサッキーウイルスA6ウイルスの病像変化に関する研究. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
3. 榎本美貴, 押部智宏, 近平雅嗣, 藤本嗣人, 林祥剛. 兵庫県における無菌性髄膜炎患者からのエンテロウイルス検出状況. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
4. 藤本嗣人, 榎本美貴, 花岡希, 谷口清州.

アデノウイルス感染にともなう胃腸炎の
発症頻度. 第54回日本臨床ウイルス学会,
6月8 - 9日, 2013年, 倉敷市.

5. 菅原民枝, 藤本嗣人, 花岡希, 大日康史.
流行初期段階のkokosakki-A群9型の検
出・同定—保育所の発疹集団発生 of 事例.
第54回日本臨床ウイルス学会, 6月8 - 9
日, 2013年, 倉敷市.
6. 菅原民枝, 藤本嗣人, 大日康史, 安井良
則, 大石和徳. 保育所の集団発生におけ
るkokosakki-A群9型の検出・同定. 第
54回日本臨床ウイルス学会, 6月8 - 9日,
2013年, 倉敷市.
7. 山本佳, 金川修造, 藤本嗣人. kokosakki
ウイルスによる無菌性髄膜炎を契機
に発見された本邦初のエンテロウイルス
99類似株検出例. 第44回日本小児感染症
学会, 10月25 - 27日, 2013年, 札幌市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大前比呂思	<i>Plasmodium</i> 属マラリアの検査	検査技術協会	ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫便覧	検査技術協会	東京	2014	324-327
大塚菜緒 蒲地一成	百日咳. 新興・再興感染症 up to date	大石和徳	化学療法の領域 2013 年増刊号	医薬ジャーナル	大阪	2013	71-79
蒲地一成	百日咳検査の使い方		SRL 宝函 vol. 34, No. 3	エスアルエル	東京	2013	41-43

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y.	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing	Jpn J Infect Dis.	66(1)	51-5.	2013
Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K.	Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Jpn J Infect Dis.	66	216-221	2013
町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健.	経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例.	日本呼吸器学会雑誌.	2	274-278	2013
大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 宮崎義継.	<i>Cryptococcus gattii</i> 感染症 -新興・再興感染症 up to date-	化学療法の領域.	29 S-1	1144-1151,	2013
前川純子, 倉 文明, 大西 真, 渡辺ユウ, 渡辺祐子, 磯部順子, 田中忍, 中嶋 洋, 吉野修司	レジオネラ臨床分離株の型別 — レファレンスセンター活動報告として	病原微生物検出情報	34	161-162	2013

坂本裕美子、廣地敬、大西麻実、伊藤はるみ、高橋広夫、宮北佳恵、細海伸仁、片岡郁夫、久保亜希子、池田徹也、小川恵子、長瀬敏之、森本洋、清水俊一、伊豫田 淳、寺嶋 淳	白菜浅漬による腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例について - 札幌市	病原微生物検出情報	34	126	2013
太田昭生、高木積、大前比呂思、中野由美子、藤井充	発熱で受診した生殖母体を有する輸入熱帯熱マラリアの1例	臨床寄生虫学会誌	24	74-77	2013
鈴木真紀、黒崎貴子、加藤はる、佐藤隆也、古畑健司、山本明彦、宮上寛之	外部委託検査で創部から <i>Clostridium tetani</i> が分離された破傷風の1例	医学検査	62 (6)	698-702.	2013
駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠	日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009-2011	病原体検出情報	34	36-7	2013
染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠	2012年の海外の麻疹情報	病原体検出情報	34	24-5	2013
Miyaji M Otsuka N Toyoizumi-Ajisaka H Shibayama K Kamachi K	Genetic analysis of <i>Bordetella pertussis</i> isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan	PLOS ONE	8(10)	e77165	2013

