

201420045A

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
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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎 義継
(国立感染症研究所)

平成27(2015)年3月

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成27(2015)年3月

平成 26 年度新興・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」

班員名簿

氏名	所属	職名
宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部	部長
大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部	部長
調 恒明	山口県環境保健センター	所長
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター 微生物部	部長
野崎 智義	国立感染症研究所 寄生動物部	部長
加藤 はる	国立感染症研究所 細菌第二部	室長
高崎 智彦	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室長
清水 博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部	室長
竹田 誠	国立感染症研究所 ウイルス第三部	部長
蒲地 一成	国立感染症研究所 細菌第二部	室長
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
森川 茂	国立感染症研究所 獣医科学部	部長
俣野 哲朗	国立感染症研究所 エイズ研究センター	部長
藤本 嗣人	国立感染症研究所 感染症疫学センター	室長

目 次

- I. 総括研究報告書（平成 26 年度）
国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
研究代表者：宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部）

- II. 分担研究報告書
 - 1. 真菌検査標準作業手順書（SOP）の作成・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 1
研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）

 - 2. 大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 7
研究分担者：大西 真（国立感染症研究所 細菌第一部）

 - 3. 地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集・・・・・・・・ 3 9
研究分担者：調 恒明（山口県環境保健センター）

 - 4. カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴・・・・・・・・ 4 1
研究分担者：甲斐 明美（東京都健康安全研究センター 微生物部）

 - 5. 寄生虫症に関するサーベイランス強化に関する研究・・・・・・・・ 4 7
研究分担者：野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）

 - 6. クロストリジウム属菌およびコリネバクテリウム属菌による
感染症のラボネットワークについて・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 1
研究分担者：加藤 はる（国立感染症研究所 細菌第二部）

 - 7. 日脳および新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断体制の拡充・・・・・・・・ 5 7
研究分担者：高崎 智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

 - 8. リケッチア・レファレンスセンターの 2014 年活動について
リケッチア Multiplex Realtime PCR の多施設間相互検証・・・・・・・・ 6 3

	研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
9.	下痢症ウイルスのレファレンスにかかる研究	69
	研究分担者：清水 博之（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
10.	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	75
	研究分担者：清水 博之（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	
11.	麻疹検査診断法（RT-PCR 法）の外部精度管理（EQA）法の検討	85
	研究分担者：竹田 誠（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
12.	百日咳レファレンスセンター	89
	研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所 細菌第二部）	
13.	結核菌型別分析における精度保証	93
	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）	
14.	動物由来感染症レファレンスセンター 平成 26 年度活動報告 狂犬病の検査ネットワーク構築と検査系の検証および標準化	97
	研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）	
15.	HIV 関連感染症	105
	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）	
16.	アデノウイルスレファレンス活動改善のためのアンケート	107
	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）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	113

I. 総括研究報告書

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：大西 真	（国立感染症研究所細菌第一部）
調 恒明	（山口県環境保健センター）
甲斐 明美	（東京都健康安全研究センター）
野崎 智義	（国立感染症研究所寄生動物部）
加藤 はる	（国立感染症研究所細菌第二部）
高崎 智彦	（国立感染症研究所ウイルス一部）
安藤 秀二	（国立感染症研究所ウイルス一部）
清水 博之	（国立感染症研究所ウイルス二部）
竹田 誠	（国立感染症研究所ウイルス三部）
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）
森川 茂	（国立感染症研究所獣医科学部）
俣野 哲朗	（国立感染症研究所エイズ研究センター）
藤本 嗣人	（国立感染症研究所疫学センター）

研究要旨 国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所は病原体検査に関して、各種の病原体情報を共同で発信しているが、両者は行政上、所属の違う組織であり連携の明確な法的根拠は無く、共同作業の障壁になっている。危機的感染症発症の迅速な察知、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

新型インフルエンザ等の感染症アウトブレイク、バイオテロや広域に及ぶ致死的中毒など国民生活に脅威となる感染症のリスクは常に存在し、時に現実となっている。

これら危機的感染症の発生に対する初動スキームは、①先ず病原体を特定する、②判明した病原体のサーベイランスにより感染拡大を把握する、ことである。しかし、現行では国全体として統一的に初動スキームを可能とするような、法的に整備された

システムが存在しない。

そこで、危機発生時に直ちに何らかの手段により全国規模で病原体診断を実施できる、基盤となる全国ラボネットワークを構築・維持することは危機管理上必須である。

本研究班では、感染研と各地方自治体の検査室（地方衛生研究所等）が相互に補完協力することを前提として、危機的な感染症の発生に際して上記の初動が可能となるように、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などあらゆる病原体の危機的感染症発生に備

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の病原体を優先して対象としていく。

具体的には、以下のような共同作業を通じてラボネットワーク機能を強化し、危機的感染症発生に際して、感染研と協力し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・検査法共有のための相互研修やマニュアル作成、③病原体診断用器機や試薬等の整備、④診断・検査法の精度管理、など。

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

また、インフルエンザ等のパンデミックにおいて流行状況を把握する必要性が生じた場合、緊急に検査法を構築し共有する必要があるが、本研究成果の活用により、全国での病原体検査実施が迅速、且つ、円滑に行われ、また流行状況の正確な把握が可能になり、パンデミック対策に資する。

B. 研究方法

研究は研究代表者（宮崎）、研究分担者14名の計15名によって行われた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が総括する形で遂行された。研究は、1）各病原体レファレンスセンター活動、2）病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立を中心に行った。具体的には、以下の方法で研究を遂行した。

1) 各病原体レファレンスセンター活動

■病原体検査標準作業手順書（SOP）の作成：真菌検査についてのSOPを作成した。作成したSOPに基づき検査を行い、SOPの内容について検証を行い、必要に応じて改訂を行った。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：薬剤耐性レファレンスセンター（仮称）の設置に向けた活動を行った。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：大腸菌血清型別・遺伝子型別、レジオネラ SBT法による遺伝子型別・血清群別、溶血性レンサ球菌のT型別およびM型別を行った。

■カンピロバクター：全国で分離されたカンピロバクター菌株について、Lior法およびPenner法で型別して、その動向を把握。また、薬剤耐性株の出現状況調査を実施。

■寄生虫：ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は2例あり、ウエスタンプロットによる血清検査を行った。クドア感染症について地研・国研・厚労省の担当者間で情報交換を行った。肺吸虫症を対象とするイノシシ肉の検査に鹿児島県環境保健センターと取り組んだ。

■ジフテリア・ボツリヌス：ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会、および*Clostridium difficile*感染症（CDI）の細菌学的検査に関する研修会を行った。*Corynebacterium*属菌感染症およびCDIによるアウトブレイク事例について調査した。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：ジカウイルスリアルタイムRT-PCR法を評価し、地方衛生研究所アルボウイルスセンターおよび希望施設に技術移転を開始した。

■リケッチア：全国共通となるmultiplex realtime PCR検査法の評価、全国情報の共有の機会とレファレンスセンター担当者のスキルアップを行った。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)：ロ

タウイルス検出マニュアルを改訂した。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス):エンテロウイルス検査に関するワークショップを実施した。

■百日咳:Prn 欠損株の流行調査およびマクロライド耐性菌の調査を行った。

■抗酸菌:外部精度評価への参加施設を募集し、参加施設への検体送付および検査成績のまとめを行った。

■動物由来感染症:狂犬病の検査手法の検証と標準化を行った。17 地衛研にて RT-PCR ブラインドテストを行い、直接蛍光抗体法の陽性対照スライドを配布した。

■HIV 関連感染症:衛生微生物技術協議会第 35 回研究会(東京)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。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。

■アデノウイルス:アデノウイルス検査に関するアンケート調査を行った。

2) 病原体・細菌毒素などの診断法・疫学解析法の確立および評価

■カンピロバクター:PCR 法による型別法を検討した。

■ジフテリア・ボツリヌス:診断用ボツリヌス抗毒素の標準化作業を開始した。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス:IgM 抗体捕捉 ELISA 法を構築し、ジカウイルスとの交差反応性について検討した。日本脳炎ウイルスリアルタイム PCR 系の設定を見直した。デング熱患者血清を用いて非特異反応の有無を検討した。

■リケッチア:オリエンチアおよびリケッチアの multiplex realtime PCR の特異性、汎用性、反応性を検討した。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス):ノロウイルスの GII.4 バリアントの VLP 特異的モノクローナル抗体を作製した。ノロウイルスの新規 genotyping 法の普及活動を行った。全ゲノムセグメントを対象としたロタウイルス分子疫学法の基盤を構築した。

■麻疹・風疹:麻疹ウイルスの RNA 検体の安定な保存法および送付法について検討した。

■百日咳:*B. holmesii* の LAMP 法をキット化した。百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii*、*M. pneumoniae* を標的とする 4Plex リアルタイム PCR は一部改良を加え、プライマーとプローブ濃度を至適化した。

C. 研究結果

■病原体検査 SOP の作成:遺伝子検査を中心とした真菌検査を実施する上での統一ルールを記載した SOP を作成した。国立感染症研究所真菌部内での意見を集約し、改訂を重ねた。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集:6 カ所の地方衛生研究所を各支部の薬剤耐性レファレンスセンター(仮称)とした。CRE の検査のための研修を 19 カ所の地方衛生研究所に対して行った。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHEC のサーベイランス:2014 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 2767 株であった。

1.2 コントロール株、プライマーの配布および情報提供を実施した。

1.3 下痢原性大腸菌 EQA の実施:菌株(2013-2014 年用)10 株を用い精度管理を実施したところ、すべての菌株において血清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

における臨床分離株の収集状況：今年度 37 株が追加された。2014 年 3 月末現在で、合計 316 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。

2.2 レジオネラ免疫血清検査法について混合血清 3 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2013 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 951 株で実施した。

3.2 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の T 型別：2013 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の報告が 50 症例あった。最も多く分離された型は TB3264 型で全体の 30%であった。

3.3 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の emm 型別、M 型別：STSS の確定診断例 50 例中、emm89 型(M 型別不能)が 15 例(30%)で最も多かった。

■カンピロバクター

1. Lior 法及び Penner 法による血清型別：2013 年に分離された *C. jejuni* 337 株を Lior 法によって、336 株について、Penner 法で型別を行い、それぞれの検査法の特性が判明した。

2. PCR 法による型別法の検討：4 回の PCR を行うことで 10 種血清群の型別が可能となった。

2. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2013 年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株(NA、NFLX、OFLX、CPFX)の割合は、43.6%、*C. coli* では、62.5%であった。一方、エリスロマイシン (EM) に対する耐性率は、*C. jejuni* では 1.2%、*C. coli* では 18.8%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. エキノコックス症：ヒトの疑診例 2 例は抗体検査陽性で、多包性エキノコックス症と診断され、いずれも北海道との関連が認

められた

2. クドア感染症：厚労省担当者との情報交換により、届出は従来通り、患者の喫食残品におけるクドアの存在を顕微鏡下に確認することに基づく確認された。

3. 肺吸虫症：検査したイノシシ 7 頭のうち、3 頭から肺吸虫の幼若虫が検出された。

■ジフテリア・ボツリヌス

1. 講習会および研修会：ボツリヌス症および *C. difficile* 感染症の細菌学的検査に関して講習会と研修会を行った。それぞれ、4 および 16 件の参加があった。

2. *Corynebacterium* 属菌感染症および CDI によるアウトブレイク事例の調査：検査室に対して指導を行った。

3. 診断用ボツリヌス抗毒素の標準化：D 型および G 型の抗毒素の標準化は終了し、C 型については検討中である。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱患者をウイルス学的に確定し、抗ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築した。デング熱患者血清との交差反応をわずかに示す患者血清が存在した。検出用リアルタイム PCR 法のプロトコールを作成し、希望する地方衛生研究所には遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

2. 日本脳炎ウイルス：遺伝子検出法としてリアルタイム逆転写 PCR (rtRT-PCR) は遺伝子 1 型、3 型に対する型別検出系は確立され、十分な感度と特異性を有していた。しかし、E 領域に設定された 1-3 型共通検出系は非特異反応を来すことが多かった。そのため NS5 領域に設定し、日脳疑い患者血清を用いて評価を継続した。

■リケッチア

1. multiplex realtime PCR：特異性と汎用性、臨床検体に対する有効性を検証した結

果、標準血清型のオリエンチアおよび全ての紅斑熱群リケッチアが検出可能であった。

2. 全国情報の共有の機会と担当者のスキルアップ：研究協力者である衛研担当者間の情報共有を可能とする機会をそれぞれ積極的に行い、相互の連携を可能とする調整を行った。研究会等に参加、発表を行うことにより、担当者自身のレベルアップを志すとともに、衛研関係者以外のリケッチア症関連の研究者や医師との連携を積極的にすすめ、より深い情報の蓄積を継続している。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)

1. ノロウイルス：GII.4 2004 (Narita104)、2006a (Saga-1), 2006b (Aomori), 2008a(Sakai), 2012 変異株(NI, LM)のリコンビナントバキュロウイルスから、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作出およびモノクローナル抗体の作出に成功した。新規 genotyping 法の普及活動として IASR8 月号にノロウイルスの遺伝子型 2014 年度版を掲載した。

2. ロタウイルス：全ゲノムセグメントを対象としたロタウイルス分子疫学法として、RNA-PAGE パターンフィッティング法と命名した手法を開発した。ロタウイルス検出マニュアルを作成し、IASR にロタウイルス特集を組み、出版した。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：8名の参加者と3名の講師でワークショップを開催した。内部精度管理試験として、細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験を行い、グループ討論により SOP ひな形を作成した。SOP の項目には基準がないため、今後検討が必要である。

■麻疹・風疹

1.EQA のデザインの検討：感度、特異度、ならびに遺伝子解析技術に対する EQA の方

法を検討した。

2. RNA 検体の送付法の検討：分解されやすい RNA 検体を劣化なく、手間、コストを最小にして送付する方法として、FTA カードを採用した。濃度管理が求められる標準 RNA (合成 RNA) の送付には RNastable (Biomatrix) を採用した。

■百日咳

1. レファレンス関係：レファレンスセンター以外の地衛研6施設へ *B. holmesii*-LAMP キット1件、4Plex リアルタイム PCR キット8件、陽性コントロール DNA 1件を配布した。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株 (260 株) における Prn 欠損株の出現状況について疫学的解析を行った。

3. マクロライド耐性菌の調査：2013-14 年の国内臨床分離株 (26 株) の EM に対する MIC を <10 µg/mL と判定した。

■抗酸菌：

1. 外部精度評価への参加希望施設の調査：54 施設が参加を希望した。3 種類の EQA 用 DNA を送付し、約 2 ヶ月半で型別結果の報告を受け取った。

2. VNTR 分析に利用しているローカセット・PCR 産物のサイズ測定方法：各施設の分析対象ローサイおよび分析方法に関する回答が得られ、分析法としてはアガロースゲル電気泳動が 37 施設と最も多かった。

3. 外部精度管理の正答率の比較：ほとんどの分析法で 95%以上の正答率であり、分析ローカセットでも 94-100%の正答率であった。

■動物由来感染症：狂犬病ウイルス RT-PCR ブラインドテストの結果、数サンプルを除いて、感染研と同じ結果が得られた。

■HIV 関連感染症：ネットワーク体制を推進し、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。特に、年齢構成について、新規報告数では 30 歳代後半が最多で、年齢人口 10 万人あたりの HIV 患者数では 20 歳代後半が最も高かった。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。

■アデノウイルス：77 箇所の地方衛生研究所に対してアンケート調査を行い、100%の回収率を得ることができ、84%がアデノウイルスの分離が行われていた。PCR 型別検査は 75%で実施されていた。情報発信の強化に関する意見が多かった。

D. 考察

■病原体検査 SOP の作成：作成した真菌検査用 SOP は検査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。さらに、詳細な検査項目については、現行では付表として作成している。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され検査の精度管理基盤となることを期待する。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：今後の以下の項目を検討することが必要である。

1. EHEC 検査マニュアルの改訂
2. EQA の実施
3. ウシ由来 EHEC 株の分布解析
4. レジオネラサーベイランス：感染源推定の精度を高める。臨床検体からの菌の分離の重要性。
5. A 群レンサ球菌のワクチンとして、26 価、または 30 価の M タンパクワクチンが開発

中であるが今後、どこの施設でも型別が可能な emm 遺伝子型別の普及が課題。

■カンピロバクター：近年、カンピロバクターの血清型別率が低下しているため、PCR による血清型別の検討を行った。標準株での型別は一部で可能になり、今後、実用性に対する評価を行う予定である。遺伝子および抗原成分の両側面から検討を行い、型別率を上げていくことが重要である。

■寄生虫：エキノコックス症流行地の拡大が懸念されることから、新たな監視体制の構築が必要となっている。食品寄生虫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。そのために情報交換と相互研修がまず重要であると考えられた。

■ジフテリア・ボツリヌス

1. ボツリヌス症：稀少感染症であるが、地方衛生研究所がその重要性を認識しているため、検査の技術移転をすることにより、地方自治体における検査体制は整備されると考えられる。

2. *C. difficile* 感染症：希少な疾患ではないが、医療関連感染症として重要であり、ひとたびアウトブレイクが発生すると対応に困難を極める。実際、自治体によって対応は多様である。

3. *Corynebacterium* 属菌：今回アウトブレイク事例を報告したが、地方衛生研究所においても、提出された菌株や検体の検査を行うだけでなく、細菌学的検査に関して医療機関に指導する能力が求められると考えられた。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱はデング熱やチクングニア熱ほどの世界的流行拡大傾向はみられていない。しかし、臨床症状がデング

熱に似ている上に、抗原性もデングウイルスと近似である。したがってデング熱流行地域では流行があっても見過ごされている可能性がある。デング熱同様感染者により日本国内に持ち込まれ、国内流行が発生する可能性があり、デング熱と鑑別できる体制を整えておく必要がある。

2. 日本脳炎ウイルス：赤血球凝集阻止抗体、補体結合反応抗体検査は必ずしも感度は高くないので、より高感度で特異性の高い遺伝子型 1-3 共通の遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を構築、確立した。急性脳炎患者の髄液を用いて評価した結果、非特異的な反応を認めず、日本脳炎ウイルス遺伝子検出検査として有用であると考えられる。

■リケッチア：新規診断法等の相互評価（標準化）を目的に、つつが虫病と日本紅斑熱を同時に検討する multiplex real time PCR について多施設間での評価検討を行った。昨今、多様な感染症検査に対応を求められる衛研においては、単発症例として検査依頼が多いリケッチア症の検査をできるだけ負担を少なくかつ確実に診断していく上で、有効な検査系である。レファレンスセンターを中心とした地域内、レファレンスセンター同士を結び付けた地域間の全国的なネットワークを維持する事が、決して少なくない、また対応の遅れによりいまだ死者をだすリケッチア症対策の基盤となる事が期待できる。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：初年度行ったアンケート調査の結果を踏まえて、検査に関するワークショップを開催した。ウイルス分離における細胞の維持管理の重要性を認識する機会となっている。参加者が問題を発見し、グループディスカッションで討議をおこなう参加型研修コースは今後も実施につき検討する必要がある。

ある。

■麻疹・風疹：EQA の効果的な方法について今回のデザインに従って試行し、実施施設に過度に負担のかからない、効果的な方法を検討していく。

■百日咳：平成 26 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キット ver3.2 を配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。レファレンスセンター内における遺伝子検査の整備が完了したと言える。今後は検査キットの更新・補充への対応が必要課題となる。Prn 欠損株の流行調査により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少していることが新たに判明した。継続した監視が必要である。マクロライド耐性菌は検出されなかったが、今後は他国から流入する可能性があるため、臨床分離株の収集と薬剤耐性の定期的なモニタリングは重要な検討課題となる。

■抗酸菌：全国 54 の施設で行われている VNTR 型別法に関する初めての外部精度評価を行った。正確に分析できる分析システムやコピー数を算出するため、方法及び正答率が低いローカスのプライマーの変更等が必要と考えられる。

■動物由来感染症：狂犬病の遺伝子検査系を地衛研で簡便かつ容易に行うために、地衛研が RT-PCR 用に通常使用している機器と試薬でブラインドテストを行ったところ、参加した地衛研の全てで RT-PCR が可能であることが明らかとなった。各地衛研の異なる機器等条件下での検査成績や検出限界等の知見を共有することは、より機能的なラボネットワークの強化につながるものと考えられた。

■HIV 関連感染症：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、年齢構成について得られた情報から、若年層の HIV 罹患率の高さには、留意が必要と考えられた。

■アデノウイルス：現在、理論的には完全長の配列決定が簡単に出来る時代である。しかし、現実的には通常のルーチン検査でアデノウイルスに適用するのは、経済的に実施困難である。引き続き、簡易・安価かつ正確でコンタミリスクの少ない検査法を開発する必要がある。

E. 結論

■病原体検査 SOP の作成：真菌検査のための標準作業手順書 (SOP) を作成した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：今回、新たな薬剤耐性菌に対する検査対応が求められるようになったことから、レファレンスセンターを設置し研修をおこない、全国における検査体制の強化が図られた。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：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のためには、病原体検出マニュアルの記載事項の整備、改訂等をすすめることが重要である。また、安定的なネットワーク形成には、各施設において実施可能であり、技術的継承が用意であることも必要である。本研究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ること、問題点、ニーズを抽出することがもとめられ、ラボネットワークの充実度を検証する必要がある。感染研が参加している EQA システムが応用可能か更なる検討が必要である。

■カンピロバクター：2013 年にヒトから分

離された *C. jejuni* 337 株について血清型分類を実施したところ、検査法の特徴が判明した。PCR による型別法は引き続き検討が必要である。薬剤耐性株の出現状況は、キノロン系薬剤、EM 共に例年とほぼ同様の耐性率であった。

■寄生虫：エキノコックス症に関する監視体制は十分と言えず、地研や保健所、医療機関等への情報提供を行って体制整備を図る必要がある。また本症伝播に重要な役割を果たすと考えられるイヌなどの終宿主動物に関しては、これを対象とした簡易な検査方法の開発と普及が必要である。さらに食品寄生虫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。情報交換と相互研修がまず重要である。

■ジフテリア・ボツリヌス：地方衛生研究所において、提出された病原体や臨床検体において検査を行うだけではなく、その感染症を疾患として理解し、保健所、医療機関とともに対応にあたっていく姿勢が求められていると考えられた。また医療関連感染、特にアウトブレイク対応では、医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所、さらに、(特に検査を外部委託している場合は) 民間検査センターがネットワークを結び、対処することが重要と考えられた。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：ポリネシアなど太平洋島嶼国で流行しているジカ熱の実験室診断系を確立し、アルボウイルスレファレンスセンターと情報共有した。3 例の輸入症例を確定診断した。遺伝子型 1-3 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を改良した。

■リケッチア：多施設間で検討した multiplex real timePCR は、つつが虫病、

日本紅斑熱を含む輸入症例としても注すべき紅斑熱群リケッチアを効果的に検出可能であり、臨床検体を用いた従来法との比較評価でも良好な結果を示した。多様な感染症検査を行う地方研究所においては、負担の少ないスクリーニング系として有効な検査系である。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス): ノロウイルス・サポウイルスの糞便パネルを充実させ、バリエーションに対するモノクローナル抗体を作製した。マイクロチップ RNA-PAGE を用いたロタウイルス分子疫学手法にパターンフィッティングの手法を導入した。ロタウイルス検査マニュアルを完成させた。ノロウイルス・ロタウイルスの IASR 特集号を出版し、啓発活動を行った。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス): エンテロウイルス検査に関する内部精度管理を制度として普及するために、①SOP の項目の検討、②教材、SOP 案の作成、③持続可能な実施スケジュールの検討、④標準参照品の供給体制の確立(含む保管)、⑤意義を理解する目的の精度管理導入研修、など検討してゆく必要性が認められた。

■麻疹・風疹: 麻疹検査診断法である nested RT-PCR 法の EQA 法を検討した。また、RNA 検体を送付方法について検討した。20 施設程度で EQA 法を試行し、問題点を検討していく。

■百日咳: 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。また、百日咳流行株の解析により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少傾向にあること、近年の臨床分離株はすべてマクロライド感性菌であることを確認した。

■抗酸菌: VNTR 型別法に関する外部精度評価を 54 施設に対して行い、全ローサイ完

全一致だったのは 36 施設だった。アガロースゲルを用いた電気泳動による分析が使用頻度・正答率ともに最も高かった。幾つかのローカスで正答率が低く、増幅効率が悪いことから使用プライマーの変更を含めて再検討する必要がある。

■動物由来感染症: 狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、狂犬病検査について遺伝子検査法の検証を RT-PCR ブラインドテストによって行い、抗原検査の標準化を行うために必要となる陽性対照スライドの作製と配布を行った。本ネットワークの構築によって感染研と地衛研の間でレファレンス機能向上に必要となる検査手技と関連情報の共有および検討すべき課題等が明らかとなり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が期待された。

■HIV 関連感染症: 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。

■アデノウイルス: アデノウイルスの地方衛生研究所を対象としたアンケートによりウイルス分離が多く実施されていることが明らかになった。レファレンス活動への要望として、精度管理や、マニュアルを分かりやすくしてほしいという意見が見られた。

F. 健康危険情報

■カンピロバクター: *C. jejuni* のキノロン系薬剤に対する耐性株の割合は 43.6%, *C. coli* では 62.5%で、非常に高い状態が続いている。カンピロバクター下痢症の治療のための第一選択薬として推奨されている EM に対する耐性率は *C. jejuni* で 1.2%, *C. coli* で 18.8%である。薬剤耐性菌の出現状況について注視する必要がある。

■ ジフテリア・ボツリヌス：
Corynebacterium 属菌は、無菌的検査材料から分離されても検体採取時あるいは培地への接種時のコンタミネーションと考えられがちであるため、今回経験した *Corynebacterium striatum* によるアウトブレイクは貴重な事例である。また、今回発生した *Clostridium difficile* 感染症事例は非常に大きなアウトブレイクであるにもかかわらず、医療機関や自治体（地方衛生研究所）における危機感が低かったことは大きな問題と考えられた。

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

G. 研究発表

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。

II. 分担研究報告書

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

真菌検査標準作業手順書（SOP）の作成

研究代表者	宮崎義継	国立感染症研究所	真菌部
研究協力者	梅山 隆	国立感染症研究所	真菌部
	金子幸弘	大阪市立大学大学院	医学研究科
	大野秀明	埼玉医科大学	総合医療センター
	星野泰隆	国立感染症研究所	真菌部
	田辺公一	国立感染症研究所	真菌部
	山越 智	国立感染症研究所	真菌部
	名木 稔	国立感染症研究所	真菌部
	壇辻百合香	国立感染症研究所	真菌部
	中山靖子	国立感染症研究所	真菌部
	浦井 誠	国立感染症研究所	真菌部
	金城雄樹	国立感染症研究所	真菌部
	上野圭吾	国立感染症研究所	真菌部

研究要旨 病原体検査において、品質・精度を維持・向上させるため標準作業手順書（Standard Operating Procedure, SOP）の作成とSOPに基づいた検査の施行が求められる。本研究では、国立感染症研究所真菌部における真菌検査のためのSOPを作成しSOPに準じて検査を試行した。定期的に改訂は必要ではあるが、他の病原体に関する検査のSOPを作成する際に本報告書のSOPが参考になると考える。

A. 研究目的

感染症法に基づく病原体の行政検査は、ほとんどの自治体において地方衛生研究所（以下、地衛研）が行っている。対象となる病原体の種類は、ウイルス・細菌・真菌・原虫・寄生虫と多種に及び、それぞれの病原体に対応して、高度な検査技術によって同定される必要がある。近年、様々な事情により、地衛研の検査基盤の継承が困難になってきており、検査品質・精度の維持・向上のためにも標準作業手順書（Standard Operating Procedure, SOP）の作成が必須となってきている。しかしながら、多くの地衛研においては感染症検査のSOPが作成されていないのが現状である。

本研究では、SOP作成の際に参考となるようなひな形として、真菌検査における

SOPを作成することを目的とする。

B. 研究方法

国立感染症研究所真菌部において、真菌検査についての標準作業手順書（SOP）を作成した。作成したSOPに基づき検査を行い、SOPの内容について検証を行い、必要に応じて改訂を行った。

C. 研究結果

遺伝子検査を中心とした真菌検査を実施する上での統一ルールを記載したSOPを作成した。国立感染症研究所真菌部内での意見を集約し、改訂を重ね、2015年1月現在試験運用中の標準作業手順書（SOP）の概要を附1に示す。

D. 考察

真菌症検査のための SOP および検証を行った。本研究で作成した 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。さらに、詳細な検査項目については、現行では付表として作成している。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され検査の精度管理基盤となることを期待する。

E. 結論

真菌検査のための標準作業手順書 (SOP) を作成した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から. 小児科. 55(4):403-6, 2014 年.

学会発表

国際学会

該当なし

国内学会

1. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公徳, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 澁谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第 58 回日本医真

菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.

2. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 澁谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
3. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
4. 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
5. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10 月 29-31 日, 2014 年, 東京.
6. 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7 月 9-11 日, 2014 年, 仙台.

7. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会. 6月18-20日, 2014年, 博多.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコードNo :
 版 No :
 承認者氏名 :

署名又は捺印

Standard Operating Procedure

標 題	臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査		
SOPN		版 No	0.01Gb
発効日	2015 年	月	日
作成者	真菌部	主任研究官 (署名)	2015 年 月 日
	真菌部	第1室 室長 (署名)	年 月 日
室 長	真菌部	第3室 室長 (署名)	年 月 日
	真菌部	部長 (署名)	年 月 日
承認者	真菌部	宮崎義継 (署名)	年 月 日

1. 目的

臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査の手順を記載する。

2. 適用範囲 (手順の対象)

保健所・地方衛生研究所から感染研に依頼される行政検査、および、医療機関や大学等から当部に依頼される依頼検査がある。適用範囲は以下の通りとする。

- 培養菌 (すでに培養された真菌) の同定・感受性検査
- 臨床検体 (未培養) からの真菌の分離および同定・感受性検査、および/または遺伝子検査
- 臨床検体の血清検査
- 固定された検体等からの遺伝子検査
- その他真菌および真菌症に関連した検査

なお、環境菌からの真菌分離については別途考慮する。

3. 実施場所

真菌部
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-042
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-043

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
 SOPコードNo :
 版 No :
 承認者氏名 :

署名又は捺印

Standard Operating Procedure

感染症研究所戸山庁舎 3階 03-045
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-046
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-049
 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-051
 感染症研究所戸山庁舎 地下3階 BSL3 実験室第6室

4. 材料、機材・機器

4.1 作業環境

BSL1 および 2: 感染症研究所戸山庁舎 3階 03-043 および 03-049 (共通部屋), 03-042 および 03-045 (RI)、03-046 (小部屋)、03-051 (糸状菌専用小部屋): 見取り図

BSL3 (またはその疑い): 感染症研究所戸山庁舎 地下3階 BSL3 実験室第6室

4.2 設備

安全キャビネット: 臨床検体処理用 1台 (03-043)、糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 6台 (03-043)

クリーンベンチ: PCR 反応液調製用 1台 (03-045)、DNA 添加用 1台 (03-043)

4.3 機器

サーマルサイクラー: 3台 (03-043)

培養器: 臨床検体専用 2台 (03-043)、糸状菌専用 3台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 2台 (03-046)

振盪培養器: 糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 3台 (03-043)

オートクレーブ: 培地作製用 1台 (03-043)、廃棄用 2台 (03-051, 03-046)

遠心器: 臨床検体処理用 1台 (03-043)、糸状菌専用 2台 (03-051)、糸状菌以外の生菌用 1台 (03-046)

顕微鏡: 蛍光位相差微分干涉倒立型顕微鏡 1台 (03-051)、正立型顕微鏡 1台 (03-051)

実体顕微鏡: 1台 (03-051)

分光光度計 (single, plate 用)

スキャナー (03-051)

シクエンサー (03-043)

DNA 濃度測定器

4.4 材料

① 試薬類

滅菌蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水

PCR 試薬 (別紙)

培地用試薬 (別紙)

② ディスホ製品

a) チューブ類

DNA、RNA および病原体フリーの、0.2 ml PCR チューブ、1.5mL のエッペンチューブ

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOPコードNo :
版No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

(10・50 本/袋)、15mL および 50mL (10・20 本/袋) の遠心管を用いる。常に、包装されたものを新規に開封し用いる。

b) ピベットチップ類

DNA、RNA および病原体フリーのピベットチップおよびピベットを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し用いる。

c) ホモジナイザー

1.5 ml および 15 ml のディスポーザブルホモジナイザーを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し、用いる。

d) 寒天培地塗布用コンラージ棒

検体の寒天培地への塗布用に L 字型ディスポーザブルスプレッダーを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し、用いる。

e) 個人防護具 (PPE)

グローブ、マスク、前掛け、キャップ

③ その他

ハサミ、ピンセット、カミソリ刃
ピベットマン、ピベットコントローラー
アルミホイル、サランラップ
白衣、青衣、黄衣
感受性検査用プレート、ディスポーザブルキュベット、ディスポーザブルリザーバー、
ストレーナー

5. 実施手順

5.1 概要・原理

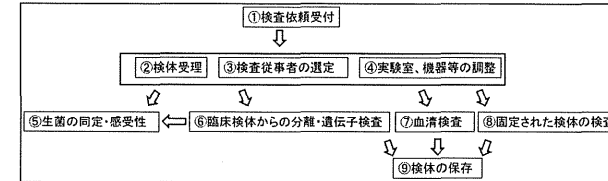
- 培養菌の同定は、生化学的性状、生理的・形態学的性状 (培養条件、コロニー形態、顕微鏡下の形態) と遺伝子検査を組み合わせて行う。また、感受性検査は、国際的に推奨されている真菌感受性検査の標準法に準拠して行う。
- 臨床検体からの真菌の分離は、臨床背景を考慮し、適切な培養条件等を用いて行う。また、分離後の同定・感受性は、上記に準ずる。遺伝子検査は、必要に応じて考慮し、適切な方法を選択して行う。
- 臨床検体の血清検査は、各血清診断の定法に準じて行う。
- 固定材料からの遺伝子検査
- その他真菌および真菌症に関連した検査は、定法が定められないため、状況に応じて検討する。

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOPコードNo :
版No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

5.2 手順



① 検査依頼受付

- 1) 電話、メール等で連絡。依頼の窓口は、真菌部長、担当室長とする (ただし、不在等の場合は、担当室主任研究官等が代行する)。また、部長以外に直接依頼があったものについては、部長へ報告、承認を経て正式な受諾とする。
- 2) 所定の依頼書 (別紙 真菌検査依頼書、輸入真菌検査依頼書) への記載 (依頼者)
- 3) 依頼書の受付 (Fax、e-mail または郵送)
- 4) 必要に応じて、検体の梱包・送付法 (持参、ゆうパック、他の宅配業者等の選択) について指示する。

② 検体受理

- 1) 検体の種類、数を確認し、依頼書と照合する。検査開始チェックシートに記入する。検体に検査固有の番号 (真菌部 ID) を振り当てる。
- 2) また、検体受理を依頼者へ報告し、依頼書にチェックを入れる。

③ 検査従事者 (検査担当者および検査実施者) の選定

- 1) 検査担当資格者 (別途定める) の中から、真菌部長または担当室長 (ただし、不在時は、担当室主任研究官等が代行) が検査担当者 (以下担当者) の選定を行う。通常は 1 名を選定するが、2 名以上を選定した場合には、1 名を主担当者とし、その他を副担当者とする。
- 2) 検査実施資格者 (別途定める) の中から、検査実施者 (以下実施者) を選定する。実施者は、担当室長および担当者の依頼により、検査実務とその記録を行う。なお、担当者が実施者を兼ねてもよく、必要に応じて複数の実施者を選定することが出来る。

④ 実験室、機器等の調整

担当室長または担当者は、臨床診断、患者渡航歴等の情報から推定される真菌の BSL を確認し、実験室使用等の調整を行う。

⑤ 培養菌の同定・感受性検査

a) 糸状菌 (疑い含む)

培養菌の取り扱いは、03-051 内にある安全キャビネット内で行う。

検体を、ディスポプラスチックループ (1 もしくは 10 µl サイズ) を用いて、平板培地 (形態観察および継代)、斜面培地 (感受性用)、液体培養 (遺伝子検査および保存用) で培

		(検定等 SOP 様式 1)
標題	:	
SOPコード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- 養する。必要に応じてスライドカルチャーを行う。
- 遺伝子検査（別紙）を定法により行う。
- 感受性検査（別紙）を定法により行う。
- b) 酵母（疑い含む）
- 培養菌の取り扱いは、安全キャビネット 2 で行う。
- 検体を、平板培地（形態観察および継代、感受性）、液体培養（遺伝子検査および保存用）で培養する。
- 生化学的同定検査は必要に応じて考慮する。
- 遺伝子検査（別紙）を定法により行う。
- 感受性検査（別紙）を定法により行う。
- c) BSL3 真菌（疑い含む）
- 培養菌の取扱いは、B3Fにある BSL3 区域実験室細胞 6 内の安全キャビネット内で行う。*Coccidioides* 属が疑われる検体については、適宜アクリル性のキャビネットを安全キャビネット内に設置して取り扱う。
- 検体をスクリーキャップ付き斜面培地（ファルコンチューブなど）で継代培養する（遺伝子検査、保存用、形態観察（必要時））。培養は蓋付きプラスチック容器に収納のうえ培養器に入れる。培地等を一時保管する場合は、密封可能な容器、袋に入れ適切な場所に保管する。
- 形態観察（別紙）
- 遺伝子検査（別紙）
- d) 培養菌の保存
- 基本的には 20%グリセロール含有の液体培地（YPD、BHI など）の形態で、セラムチューブ 3-5 本分を保存する。表示は真菌部 ID もしくは菌株につけられた識別可能な固有の番号とし、保存の際にはリスト記入を行う（保管箱番号も）。保管庫として、03-051 実験室前の超低温フリーザー、地下 3 階フリーザー室の超低温フリーザーとし、常時施錠する。BSL3 真菌についてはリスト記入、ならびに細胞 6 室に備えてある台帳両方に記入し、細胞 6 室内の超低温フリーザーに保管し、常時施錠する。
- ⑥ 臨床検体からの分離・遺伝子検査
- a) 真菌の分離
- 未培養の臨床材料は、真菌の分離、遺伝子学的検査、血清検査のいずれか、または複数ないし全てを行うかどうかを考慮し、検体を分割する。
- 全検体（小さな組織片など分割できない場合）または検体の一部を、寒天培地または液体培地（無菌の液性検体など）に塗布・添加し、所定の培養器で、適切な温度下（25℃と 37℃など）で培養する。糸状菌が培養された場合には、ただちに糸状菌用の培養器に移して培養を継続する。2~8 週間培養して真菌の生育が認められない場合は、培養陰性と判定する（培養期間は、検体毎に考慮する）。
- 分離された後は、① 培養菌の同定・感受性検査に従って検査を行う。
- i. 組織検体
- 無菌検体は、無菌的（遺伝子検査を行う場合には DNA 等の汚染がないよう）に操作する。必要に応じて、細断・すりつぶし等の処理を行う。細断に際しては、滅菌したビ

		(検定等 SOP 様式 1)
標題	:	
SOPコード No	:	
版 No	:	
承認者氏名	:	署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- ンセット、ハサミあるいは使い捨てのメス等を用いる。
- 検体そのもの、あるいは細断・すりつぶした検体の全量または一部を寒天培地に塗布し、培養する。
- また、必要に応じて、DNA 抽出等を行う。
- ii. 血液検体
- 全血は、全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、血清分離等の調整を行い、血清検査や血清からの DNA 抽出等を行う。
 - 血清は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。DNA 抽出には、proteinase K による lysis 処理を行った後、westase 処理を行ったものを PCR の鋳型とする。
 - 血漿は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。DNA 抽出には、血清と同様の処理を行う。
- iii. 液性検体（血液以外の無菌検体）
- 必要に応じて、遠心分離し、沈さ部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈さまたは上清からの DNA 抽出を行う。
- iv. 液性検体（上記以外の液性検体）
- 必要に応じて、遠心分離し、沈さ部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地に塗布し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈さまたは上清からの DNA 抽出を行う。
- v. その他の検体
- 上記以外の検体については、用途に応じその都度考慮する。
- b) 遺伝子検査
- 上記の処理で得られた DNA 溶液に対し、定法により PCR を行う。必要に応じて、シークエンスを行い、BLAST 等を用いた塩基配列の相同性検索によって、菌種の同定を行う。遺伝子検査の詳細は、別途定める。
- ⑦ 血清検査
- 全血の場合は、血清を分離する。血清はそのまま用い、髄液は遠心後その上清を使用する。その他の体液は、必要に応じて考慮する。ELISA 法では必ず duplicate で測定する。
- i. クリプトコックス抗原
 - ii. ヒストプラズマ抗原および抗体
 - iii. コクシジオイデス抗原および抗体
 - iv. アスペルギルスガラクトマンナン抗原
 - v. アスペルギルス沈降抗体
- 検査陰性時の取り扱い
- 陽性対照、陰性対照が確実に指示書の範囲であることを確認できれば陰性と取り扱う。判定ボーダーライン上の場合は再検査とする。

(検定等 SOP 様式 1)

Standard Operating Procedure
標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

c) 臨床検体の保存

基本的に検査後に残った臨床検体は全て（遠心後の上清も）について適切な容器に収納の上、キャップをシールし保管する。検体にはすべて真菌部 ID もしくは検体 ID を表示する。複数個の容器がある場合は、ビニール袋などにひとまとめにし、袋にも ID を表示する。チューブ検体のみの場合は臨床検体箱へ収納し、その他は保存用フリーザーの収納棚（-30℃）に保管する。

⑧ 固定された検体の検査

ホルマリン固定された検体、パラフィン包埋された検体からの遺伝子検査等は、QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue kit もしくは Takarabio Extraction buffer for MightyAmp® FFPE などを用いて DNA を抽出し、遺伝子検査を行う。以降、⑥b) 遺伝子検査の項参照。

⑨ 検体の保存

送付されてきた検体は全量を検査に供する必要がない場合は、少なくとも検査結果が確定するまで適切に保管する（血清等の臨床検体で長期保管に耐えられる場合は専用の保管場所に保管する）。

6. 判定、報告および決裁

6.1 判定

検査結果は担当者がまず確認を行う。渡航歴など臨床情報がある場合は、その情報との大きな矛盾がないか（米国渡航歴のない患者からコクシジオイデス真菌が分離されるなど）などを総合的に判断する。部内の検査会議において、担当者、担当室長、部長および関係者が、検査結果の妥当性を吟味し、結果に疑問が挟まれる場合は、再試験等を考慮する。

矛盾がない場合や、再検査でも同じ結果が得られた場合には、検査を終了する。

6.2 報告

仮報告・中間報告は部長から検査依頼者宛に E メール等で行う（この際関係者にも転送する）。なお、部長からの指示があれば、仮報告・中間報告を担当室長または担当者等が代行できる。

最終検査結果が出次第、検査報告者（通常は担当者または主担当者を当てる）が送付検体解析報告書（以下報告書）をまとめる。

報告書の内容を、検査責任者（通常は部長とし、部長の指示により、担当室長等が代行できる）が確認する。報告書は、添付文書等の必要な書式とともに、部長が依頼者に送付する。

6.3 決裁

報告書を送付した後、担当室長が検査データベースに終了の入力を行う（担当室長の

(検定等 SOP 様式 1)

Standard Operating Procedure
標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

指示により担当者等が代行できる)。担当者が、検査終了チェックリストで、最終確認を行い、真菌検査結果記録書の作成を行う。全ての関連文書をファイルし、真菌検査結果記録書を表紙にして、検査実施者の確認を得た後、担当以外の職員、部長に提出し、それぞれの署名を得る。

7. 記録の保存・保管

検査リストの記録は別途行うこととし、個別の検査の記録について記載する。

1) 記録の様式

デジタル記録およびハード記録（紙媒体）とする。

2) 保存方法

デジタル記録は、保存用の共通コンピューター内のストレージに個別のフォルダーを作成し、保存する。共通コンピューターは、通常のリ線からは隔離する。共通コンピューターの不具合等に備え、外付けのストレージ装置でもバックアップをとっておく。また、必要に応じて、CD や DVD 等のメディアにも保存する。

3) ハード記録

記録書の生データと、一部の添付ファイルは印刷して、一つのファイルとして保存する。一つのファイルに、複数の検査記録を保存できる。ファイルは、施錠可能な棚に保管する。

4) 保存期間

最短 5 年保存するが、保存スペースが可能な限り長期に保存する。

8. 関連文書

教育訓練 SOP

9. その他

9.1 本検査にかかるミーティング

個別案件の協議、検査技術の向上、情報共有および収集、および教育訓練を目的として、真菌検査に関するミーティング（検査ミーティング）を週一回程度行う。

9.2 教育訓練

教育訓練の SOP は別途定めるが、概要は以下の通りである。

● 新規従事者教育訓練

新規従事者（検査担当者および検査実施者に従事するものを指す）の資格認定を目的として、実地訓練を行う。実地での見学および実技研修を行う。実技研修は、熟練した従事者と同伴で、SOP に準じた方法により、臨床検体の処理を行う。

● 継続者教育訓練

上記ミーティングおよび実地訓練を持って教育訓練とする。

9.3 機器点検、消耗品類の管理

定期的に機器および消耗品等の点検・管理を行う

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

- 機器点検
- 消耗品等の在庫状況の確認、ロット管理

PCR 酵素消費期限およびロット、premix の調製年月日、RAPID の消費期限およびロット、血清診断試薬の消費期限およびロット)

9.4 代替手段、代替機器

検査が感染研内で不可能な状態となった場合には、その検査の必要性を判断した上で、依頼先はその旨を説明し、検査を延期または中止するか、他の代替施設を紹介し、再依頼する。

設備または機器が、故障またはメンテナンス等により使用不可能になった場合には、部内の代替設備または機器を用いて検査を行う。

試薬等が入手できない場合には、代替試薬を入手し、試行後に問題がなければ、変更後の試薬を用いる。継続的に元の試薬が入手できない場合には、SOP を変更する。

9.5 届け出関係

感染症法における報告義務、所内の届け出義務等に準じて行う。

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

付属文書

当該 SOP の手順の実施にあたって使用する

- 真菌検査依頼書
- 輸入真菌検査依頼書
- 真菌同定等検査依頼に関するお願い
- 真菌症関連の検体に関する運搬方法
- 検査記録書
- 解析結果報告書
- 見取り図
- 別紙および別表

別紙 1 遺伝子検査

別紙 2 感受性検査

別表 1 検査従事資格者リスト

(検定等 SOP 様式 1)

標題 :
SOP コード No :
版 No :
承認者氏名 : 署名又は捺印

Standard Operating Procedure

改訂履歴一覧

検定等 SOP No	
検定等 SOP 標題	臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査

0.01D 版 β版として 2013 年 9 月 4 日作成、2013 年 10 月 1 日より仮実施

0.01E 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

0.01F 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

版	第 1 版		
作成者	部 第 室	年 月 日	
室 長	部 第 室	年 月 日	
承認者	部	年 月 日	
改訂内容理由			

版	第 2 版		
作成者	部 第 室	年 月 日	
室 長	部 第 室	年 月 日	
承認者	部	年 月 日	
改訂内容理由			

別紙 1

遺伝子検査

原理および概要

病原真菌の rRNA 遺伝子は、18S、5.8S、26S、5S の 4 つのサブユニットから構成され、これらのサブユニットの長さは菌種によらず、ほぼ同じである。18S と 26S の間にある internal transcribed spacer (ITS) および 26S と 18S の間にある intergenic spacer (IGS) 領域は、菌種により長さが著しく異なることが知られている。また、26S サブユニットの部分塩基配列 (Domain1/Domain2:D1/D2) は、同種間で 99% 以上の類似度を示すことが分かっている。

杉田らの検討によると、同一種内の ITS 領域の類似度は 99% 以上であり、変種以上の関係では 99% 未満であることが示されている¹⁾。

これらの理由から、現時点では 26S および ITS 領域の塩基配列類似度に基づく同定基準は、おおむね妥当であると考えられている。

また、*Cryptococcus neoformans* および *C. gattii* の区別は、ITS 領域でも可能であるが、その DNA 塩基配列の差異は 1% 程度であり、IGS 領域の塩基配列を比較することによって、より容易に区別が可能となる。

引用文献

- 杉田隆, 西川朱貴: DNA 塩基配列解析による病原真菌の分離・同定, 真菌誌 45 (2): 55-58, 2004.

実際の手順

<培養菌の場合>

遺伝学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう。標準株の遺伝子を対照として、rRNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS) 領域、または rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit) を増幅するプ

ライマーにて PCR を行い、増幅産物が得られた場合には、この産物についてシーケンスを行ったのち、国際的に公表されているデータベースを参照して菌種を同定する。

1) DNA の抽出

培養した菌を集菌し、DNA 抽出キットのマニュアルに従い DNA を抽出する。

2) PCR

1) で抽出した DNA を template にして、panfungal primer (D1/D2 LSU および ITS 領域: プライマーは原則 ITS5-NL4 を使用) または特異的な primer を用いて増幅する。

<未培養臨床検体の場合>

SOP に従って DNA を抽出する。非固定検体の場合は、ITS5-NL4 プライマーを使用する。ホルマリン固定検体では、ITS1-ITS2, ITS3-ITS4, NL1-NL4 プライマーの組合せで行う。糸状菌症疑いの検体では、アスペルギルス β-tubulin PCR プライマーおよびムコル属特異的プライマーを使用する (必要に応じて semi-nested PCR を行う)。

<PCR reaction の組成>

03-045 (RI 室) のクリーンベンチで premix 化したものを用いる。

03-043 のクリーンベンチで陰性対照を添加する。その後、抽出 DNA (臨床検体由来のみ) を添加する。

所定の実験台で、培養菌からの抽出 DNA および、最後に陽性対照を添加する。

DNA ポリメラーゼの添付文書に従い、アニール温度 55℃ もしくは 60℃、伸長時間 1 分で行う。

03-043 に設置してある TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice もしくは Bio-rad T100 サーマルサイクラーを用いて PCR を行う。

1) 生菌より抽出した DNA からの PCR
DNA xμl

100 μM primer 5'	0.5 μl
100 μM primer 3'	0.5 μl
2xPrimeSTARMax	25 μl
PCR用純水	24×μl
計	50 μl

2)臨床検体より抽出した DNA からの PCR

DNA	x μl
100 μM primer 5'	0.5 μl
100 μM primer 3'	0.5 μl
2xMightyAmp buffer	25 μl
MightyAmp DNA polymerase	1 μl
PCR用純水	23×μl
計	50 μl

3) PCR産物の確認・コンタミの予防

1.5% agarose gelで泳動し、増幅産物の有無、大きさを確認する。キャリアオーバーによる汚染を判別可能とするマーカー入り陽性対照を複製し、常に使用する。また、試薬の調製、検体処理、泳動などは物理的に隔絶された場所で実施する(見取り図;別添〇)。試薬調製・DNAの添加に用いるチップおよび1.5 mlチューブは、毎回新しい包装を開封する。専用のピペットマン・チューブブラックを用いる。

陽性対照で増幅が確認され、陰性対照で増幅が認められない上で、抽出DNAからの増幅産物が確認できない場合、遺伝子検査陰性と判定する。

陽性対照:

panfungal PCR	pCR4-ITS-NL-Hph-PC
ヒストプラズマ/コクシジオイデス特異的PCR	pUC19-Coi-Hc-Hph-PC
ムーコル属特異的PCR	pUC19-ZM-Hph-PC
βチューブリンPCR	pUC19-bTub-nest-Hph-PC

陰性対照: PCRグレードの水、抽出に用いた生理食塩水、抽出バッファーを、用途に応じて用いる。臨床検体由来のPCRでは、抽出・精製の際に検体を入れない陰性対照を設定し、検体と同様の抽

出・精製過程を経た溶出液を、PCRの陰性対照とする。

4) シークエンス

PCR増幅産物が確認できれば、増幅産物を精製後、それぞれ、PCRに用いたプライマーで、シークエンスを行う。BigDye(R) Terminator v3.1Cycleを用い、マニュアルに従い試薬を混和する。03-043に設置してあるTaKaRa PCR Thermal Cycler DiceもしくはBio-rad T100サーマルサイクラーを用いて35サイクルのシークエンス反応を行う。

5) ホモロジー検索

国際的に公表されているデータベースであるBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) およびMycobank (<http://www.mycobank.org>)を参照して、99%以上の相同性を基準として、菌種を同定する。比較対象となる菌株はCBSもしくはATCCの標準株とする。99%以上の相同性が得られない場合、再度同定を試み検索する。再同定でも同定できない場合は可能性の高い上位菌種を列挙し、参考結果とする。また、アスペルギルス属に関しては上記以外にβ-tubulin遺伝子、クリプトコックス属に関してはIGS領域の塩基配列まで決定し、同定する。

表1 Panfungal primer

● D1/D2 primer	
NL1	5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA-3'
NL4	5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'
● ITS primer	
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS2	5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'
ITS3	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
ITS4	5'-TCC TCC GGT TAT TGA TAT GC-3'
ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

表2 特異的 primer

● β-tubulin primer	
bTub1	5'-AATTGGTGCCGCTTCTGG-3'
bTub2	5'-AGTTGTCCGGGACGGAATAG-3'
bTub4	5'-AGCGTCCATGTTACCAGG-3'
※通常はbTub1-bTub2でPCRを行う。semi-nested PCRの際には、1回目のPCRにbTub1-bTub2、2回目のPCRにbTub1-bTub4を用いる。	
● クリプトコックス IGS primer	
IGS1F	5'-atc ctt tgc aga cga ctt ga-3'
IGS1R	5'-gtg atc agt gca ttg cat ga-3'
IGS2F	5'-cag gaa gtt aag ctg aag ag-3'
IGS2R	5'-agt gtt tga gcc tac cac gta-3'
※同時にIGS1F-IGS1RおよびIGS2F-IGS2Rの組み合わせでPCRを行う。	

● Cryptococcus mating type PCR primer

STE20AaF	5'-cca aaa gct gat gct gtg ga-3'
STE20AaR	5'-agg acn tct ata gca gat-3'
STE20AaF	5'-tec act ggc aac cct gcg ag-3'
STE20AaR	5'-atc aga gac aga gga gca aga c-3'
STE20DaF	5'-gat tta tct cag cag cca eg-3'
STE20DaR	5'-aaa tgg gat acg gca cgt c-3'
STE20DaF	5'-gat etg tet cag eng cca c-3'
STE20DaR	5'-aat ate agc tgc cca ggt ga-3'

※各プライマーのセットで増幅されるDNA断片の大きさは、STE20AaF・STE20AaR: 588 bp、STE20AaF・STE20AaR: 865 bp、STE20DaF・STE20DaR: 443 bp、STE20DaR・STE20DaR: 440 bpである。

● ムーコル属特異的 primer

ZM1	5'-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3'
ZM2	5'-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3'
ZM3	5'-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3'

※通常はZM1-ZM2でPCRを行う。semi-nested PCRの際には、1回目のPCRにZM1-ZM2、2回目のPCRにZM1-ZM3を用いる。

● ヒストプラズマM抗原 primer	
Msp1F	5'-ACAAGAGACGACGGTAGCTTCACG-3'
Msp2R	5'-ACCAGCGGCCATAAGGACGTC-3'
Msp2F	5'-CGGGCCCGTTTAAACAGCGCC-3'
Msp3R	5'-ATAAGGACGTCACGAAGGGC-3'
※nested PCR用プライマー。1回目のPCRにMsp1F-Msp2R、2回目のPCRにMsp2F-Msp3Rを用いる。	

● コクシジオイデス特異的 primer	
Coi9-1F	5'-TACGGTGAATCCCGATACA-3'
Coi9-1R	5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'

改訂履歴一覧

0.01版 2014年9月1日改定・実施

別紙 2

感受性検査

感受性検査の実施及び判定に際し、精度管理された感受性プレートを実験にてカスタム作製し、国際的に推奨されている真菌感受性検査の標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) および CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して検査を行う。

また、酵母様真菌については、臨床効果と相關する感受性、耐性等の基準であるブレイクポイントが設定されているが、糸状菌については設定されていない。

I. 準備

1. 作業スペースとキャビネット
P2 スペースのセーフティキャビネットを使用する。
糸状菌の取り扱いには P2-051 室を使用する。

2. 使用機材と薬剤プレート

2-1 機材
分光光度計 (Erma Inc.) P2-049 室
三菱クーリングキューベータ P2-051 室 35°C
ミキサー (タイテック S-100)
マルチウエル対応ピペット (BIOHIT 8 チャンネル)
ピペットエイド
マイクロプレートリーディングミラー (特極東製薬工業)
ディスプレイザブルキューベット (アズワン BRA759116)
ピペットマン
ディスプレイザブルピペット (COSTAR)
チップ (QSP)
リザーバ (住友ベークライト) オートクレープして使用する。
セルストレーナー (ファルコン) 糸状菌で使用する。

2-2 薬剤プレート
96-well plate NQD9 (栄研特注品)
-80 C deep freezer でストックし、検査日に解凍して使用する。
2-3 菌希釈液
大塚生食注、Aspergillus 属の場合、生食水に Tween 20 を加えて使用する。

使用薬剤

なお、本施設において試験に供する薬剤は、現地において以下の通りである。
Micafungin (MCFG)、Amphotericin B (AMPH)、5-FC、Fluconazole (FLCZ)、Itraconazole (ITCZ)、Voriconazole (VRCZ)、Posaconazole (PSCZ)。なお、PSCZ は日本未発売である。

精度管理

国際的に推奨されている品質管理株 (*C. parapsilosis* ATCC 22019) を用いて、精度管理を行う。

実施手順

II. 酵母の感受性テスト
真菌感受性検査標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) に準拠して施行する。

- 1. 菌の分離
到着検体の状態に応じ、必要であれば PDA プレートに播き、purity、viability を確かめる。35C で培養し、single colony growth を確認する。
- 2. 菌液の調整と薬剤プレートへの添加
Quality control 株として *C. parapsilosis* (ATCC 22019)、*C. krusei* (ATCC 6258) を使用する。

- 1) candida 種は約 24 h、*C. neoformans* は約 48h 培養コロニー (~1mm 径) をピックアップして植菌する。コロニーは生食水に suspend する。
- 2) 1) を 15 秒 vortex mix し、A530 を 0.08-0.1 に合わせる (McFarland 0.5 に相当)。
- 3) 2) を生食水で 10 倍に希釈する。
- 4) 3) を予めオートクレープ滅菌したリザーバに移し、マルチチャンネルピペットを使用して plate に 0.5 ul ずつ分注するする。

3. 培養

35°C の静置培養で 24h (MCFG)、48 h (MCFG 以外の薬剤) 培養する。
但し、Trailing growth を示す株については 24h 培養する。
C. neoformans は 70-74 h 培養する。

4. 結果判定と保存

マイクロプレートリーディングミラーを使用して目視し、positive control と比較して判定する。判定結果を別表に記入する。また、プレートをスキャナーに画像としてとりこみ、レファレンス用 PC およびレファレンス用 USB メモリーに保存する。
Rem: 必要に応じて A595 の測定をして IC50 を計算することも可能。

- 4-1 AMPH
Complete inhibition (24 hr or 48 hr)
- 4-2 5-FC と FLCZ 以外の azole
IC50 (48 hr)
- 4-3 Fluconazole
IC50 (24 hr or 48 hr)
- 4-4 Echinocandin
IC50 (24h)

Rem: azole で trailing growth を示す株については 24 hr での評価
酵母

真菌感受性検査標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) に準拠して施行する。

III. 糸状菌の感受性テスト
真菌感受性検査標準法 CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して施行する。

1. 菌の分離

PDA スラントに播き、growth を確認する。
たいていの真菌は PDA/35°C/1 week で growth する。
接合菌、*Aspergillus* spp.; 35°C、48 hr、*Fusarium*; 35°C、48-72 hr、さらに 7 日目まで 25-28°C の培養が必要。

2. 菌液の調整と薬剤プレートへの添加

Quality control 株として *C. parapsilosis* (ATCC 22019)、*C. krusei* (ATCC 6258) を使用する。
生理食塩水 (*Aspergillus* spp. では 1% tween20/生理食塩水) に suspend する。
セルストレーナー (4 um) を通して大きな分子をトラップして除去する。
15 秒 vortex mix し、菌種によって以下の OD に調整する。

Fusarium spp. *S. apiospermum*, *Ochroconis gallopava*, *Cladophialophora bantiana*, *R. oryzae* and other zygomycetous species A530 0.15-0.17

Aspergillus, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, *Exophiala dermatitidis*, *S. Sschenckii* A530 0.09-0.13

Bipolaris spp. and *Alternaria* spp. A530 0.25-0.3

2. を予めオートクレーブしたりザーバーに移し、マルチチャンネルピペットを使用して薬剤プレートに1 ul ずつ添加する (x101)
S. apiospermum, *Bipolaris* spp. *Alternaria* spp. では 2x concentrated が必要

* *T.rubrum* ではオートミールアガーを使用。それ以外の皮膚糸状菌は PDA で 30℃、4-5 days あるいは良好な生育が確認されるまで培養し、生理食塩水で調整、セルストレーナーを通し hemacytometer でカウントする。必要な濃度に調製する。検査に必要な 1x10³ から 3x10³ CFU/mL の密度の 2 倍濃いものを調整する。

3. 培養

3-1 温度

静置培養 35℃

Alternaria spp 30℃

3-2 時間

Echinocandin の MEC 評価:

21-26 hr: *Aspergillus* spp, *Paecilomyces variotti*.

46-72hr: *Scedosporium* spp

Control well で十分な growth を確認する。

Echinocandin 以外の薬剤の評価:

21-26 hr: *Rhizopus* spp.

70-74 hr: *Scedosporium* spp

46-50 hr.: その他の糸状菌 (*Fusarium* spp,

Aspergillus spp, *S. schenclai*)

4. 結果判定と保存

マイクロプレートリーディングミラーを使用して目視し、positive control と比較して判定する。判定結果を別表に記入する。また、プレートをスキャナーに画像としてとりこみ、レファレンス用 PC およびレファレンス用 USB メモリーに保存する。

4-1 AMPH-B complete inhibition

4-2 FLCZ, FC, KTCZ IC50 (皮膚糸状菌は IC80)

4-3 ITCZ, PSCZ, Ravuconazole, VRCZ complete inhibition

* 皮膚糸状菌では 80%あるいは 80%以上 阻害とする場合あり (ITCZ, PSCZ, VRCZ)

4-4 Echinocandin (anidulafungin, CSFG, MCFG) MEC

4-5 Ciclopir ox はっきりと規定されていない。80%あるいは 80% 以上阻害

4-6 Griseofulvin はっきりと規定されていない。80%あるいは 80% 以上阻害

糸状菌

真菌感受性検査標準法 CLSI-M38-A2 (糸状菌) に準拠して施行する。

まず、斜面培地 (PDA) に継代したのち、生理食塩水を加え、40 μm メッシュサイズのナイロンメッシュ (セルストレーナー、BD) を通して、孢子懸濁液を調整する。吸光度 (OD530) が 0.15~0.17 になるように生理食塩水で調整したものを、接種菌液とする。

この菌液を、感受性プレート (図 2) の各ウェルに、マルチピペットを用いて、1.0 μL ずつ接種する。35℃で培養し、24 時間後、48 時間後に目視で観察する。記録のため、スキャナーで取り込む。48 時間後の結果を最終判定とする。

判定基準

MCFG は最小有効濃度 (MEC)、5-FC と FLCZ は 50%発育阻止濃度 (IC50) を、その他は、完全に発育を抑制した濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とする。

2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved

standard, 2nd ed. CLSI document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA.

図2 感受性プレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
AMPH	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

感受性プレート。栄研化学にてカスタムメイドした (NQD9 プレート)。RPMI-1640 + 0.165 M MOPS pH7.0 100μL ずつに各薬剤が各濃度 (μg/mL) で含まれている。NGC: negative growth control, PGC: positive growth control

5. Break point

Echinocandin	≤2ug/ml は感受性
AMPH	> 1 ug/ml (likely resistant)
FLCZ	≥64
Flucytosine	≥32
ITCZ	≥1
KTCZ	-
VRCZ	≥4
New triazoles	-

6. チェック

	チェック
検体の吟味	
PDA 植え継ぎ (必要に応じて)	
35℃ 確認、培養開始	
コロニー確認	
生食水 suspension 調整	
A530 (1)	
希釈	
A530 (2)	
10 倍希釈	
Plating	

35℃ 確認、培養開始	
培養開始日時	
24 hr (評価チェック/別紙)○つける	
48 hr(評価チェック/別紙)○つける	
マイクロプレートリーディングミラーを使用してウエルを目視し判定	
Plate をスキャナーに取り込む	
結果保存	
結果報告	

【付表】

判定時間と評価の要約

	Candida 属	C. neoformans
Echinocandin	24 hr IC ₅₀	△ (-)
AMPH	24 or 48 hr complete inhibition	complete inhibition
FLCZ	24 or 48 hr △	△
Flucytosine	△	72 hr
ITCZ	48 hr IC ₅₀	IC ₅₀
VRCZ		
RVCZ		
PSCZ		

5. Break point

かびの break point は確立していない。

Working break point 設定 (large number isolate から得られた vitro data に基づく)

≤ 1 ug/ml	Susceptible
2 ug/ml	Intermediate
≥4 ug/ml	Resistant

6. チェック

	チェック
検体の吟味	
PDA 斜面培地植え継ぎ	

35℃確認、培養開始	
生育確認	
生食水(+ Tween 20) suspension 調整	
A530 (1)	
希釈	
A530 (2)	
Plating	
35℃確認、培養開始	
培養開始日時	
24 hr (評価チェック/別紙)○つける	
48 hr(評価チェック/別紙)○つける	
マイクロプレートリーディングミラーを使用してウェルを目視し判定	
Plate をスキャナーにとりこむ	
結果保存	
結果報告	

【付記】

播菌量の確認、CFU

基礎 data として、必要に応じて行う。

1 非皮膚糸状菌

調製菌 x11 の希釈液を SDA に 10 ul まで CFU/mL をカウントする。28-30℃で培養し、colony が検出されたら (24 hr あるいは 5 days 以内) ただちにカウントする (特に *R.oryzae*)。

2 皮膚糸状菌

調製した菌液 10 ul を SDA にまき、CFU/ml をカウントする。28-30℃で培養して連日観察し、colony が検出されたらただちにカウントする。

別紙

d candida A530 0.08*0.1 x10 して plating

【評価】

AMPH-B: MIC, others IC₅₀

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G FSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

MCFG: 24 hr.
others 48 h
TG growth
strain 12 24
hr で判定

^d糸状菌

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

【菌の調整と植菌】

アスペルギルス（1% Tween 入り生理食塩水） 0.09-0.13 1 ul ずつ plating

接合菌&フサリウム（生理食塩水） 0.15-0.17 1 ul ずつ plating

Paecilomyces lilacinus, *P. variotii*, *Exophiala dermatitidis*, *S. schenckii*（生理食塩水） 0.09-0.13

1ul ずつ plating

【培養】

・温度

静置培養 35℃

Alternaria spp 30℃

・時間

【判定】

Echinocandin の MEC 評価:

21-26 hr: *Aspergillus spp*, *Paecilomyces variotii*.

46-72hr: *Scedosporium spp*

Control well で十分な growth

Echinocandin 以外の評価:

21-26 hr: *Rhizopus spp*.

70-74 hr: *Scedosporium spp*

46-50 hr: その他の糸状菌 (*Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *S. schenckii*)

^dクリプトコックス

A530 0.08-1.0 x10 を 0.5 ul ずつ plating

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A MCFG	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
B AMPH-B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PGC	
C 5-FC	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
D FLCZ	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PGC	
E ITCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
F VRCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
G PSCZ	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PGC	
H	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	NGC	PGC	

【評価】

AMPH-B: MIC, others IC₅₀

72 hr

改訂履歴一覧

0.01 版 2014年9月1日改定・実施

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

大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
野田 万希子 岐阜県保健環境研究所 保健科学部
亀山 芳彦 岐阜県保健環境研究所 保健科学部
北川 恵美子 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
加藤 真美 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
川上 慶子 石川県保健環境センター健康・食品安全科学部
倉 文明 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

研究要旨 大腸菌、レジオネラ属菌、溶血性レンサ球菌の機能的なラボネットワークの構築・改善点を抽出することを目的とした。精度の高いサーベイランスを全国的に実施するためにも、技術的基盤の継承が重要である。平成26年度においては、現在実施されている3菌種の病原体サーベイランスの状況を検証した。コントロールDNAの配布とそれを使った試験のトラブルシューティング等を通して試験法の改善等につなげていくことが重要であった。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。市販されていない型別用血清を感染研で用意、配布することで、今後の課題も明らかにされつつある。今後も、問題点の把握とそれを解決するための実施可能な検査法・ツールの開発が不可欠である。

A. 研究の背景と目的

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。2014年も4,100例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,500例以上の重症例(血便または溶血性尿毒症症候群[hemolytic uremic syndrome: HUS]発症例)が報告されている(NESIDの集計による)。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*: EAaggEC])を含む、各病原性遺伝子の検出が重要である。さらに、新規下痢原性腸内細菌として同定されている*Escherichia albertii*についてもPCRによる検出を行っている。

レジオネラ

感染症の予防及び感染症の患者に対する

医療に関する法律第15条第1項の規定の実施のための法律施行規則第8条第2項に基づき、レジオネラ感染症の発生状況、動向及び原因の調査のため、国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、平成19年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行なっている。レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型を調べたところ、冷却塔由来株、浴槽水由来株、土壌由来株でそれぞれ異なる結果が得られ（参考文献1）、遺伝子型を調べることにより、感染源が推定できる可能性が示唆され、菌株型別の有用性が明らかになってきている。

A 群溶血レンサ球菌（Group A *Streptococcus*、*Streptococcus pyogenes*、以下A群溶レン菌）は、グラム陽性球菌であり、様々な疾患を引き起こす。A群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、本菌を原因とする代表的な疾患は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、丹毒、蜂窩織炎、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等であり、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う重篤な症状を呈す劇症型溶血性レンサ球菌感染症も本菌による疾患として注目されている。A群溶レン菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する。

「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（感染症法）」において、A群溶レン菌が引き起こす疾患として、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎と劇症型溶血性レンサ球菌感染症が含まれる。これらの疾患は5類感染症に属し、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎は小児科定点把握疾患、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。

A群レンサ球菌は、溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター（図1）を構築しており、各都道府県の衛生研究所と国立感染症研究所協力の下、本感染症のサーベイランスや新たな検査法の開発に取り組んでいる。

3つの病原細菌に対して以下の目的で研究を実施した。

A: 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

B1 遺伝子型別法により感染源を推定するための基盤情報の整備

B2 分離されたレジオネラ属菌の同定のために、市販されていない免疫血清を作製し配布することでより同定技術を改善すること。

A群溶血レンサ球菌

C: A群レンサ球菌感染症の流行株について、現状を把握するため、溶血性レンサ球菌感染症のうち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を溶血性レンサ球菌レファレンスセンターを通じて収集し、菌株の解析を行うことを目的とする。

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法は定法に従って実施した。

2. レジオネラ SBT 法と血清群別

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)

レジオネラ特異的な免疫血清の作製は、デンカ生研で行い、その特異性は、感染研のレファレンスセンターで確認した。

3. 溶血性レンサ球菌の T 型別および M 型別

病原体検出マニュアルに準じて行なった。

C. 研究結果

1.1 EHEC のサーベイランス

2014 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 2,767 株であり、分離数の多い順に、O157 (61.8%)、O26 (21%)、O111 (3.9%)、O145 (3.8%)、O111 (2.7%)、O121 (2.4%)、O91 (0.8%)、O165 (0.3%)、その他 (3.3%) となっていることが判明した。

1.2 コントロール株の配布およびそれらを用いた解析

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バリエーション検出用コントロール株、新規下痢原性腸内細菌である *E. albertii* コントロール株 (大分県衛生環境研究センターからの分与株をコントロール株として整備した) の配布を次の

各衛生研究所：藤沢市保健所、浜松市保健環境研究所、香川県環境保健研究センター、石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、茨城県衛生研究所へ行った。配布を行ったいくつかの地研からは、解析に関するトラブルシューティング、および解析結果に関する問い合わせを受け付けた。石川県では、送付したコントロール菌株を用いて、H19-H25 年度に石川県で分離された O157 分離株 (204 株) について *stx1* および *stx2* バリエーションの解析を実施した。

1.3 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 (2013-2014 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 (*stx1a*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2f*, *eae*, *lt*, *aggR*, *saa*, *subA*, *ehx*) 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、収集した臨床分離株の遺伝子型別の結果を、毎年、衛生微生物技術協議会研究会のレファレンスセンター関連会議で報告している。今年度の報告では、37 株が追加された (表 1)。 *Legionella dumoffii* が 1 株あった以外は *Legionella pneumophila* で、

血清群 (SG) 1 が 31 株、SG2 が 1 株、SG3 が 2 株、SG12、14 が各 1 株だった。混合感染が 2 例あり (いずれも浴槽での溺水で、*L. dumoffii* と *L. pneumophila* SG1 の事例と *L. pneumophila* SG3、SG14 の事例)、事例数は 35 例である。感染源が、浴槽水と推定・確定されている例は 9 例 (26%) だった。PFGE による感染源確定例は浴槽水 (公衆浴場) と冷却塔水 (院内感染) による各 1 例だった。農作業・庭仕事による疑い事例が 6 例あり、これは土壌による感染の可能性が周知されてきたためと思われる。他には、高圧洗浄水 2 例、水道関係 1 例、海外旅行 1 例、空調疑いが 1 例などとなっている。

2014 年 3 月末現在で、合計 316 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集された (集団感染事例由来の重複している株を含めると 321 株)。図 1 にこれまでに収集した臨床分離株の分離年、表 2 に菌種および血清群の内訳を示した。*L. pneumophila* が 308 株 (97.5%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 83% を占めた。

2.2 レジオネラ免疫血清により検査された事例

今年度は、混合血清 3 種を試作した。*L. pneumophila* SG2~SG15 の菌抗原グループ 3 種に対応したグループ血清 (1G は 2, 3, 6, 12, 14 の各 SG の菌を凝集; 2G は 4, 5, 9, 10, 15 の各 SG の菌を凝集; 3G は 7, 8, 11, 13 の各 SG の菌を凝集) である。これらは昨年度も配布している。

昨年度配布した 4 種の混合血清の利用状況については、関東・甲・信・静地区で (20 施設中) 配付血清を利用したのは 35% で、「凝集が見やすかった。スクリーニングとして有用であった。検査の効率化が図れた。」とあった。一方、利用しなかった理由

として、「検体がなかった。市販血清で同定可能であった。スポイト付きでないため扱いにくい。」とあった (スポイトについては、元の容器はスポイト付きだが小分けした容器がそうでなかったという意味)。9 割の施設が市販を希望した。

近畿地区では「血清型別を効率よく行うことができた。混合血清の配布を今後も継続してほしい。1 回につき 10 μ l の使用で十分の凝集が確認できた。混合血清で凝集するも単味で凝集ができない UT の場合があった。」のコメントがあった。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別

2013 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、951 株であり、すべての株に対して T 型別が行われた。分離頻度の高かった T 型は、T12 (211/951, 22.2%)、TB3264 (189/951, 19.9%) であった。T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。TB3264 型の分離比率は、2010 年、急激に上昇し、2013 年さらに増加した (2009 年、5.3%、2010 年、12.6%、2011 年、11.1%、2012 年、14.5%、2013 年、19.9%)。2011 年最も分離比率の高かった T1 型は、2013 年さらに減少した (2011 年、31.1%、2012 年、26.8%、2013 年、12.1%)。(図 3)。

3.2 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の T 型別

2013 年、A 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) の報告が 50 症例あった。49 例が *S. pyogenes*、1 例が *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による症例であった。

最も分離された型は、TB3264 型であり、分離比率が上昇している (2011 年、10.7%; 2012 年、18.9%; 2013 年、30.0%)。また、咽頭炎由来株の分離比率 (26.8%) に比べ、依然高

い分離比率を示している。次いで、昨年最も分離された T1 が多く、その分離比率は昨年と比較して減少した(2011年, 69.0%; 2012年, 51.6%; 2013年, 28.0%)。この2つの型で全体の50%以上を占めている(図4)。

3.3 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の *emm* 型別、M 型別

STSS の確定診断例 50 例中、*emm89* 型(M 型別不能)が 15 例(30.0%)と最も多く、次いで *emm1* 型(M1)が 14 例(28.0%)、*emm3* 型(M3)が 4 例(8.0%)と多かった。

2012 年と比較し、*emm1* 型は、51.6% (49/95)から 28.0% (14/50)に減少し、*emm89* 型は 17.9% (17/95)から 30.0% (15/50)に増加した(図5)。

D. 考察

今後の以下の項目を検討することが必要である。

1) EHEC 検査マニュアルの改訂

EHEC の重症例として分離頻度の高い 7 血清群 (0157, 026, 0111, 0103, 0145, 0121, 0165) と *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類を検出可能なワンショット PCR のプロトコールを EHEC 検査マニュアルに追加した。現在、その他の変更項目と共に共著者に確認中であり、確認後感染研ホームページにアップロードする予定である。

2) 大腸菌 EQA の実施

SSI から 2014-2015 年用 EQA 株 (10 株) が分与される予定である。大阪府を含めたいくつかの地研に参加を呼びかけ、感染研を含めた EQA を行う予定である。

3) EHEC に関して、主たる保菌動物と考えられている畜牛において、EHEC の分布解析を行う。地方衛生研究所や宮崎大学との共同研究からウシ由来株の血清型別および病原性遺伝子型別を行い、ヒト由来株との各

種比較解析を行う予定である。

4) レジオネラサーベイランス

昨年度、レジオネラ症の主要起因菌である *L. pneumophila* 血清群 1 株は遺伝子型により、浴槽水グループ (B1, B2, B3)、冷却塔水グループ (C1, C2)、土壌グループ (S1, S2, S3)、および U グループの大きく 9 つのグループに分けられることを報告した。この遺伝子型グループは環境分離株の由来に基づくものである。今回の農作業・庭仕事による疑い事例 6 例のうち、血清群 1 によるものが 5 例で、そのうち 4 例の遺伝子型が、実際に土壌 (S1) グループであった。したがって、臨床分離株の遺伝子型を調べることにより、感染源の種類が可能になると考えられた。その一方で、入浴施設が感染源と推定される患者分離株で、S グループに属する菌株も見られた。これは土などに混じって *L. pneumophila* が浴槽水に混入している可能性を示唆する。

レジオネラ症患者から菌分離が行われると、患者周辺環境からの分離菌との異同の確認により、感染源を明らかにすることができる。また、*L. pneumophila* SG1 以外のレジオネラ症起因菌の場合は、ほとんど尿中抗原陰性となるので、菌分離による確定診断が必要となる。臨床検体から菌を分離することの重要性を改めて強調したい。

5) A 群レンサ球菌のワクチンとして、26 価、または 30 価の M タンパクワクチンが開発中である(参考文献 4)。M タンパクは、*emm* 遺伝子によりコードされているため、*emm* 遺伝子型別をすることで型を決定することができる。STSS 患者分離株は *emm* 遺伝子型別を決定しているが、咽頭炎由来株は決定していない。理由として、コストがかかることや設備が整っていないことが挙げられ

る。2010年以降、TB3264型が咽頭炎由来株で増加傾向あり、それに引き続き2011年からTB3264型株によるSTSS増加している。この増加は近年のSTSSの増加と関連性がある(参考文献5)。TB3264型は様々なemm型と関連性がある。TB3264型であったSTSS分離株のemm型はすべてemm89型であり、TB3264型株の中でも特定のものだけが引き起こしていることが推測される。TB3264型の咽頭炎分離株は様々なemm型株により引き起こされることから、咽頭炎由来株のTB3264/emm89型の流行を追うことは重要である。

参考文献

- 1) Amemura-Maekawa J, et al. Appl Environ Microbiol. 78(12):4263-4270, 2012.
- 2) Amemura-Maekawa J, et al. J Med Microbiol. 59(Pt6):653-659, 2010.
- 3) Nishiyama A, et al. Kansenshogaku Zasshi. 85(4):373-379, 2011. in Japanese.
- 4) Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, Chiba K, Katsukawa C, Ohya H, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Ogawa M, Ohnishi M, Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010-2012. Epidemiol Infect, in press

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のためには、病原体検出マニュアルの記載事項の整備、改訂等をすすめることが重要である。また、安定的なネットワーク形成には、各

施設において実施可能であり、技術的継承が用意であることも必要である。本研究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ること、問題点、ニーズを抽出することがもとめられ、ラボネットワークの充実度を検証する必要がある。感染研が参加しているEQAシステムが応用可能か更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

- 1) 坂本裕美子、廣地敬、大西麻実、伊藤はるみ、高橋広夫(札幌市衛生研究所)、宮北佳恵、細海伸仁、片岡郁夫(札幌市保健所)、久保亜希子、池田徹也、小川恵子、長瀬敏之、森本洋、清水俊一(北海道立衛生研究所)、伊豫田 淳、寺嶋 淳(国立感染症研究所)：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 IASR Vol. 34 p. 126: 2013年5月号
- 2) 笠原ひとみ、関口真紀、中沢春幸、藤田暁、畔上由佳、高山 久、千秋智重、関 年雅、池田元彦、前川純子、倉 文明:L. pneumophila 血清群9の症例について、病原微生物検出情報 36(1):14-5, 2015.
- 3) Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, Chiba K, Katsukawa C, Ohya H, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Ogawa M, Ohnishi M, Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010-2012. Epidemiol Infect, in press

- 4) Ikebe T, Chiba K, Shima T, Masuda C, Okuno R, Ohya H, Ogata K, Katsukawa C, Kawahara R, Tominaga K, Yabata J, Tada Y, Okabe N, Watanabe H, Chang B, Ogawa M, Ohnishi M, the Working group for beta-hemolytic streptococci in Japan. Evaluation of streptococcal toxic shock-like syndrome caused by group B streptococcus in adults in Japan between 2009 and 2013. J Infect Chemother, in press
- 5) Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T, Sera N. A Foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 67 (4): 321-322 (2014).
- 6) Morimoto M, Tamura S, Hayakawa T, Yamanishi H, Nakamoto C, Nakamoto H, Ikebe T, Nakano Y, Fujimoto T. Phlegmonous gastritis associated with group A streptococcal toxic shock syndrome. Intern Med 53 (22): 2639-2642 (2014).
- 7) Kohayagawa Y, Ishitobi N, Yamamori Y, Wakuri M, Sano C, Tominaga K, Ikebe T. Streptococcal toxic shock syndrome from necrotizing soft-tissue infection of the breast caused by a mucoid type strain. J Infect Chemother, in press
- 8) Sanderson-Smith M, Oliveira D, Guglielmini J, McMillan D, Vu T, Holien J, Henningham A, Steer A, Bessen D, Dale J, Curtis N, Beall B, Walker M, Parker M, Carapetis J, Melderen L, Sriprakash K, Smeesters P, the M Protein Study Group. A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. J Infect Dis 210 (8): 1325-1338 (2014)
- 9)
- 学会発表
- 1) 前川純子、倉 文明、渡辺祐子、金谷潤一、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真：新しい *neuA* プライマーによる *Legionella pneumophila* 臨床分離株の sequence-based typing (SBT). 第 88 回日本感染症学会学術講演会、2014 年 6 月、福岡。
- 国際学会
特記事項無し
- 国内学会
特記事項無し
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
特記事項内なし
- 実用新案登録
特記事項内なし
- その他
特記事項内なし

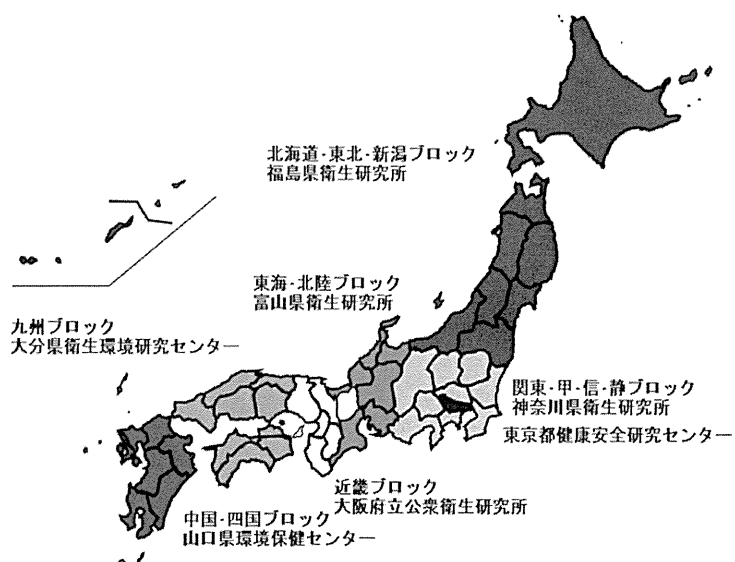


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

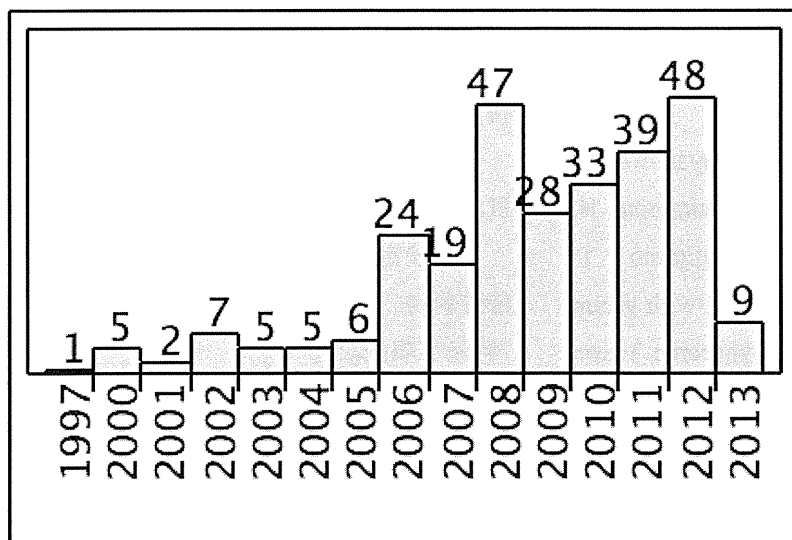


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2013年6月現在)

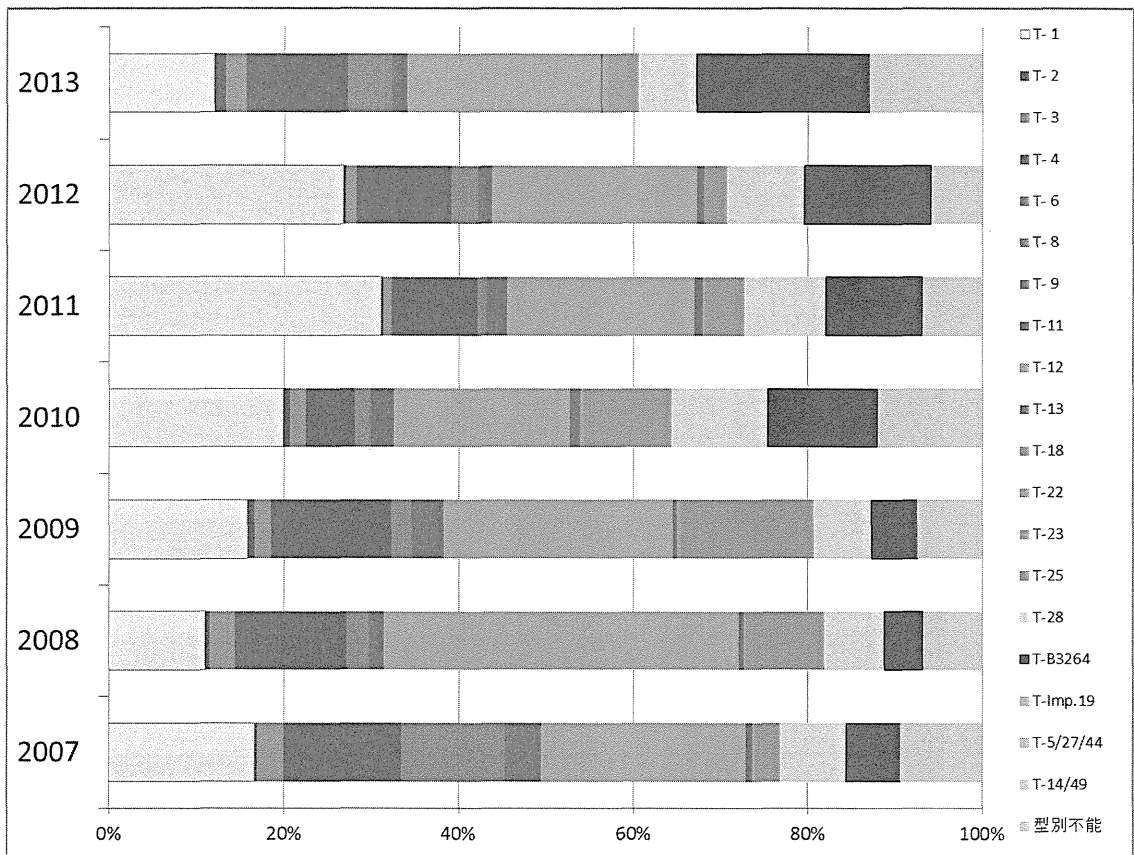


図3 咽頭炎由来株の T 型別 (2006-2012)

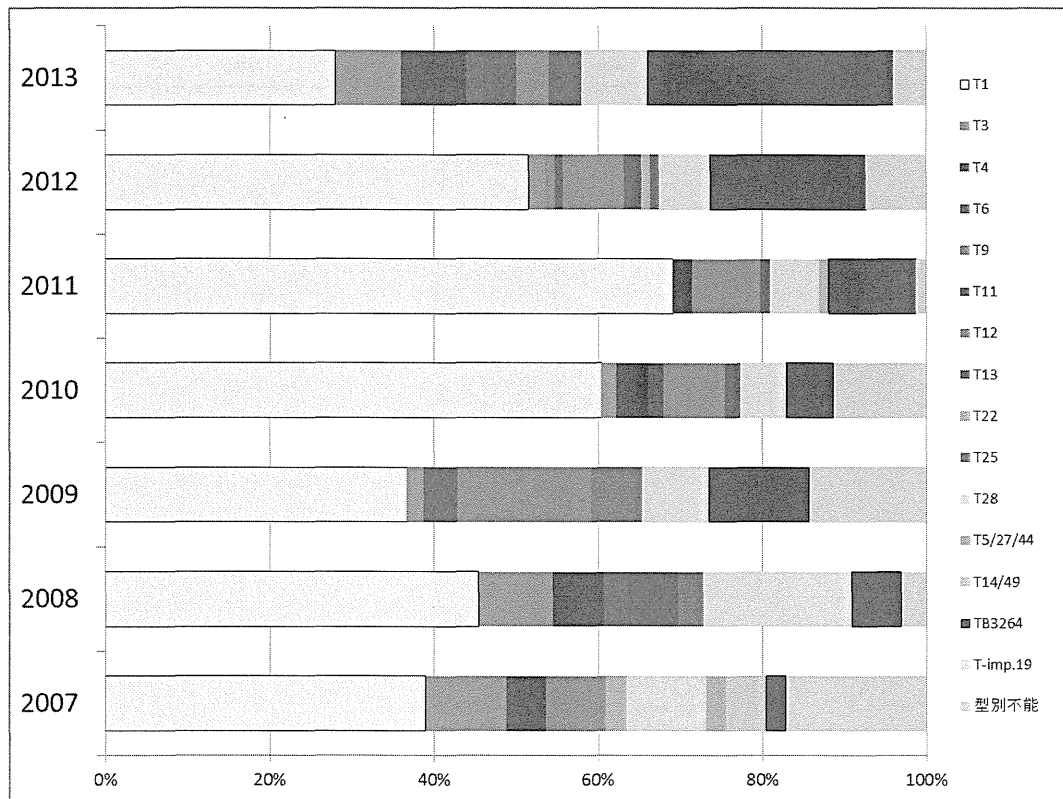


図4 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の T 型別

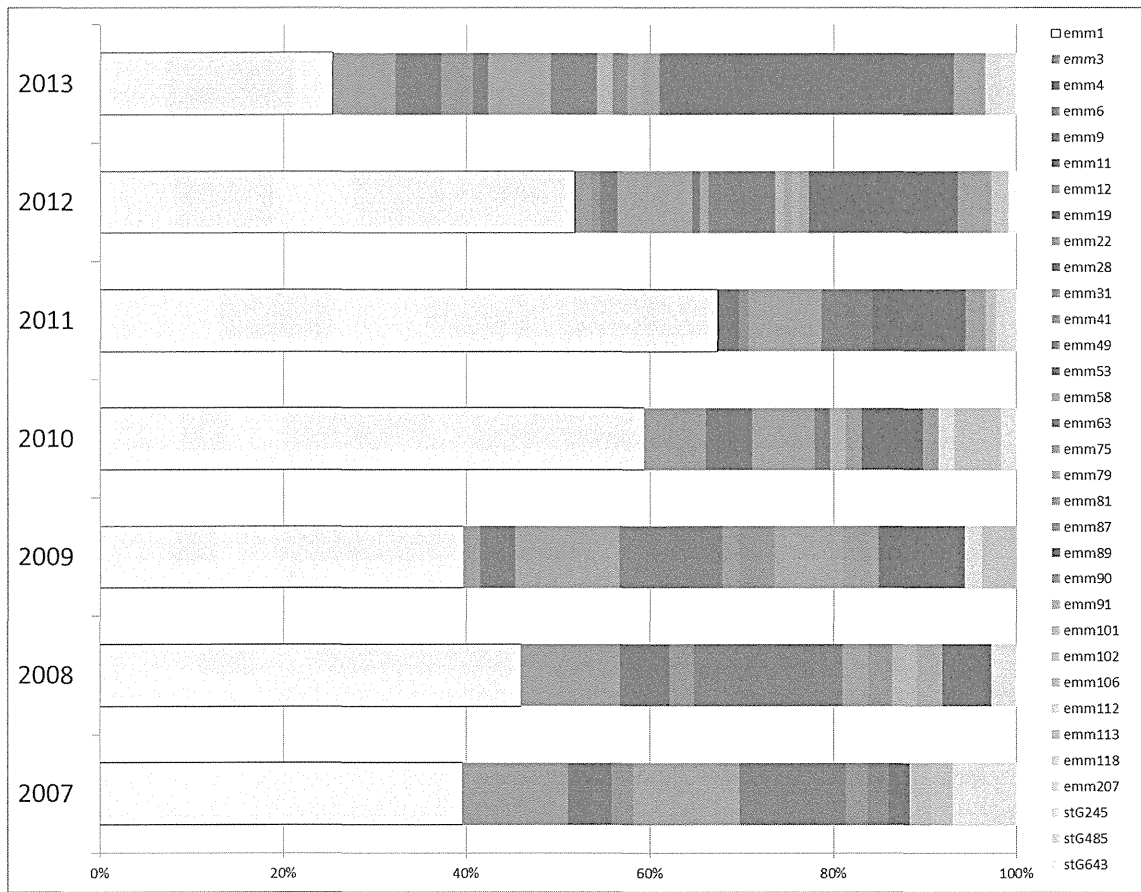


図5 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の *emm* 型別

表1 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2013年6月~2014年3月)

分離 No.	年	性別	感染源(推定、と記載していない場合は環境分離株とPFGE一致)	PFGE	NIIB (菌株 受付番号)	種名	血清 群	ST (Sequence Type)										Group (SG1)	同じSTの報告があるか
								flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA					
285	2013	男	入浴中に意識消失(溺水は無、推定)		3015	<i>L. pneumophila</i>	1	363	7	6	3	3	13	11	11	B2	国外1例(国外環境は複数)		
286	2013	男	不明(今季未清掃の空拭使用)		3016	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内3例目		
287	2013	男	水道関係の仕事(暴雨災害後2日後感染推定)		3017	<i>L. pneumophila</i>	2	354	3	5	1	7	14	32	8	-	国内4例目、国外1例(全てSG2)		
288	2013	男	不明(自動車整備工、高圧洗浄水使用)		3020	<i>L. pneumophila</i>	1	1571	15	19	5	15	18	5	6	N	無		
289	2013	男	温泉(検査中)		3021	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内18例目、国外		
290	2011	男	温泉(推定)		3024	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内6例目、国外		
291	2012	女	不明(農作業)		3025	<i>L. pneumophila</i>	12	863	6	10	5	3	18	14	9	-	国外1例(SG6)		
292	2013	男	不明		3026	<i>L. pneumophila</i>	1	973	2	3	5	15	2	1	6	S1	国内2例目		
293	2013	男	不明		3069	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	-	国外多、県内9例目		
294	2013	男	不明(庭いじり、井戸水使用)		3077	<i>L. pneumophila</i>	1	1621	2	3	6	11	2	1	6	S1	無		
295	2013	女	不明(花壇への花植え程度)		3084	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内19例目、国外		
296	2013	男	不明(自宅でシャワーのみ、塗装業)		3085	<i>L. pneumophila</i>	1	642	2	10	3	10	9	14	6	B1	国内2例め		
297	2013	男	不明(自宅風呂で入浴、畑があり水まき・草むしり、板金業)		3086	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内7例目、国外		
298	2013	男	不明(公衆浴場の利用なし、無職)		3087	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内18例目、国外		
299	2012	男	不明(草取り、建設業)		3088	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内4例目		
300	2013	男	不明(草刈機を使用)		3089	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内5例目		
301	2013	男	不明(温泉施設・循環風呂・加湿器の利用なし、無職)		3090	<i>L. pneumophila</i>	1	687	7	6	17	21	35	11	9	B2	国内3例目		
302	2013	男	不明(近隣の温泉施設に1回/2日、土木業)		3102	<i>L. pneumophila</i>	1	1645	5	2	22	10	6	10	10	S2	無		
303	2013	男	不明(無職)		3106	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内16例目、国外		
304	2013	男	高圧洗浄機で外壁を清掃		3109	<i>L. pneumophila</i>	1	758	2	3	9	15	2	1	6	S1	国外		
305	2013	男	不明(歯科医)		3111	<i>L. pneumophila</i>	1	127	3	13	1	10	14	9	11	U	国内環境(浴槽水)のみ		
306	2010	男	不明(毎日銭湯に行っていた)		3119	<i>L. pneumophila</i>	1	973	2	3	5	15	2	1	6	S1	国内3例目		
307	2011	男	不明(タイ、 Hancock)		3120	<i>L. pneumophila</i>	1	1694	12	8	11	21	40	12	9	(S3)	無		
308	2012	男	ゴルフ場の浴場(推定)		3121	<i>L. pneumophila</i>	1	1693	3	6	1	14	8	8	9	(U)	無		
309	2013	男	温泉(推定)		3122	<i>L. pneumophila</i>	1	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内2例目		
310	2013	男	院内感染(冷却塔)	確定	3124	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内20例目、国外		
311	2014	男	公衆浴場(溺水、3132と同一患者)		3131	<i>L. dumoffii</i>													
312	2014	男	公衆浴場(溺水、3131と同一患者)	確定	3132	<i>L. pneumophila</i>	1	1696	6	10	17	3	9	14	3	(B1)	無		
313	2014	男	温泉(推定、転倒し、溺水、3155と同一患者)		3154	<i>L. pneumophila</i>	3	1712	27	3	9	12	2	1	6	-	無		
314	2014	男	温泉(推定、転倒し、溺水、3154と同一患者)		3155	<i>L. pneumophila</i>	14	1638	2	3	6	10	51	1	218	-	国外1例		
315	2014	男	不明		3157	<i>L. pneumophila</i>	1	328	6	10	19	28	19	4	9	B1	国外(臨床1例環境多)		
316	2014	男	不明(運転手)		3158	<i>L. pneumophila</i>	1	1726	21	14	29	1	15	29	206	N	無		
317	2013	男	入浴施設(推定)		3159	<i>L. pneumophila</i>	1	1186	2	3	5	3	2	1	9	S1	国内環境(水たまり)1例		
318	2013	男	温泉(推定)		3160	<i>L. pneumophila</i>	1	1730	2	6	17	6	8	8	9	(B1)	無		
319	2013	男	不明		3161	<i>L. pneumophila</i>	1	1722	2	3	6	50	51	1	9	S1	無		
320	2013	男	不明(餅物加工)		3162	<i>L. pneumophila</i>	1	1205	2	3	18	10	2	1	10	S1	国内環境(水たまり)1例		
321	2013	男	不明(警備員)		3163	<i>L. pneumophila</i>	1	256	6	10	14	5	39	14	9	(B1)	国内3例目、国外、国内環境(シャワー)		

表2 収集臨床分離株の内訳

2014年3月末日現在

<i>L. pneumophila</i>	308株 (97.5%)	<i>L. dumoffii</i>	1株 (0.3%)
SG1	262株 (82.9%)	<i>L. feeleii</i>	1株 (0.3%)
SG2	7株 (2.2%)	<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.3%)
SG3	13株 (4.1%)	<i>L. longbeachae</i>	4株 (1.3%)
SG4	2株 (0.6%)	<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.3%)
SG5	7株 (2.2%)		
SG6	7株 (2.2%)		
SG9	3株 (0.9%)		
SG10	2株 (0.6%)		
SG12	2株 (0.6%)		
SG14	1株 (0.3%)		
SG15	1株 (0.3%)		
Untypable*	1株 (0.3%)		
		計	316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。

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）

研究要旨 平成26年9月19日付けで、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症及び薬剤耐性アシネトバクター感染症が全数把握疾患となり、感染症発生動向調査事業において病原体検査対象疾患となったことから地方衛生研究所における検査依頼が増加することが考えられた。特にCREについては、薬剤耐性の表現型だけでは確定が困難であり、PCR法によるIMP遺伝子の検出が必要である。このため地方衛生研究所に薬剤耐性菌検査技術の普及の必要性を認め、各支部に1施設のレファレンスセンターを設置し、レファレンスセンターの地方衛生研究所の検査担当者は国立感染症研究所において研修をうけた。

A. 研究目的 2014年2月に大阪市内の医療機関において100例を超えるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症もしくは保菌者の大規模なアウトブレイクが報告された。1 この事例では、カルバペネムを含む複数の抗菌薬に耐性を示すメタロ-β-ラクタマーゼ（Metallo-β-lactamase: MBL）産生腸内細菌科細菌（MBL-Ent）の *Klebsiella pneumoniae* が分離された。メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子は伝達性の高いプラスミド上にあり、腸内細菌科細菌の間で種を超えて広がっていく。このプラスミドによる耐性機構は2009年に広島大学で初めて発見され、今回の事例報告により西日本に広がっている可能性が懸念されている。分離された耐性菌は、イミペネムに耐性を示さないため通常の検査では検出されにくく、プラスミド上の耐性遺伝子が菌種を超えて水平伝達する。また、通常の院内感染とは異なり、必ずしも

同一菌種から検出されるとは限らないことからカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の中でも特にアウトブレイク探知が困難である。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症については、平成26年9月19日から全ての医療機関で届出が必要となった。ところが実際には届け出基準に合致した細菌であっても、問題となっているプラスミドによる耐性であるかは判断できない場合が多く、薬剤耐性の原因遺伝子であるIMP遺伝子をPCR法により検出する必要がある。PCR検査は一般の医療機関では行われておらず、地方衛生研究所における検査依頼が増加することが予想された。薬剤耐性菌の検査はこれまで地方衛生研究所において経験が少な分野でありレファレンスセンターの新たな設置が必要であると判断された。

B. 研究方法 薬剤耐性レファレンスセン

ター（仮称）の設置については、国立感染症研究所の渡邊治雄所長、宮崎義継レファレンス委員長、薬剤耐性菌の調査研究を担当している柴山恵吾細菌第二部長の了解を得た。また、地方衛生研究所全国協議会のレファレンス委員の了解を得ている。正式には平成 27 年度の全国衛生微生物技術協議会レファレンス委員会において承認される必要がある。レファレンスセンターの設置により、地方衛生研究所における薬剤耐性菌検査の対応が強化される事が期待される。レファレンスセンターは、PCR 用の陽性コントロールの配布、支部における技術的支援の役割を担うこと等が想定される。

C. 結果と考察 各支部のレファレンスセンターは以下の通りである。

北海道東北：秋田県健康環境センター
関東甲信静：横浜市衛生研究所
東海北陸：愛知県衛生研究所
近畿：大阪府立公衆衛生研究所
中国四国：香川県環境保健研究センター
九州：福岡県保健環境研究所

今回の CRE の検査では、ディスク拡散法による薬剤耐性パターンの確認と PCR 法による Inc N、CTX-M-2、IMP-6（IMP 遺伝子を増幅後に遺伝子配列を確認する必要がある）の各遺伝子の同定が必要となることから国立感染症研究所において技術的研修と陽性コントロールの配布を目的とした 3 日間の研修が 4 回にわたって行われた。今年度、研修に参加した地方衛生研究所は、広島県立総合技術研究所保健環境センター、香川県

環境保健研究センター、岡山県環境保健センター、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生研究所、高知県衛生研究所、広島市衛生研究所、山口県環境保健センター、徳島県立保健製薬環境センター、愛媛県立衛生環境研究所、横須賀市健康安全科学センター、名古屋市衛生研究所、茨城県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、神戸市環境保健研究所、兵庫県立健康科学生活科学研究所、福岡県保健環境研究所、埼玉県衛生研究所の 19 カ所である。レファレンスセンター設置後に行われた 4 回目の研修はレファレンスセンターの地方衛生研究所を優先して行われた。

D. 結論

今回、新たな薬剤耐性菌に対する検査対応が求められるようになったことから、レファレンスセンターを設置し研修をおこない、全国における検査体制の強化が図られた。

E. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

なし

国内学会

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
平成26年度分担研究報告書

カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	横山 敬子	東京都健康安全研究センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	福司山郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 7ヶ所のカンピロバクターレファレンス支部センターで、2013年に散发下痢症患者から分離された*C. jejuni* 337株についてLior法およびPenner法による血清型別を実施した。Lior法では337株中259株（76.9%）、Penner法では336株中175株（52.1%）が型別された。マルチプレックスPCR法によるPenner型別法を検討した。市販のPenner血清25種類のうち10血清群についてマルチプレックスPCR法による型別が可能となった。2013年分離株のキノロン耐性率は、*C. jejuni* では43.6%、*C. coli*では62.5%であった。EM耐性率は*C. jejuni* では1.2%、*C. coli*では18.8%であった。

A. 研究目的

カンピロバクターレファレンス・サービスを開始した1989年以降実施しているLior法（自家調製血清による型別）およびPenner法（市販血清を用いた型別）による*Campyrobacter jejuni* 分離菌株の型別状況調査を行い、両方法の型別率を比較した。また、Penner法による型別を、PCR法を用いて遺伝子学的に型別する方法について検討した。さらに、薬剤耐性菌の出現状況についても併せて調査した。

B. 研究方法

1. カンピロバクター血清型別レファレンス・サービス支部センター
支部センターおよびその所管地区は以下のとおりである。北海道・東北・新潟地区：秋田県健康環境センター、関東・甲・信・静地区：東京都健康安全研究センター、東海・北陸地区：愛知県衛生研究所、近畿地区：大阪府立公衆衛生研究所、中国・四国地区：山口県環境保健センター（広島県を除く中国地方）広島市衛生研究所（広島県及び四国地方）、九州地区：熊本県保健環境

科学研究所

2. Lior 法及び Penner 法による血清型別

各支部センターで分離された *Campylobacter jejuni* を対象に、自家調製血清を用いた Lior 法による型別、及び市販血清（デンカ生研）を用いた Penner 法による型別を行った。各方法の概要は表 1 に示した。

3. PCR 法による型別法の検討

Penner 血清型別を遺伝子レベルで型別するマルチプレックス PCR 法を検討した。供試菌株は、市販 Penner 血清 25 種類のうち 10 血清群の血清型別用レファレンス株 (serostrain) 14 株である。その内訳は、A 群 (HS1, HS44), B 群 (HS2), C 群 (HS3), D 群 (HS4, HS13, HS50), F 群 (HS6), G 群 (HS8), I 群 (HS10), L 群 (HS15), R 群 (HS23/36, HS53) および Z2 群 (HS41) である。プライマーは、Poly, F., et al. の方法 (JCM 49:1750-1757, 2011) に従った。PCR 条件は、図 1 に示した。

4. 薬剤耐性菌出現状況の把握

エリスロマイシン (EM), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), シプロフロキサシン (CPFX) の 5 薬剤を供試し、米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) の方法に従い、センシディスク (BD) を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。

C. 研究結果

1. Lior 法および Penner 法による血清型別

2013 年に本レファレンスセンターで散发下痢症患者から分離された *C. jejuni* 337 株の Lior 法による型別成績をまとめた。最

も多く検出された血清型は LIO 4 (31.2%), 続いて LIO 1 (9.2%), TCK 1 (3.9%), LIO 10 (3.3%) であった (表 2)。

次に、2013 年に分離された 336 株について、Penner 法で型別を行った。最も多く検出されたのは、昨年度と同様に B 群 74 株 (22.0%), 次いで D 群 23 株 (6.8%), L 群 22 株 (6.5%) であった。UT 株は、161 株 (47.9%) で、2012 年の 50.0% よりやや低くなったが、依然として型別不能株の割合は高い状況であった (表 3)。

2. PCR 法による型別法の検討

Penner 血清型別用レファレンス株 (serostrain) から DNA をアルカリ熱抽出し PCR を実施した。今回検討した 10 血清群 14 菌株については、HS53 を除き型別が可能であった (図 1)。HS53 については、既報のプライマーでは増幅が認められなかったため、さらに検討が必要である。マルチプレックス PCR 条件を検討し、4 回の PCR をかけることで、10 種血清群の型別が可能となった。

3. 薬剤耐性菌出現状況の把握

2013 年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株 (NA, NFLX, OFLX, CPFX) の割合は、43.6% で、昨年 の 47.7% に比べ若干耐性割合は低下した。*C. coli* では、その 62.5% がキノロン耐性株であった。

一方、カンピロバクター下痢症の治療のための第一選択薬として推奨されている EM に対する耐性率は *C. jejuni* で 1.2%, *C. coli* で 18.8% であり、増加傾向は認められなかった (図 2, 3)。

D. 考察

近年、*C. jejuni* の血清型別率が低下して

いる。特に、Penner 法においては、ほぼ半数が型別できない状況である。そこで、マルチプレックス PCR による Penner 血清型別の検討を行った。今回検討に用いた serostrain では、HS53 を除き PCR 法による型別が可能であった。今後、臨床分離株を用いて検討を行い、実用性に対する評価を行う予定である。また、UT 株を解析し、血清の追加を考えることも必要かもしれない。

一方、PCR 法による型別は、操作性の煩雑さから、多数検体を処理する日常のルーチン検査での実用化が現実的か否かについては、さらに検討が必要である。また、今回検討した 10 血清群以外の血清型の型別法については、今後の課題である。

昨年度の本研究において、型別不能株の増加の一因に、市販血清の力価が弱いことがあるのではないかと推察した。そこで、市販血清の 2 倍の力価の血清で型別を実施したが、型別率の上昇は認められなかった。

今後、遺伝子および抗原成分の両側面から検討を行い、型別率を上げていくことが重要であると考えている。

E. 結論

2013 年にヒトから分離された *C. jejuni* 337 株について血清型別を実施したところ、Lior 法では 76.9%、Penner 法では 52.1% の型別率であり、依然として Penner 法の型別率が低い傾向であった。PCR による型別法は引き続き検討していく必要がある。

薬剤耐性株の出現状況を調査した結果、キノロン系薬剤、EM とともに例年とほぼ同様に高い耐性率であった。

F. 健康危険情報

C. jejuni のキノロン系薬剤に対する耐

性株の割合は 43.6%、*C. coli* では 62.5%で、非常に高い状態が続いている。カンピロバクター下痢症の治療のための第一選択薬として推奨されている EM に対する耐性率は *C. jejuni* で 1.2%、*C. coli* で 18.8%である。薬剤耐性菌の出現状況について注視する必要がある。

G. 研究発表

カンピロバクターレファレンスセンター報告：

http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H26_Campyrobacter.pdf

論文発表 準備中

学会発表

国際学会 なし

国内学会

横山敬子：ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性状況の変遷，第 7 回日本カンピロバクター研究会，2014 年 12 月，東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

表1. カンピロバクターの血清型別法

	Lior 法 自家調製	Penner 法 市販品(デンカ生研)
方法	スライド凝集反応	受身血球凝集反応
標的抗原	易熱性抗原 (H, K様抗原?)	耐熱性菌体抗原 (LOS)
血清群数	30(原法:118)	25(原法:57)
操作性	容易	煩雑
判定	やや困難	容易
価格	安価	高価(1検体 2000円)

PCR 条件

10 X Ex-taq buffer	2.5 μl
2.5mM dNTP	2 μl
50 x Primer mix	0.5 μl
Ex-taq Hot-start	0.125μl
Template DNA	2 μl
DW	17.875μl
	25 μl

35cycles	94°C	1min
	94°C	30sec
	56°C	60sec
	72°C	90sec
	72°C	5min



3% agarose gel 100V 40min

図1. マルチプレックスPCRによる Penner 型別法の検討

表2. *C. jejuni* 散発事例由来株のLior血清型別成績
(全国・2013年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
LIO 4	13	16	11	15	44	5	1	105	31.2
LIO 1	1	8	1	-	15	6	-	31	9.2
TCK 1	-	4	2	-	7	-	-	13	3.9
LIO 10	1	5	3	1	-	1	-	11	3.3
LIO 11	-	3	3	-	4	-	-	10	3.0
LIO36	-	6	-	-	-	1	-	7	2.1
その他*	4	20	6	5	5	4	-	44	13.1
小計	19	62	26	21	75	17	1	221	65.6
(%)	55.9	72.9	60.5	58.3	65.8	70.8	100.0	71.0	
複数血清	6	-	7	-	25	-	-	38	11.3
型別不能	9	23	10	15	14	7	-	78	23.1
合計	34	85	43	36	114	24	1	337	100

* 20種類

表3. *C. jejuni* 散発事例由来株のPenner血清型別成績
(全国・2013年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
B群	10	9	5	11	37	1	1	74	(22.0)
D群	3	11	2	4	3	0	0	23	(6.8)
L群	0	7	6	1	8	0	0	22	(6.5)
C群	0	8	0	1	2	0	0	11	(3.3)
A群	2	3	0	1	1	3	0	10	(3.0)
その他*	8	7	4	5	8	0	0	32	(9.5)
小計	23	45	17	23	59	4	1	172	(51.2)
(%)	(67.6)	(53.6)	(39.5)	(63.9)	(51.8)	(16.7)	(100)	(51.2)	
複数血清	2	1	0	0	0	0	0	3	(0.9)
型別不能	9	38	26	13	55	20	0	161	(47.9)
合計	34	84	43	36	114	24	1	336	(100)

*11種類

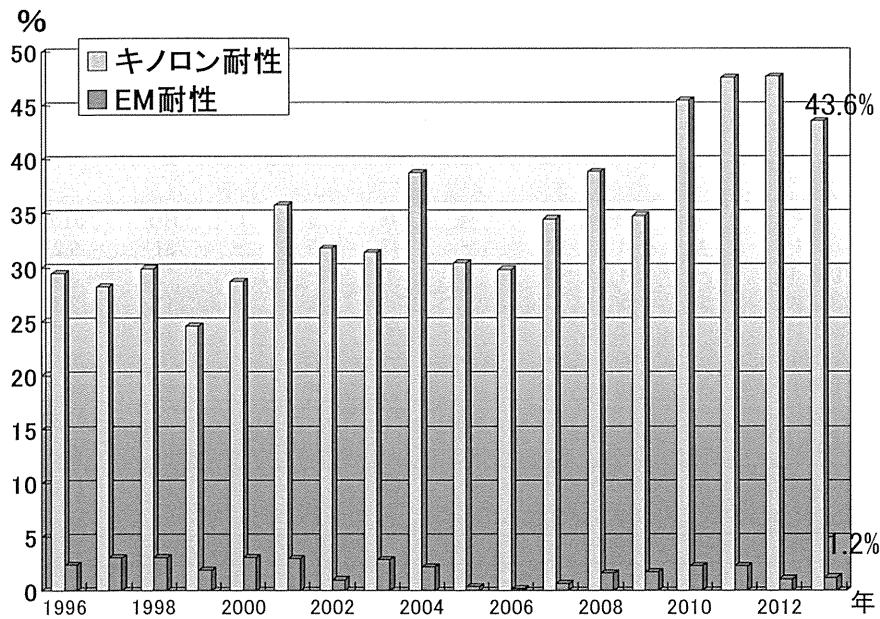


図2. *C. jejuni* キノロン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況
キノロン耐性: NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性

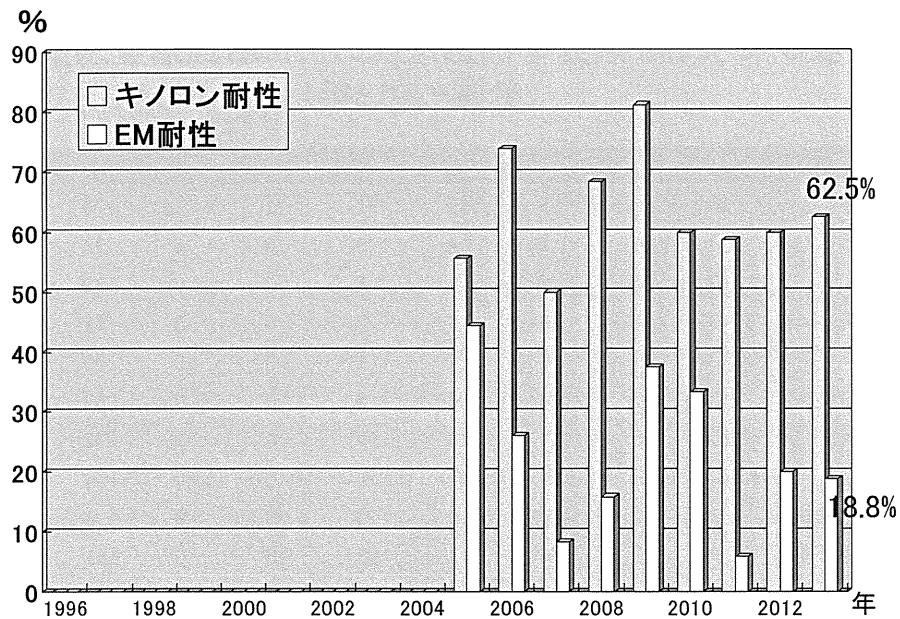


図3. *C. coli* キノロン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況
キノロン耐性: NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性

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

分担研究課題 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	野崎智義	国立感染症研究所寄生動物部	部長
研究協力者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部	第2室長
同	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官
同	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部	主任研究官

研究要旨 感染症法で第四類に分類されるエキノコックス症について、国内における検査ネットワークの強化に関連する研究を進めた。まず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などの動物の疑診例に関する依頼検査を実施し、流行ならびに拡散に関する情報収集を目指した。この一連の検討において、愛知県内で捕獲されたイヌに道外第2例目となるエキノコックス感染例が発見され、愛知県衛生研究所と共同で流行調査を開始した。併せて食品媒介寄生虫症であるクドアと肺吸虫に関しても、地方衛生研究所等との検討・研究に取り組んだ。

A. 研究目的

感染症法において寄生虫症は5つの病原体（類）を原因とする疾病が規定される。このうちエキノコックス症（多包性と単包性）は四類に分類され、ヒトおよび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が届出の義務を負う。我が国に土着するエキノコックスは、多包性の原因種である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* であるが、分布は北海道に限局する。そのため北海道外の都府県におけるイヌの感染例は、2005年の埼玉県での発見以降、届出がなかった。ところが、2014年4月に愛知県内で捕獲されたイヌから本虫の虫卵が検出され、この道外第2例目の発見に端を発して、愛知県衛生研究所との間で相互研修および共同研究を実施し、ラボネットワークの強化に係わる作業を進めた。

食品媒介寄生虫症もまた、地方衛生研究所（以下、地研と略）との間でラボネットワークの強化に取り組むべき重要な課題である。今年度はクドアと肺吸虫に関して検討を進めた。

B. 研究方法

1. 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。昨年度の報告以降、平成26年1月末までに計98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依頼はヒトで2件、動物で5件の計7件であった。なおヒト由来材料に関しては、昨年度報告した単包性エキノコックス症の術後フォローアップ分として、さらに5件の検査も引き受けた。検査にあたりヒトの場合は、血清を材料とし

てウエスタンブロット法による血清検査を行った。動物の疑い例の場合は、糞便（イヌ）もしくは臓器（ネズミ）を材料として、虫卵検査もしくは肉眼検査（さらに病理組織学的検査）を実施した。

2. クドア感染症

本症はナナホシクドア *Kudoa septempunctata* を病原体とする一過性下痢症で、ヒラメが原因食品の場合は食中毒として届け出るように、2011年6月17日に厚労省から通知が発出された。届出には、喫食残品におけるクドアの存在を顕微鏡下に確認することと通知に記載されている（遺伝子検査を補助的に用いる）。一方で2014年5月26日に、「食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法（参考）について」との事務連絡が厚労省から都道府県等に発出された。この結果、患者便からの遺伝子検出が果たしてクドア食中毒の届出基準として有効なのか、地研の間に見解の相違が生じた。さらにヒラメ以外の魚種（カワハギ）からのナナホシクドアの検出（これを喫食しての人体症例は未報告）、あるいはナナホシクドア以外のクドア属寄生虫に起因する一過性下痢症の発生が報告されるようになった。これら関連の情報を共有・整理することを目的に、クドア食中毒の研究を進める地研（大阪府公衆衛生研究所および東京都健康安全研究センター）と国研（感染研および国立医薬品食品衛生研究所）の担当者が集まり、厚労省の担当者も交えて情報交換を行った。またその議論の内容をレファレンスセンター会議（2014年6月26日）で公開し、他の地研の担当者にも周知を図った。

3. 肺吸虫症

鳥獣保護法が昨年一部改正され、野生鳥獣肉の消費量増加が予想されることから、食品としての衛生管理の強化が必要となった。強化が必要な一つの事例として、例えばイノシシは我が国の代表的な野生鳥獣の一つであるが、九州南部ではその肉を加熱なしで喫食し肺吸虫症の患者が続発しているとの事実を取り上げることができる。このような事例が認められるにもかかわらず、イノシシは「と畜場法」の対象外であるために、寄生虫等病原体による汚染の実態は、ほとんど把握されていない。そこで、肺吸虫を対象とするイノシシ肉の検査に鹿児島県環境保健センターと取り組んだ。

C. 研究結果

1. エキノコックス症

ヒトの疑診例2例は抗体検査陽性で、多包性エキノコックス症と診断され、いずれも北海道との関連が認められた（1例は居住者、もう1例は旅行歴保有者）。単包性エキノコックス症フォローアップ分では、抗体応答の低下は認められたが完全消失せず、化学療法剤（アルベンダゾール）投与とCTによるモニター継続が決定された。動物の疑診例5例のうち、ネズミ由来検体（1例）は陰性であったが、イヌ由来検体（4例）の1例が陽性であった。この陽性検体は、愛知県内の動物保護管理センター抑留個体の寄生虫調査を行っていた開業獣医師から大学獣医学部を経由して依頼されたもので、当部で実施した確定診断の結果に基づき、イヌのエキノコックス症として所管の半田保健所に届出がなされた。この結果を受けて、愛知県衛生研究所と協議し、診断技術研修を行うと同時に、共同で同県動物保護

管理センターに抑留されるイヌのエキノコックス調査を開始した。さらに、上記届出とその後の報道に付随して、消化管内寄生蠕虫検査 (MGL 法) の詳細に関する問い合わせが増加したため、病原体検出マニュアル収載の同検査法について、改訂を行って対応した。

2. クドア感染症

厚生省担当者との情報交換により、食中毒患者便からのナナホシクドア遺伝子検出法はあくまでも参考であり、届出は従来通り、患者の喫食残品におけるクドアの存在を顕微鏡下に確認することに基づくと確認された。またナナホシクドア以外のクドア属寄生虫に起因する一過性下痢症は、現時点では有症苦情として取り扱い、食中毒として取り扱うかは喫緊の課題として厚生労働省 (監視安全課) で更に検討することになった。ヒラメ以外の魚種 (カワハギ) から検出されるナナホシクドア以外のクドアに関しては、地研と国研とでさらに検討を進め、一層の情報交換を図ることになった。

3. 肺吸虫症

検査したイノシン 7 頭のうち、3 頭から肺吸虫の幼若虫が検出され、遺伝子検査を行った。その結果、幼若虫はいずれもウエステルマン肺吸虫 (人体寄生性の肺吸虫種) と種同定された。イノシン肉における肺吸虫汚染は極めて濃厚で、例えば 215g の筋肉に 8 隻もの肺吸虫の幼若虫が寄生する個体も認めた (平均すると約 30g の筋肉に 1 隻の寄生)。鹿児島衛研とは更にこの問題で共同研究と相互研修を進め、また隣接する自治体の地研にも呼び掛けて、虫体検出法や検出虫体の遺伝子検査に関する技術研修を

実施すると共に、野生鳥獣の処理施設や猟友会への啓発活動に取り組む予定になっている。

D. 考察

わが国で発生するエキノコックス症は、常在地である北海道を除き、いずれも域外で感染して持ち込まれた非原発性症例と考えられていた。今年度発見されたヒトの多包性エキノコックス症例のうちの道外例 1 例も北海道旅行歴を有し、同地での感染が示唆された。しかし今回、2005 年の埼玉県での届出に続き、ヒトへの直接の感染源となるイヌの感染例が発見されたことによって、上述のような旅行歴、さらに居住歴などの情報だけから感染地を推定することが困難となってきた。ヒトのエキノコックス症の診断は曝露後相当年を経過してから実施されるのが一般的で、このためヒト症例の解析のみでは十分な監視体制が敷かれているとは言いがたい。エキノコックス症流行地の拡大が懸念されることから、新たな監視体制の構築が必要となっている。

食品寄生虫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。そのために情報交換と相互研修がまず重要であると考えられた。

E. 結論

エキノコックス症に関する監視体制は十分と言えず、地研や保健所、医療機関等への情報提供を行って体制整備を図る必要がある。また本症伝播に重要な役割を果たすと考えられるイヌなどの終宿主動物に関しては、これを対象とした簡易な検査方法の開発と普及が必要である。さらに食品寄生

虫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。情報交換と相互研修がまず重要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

誌上発表

1. 登丸優子, 福本真一郎, 森嶋康之. 本州以南第二例目の届出となった犬のエキノコックス(多包条虫)症 — 愛知県. 病原微生物検出情報35, 183.
2. 田中照久, 平田哲生, 東新川実和, 岸本一人, 外間 昭, 金城福則, 林 裕樹, 尾下陽大, 石野信一郎, 白石祐之, 西巻 正, 森嶋康之, 杉山 広, 山崎 浩, 藤田次郎. ネパール人留学生の単包虫症の1例. *Clinical Parasitology* 25, 77-79.
3. 森嶋康之, 市村静江, 山崎 浩, 杉山 広: ネパール人の単包虫症. *Echinococcus ortleppi*の心寄生例. *Clinical Parasitology* 25, 99-101.
4. 杉山 広, 柴田勝優, 荒川京子, 森嶋康之, 山崎 浩, 御供田睦代, 岩切忠文, 福盛順子. 猪肉の生食を原因に発生が続く肺吸虫症: 鹿児島県産猪の筋肉における本虫の寄生状況調査. 病原微生物検出情報, 35, 248, 2014.
5. 杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之. 肺吸虫症. *臨床と微生物*, 41, 373-378, 2014.

学会発表

1. 田中照久, 平田哲生, 東新川実和, 岸

本一人, 外間 昭, 金城福則, 林 裕樹, 尾下陽大, 石野信一郎, 白石祐之, 西巻 正, 森嶋康之, 杉山 広, 山崎 浩, 藤田次郎: ネパール人留学生の単包虫症の1例. 第25回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2014年6月.

2. 森嶋康之, 市村静江, 山崎 浩, 杉山 広, 北井 豪: ネパール人の単包虫症: *Echinococcus ortleppi*の心寄生例. 第25回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2014年6月.
3. 福本真一郎, 登丸優子, 森嶋康之: 本州以南第2例目にあたる愛知県内の犬から検出された多包条虫虫卵. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014年9月.
4. 杉山 広, 柴田勝優, 荒川京子, 市村静江, 森嶋康之, 山崎 浩: イノシシ肉の生食を原因に発生が続く肺吸虫症に関する実態調査. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014年9月.

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

クロストリジウム属菌およびコリネバクテリウム属菌による感染症のラボネットワークに
ついて

研究分担者	加藤はる	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	岩城正昭	国立感染症研究所	細菌第二部
	山本明彦	国立感染症研究所	細菌第二部
	小宮貴子	国立感染症研究所	細菌第二部
	妹尾充敏	国立感染症研究所	細菌第二部
	福田千恵美	香川県環境保健研究センター	
	山田裕子	広島県立総合技術研究所	
	河合央博	岡山県環境保健センター	
	木村千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所	

研究要旨

ボツリヌス症および*Clostridium difficile*感染症に関する講習会（座学および実習）を、地方衛生研究所を対象に行った。ボツリヌス診断用抗毒素D型およびG型の標準化作業を終了した。また、平成26年に発生した多剤耐性*Corynebacterium striatum*による院内アウトブレイク事例、および、*Clostridium difficile*による院内アウトブレイク事例を通して、医療機関、保健所、地方衛生研究所、民間検査センター、国立感染症研究所におけるネットワークについて検討した。

A. 研究目的

ボツリヌス症は、重篤な経過をとり、適切な細菌学的診断が必要であるとともに、食中毒の場合は特に公衆衛生学的に非常に重要な疾患である。しかしながら、稀少感染症であること、ボツリヌス毒素検出には動物実験が必要であることから、ボツリヌス症のレファレンスセンターであっても、検査ができない地方衛生研究所が少なくない。本研究では、レファレンスセンターを含めた地方衛生研究所で検査が行えることを目的に地方衛生研究所の研究者を対象にボツリヌス症の細菌学的検査法の講習会を開催した。

また、ボツリヌス毒素には、AからGまでの7型があるが、ボツリヌス診断用抗毒素C型、D型、G型が日本ではなかった。

そこで、これらを作製することを本研究の目的のひとつとした。

また、ボツリヌス菌以外の*Clostridium*属菌では、*Clostridium difficile*が医療関連感染の原因として重要であり、アウトブレイク事例や重症例に関して、保健所や地方衛生研究所への問い合わせが増加している。そのため、本研究では、地方衛生研究所を対象に*C. difficile*感染症(CDI)に関する講習会を行った。

一方、平成26年9月にある医療機関において*Corynebacterium*属菌による感染症の院内アウトブレイク、同年11月に別の医療機関においてCDIの院内アウトブレイクが発生した。アウトブレイクへの対応は、医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所、さらに、民間検査センター

とのネットワークが重要であるが、事例を通して明らかになった問題点について検討した。

B. 研究方法

1. ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

平成 26 年 11 月 19 日から 11 月 21 日まで、ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会を行った。マウス法によるボツリヌス毒素検出およびボツリヌス菌のコロニー観察を中心に講習を行った。

2. 診断用ボツリヌス抗毒素の標準化

化学及血清療法研究所（化血研）と大阪府立大学の協力を得て、C、D、G 型の抗毒素を製造した。本抗毒素について標準化作業を開始した。

3. *Clostridium difficile* 感染症(CDI)の細菌学的検査に関する研修会

平成 26 年 8 月 20 日-22 日、8 月 27 日-29 日、及び、10 月 1 日-3 日の 3 回に分けて、医療関連感染で重要な薬剤耐性菌の研修のなかで、座学と実習を行った。地方衛生研究所では、本感染症はなじみが薄い場合が多いため、まずどのような感染症であるかという概説、さらに検査法に関する座学、実習ではコロニー観察を主に行った。

4. アウトブレイク事例

① *Corynebacterium* 属菌感染症によるアウトブレイク事例

平成 26 年 9 月、ある医療機関において、同一病棟入院の 4 患者の血液、創部浸出液、医療デバイス先端等から、続けて *Corynebacterium* 属菌が検出され、医療機関が同一 antibiogram を呈していることに気づき管轄の保健所に届けた。地方衛生研究所では、ジフテリア菌以外の *Corynebacterium* 属菌の検査については

経験がないという理由で、分離された 8 菌株については国立感染症研究所において行政検査を行うこととなった。国立感染症研究所は、行政検査を行うとともに、医療機関における細菌学的検査について、保健所および地方衛生研究所と情報共有しつつ、本医療機関および医療機関が細菌学的検査を外部委託している民間検査センターと、*Corynebacterium* 属菌の細菌学的検査に関する調査および対応策について検討した。

② *Clostridium difficile* 感染症(CDI)によるアウトブレイク事例

平成 26 年 11 月、約 1 ヶ月間に約 20 例の CDI 発症があったと医療機関から管轄の保健所に届出が出された。*C. difficile* 菌株あるいは糞便検体が保存されているかどうかの情報が明確となる前に、地方衛生研究所から本アウトブレイク関連の検査は行わないという意思表示があった。保健所からの情報では本医療機関で CDI の細菌学的検査が適切に行われていないことが推測されたため、12 月初旬に保健所担当者とともに、医療機関を訪問し、職員を対象に勉強会を行った。

C. 研究結果

1. ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

香川県環境保健研究センター、広島県立総合技術研究所、岡山県環境保健センターおよび愛媛県立衛生環境研究所より、計 4 名の参加があった。

2. 診断用ボツリヌス抗毒素の標準化

D 型および G 型の抗毒素の標準化は終了した。C 型について検討中である。

3. *Clostridium difficile* 感染症の細菌学的検査に関する研修会

平成 26 年 8 月 20 日-22 日には、広島県立総合技術研究所、香川県環境保健研究センター、岡山県環境保健センター、川崎市健康福祉局、相模原市衛生研究所；8 月 27 日-29 日には、高知県衛生研究所、広島市健康福祉局、山口県環境保健センター、徳島県立保健製薬環境センター、愛媛県立衛生環境研究所、横須賀市健康部健康安全科学センター；10 月 1 日-3 日には、名古屋市衛生研究所、茨城県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、愛媛県立衛生環境研究所が参加した。参加者により、嫌気性菌学の経験や CDI に対する興味や関心に幅があった。

4. アウトブレイク事例

① *Corynebacterium* 属菌感染症によるアウトブレイク事例

4 患者から分離された 8 菌株は、*Corynebacterium striatum* と同定され、多剤耐性であった。本医療機関は細菌学的検査をすべて民間検査センターに外部委託しており、細菌学的検査に詳しいスタッフがいないため、情報の収集・整理に苦慮していた。そこで、医療機関、国立感染症研究所、および、検査委託している検査センターで協議し、検査センターで行っている *Corynebacterium* 属菌についての検査内容について整理し、検査センターに過去に検出された *Corynebacterium* 属菌のデータ提出を依頼した (図)。また、アウトブレイクの 4 患者において *Corynebacterium* 属菌による敗血症等に先行して吸引喀痰から *Corynebacterium* 属菌が分離されている記録から、上気道がリザーバーになっている可能性が示唆されたため、上気道における *C. striatum* のモニタリングができないか検討した。本検査センターでは、血液などの無菌的材料以外から分離された

Corynebacterium 属菌については、薬剤感受性試験は行わないシステムをとっていた。しかし、本アウトブレイクの原因となった *C. striatum* については特徴的なコロニーを呈することから、対象医療機関から提出された検体において、同様のコロニーが認められた場合は、検査材料に関わらず薬剤感受性試験を行うという提案が検査センターからなされ、実施された。

② *Clostridium difficile* 感染症(CDI)によるアウトブレイク事例

保健所と国立感染症研究所により、聞き取り調査をしたところ、対象医療機関で、適切な細菌学的検査が行われていなかったことが判明した。そこで、検体採取から、検査依頼、検査の読み方まで、すべての検査ステップにおいて繰り返し指導が必要であった。保健所と国立感染症研究所の指導が入る前までは、民間検査センターに外部委託していた *C. difficile* 分離培養検査を医療機関の検査室で開始することにし、検査技師を技術指導するとともに、軌道に乗るまで、検査室と国立感染症研究所の両方で培養検査を行うことになった。本事例はまだ調査中であるが、地方衛生研究所はまったく関与していない。

D. 考察

Clostridium 属菌による感染症では、ボツリヌス症のように稀少感染症であるが重篤な疾患もあれば、*C. difficile* 感染症のように医療関連感染として多くの医療機関で問題となる感染症もある。ボツリヌス症に関しては地方衛生研究所がその重要性を認識しているため、検査の技術移転をすることにより、地方自治体における検査体制は整備されると考えられる。そのボツリヌス症であっても、医療機関から提出された検

体について検査を行うことだけに集中し、感染症例に関する情報を入手した上で、さらに必要な検査（たとえば、食餌性ボツリヌス症を疑うのであれば、食品の調査）を提案することが疎かになることが多い。提出された検体をどのように処理するかだけでなく、感染症として理解し対応することが今後重要であると思われた。

C. difficile 感染症は、いずれの医療機関においても認められる感染症であるが、ひとたびアウトブレイクが発生すると、その対応には困難を極める。近年、アウトブレイク事例について、医療機関から保健所に相談されることが増加し、地方衛生研究所にも、細菌学的検査のエキスパートとして相談が持ち込まれることが増えてきたが、対応は自治体により多様である。今回報告した CDI のアウトブレイク事例は非常に大きなアウトブレイクと考えられ、管轄している保健所はその公衆衛生学的重要性について認識し対応したものの、地方衛生研究所はまったく関わらなかった。本事例において、もっとも重要な点は、今後本医療機関が適切な細菌学的検査を行うことができるよう指導する点と考えられたが、実際には保健所だけによる指導は難しく、国立感染症研究所が支援するかたちとなった。保健所サイドはこのアウトブレイク事例を通して、理解と知識を蓄積しつつあるものの、関わらなかった地方衛生研究所は本感染症のネットワークには加わらないままとなった。

Corynebacterium 属菌についての検査に関して、地方衛生研究所ではジフテリア菌以外の検査はできないという理由により、行政検査となった。国立感染症研究所としても、*Corynebacterium* 属菌による医療関連感染症事例対応に経験はなかったが、文献

を調べることにより解析を行った。本アウトブレイク事例においても、医療機関における細菌学的検査の充実は重要なポイントであった。細菌学的検査に関して理解を深め、民間検査センターに蓄積された過去の記録の情報提供を依頼、さらに、上気道キャリアの多剤耐性 *Corynebacterium* 属菌のモニタリングを行う工夫を行うなど、医療機関、国立感染症研究所、さらに、民間検査センターのネットワークがうまく機能した点が評価できた。地方衛生研究所においても、提出された菌株や検体の検査を行うだけでなく、細菌学的検査に関して医療機関に指導する能力が求められると考えられた。

E. 結論

地方衛生研究所において、提出された病原体や臨床検体において検査を行うだけではなく、その感染症を疾患として理解し、保健所、医療機関とともに対応にあたっていく姿勢が求められていると考えられた。また医療関連感染、特にアウトブレイク対応では、医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所、さらに、（特に検査を外部委託している場合は）民間検査センターがネットワークを結び、対処することが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

Corynebacterium 属菌は、無菌的検査材料から分離されても検体採取時あるいは培地への接種時のコンタミネーションと考えられがちであるため、今回経験した *Corynebacterium striatum* によるアウトブレイクは貴重な事例である。また、今回発生した *Clostridium difficile* 感染症事例は非常に大きなアウトブレイクであるにも

かかわらず、医療機関や自治体（地方衛生研究所）における危機感が低かったことは大きな問題と考えられた。

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

図 *Corynebacterium striatum*感染症によるアウトブレイクへの対応

