

2015/7005A

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27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 28 (2016) 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27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 28 (2016) 年 3 月

平成 27 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 | 主任研究員 |
| 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 |
| 吉田 弘 | 国立感染症研究所 ウイルス第二部 | 主任研究官 |
| 駒瀬 勝啓 | 国立感染症研究所 ウイルス第三部 | 室長 |
| 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 27 年度）

- 国内の病原体サーベイランスに資する機能的な
ラボネットワークの強化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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. BSL3 真菌取扱マニュアルの作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
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・・・・・・・・・・ 31
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株の特徴・・・・・・・・・・ 51
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・・・・・・・・・・ 57
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
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・・・・・・・・ 67
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 2015 年度活動について・・・・ 71
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. | エンテロウイルスのレファレンス・・・・・・・・・・・・・・・・ | 75 |
| | 研究分担者：吉田 弘（国立感染症研究所 ウイルス第二部） | |
| 10. | real-time PCR 法 の利用促進に関する検討・・・・・・・・ | 79 |
| | 研究分担者：駒瀬 勝啓（国立感染症研究所 ウイルス第三部） | |
| 11. | 百日咳レファレンスセンター・・・・・・・・・・・・・・・・ | 85 |
| | 研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所 細菌第二部） | |
| 12. | 結核菌型別分析における精度保証・・・・・・・・・・・・・・・・ | 89 |
| | 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） | |
| 13. | 動物由来感染症レファレンスセンター 平成 27 年度活動報告・・・ | 97 |
| | 研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部） | |
| 14. | HIV 関連感染症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 103 |
| | 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） | |
| 15. | 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・・・・ | 105 |
| | 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） |
| 吉田 弘 | （国立感染症研究所ウイルス二部） |
| 駒瀬 勝啓 | （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、講習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性食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ま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

研究は研究代表者と研究分担者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

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成:国立感染症研究所真菌部において、BSL3 真菌の取扱マニュアルを作成した。作成したマニュアルに基づきコクシジオイデス属真菌の検査を行い、マニュアル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:季節性インフルエンザ SOP とポリオ/エンテロウイルス検査 SOP に含む項目の検討を行った。

■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:マラリアに関しては、厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会に参加した検疫所職員を対象に、検査診断法に関する技術研修と情報提供に努めた。ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は7例あり、ウエスタンプロットによる免疫学的検査および遺伝子検査を行った。クドア感染症について地研・国研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とシカ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に

陽性コントロールと共に配布し、各ブロック内に普及を図った。

■リケッチア：全国ならびにブロック毎に地域情報に関する情報交換を行い、疫学情報、診断情報の収集・分析と共有を行った。担当者のスキルアップの機会として学会・研究会等への積極的な参加と発表を推し進めた。

■エンテロウイルス：感染症法改正(H28年4月施行)にあわせ、標準作業手順書等の作製のための作業部会を開催した。

■麻疹・風疹：病原体検出マニュアルを改訂し、realtime PCR法を記載した。本法に用いるプライマー、プローブ、標準RNAを地衛研に配布した。導入状況、検査実績のアンケートを実施した。

■百日咳：*B. holmesii*のLAMP法キットおよび百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii*、*M. pneumoniae*を標的とする4PlexリアルタイムPCRキットを配布した。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：EQAの希望対象のアンケート調査を実施した。SFTSの各種動物の血清疫学を行うためのELISA系の配布とEQAを実施した。

■HIV関連感染症：衛生微生物技術協議会第36回研究会(仙台)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。特に国内の地域別発生動向に関する情報交換を進めた。

■アデノウイルス：流行性角結膜炎の検出状況に関するアンケート調査を行った。患者発生動向を調べた。

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行った。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス：日本脳炎ウイルスリアルタイムPCR系を開発した。

■リケッチア：つつが虫病のPCR利便性に関して検討を行った。

C. 研究結果

■BSL3真菌取扱マニュアルの作成：コクシジオイデス属真菌等のBSL3に分類される真菌の検査を実施する上での実践的なマニュアルを作成した。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：季節性インフルエンザとポリオウイルス検査の各種技術管理文書の内容を検討した。グループディスカッションによる比較検討作業により、地衛研間の検査体制の違いを共有する機会となった。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHECのサーベイランス：2015年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全3187株であった。

1.2 コントロール株を配布し、問合せを受け付けた。

1.3 新規下痢原性腸内細菌 *Escherichia albertii* についてコントロール株を設定し、配布した。

1.4 下痢原性大腸菌EQAの実施：菌株(2014-2015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おける臨床分離株の収集状況：今年度 67 株が追加された。2015 年 3 月末現在で、合計 388 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免疫抗血清 3 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2014 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 947 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：2014 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 74 症例あった。最も多く分離された型は T1 型で全体の 39.2%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 74 例中、*emm1* 型が 29 例(39.2%)で最も多かった。

3.4 *emm89* 型株を特異的に検出する PCR 法の開発を試みた。

■カンピロバクター

1. Lior 法及び Penner 法による血清型別：2014 年に分離された *C. jejuni* 388 株を Lior 法および Penner 法で型別を行った。

2. 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 を行うことで 10 種血清群の型別が可能となった。

3. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2014 年分離の *C. jejuni* 380 株のキノロン耐性株 (NA、NFLX、OFLX、CPFY) の割合は、57.1%、*C. coli* 17 株では、82.4%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 1.3%、*C. coli* では 24.7%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. マラリア：厚生労働省検疫所業務管理室が実施する感染症検査技術研修会では、全国 13 検疫所本所及び 3 空港検疫所支所 (東京空港、中部空港、福岡空港) から、検疫所職員が合計 21 名参加した。

2. エキノコックス症：ヒトの疑診例 7 例中 1 例が遺伝子検査・抗体検査ともに陽性で、多包性エキノコックス症と診断され、北海道との関連が認められた

3. クドア感染症：有症苦情事例の情報に関しては、全国の地研に積極的に提供することになった。

4. 肺吸虫症：検査したイノシシ 30 頭のうち、9 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 20 件の参加があった。

2. *Corynebacterium striatum* 感染症によるアウトブレイク事例の調査：分離菌の同定を行い、PFGE によるパターン解析・質量分析を行い、両者の解析結果は必ずしも一致しなかった。

3. *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) によるアウトブレイク事例の調査：79 患者から採取された 99 検体において分離培養を行い、84 検体において *Clostridium difficile* が分離培養された。

■ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱患者をウイルス学的に確定するためのリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) のプライマー&プローブは、2016 年 2 月 1 日、WHO 緊急事態宣言を受けて、多くの全国の地方研究所に普及が計られた。

2. 日本脳炎ウイルス：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 I 型、III 型および V 型に対する共通検出系が確立され、十分な感度と特異性を有していた。

■リケッチア

1. 全国情報の共有：レファレンスセンター会議等を利用し、日本紅斑熱患者の増加傾向の再確認、患者発生地拡大、死亡例の増加に加え、輸入感染症に関する情報共有を行った。各施設の準備状況に合わせた体制構築を進めるとともに、各ブロック内の衛研等にも必要に応じ抗原分与・技術供与等を行い、全国の診断体制維持の継続的活動を試みた。

2. 担当者のスキルアップとブロック毎の活動：感染源対策ならびに発生の指標になる各地域に特有のベクター分布、保有リケッチア種、血清型を調査検討するための技術共有、指導、普及を各ブロックで行った。西日本では SFTS を、東日本・北日本では新興回帰熱なども考慮し、マダニ媒介感染症全体を俯瞰できるような活動が行われた。

3. つつが虫病の PCR 利便性に関する検討：56 kDa の *Orientia tsutsugamushi* type-specific antigen に対する one-tube nested PCR について検討を行ったところ、これまで検査現場レベルで有効とのデータが上がりつつあり、継続検討を行っている。

■エンテロウイルス：13 名（エンテロウイルスレファレンスセンター及びインフルエンザコアサポートセンター）の参加者とオブザーバー4 名で作業部会を開催した。検討した技術文書は最終的に「検査施設における病原体検査の業務管理要領」のひな形として反映されることとなった。

■麻疹・風疹

1. real-time PCR 用プローブ、プライマー、標準 RNA を合成し、73 地衛研に配布した。標準 RNA の送付には RNA stable

(Bio-matrix, Inc) を採用した。

2. 導入状況アンケート結果：試薬配布の約 5 ヶ月後に real-time PCR の導入状況のアンケートを実施した。55 カ所で real-time PCR をすでに実施しているか、実施を検討していた。マニュアルに従って実施した 54 カ所のうち、49 カ所で「標準 RNA を用いた系の最適化」を実施していた。うち、39 カ所において、最適化条件を満たす試験系を確立していた。

3. 平成 27 年の麻疹検査状況の調査：各地衛研で実施した麻疹検査診断の状況を調査した。アンケートで集計された、地衛研が検査した症例数は 1045 症例、そのうち 42 症例から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。

■百日咳

1. レファレンス関係：地衛研 11 施設へ *B. holmesii*-LAMP キット 2 件、4Plex リアルタイム PCR キット 10 件を配布した。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株における Prn 欠損株の出現状況は減少傾向にある。

3. マクロライド耐性菌の調査：2010 年以降の国内臨床分離株の EM に対する耐性菌は不検出であった。

■抗酸菌：

1. 内部精度管理用検体の提供と外部精度評価の実施：内部精度管理用結核菌 DNA を希望施設すべての 53 施設、アガロースゲル電気泳動用 VNTR マーカーを 45 施設、QIAxcel 用 VNTR マーカーを 6 施設に配布した。外部精度評価は 53 施設が参加した。

2. VNTR 分析に利用しているローカセット：各施設の分析対象ローカセットを調査し、JATA (15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 34、28、15 であり 2014 年度とほぼ同様の傾向であった。

3. 外部精度管理の正答施設数：各施設で 3

株の外部精度評価用検体を JATA(12)で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのは 46 施設 (92%) であった。各分析法におけるローカセットの正答率、各ローカスの正答率を評価した。

4.PCR 産物のサイズ測定方法:2014 年同様にアガロースゲル電気泳動による分析を行っている施設が最も多かった (66%)。

■動物由来感染症: SFTV 抗体検査 ELISA 系を 19 地衛研に配布し、EQA を行った結果、14 地衛研で感染研とほぼ同等の成績が得られた。

■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。HIV・AIDS 報告件数は関東・甲信越、近畿に多い状況であったが、九州の件数が初めて東海を上回り、近畿に次ぐ報告数となった。特に沖縄県では、人口 10 万対での HIV 感染者件数が 47 都道府県中 3 位、AIDS 患者件数が 1 位であった。

■アデノウイルス: 80 箇所の地方衛生研究所に対してアンケート調査を行い、68 施設から回答を得ることができ、12 施設で 54 型の検出がみられた。流行性角結膜炎の発生動向を調べた結果、2015 年の患者数が最も多かった。

D. 考察

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成: 真菌症検査の中でも通常の施設では困難な BSL3 に分類される真菌を取り扱うためのマニュアルの作成および検証を行った。空気中に飛散しやすく、病原性の高い BSL3 真菌本研究で作成した取扱マニュアルは検査の関

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。BSL3 の病原体検査における安全性の確保および品質・精度の向上のためにも病原体取扱マニュアルの作成は基本である。他の飛散しやすく検査室汚染に繋がりやすい病原体でも作成され、病原体検査の安全性確保のための基盤となることが期待される。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集: これまで、検査体制について担当者レベルで協議する機会はあまりなく、本研究班による作業部会による検討を行ったことは実務者間で協議する機会となった。分担研究班で扱った疾患はポリオと季節性インフルエンザであり、今後も、他の疾患の検査体制を施設横断的に討議することは必要と考えられる。

■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. 大腸菌 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: 長年の菌株の収集・解析により、データが蓄積したので、有意義な情報が地方自治体や、医療機関に還元できるようになった。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、30 価の M タンパクワクチンが開発中である。咽頭炎由来株の TB3264/*emm89* 型の流行を追うことは重要である。

■カンピロバクター: 食中毒事例等の原因究明に、血清型別成績を活用することを考えると、現在の型別率では不十分であり、型別率の向上が急務である。特に、血清群 B 群の型別率の低下が著しいことから、B 群血清の力価の低さが問題視された。さらに

検討が必要であると考えられた。

■ 寄生虫：各検疫所におけるマラリアの検査方法に関しては、今後、検査診断法に関する技術研修を定期的実施することで、状況の改善を試みる。エキノコックス症流行地の拡大が懸念されることから、従来の発想とは異なる監視体制の構築が急務である。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：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。今回のアウトブレイク事例では、管轄保健所が公衆衛生学的重要性を認識し、緊密な連絡を取りながら対応した。

3. *Corynebacterium* 属菌：本菌による医療関連感染事例については、どの機関においても経験が無かったが、前例や経験が無くても、ネットワーク内で情報共有し協力して対応していくことが必要であると考えられた。

■ ジカウイルス・日本脳炎ウイルス

1. ジカウイルス：ジカ熱 (Zika fever) の流行は、2007年にミクロネシアで発生した後、2013年にフランス領ポリネシアで流行が始まり、ニューカレドニア、イースター島など太平洋島嶼国に波及した。ブラジルでは4000人に及ぶ小頭症児が報告され、妊婦のジカウイルス感染との関連が強く疑わ

れるに至り、2016年2月1日にWHOが緊急事態宣言を出すに至った。ジカウイルス遺伝子検出系の配備について、アルボウイルスレファレンスセンターの機能が発揮できた。ジカウイルスも日本に生息するヒトスジシマカが媒介可能である。したがって、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さらに整備しておく必要がある。そのため、今後感染研が保有するジカウイルスをアルボウイルスセンターに配備する必要があると思われる。

2. 日本脳炎ウイルス：より高感度で特異性の高い遺伝子型 I・III・V型共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR系を構築、確立し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：つつが虫病も日本紅斑熱も、リケッチア症は、有効な抗菌薬により治療可能であるにも関わらず、いまだ死に至る感染症である。レファレンスセンター等でも情報共有したように、現に今年度はこれまでにない数の日本紅斑熱の死亡例が報告された。治療可能な疾患の死亡例をなくすためにも、地域特性を考慮しながらも全国情報も随時更新共有でき、適切な情報発信ができるレファレンスセンターの存在意義は高く、その維持・活動は、地域の医療と公衆衛生に大きな貢献になると考えられる。

■ エンテロウイルス：レファレンスセンターの協力を得て季節性インフルエンザとポリオウイルス検査の各種技術管理文書の内容を検討した。全国調査を目的とする場合、一定の質の確保が求められることから、施設内における技術管理は望ましい。このため人、物、予算の投入を行う必要があるが、

病原体検査体制は自治体の裁量によるところが大きい。本研究では、現行の資源を有効活用しつつ、実務的に最小限の信頼性確保を行うための、検査体制構築を考慮した。

■麻疹・風疹：麻疹の症例数が減少した現在の日本では、抗体検査と遺伝子検査が確実に実施される体制が望まれている。本年度は real-time PCR 法を地衛研に広く周知する事に主眼をおき検討した。試薬の配布、アンケートの実施が多く、地衛研で導入を検討するきっかけになったと考えられた。

■百日咳：遺伝子検査キットを地衛研に配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。今後も検査キットの配布を続ける必要がある。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、中国では北東部で高頻度に分離され、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：昨年度、本年度の外部精度評価により、本邦において VNTR 分析系が適切に導入されつつあることが確認された。結核分子疫学調査では、VNTR 情報を継続的に蓄積し、必要に応じて自治体間で情報共有する必要がある。そのためには VNTR 分析の精度保証は必須であり、今後も分析精度の維持と向上を支援する活動が必要と考えられる。

■動物由来感染症：最終的に参加した 19 地衛研のうち、14 地衛研に関しては EQA により動物からの SFTSV 抗体検出が問題なく出来ることが確認された。各地衛研で有害動物として駆除されたり、狩猟期に捕獲

された動物の血清を収集できれば、経年的に SFTSV 抗体陽性率の推移を調査して SFTS 患者発生リスクを把握することが出来ると考えられる。

■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、地域別にみると、近年、九州における HIV/AIDS 報告件数の増加が認められ、人口 10 万対での報告件数では、特に沖縄が極めて高い件数となっていることに留意が必要と考えられた。

■アデノウイルス：一部の地域では全く眼科の病原体サーベイランスが動いていない状況と推察され今後の改善が必要と考えられる。54 型は日本でのみ流行しており、流行性角結膜炎の症状が 8 型と同様に重篤であることが推察されるので、さらなる研究が必要である。

E. 結論

■BSL3 真菌取扱マニュアルの作成：BSL3 真菌検査のための病原体取扱マニュアルを作成した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：本研究班で検討した技術文書（添付文書）は、平成 27 年 11 月 17 日付けの厚生労働省健康局結核感染症課課長通知（健感発 1 1 1 7 第 2 号）「検査施設における病原体検査の業務管理要領」の別添資料として発出された。

■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求められ、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：従来から実施している Lior 法（自家血清）と Penner 法（市販血清）法の型別率を比較したところ、Penner 法による型別率が低いことが確認された。原因については、現在も検討を行っている。PCR 法による型別を検討し、その有用性が確認された。しかし、日常業務に用いるためには、今後、型別可能な血清群を増やすこと、多数検体について検査を実施するために、その操作性を簡便にすること等が課題である。

■寄生虫：エキノコックス症に関する監視体制は改築の必要もあり、地研をはじめ、医療機関等への情報提供を行いつつ、積極的に発生情報を収集する必要がある。また、監視体制をより効率的に運用するためには、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の簡易な検査方法の開発と普及に加え、既知流行地で利用されている歩哨動物（ブタなど）が利用可能であるかどうか評価を進める必要がある。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：過去に「ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会」に参加した施設において、実際の事例で検

査が成功し、講習会の成果と考えられた。

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んで対処すること、さらに、地域での感染実態の調査へ繋げていくこと、が重要と思われた。

■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、南米に侵入したジカウイルス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にプライマー、プローブセットおよび陽性コントロールを提供した。日本脳炎ウイルス遺伝子型 I・III・V 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を開発し、地方衛生研究所に情報提供した。

■リケッチア：国内での多様性ととともに、地域特性の強いリケッチア症の対応においては、レファレンスセンターの維持とともに、マニュアル等の既存のものから発展させられる知識・技能の蓄積をもつ経験のある衛研職員の維持と確実な技術継承が必須である。このことは、さまざまな感染症を含め、コンタミネーション等の対策やラボの信頼性を高めることにもつながる。

■エンテロウイルス：感染症法改正(H28年4月施行)にあわせ、H26年度作成した各種標準作業書類を、省令と整合性を取るべく内容を再検討した。実務者レベルで検査体制の違いを認識、共有しつつ、検査標準作業書の内容についてグループディスカッション形式で討議した。検討した技術文書は最終的に「検査施設における病原体検査の業務管理要領」のひな形として反映されることとなった。

■麻疹・風疹：麻疹遺伝子検査法として real-time PCR 法の周知や導入を促す方法

を検討した。プライマーやプローブの配布やアンケートの実施は real-time PCR 法の導入を促す効果があったと考えられた。一方、「系の最適化」が不十分である地衛研もあった。精度管理を通じて、技術の向上や検査の普及を諮り、ネットワークの機能を強化、維持し、質の高いサーベイランス体制を維持していく事が、麻疹、風疹の排除の達成、維持に必要であると考えられた。

■百日咳：地方衛生研究所を対象に百日咳遺伝子検査キット（12 件）の配布を行った。また、百日咳菌の国内臨床分離株を解析し、わが国では 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：国内結核菌型別に用いられている JATA（12）のローカセットによる 3 株の分析では、2014 年度と比べて 2015 年度は多くの施設から正答と完全一致する結果が報告された。また、2014 年度の外部精度評価で精度不良を認めた 5 つのローサイにおいても高い正答率（99–100%）が示された。VNTR 情報の蓄積と他施設との情報共有を推進するためには精度保証が重要であり、分析精度の維持と向上を支援する継続的な活動が必要と考えられた。

■動物由来感染症：血清診断として ELISA をほとんど実施していない地衛研があり、幾つかの問題点が明らかになったが、今回参加した 19 地衛研のうち 14 地衛研では、動物からの SFTSV 抗体検出が可能であることが EQA により確認できた。

■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。このネットワーク体制は、病原微生物検出情報（IASR）2015 年 9 月号の特集

HIV/AIDS 2014 および特集関連情報作成にも貢献した。

■アデノウイルス：2015 年に流行性角結膜炎の大規模な国内流行がみられた。地方衛生研究所に対するアンケートを 5 類定点疾患である流行性角結膜炎について実施した。検出数が最も多かったのは 54 型で九州・関東を中心に全国的に見られた。54 検出地域の関東、九州等において流行性角結膜炎が過去 5 年のうち最大規模で観察された。眼科定点からの検体提出があつて検査がなされていない自治体があり、感染症発生動向調査の改善が望まれた。

F. 健康危険情報

■ジフテリア・ボツリヌス：*Corynebacterium* 属菌は、血液などの無菌材料から分離されても検体採取時のコンタミネーションと考えられがちである。しかし、*Corynebacterium* 属菌のなかでも、特に *Corynebacterium striatum* は重篤な感染症を引き起こし、さらには医療関連感染の原因となりうることを、情報発信していく必要がある。*Clostridium difficile* 感染症は、欧米では社会的に注目され、国として自治体として感染管理施策が進められているが、日本では、自治体はもちろん医療機関においても関心・理解が低い。行政として、本感染症の認識度を上げ、感染実態を調査し、感染管理を行っていく必要がある。

■リケッチア：日本紅斑熱患者発生地が徐々に広がっているため、常に情報のアップデートと発信、現場対応体制の見直しが必要である。

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

■動物由来感染症：感染症発生動向調査で

は、本年 1 月 27 日時点で 170 人の SFTS 患者が報告されていて年齢中央値は 74 歳である。 5～8 月の患者発生が多く、西日本を中心に 20 府県で患者が発生している (<http://www.niid.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html>)。

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

BSL3真菌取扱マニュアルの作成

| | | | |
|-------|------|----------|-----|
| 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 |
| | 名木 稔 | 国立感染症研究所 | 真菌部 |
| | 星野泰隆 | 国立感染症研究所 | 真菌部 |

研究要旨 バイオセーフティーレベル3 (BSL3) に分類される3種病原体
コクシジオイデス病原体検査において、安全性を確保し、品質・精度を
維持・向上させるため実践的な取扱操作マニュアルの作成とそのマニ
ュアル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
所におけるBSL3に分類される真菌の検査のための取扱マニュアルを作
成し、これ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、
他の飛散しやすく検査室汚染に繋がりがやすい病原体に関する検査を行
う際に本報告書の取扱マニュアル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・向上のためにも病原体検査マニュアルの作成およびアップデートが必須となってきている。

BSL3 に分類されているコクシジオイデス属真菌は、分生子となって空气中に飛散しやすく、検査室汚染事故を引き起こしかねないため、特段の注意が必要となる。現状では、真菌を取り扱う地衛研は限られているが、BSL3 病原体を取り扱う施設も少なくない。将来的には、BSL3 真菌を取り扱う可能性も否定できない。

本研究では、飛散しやすい病原真菌の取扱マニュアル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、BSL3 真菌の取扱マニュアルを作成した。作成したマニュアルに基づきコクシジオイデス属真菌の検査を行い、マニュアル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

コクシジオイデス属真菌等の BSL3 に分類される真菌の検査を実施する上での実践的なマニュアルを作成した。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、2016年1月現在試験運用中のマニュアルの概要を附1に示す。

D. 考察

真菌症検査の中でも一般の施設では困難

な BSL3 に分類される真菌を取り扱うためのマニュアルの作成および検証を行った。空気中に飛散しやすい特性を有する、病原性の高い BSL3 真菌について、本研究で作成した取扱マニュアル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。BSL3 の病原体検査における安全性の確保および品質・精度の向上のためにも病原体取扱マニュアルの作成は基本である。本報告書で示すような検査マニュアルが飛散しやすく検査室汚染に繋がりがやすい他の病原体でも作成され、病原体検査の安全性確保のための基盤となることが期待される。

E. 結論

BSL3真菌検査のための病原体取扱マニュアルを作成した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 梅山隆、宮崎義継. 播種性クリプトコックス症の感染症法に基づく届け出について. モダンメディア. 61(7):10-15., 2015 年.
2. 堀内一宏、掛屋 弘、金子幸弘、宮崎義継. 健常人に生じ、治療に難渋した肺クリプトコックス症を合併した脳クリプトコックス症. 感染症学雑誌. 第 89 巻第 3 号付録. 15-20., 2015 年.
3. Asano M, Mizutani M, Nagahara Y, Inagaki K, Kariya T, Masamoto D, Urai M, Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y, Mizuno M, Ito Y. Successful Treatment of *Cryptococcus laurentii* Peritonitis in a Patient on Peritoneal Dialysis. Internal Medicine. 54(8):941-4, 2015.
4. Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang D, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K,

Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. Infection and Immunity. 83(4):1577-1586, 2015.

5. Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. J Infect Chemother. 21(12):831-6., 2015.

学会発表
国際学会
該当なし

国内学会

1. 上野 圭吾・金城 雄樹・金子 幸弘・大野 秀明・亀井 克彦・二木 芳人・宮崎 義継. *Cryptococcus gattii* を制御する樹状細胞療法はサイトカイン産生 CD4 細胞を誘導する. 第 63 回日本化学療法学会総会. 6 月 4-6 日, 2015 年, 東京.
2. 上野 圭吾・浦井 誠・水口 裕紀・大河内 香代・宮崎 義継・金城 雄樹. 病原性真菌 *Cryptococcus gattii* に対する樹状細胞ワクチンとその感染制御作用 -ワクチンで誘導される Th1/Th17 応答と多核巨細胞の形成について-. 第 26 回日本生体防御学会総会. 7 月 10-12 日, 2015 年, 東京.
3. 上野 圭吾・金城 雄樹・浦井 誠・大久保 陽一郎・清水 公德・金子 幸弘・亀井 克彦・大野 秀明・二木 芳人・澁谷 和俊・宮崎 義継. 樹状細胞ワクチンを用いた高病原性 *Cryptococcus gattii* に対する感染制御機構の解析. 第 59 回 日本医真菌学会総会. 10 月 9 日-10 日, 2015 年, 札幌.

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

BSL3真菌 取扱操作手順 (国立感染症研究所・真菌部)

★タイムテーブル

| | |
|---------|-----------------------------|
| *Day -1 | 検体到着 |
| Day 0 | 検体開封 釣菌 (*グローブボックス内アルコール消毒) |
| *Day 1 | (*グローブボックス消毒 片付け) |
| Day 7 | ストック作製 |
| Day 14 | DNA・鏡検サンプル採取 |

*大量の胞子が飛散する場合のオプション

Blastomyces dermatitidis
Coccidioides immitis (三種) (*C. posadasii*)
Histoplasma capsulatum
Histoplasma farciminosum
Paracoccidioides brasiliensis
Penicillium marneffe

1. 検体の開封

- Day -1 (Option) 到着した検体(二次容器)を24時間静置
安全キャビネット内で開梱 チェック
- Day 0 二次容器を安全キャビネット内で開封
- 一次容器の保水性チェック
- 形態観察 デジカメ撮影記録
- グローブボックスへの器具持ち込み(図1参照)
 - ・PBS-T シャーレ等に注ぐ
 - ・消毒用アルコールスプレー
 - ・白金耳 袋の口を切っておく

2. 釣菌 (Day 0)

- ☑ 釣菌手順
 - ・検体を入れ側面テープをはがし、30分静置
 - ・白金耳 取り出し
 - ・斜面培地 開栓
 - ・白金耳先をPBS-Tで湿らせる
 - ・釣菌 (飛散させないためにごく少量にする)
 - ・ストリーク (鏡検、ストック、DNAの3本)

- ☑ グローブボックス・検体表面消毒、取り出し
 - ・Day0 ボックス内部の消毒
 - ・ボックス内を次亜塩素酸で消毒
 - ・ボックス内消毒用アルコールスプレーにて消毒
 - ・Day1 検体の消毒
 - ・ボックス内および検体表面の消毒 (次亜塩素酸)
 - ・検体をボックス外 (安全キャビネット内) に移動
 - 直ちに検体表面を消毒 (次亜塩素酸)
 - ・ボックス内壁、外表面の消毒

3. ストック作製、DNA抽出、鏡検 (Day 7*, Day 14*)

- ☑ Day7 菌の発育 形態観察 デジタルカメラ撮影記録
3本の斜面培地 BHI (0.01% TW80)、70% EtOH、36% ホルマリン
シリンジでそれぞれ20ml注入する
不活化期間は穴が開いた部分をビニールテープでふさぐ

- ストック BHI (0.01% Tween80)
→培地に浸漬状態で7 cm注射針を用いて表面をこそげ取る
500 μ lを分取
500 μ l BHI (40% glycerol)と混合し、-80°C保存

- ☑ Day14 (図2参照)

- DNA 70% EtOH→液を持って、寒天を10cmシャーレ上に
菌体部分をカミソリで切り取り
5 mm角数個を500 μ l PBS (0.01% TW80) に→100°C、10 min

- 鏡検 ホルマリン→液を持って、寒天を10 cmシャーレ上に
菌体部分をカミソリで切り取り
2mm角をスライドガラス上に
ラクトフェノールコットンブルー液1滴
カミソリでみじん切り
カバーガラスで圧迫

*発育の状況で前後する

4. 消毒時注意事項

実験操作中 消毒手順

1. ダブルグローブで操作する
2. 汚染が発生したら、ペーパータオル→次亜塩素酸タオルで消毒する
3. アウターグローブを廃棄して脱出する
4. 新たなアウターグローブをつけて操作に復帰する

実験操作終了後 消毒手順

0. 適宜アウターグローブを次亜塩素酸タオルで消毒する
1. 次亜塩素酸タオル、消毒エタノールタオル、廃棄物の入ったオートクレーブバッグ以外を消毒し、安全キャビネット外に出す
2. 次亜塩素酸タオルで作業台面を消毒する
3. 次亜塩素酸タオルでオートクレーブバッグ表面を消毒する
4. 消毒エタノールタオルで作業台面を消毒する
5. タオル2枚とアウターグローブをオートクレーブバッグに入れ、口を縛って外に出す
6. オートクレーブバッグを一回り大きいバッグに入れ、オートクレーブ処理する

図1 グローブボックス内見取り図

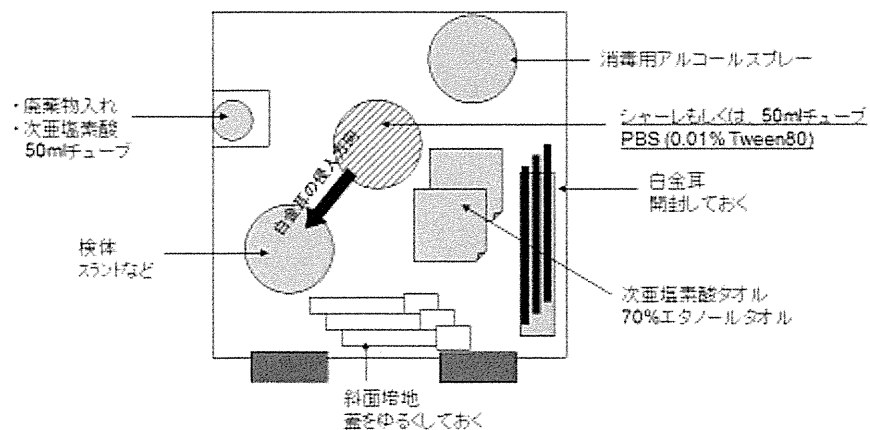
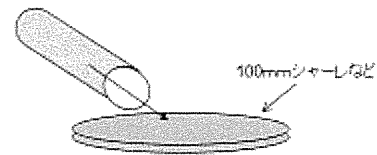
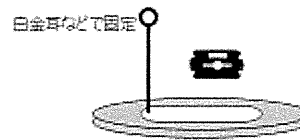


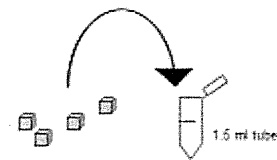
図2 斜面培地からの菌の切り出し



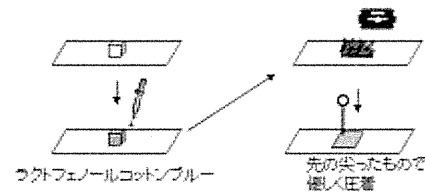
1. 白金耳や注射針でまると



2. カミソリで菌部分の切り取り



3. 500 μ l PBSに寒天片を数個
(DNA抽出用、エタノール浸漬)



3. スライドガラス上でみじん切り
(鏡検、ホルマリン浸漬)

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
前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部
池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌第一部

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 категория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。2015年も3,500例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,200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*: EAggEC]）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（Staten Serum Institut: SSI）あるいはデンカ生研から購入した血清を用いて実施した。PCR法は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

2015 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3,187 株であり、主な血清群として、O157 (53.9%)、O26 (25.5%)、O111 (4.8%)、O121 (3.1%)、O103 (3.0%)、O145 (2.4%)、O91 (0.9%)、O165 (0.5%)、その他 (5.8%) があげられる。

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サブタイプ検出用コントロール株の配布を次の各衛生研究所等：豊橋市保健所、和歌山県環境衛生研究センター、沖縄県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、岡山県環境保健センターへ

行った。配布を行ったいくつかの地研からは、解析に関するトラブルシューティング、および解析結果に関する問い合わせを受け付けた。

1.3 *Escherichia albertii* コントロール株の設定と配布

新規下痢原性腸内細菌として同定されている *E. albertii* について、大分県衛生環境研究センターの協力でコントロール株および検出用 PCR 系を設定し、必要に応じてコントロール株を分与することが可能となった。

1.4 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 (2014-2015 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、67 株が追加された (表 1、2014 年以前の分離株 14 株を含む)。すべて *Legionella pneumophila* で、血清群 (SG) 1 が 61 株、SG3、4、6、8、9、13 が各 1 株だった。感染源が、浴槽水と推

定・確定されている例は 28 例 (42%) だった。推定感染源からの環境分離株と PFGE が一致した例は 6 例あった。4 例は浴槽水分離株で、1 例は冷却塔水、1 例は散水ホースによる 2011 年の事例である。今年度も昨年度と同数の 6 例の土壌による感染の可能性が推定されている。他に、シャワーが感染源の疑い事例などがあった。

2015 年 3 月末現在で、合計 383 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた (集団感染事例由来の重複している株を含めると 388 株)。図 2 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 375 株 (97.9%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 84% を占めた。

L. pneumophila については遺伝子型別を行っており、結果を随時返却している。375 株は、ST1 から ST1966 まで 175 種類の遺伝子型に分けられた。遺伝子型と菌が生息する環境に関連性が見られており、遺伝子型別は感染源を推測する手がかりになると考えられる。

2.2 レジオネラ免疫血清の委託作製

今年度は、*Legionella sainthelsi* 1 群および 2 群と、*Legionella jordanis* の免疫抗血清を試作した。これまでも、*Legionella anisa*、*Legionella longbeachae* 1 群、2 群、*Legionella londiniensis* 1 群、2 群、*Legionella feeleeii* 1 群、2 群など、わが国で分離されるレジオネラ属菌の免疫抗血清を試作してきた。市販されている 5 菌種の抗血清と、これまで試作してきた抗血清とを併せると、レジオネラ菌種同定キットである DDH レジオネラ ‘極東’ が 2015 年で販売中止となったため、それを補完するための抗血清として有効である。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別

2014 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、947 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、TB3264 (257/947, 27.1%)、T12 (179/947, 18.9%)、T4 (136/947, 14.4%)、T1 (113/947, 11.9%) であった。TB3264 型の分離比率は、2010 年に急激に上昇し、2014 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%、2014 年, 27.1%)。T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。2010 年に分離頻度が減少した T4 型は、それ以降増加傾向にある (2010 年, 5.6%、2011 年, 9.8%、2012 年, 10.9%、2013 年, 11.7%、2014 年, 14.4%)。2011 年最も分離比率の高かった T1 型は、2014 年さらに減少した (2011 年, 31.1%、2012 年, 26.8%、2013 年, 12.1%、2014 年, 11.9%)。(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

2014 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 74 症例あった。70 例が *S. pyogenes*、4 例が *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による症例であった。

最も分離された型は、T1 型であり、2013 年と比較して分離比率が増加した (2013 年, 26.2%; 2014 年, 39.2%)。また、咽頭炎由来株の分離比率 (11.9%) に比べ、高い分離比率を示している。次いで、TB3264 型が多く、その分離比率は昨年と比較して減少した (2013 年, 31.1%; 2014 年, 16.2%)。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 74 例中、*emm1* 型が

29 例(39.2%)と最も多く、次いで *emm89* 型が 12 例(16.2%)、*emm3* 型が 4 例(5.4%)と多かった。

2013 年と比較し、*emm1* 型は、26.2% (16/61)から 39.2% (29/74)に増加し、*emm89* 型は 31.1% (19/61)から 16.2% (12/74)に減少した(図 5)。

3.4 *emm89* 型株を特異的に検出する PCR 法の開発

emm89 型株を特異的に検出する PCR 法の開発を試みた。その結果、検査した *emm89* 型において PCR 産物が見られたが、他の *emm* 型では増幅産物が見られなかった(図 6)。

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 2015-2016 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

L. pneumophila 血清群 1 株の臨床分離株と環境分離株について、遺伝子型別を行い、環境分離株の由来により遺伝子型に特徴があることが明らかとなり、臨床分離株がとられたレジオネラ症患者の感染源の種類とも関連があることが推測された。長年の菌株の収集・解析により、データが蓄積したので、有意義な情報が地方自治体や、医療機関に還元できるようになった。

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、30 価の M タンパクワクチンが開発中である。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)。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.

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 143 (4): 864-872 (2015).

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) 松田正法、重村久美子、徳島智子、吉田英弘、佐藤正雄、廣瀬みよ子、門司慶子、石津尚美、竹中 章、前川純子：病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市、病原微生物検出情報 2015. 36(1) : 13-14.

4) Tomizawa Y, Hoshino Y, Sasaki F, Kurita N, Kawajiri S, Noda K, Hattori N, Amemura-Maekawa J, Kura F, Okuma Y. Diagnostic utility of splenic lesions in a case of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med. 2015. 54:3079-3082.

5) Kaneko M, Maruta M, Shikata H, Hanayama M, Ikebe T. Acute abdomen due to group A streptococcus bacteremia caused by an isolate with a mutation in the *csrS* gene. J Infect Chemother. 21 (11): 816-819 (2015)

6) 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 143 (4): 864-872 (2015).

実用新案登録
特記事項内なし
その他
特記事項内なし

7) 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 21 (3): 207-211 (2015).

8) 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 21 (2): 144-147 (2015).

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

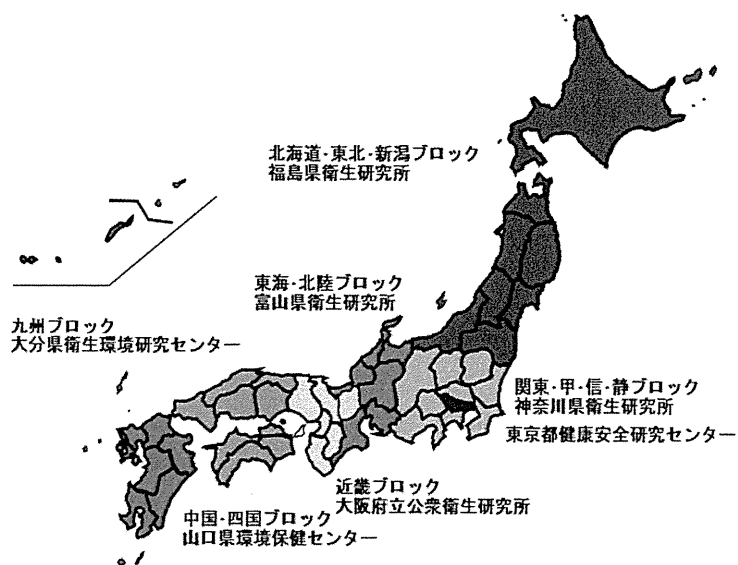


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

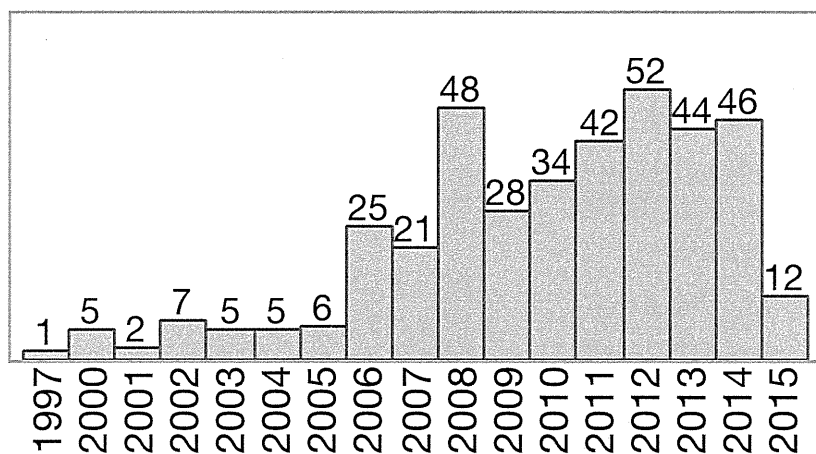


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2015年6月現在)

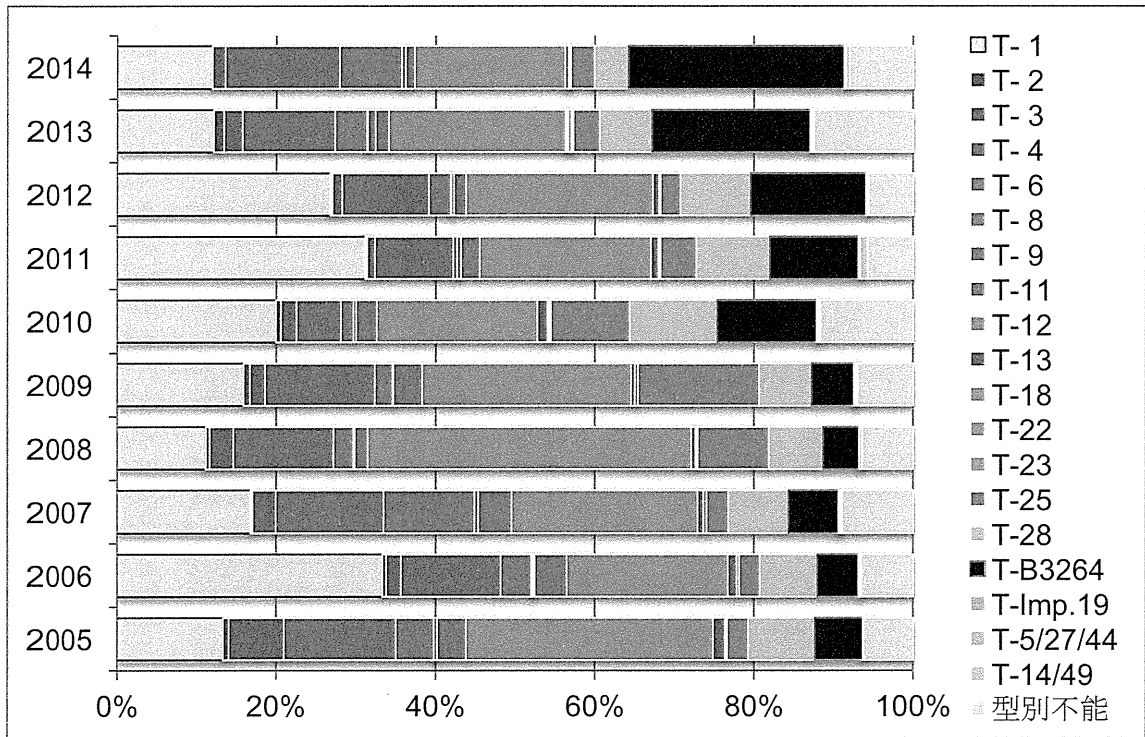


図3 咽頭炎由来株の T 型別 (2005-2014)

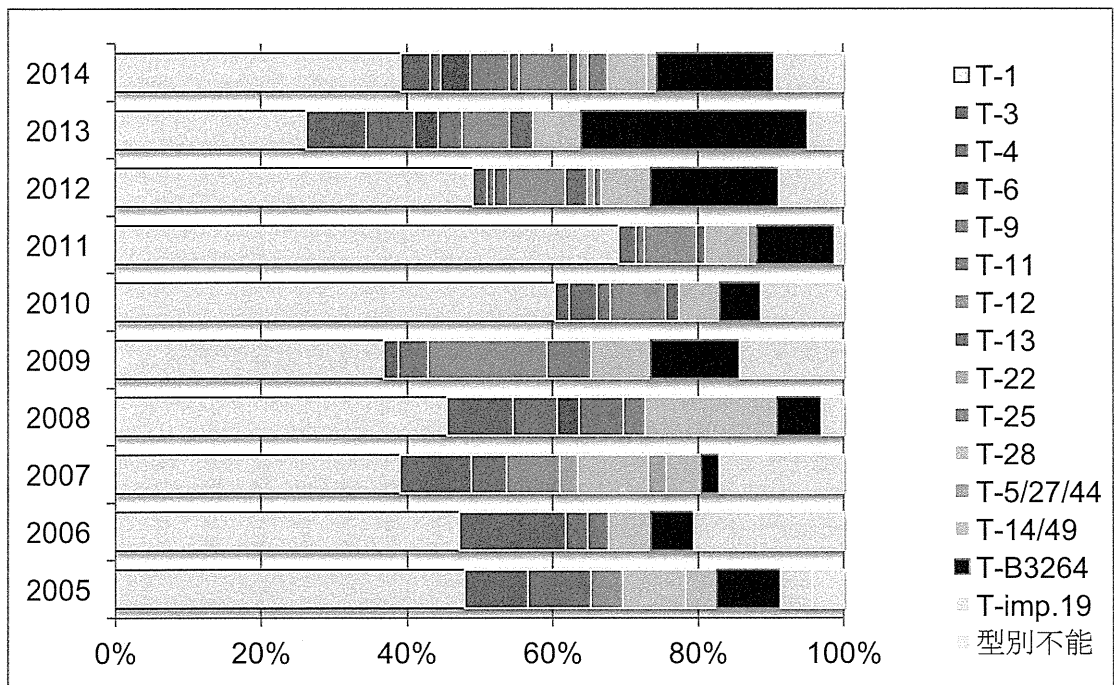


図4 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の T 型別 (2005-2014)

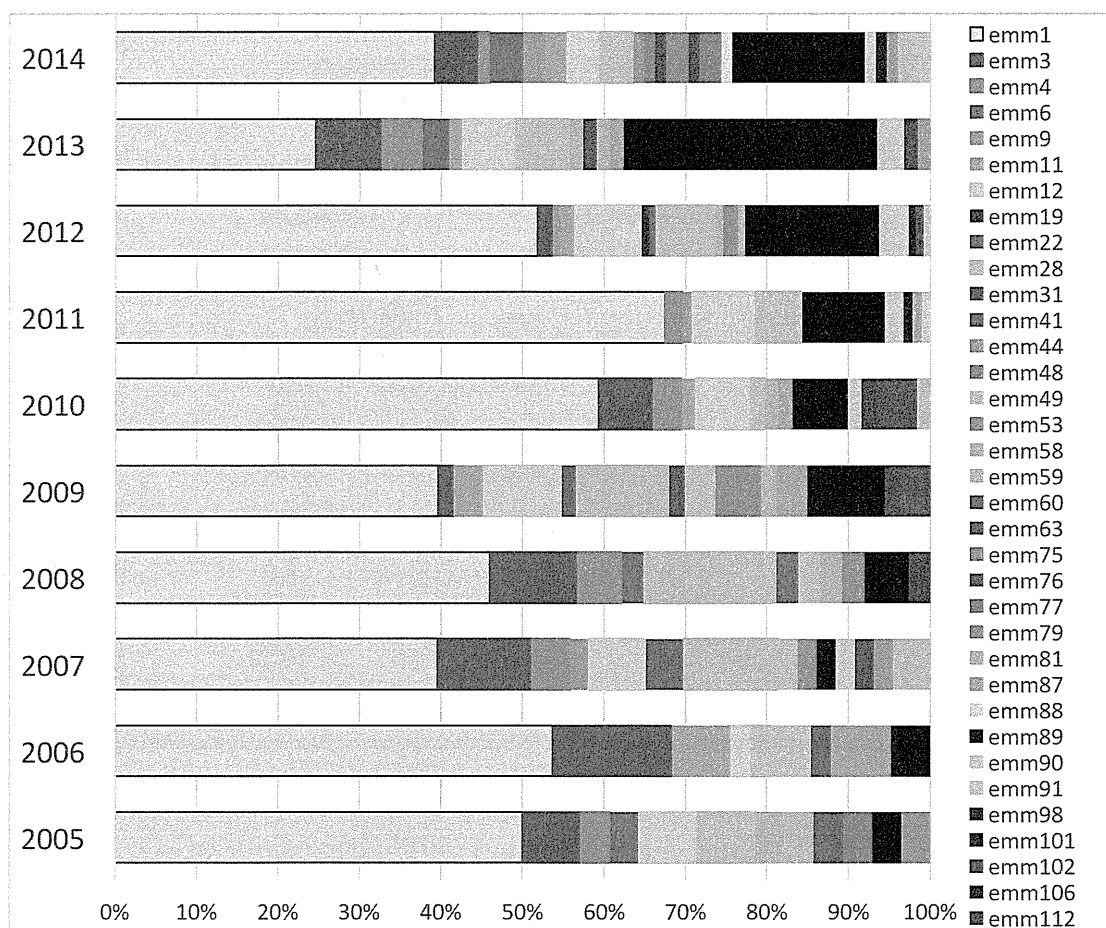


図5 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の emm 型別 (2005-2014)

emm89を特異的に検出するPCR

emm89遺伝子型の検出

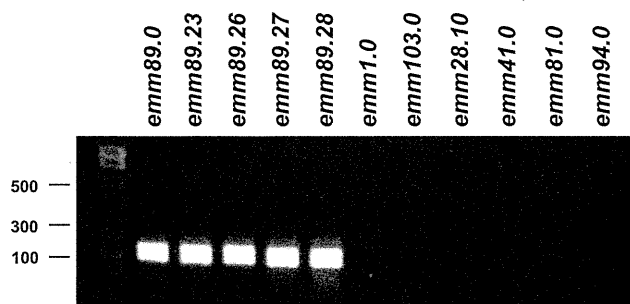
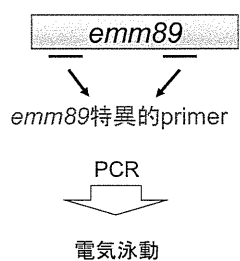


図6 emm89型株特異的PCR法の開発

表1 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2014年4月~2015年3月)

| No. | 年 | 性別 | 分離 感 染 源 | PFGE | NIB (受付番号) | 血 清 群 | ST (Sequence Type) | Group (SG1) 同じSTの報告があるか | | | | | | | | | |
|-----|------|----|--------------------------|------|------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|----------------------|---------------------|
| | | | | | | | | 種 名 | <i>flaA</i> | <i>pilE</i> | <i>asd</i> | <i>mip</i> | <i>mompS</i> | <i>proA</i> | <i>neuA</i> | 同 じ ST の 報 告 が あ る か | |
| 322 | 2014 | 男 | 不明(1回/2日のペースで近隣の温泉、菌不検出) | | 3164 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1756 | 3 | 13 | 1 | 21 | 11 | 9 | 9 | (U) | 無 |
| 323 | 2013 | 男 | 不明 | | 3183 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1773 | 6 | 43 | 15 | 6 | 21 | 7 | 53 | N | 無 |
| 324 | 2014 | 男 | 温泉(推定) | | 3184 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 138 | 10 | 12 | 7 | 3 | 16 | 18 | 6 | B3 | 国内18例目 |
| 325 | 2014 | 女 | 不明 | | 3185 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 118 | 12 | 8 | 11 | 20 | 5 | 12 | 6 | S3 | 国内3例目 |
| 326 | 2014 | 男 | 不明 | | 3186 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 353 | 8 | 10 | 6 | 15 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内6例目 |
| 327 | 2014 | 男 | 温泉(推定) | | 3187 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内21例目、国外 |
| 328 | 2014 | 男 | 不明 | | 3192 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1798 | 7 | 10 | 17 | 10 | 13 | 4 | 11 | B2 | 無一国内 |
| 329 | 2014 | 男 | 銭湯(推定) | | 3193 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 120 | 2 | 3 | 5 | 11 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内19例目、国外 |
| 330 | 2014 | 男 | 温泉(推定) | | 3194 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 505 | 7 | 6 | 17 | 3 | 11 | 11 | 9 | B2 | 県内5例目 |
| 331 | 2014 | 男 | 不明 | | 3200 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | C1 | 国内17例目、国外 |
| 332 | 2013 | 女 | 浴槽水(集団感染、高齢者福祉施設) | 一致 | 3201 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内22例目、国外 |
| 333 | 2014 | 男 | 不明 | | 3202 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 550 | 2 | 3 | 6 | 10 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内4例目 |
| 334 | 2014 | 男 | 草刈り(推定) | | 3204 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 507 | 2 | 3 | 5 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内5例目 |
| 335 | 2014 | 男 | 温泉(毎日利用、当該菌分離されず) | | 3205 | <i>L. pneumophila</i> | 9 | 1808 | 4 | 8 | 11 | 25 | 11 | 12 | 2 | - | 無 |
| 336 | 2014 | 男 | 不明 | | 3206 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内23例目、国外 |
| 337 | 2014 | 男 | 不明(水栓水検査中) | | 3208 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 42 | 4 | 7 | 11 | 3 | 11 | 12 | 9 | N | 国内8例目、国外 |
| 338 | 2014 | 男 | 不明(草刈り) | | 3209 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 739 | 12 | 8 | 11 | 2 | 10 | 12 | 2 | S3 | 国内2例目、日本・中国環境 |
| 339 | 2014 | 男 | 土壌(推定、大工) | | 3210 | <i>L. pneumophila</i> | 13 | 1826 | 12 | 10 | 5 | 10 | 18 | 1 | 209 | - | 無 |
| 340 | 2014 | 男 | 不明 | | 3216 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1847 | 2 | 3 | 5 | 12 | 2 | 1 | 6 | S1 | 無 |
| 341 | 2014 | 男 | 不明(整備員) | | 3217 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1845 | 21 | 27 | 28 | 28 | 15 | 29 | 9 | N | 無 |
| 342 | 2014 | 男 | 土壌(推定、清掃等) | | 3220 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内24例目、国外 |
| 343 | 2014 | 男 | 循環風呂(推定) | | 3224 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1846 | 2 | 3 | 9 | 12 | 2 | 1 | 20 | S1 | 無 |
| 344 | 2014 | 女 | 院内感染(冷却塔) | 一致 | 3243 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | C1 | 国内18例目、国外 |
| 345 | 2007 | 男 | 公衆浴場(推定) | | 3245 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 256 | 6 | 10 | 14 | 5 | 39 | 14 | 9 | (B1) | 国内4例目、国外、国内環境(シャワー) |
| 346 | 2007 | 男 | 公衆浴場(推定、PFGE一致せず) | | 3246 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 120 | 2 | 3 | 5 | 11 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内20例目、国外 |
| 347 | 2008 | 男 | 入浴施設(推定、血清群一致せず) | | 3247 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 143 | 4 | 17 | 11 | 23 | 5 | 12 | 19 | N | 国内2例目、国外 |
| 348 | 2011 | 男 | 家庭菜園の散水ホース | 一致 | 3248 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1865 | 2 | 3 | 46 | 13 | 2 | 5 | 6 | S1 | 無 |
| 349 | 2014 | 男 | 不明 | | 3249 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1867 | 21 | 14 | 29 | 11 | 15 | 29 | 6 | N | 無 |
| 350 | 2014 | 男 | 不明 | | 3250 | <i>L. pneumophila</i> | 8 | 1866 | 17 | 23 | 13 | 20 | 32 | 22 | 205 | - | 無 |
| 351 | 2014 | 男 | 公衆浴場(推定) | | 3251 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 502 | 6 | 10 | 19 | 3 | 19 | 4 | 6 | B1 | 国内3例目 |
| 352 | 2014 | 男 | 不明(家庭園芸をする程度) | | 3253 | <i>L. pneumophila</i> | 3 | 465 | 2 | 29 | 2 | 5 | 50 | 20 | 15 | - | 国外1例 |
| 353 | 2014 | 男 | 畑で農作業(推定) | | 3254 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 120 | 2 | 3 | 5 | 11 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内20例目、国外 |
| 354 | 2014 | 男 | 不明 | | 3260 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1924 | 2 | 3 | 9 | 12 | 2 | 1 | 6 | S1 | 無 |
| 355 | 2012 | 男 | 24時間風呂(推定) | | 3261 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 507 | 2 | 3 | 5 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内6例目 |
| 356 | 2013 | 男 | 自宅の24時間風呂(推定) | | 3262 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1964 | 6 | 10 | 17 | 28 | 19 | 14 | 6 | B1 | 無 |
| 357 | 2014 | 男 | 不明 | | 3263 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 48 | 5 | 2 | 22 | 27 | 6 | 10 | 12 | S2 | 無 |
| 358 | 2014 | 男 | 不明 | | 3264 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1480 | 3 | 13 | 1 | 14 | 14 | 9 | 6 | U | 国内2例目 |
| 359 | 2014 | 女 | 不明 | | 3265 | <i>L. pneumophila</i> | 4 | 1866 | 6 | 6 | 15 | 6 | 4 | 14 | 11 | 無 | 無 |
| 360 | 2014 | 男 | 温泉(推定) | | 3266 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 42 | 4 | 7 | 11 | 3 | 11 | 12 | 9 | N | 国内9例目、国外 |
| 361 | 2014 | 男 | 温泉(推定) | | 3267 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 42 | 4 | 7 | 11 | 3 | 11 | 12 | 9 | N | 国内10例目、国外 |
| 362 | 2014 | 男 | 入浴施設(推定、スポーツジム) | | 3268 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1965 | 4 | 3 | 18 | 28 | 5 | 1 | 9 | N | 無 |
| 363 | 2014 | 男 | 不明 | | 3269 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内26例目、国外 |
| 364 | 2014 | 男 | 24時間風呂(推定) | | 3270 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1933 | 7 | 10 | 19 | 10 | 19 | 4 | 6 | B1 | 無 |
| 365 | 2013 | 男 | 自宅風呂水、貯水槽水 | 一致 | 3275 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1857 | 6 | 6 | 3 | 28 | 9 | 4 | 11 | B1 | 国内環境株(シャワー) |
| 366 | 2013 | 男 | 不明 | | 3276 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1187 | 2 | 3 | 5 | 13 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内環境株(水溜り) |
| 367 | 2013 | 男 | 不明 | | 3277 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内25例目、国外 |
| 368 | 2013 | 男 | 不明(家庭菜園?) | | 3278 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 294 | 8 | 3 | 3 | 15 | 21 | 1 | 6 | S1 | 国内2例目、国外 |
| 369 | 2013 | 男 | 不明(タクシー運転手) | | 3279 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 905 | 2 | 3 | 9 | 13 | 56 | 5 | 6 | S1 | 国内2例目 |
| 370 | 2013 | 男 | 温泉(推定) | | 3280 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 507 | 2 | 3 | 5 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内7例目 |
| 371 | 2013 | 男 | 不明 | | 3281 | <i>L. pneumophila</i> | 6 | 1945 | 6 | 6 | 15 | 6 | 4 | 14 | 9 | 無 | 無 |
| 372 | 2014 | 男 | 不明 | | 3282 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内27例目、国外 |
| 373 | 2015 | 女 | 浴室シャワー(推定) | | 3288 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 566 | 6 | 10 | 20 | 13 | 21 | 14 | 11 | B1 | 国内3例目 |
| 374 | 2014 | 男 | 公衆浴場(推定) | | 3289 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 502 | 6 | 10 | 19 | 3 | 19 | 4 | 6 | B1 | 国内4例目 |
| 375 | 2015 | 男 | 不明(仕事でスチーム洗浄作業) | | 3290 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 1187 | 2 | 3 | 5 | 13 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内2例目、環境(水溜り) |
| 376 | 2014 | 男 | 不明(旅行歴) | | 3291 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 9 | 3 | 10 | 1 | 3 | 14 | 9 | 11 | U | 国外 |
| 377 | 2014 | 男 | 不明 | | 3292 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 211 | 3 | 10 | 1 | 1 | 14 | 9 | 11 | U | 国内4例目、国外4例 |
| 378 | 2014 | 男 | 不明(市場で魚輸送) | | 3293 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 89 | 4 | 10 | 11 | 15 | 29 | 1 | 6 | (S1) | 国内7例目、国外 |
| 379 | 2015 | 男 | 不明 | | 3294 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 42 | 4 | 7 | 11 | 3 | 11 | 12 | 9 | N | 国内11例目、国外 |
| 380 | 2015 | 男 | 入浴施設(スポーツジム) | 一致 | 3305 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 642 | 2 | 10 | 3 | 10 | 9 | 14 | 6 | B1 | 国内3例目 |
| 381 | 2015 | 男 | 温泉 | 一致 | 3308 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 138 | 10 | 12 | 7 | 3 | 16 | 18 | 6 | B3 | 国内19例目 |
| 382 | 2015 | 男 | 不明 | | 3309 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 507 | 2 | 3 | 5 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内8例目 |
| 383 | 2015 | 男 | 公衆浴場の利用あり | | 3310 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 353 | 8 | 10 | 6 | 15 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内7例目 |
| 384 | 2015 | 男 | 公衆浴場の利用あり | | 3311 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 353 | 8 | 10 | 6 | 15 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内8例目 |
| 385 | 2015 | 男 | 不明 | | 3312 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 142 | 2 | 10 | 3 | 13 | 9 | 4 | 18 | B1 | 国内4例目 |
| 386 | 2015 | 男 | 不明(自家用車の加湿器レジオネラ陰性) | | 3313 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 23 | 2 | 3 | 9 | 10 | 2 | 1 | 6 | S1 | 国内28例目、国外 |
| 387 | 2015 | 男 | 公衆浴場の利用あり | | 3314 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 353 | 8 | 10 | 6 | 15 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内9例目 |
| 388 | 2015 | 男 | 公衆浴場の利用あり | | 3315 | <i>L. pneumophila</i> | 1 | 353 | 8 | 10 | 6 | 15 | 51 | 1 | 6 | S1 | 国内10例目 |

表2 収集臨床分離株の内訳

2015年3月末日現在

| | | | | | |
|-----|-----------------------|--------------|--------------------|------------------------|-----------|
| | <i>L. pneumophila</i> | 375株 (97.9%) | <i>L. dumoffii</i> | 1株 (0.3%) | |
| SG1 | 323株 (84.3%) | SG9 | 3株 (0.8%) | <i>L. feeleyi</i> | 1株 (0.3%) |
| SG2 | 7株 (1.8%) | SG10 | 2株 (0.5%) | <i>L. londiniensis</i> | 1株 (0.3%) |
| SG3 | 14株 (3.7%) | SG12 | 2株 (0.5%) | <i>L. longbeachae</i> | 4株 (1.0%) |
| SG4 | 3株 (0.8%) | SG13 | 1株 (0.3%) | <i>L. rubrilucens</i> | 1株 (0.3%) |
| SG5 | 7株 (1.8%) | SG14 | 1株 (0.3%) | | |
| SG6 | 7株 (1.8%) | SG15 | 1株 (0.3%) | | |
| SG8 | 1株 (0.3%) | Untypable* | 1株 (0.3%) | | |

計 383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 |
| 研究協力者 | 高橋雅輝 滝澤剛則 長島真美、秋葉哲哉 皆川洋子、安井善宏 加瀬哲男 山下育孝 濱崎光宏 川上千春 吉田弘 | 岩手県環境保健研究センター 富山県衛生研究所 東京都健康安全研究センター 愛知県衛生研究所 大阪府立公衆衛生研究所 愛媛県立衛生環境研究所 福岡県保健環境研究所 横浜市衛生研究所 国立感染症研究所 |

研究要旨 感染症法一部改正（H28年4月施行）にあわせ、季節性インフルエンザの検査に関するマニュアル、および検査体制について、改正された省令と整合性を確保し、統一したものとするため、地方衛生研究所の作業部会にて内容を検討した。検討したマニュアル等は厚生労働省に提出し、「検査施設における病原体検査の業務管理要領」のひな形として反映された。

A. 研究目的

平成28年4月1日施行予定の感染症法の一部改正にともない、1) 地方衛生研究所が準備すべき季節性インフルエンザの検査（ウイルス分離、realtime PCR）に関する標準作業書のひな形を作成するとともに、2) 季節性インフルエンザの検体について地方衛生研究所が実施すべき検査数、検査方法等について検討する。

B. 研究方法

1. 季節性インフルエンザ SOP とポリオ/エンテロウイルス検査 SOP に含む項目の検討（吉田分担研究者との共同開催）

感染症法改正（H26年11月21日公布、感染症の情報収集強化に関する事項はH28年4月施行）にあわせ、平成26年度厚生労働科学特別研究「科学的根拠に基づく病原体

サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」（研究代表者 調恒明 山口県環境保健センター）において作成した各種 SOP 案を、省令と整合性を取るよう内容を検討した。特別研究報告書では、2 類感染症等、入院勧告などの行政措置が伴う検査と、季節性インフルエンザ等、病原体の流行を全国的に把握する 5 類定点における病原体検査目的の違いを考慮して、検査の質を管理することを提言の一部内容としている。報告書に基づく提言は第 10 回感染症部会（平成 27 年 5 月）にて了承され、省令改正、通知が整備されることとなった。

このため 5 類定点把握疾患の代表として、地方衛生研究所で作成すべき標準作業書のひな形として利用するため、季節性インフルエンザ検査、2 類疾患の代表としてポリオウイルス検査に必要な SOP の記載項目、

内容を比較するため、作業部会にて検討することとした。

ア. 季節性インフルエンザ、ポリオ検査に関わる SOP 検討作業部会の開催（国立感染症研究所ウイルス第 2 部吉田弘研究員との共催）

1) 作業部会開催

2015 年 8 月 10-11 日

2) 参加者

13 名（エンテロウイルスレファレンスセンター及びインフルエンザコアサポートセンターの有志）

オブザーバー 5 名（感染研 4 名、厚生労働省 1 名）

3) グループディスカッションによる討議

ポリオウイルス検査、季節性インフルエンザ検査に関わる SOP 案は参加者に事前送付した。作業部会では 3 班に分かれ、下記の項目ごとに討議を行い、標準作業書に記載する内容について検討を行った。項目は 1. 検査項目、2. 検体の種類、3. 検査方法、4. 作業環境、5. 試薬等に関する事項、6. 検体等の取扱方法、7. 機械器具に関する事項、8. 検査操作上の注意点、9. 検査の手順、10. 検査に関する記録の作成要領及び保管方法、11. 検査を実施するために必要な資格に関する事項、12. 作成及び改定年月日、である。グループディスカッション後、各班が検討結果を発表し、参加者間で討議し、ポリオウイルス検査、季節性インフルエンザ検査に含める項目及び内容（記載の程度）について合意形成を図った。作業部会終了後、電子メールを用いて参加者間でさらに検討を重ね、ポリオウイルス検査 SOP、季節性インフルエンザ検査 SOP とともに、エンテロウイルスレファレンスセンター、インフルエンザコアサ

ポートセンターの意見を反映させることとした。

C. 研究結果

1. レファレンスセンター有志の協力を得て季節性インフルエンザとポリオウイルス検査の各種技術管理文書の内容を検討した。グループディスカッションによる比較検討作業により、地衛研間の検査体制の違いを共有する機会となった。

2. 季節性インフルエンザ検査において、各地方衛生研究所において分離及び遺伝子検査を実施するが、全国調査を目的とする場合、検査方法を標準化した上で、一定の質の確保が求められることから、施設内における技術管理が望まれる。

3. 一定の検査体制を確保するためには、人、施設、予算の前提が必要であるが、病原体検査体制は自治体の裁量によるところが大きいため、本研究では、現行の人的、物的資源を活用しつつ、必要と思われる最小限の信頼性確保を行うための、検査体制構築を考慮した。

D. 考察

これまで、検査体制について担当者レベルで協議する機会はあまりなく、本研究班による作業部会による検討を行ったことは実務者間で協議する機会となった。分担研究班で扱った疾患はポリオと季節性インフルエンザであり、今後も、他の疾患の検査体制を施設横断的に討議することは必要と考えられる。

E. 結論

本研究班で検討した技術文書（添付文書）は、平成 27 年 11 月 17 日付けの厚生労働省健康局結核感染症課課長通知（健感発 111

7 第2号)「検査施設における病原体検査の業務管理要領」の別添資料として発出された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

論文発表

1. 調恒明. 地域保健法制下の地方衛生研究所の現状、課題と将来像. 公衆衛生 80 (1): 37-43, 2016.
2. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. Sci Rep. 2015 Sep 4;5:13806.
3. Kawase J, Etoh Y, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. Improved multiplex real-time SYBR Green PCR assay for analysis of 24 target genes from 16 bacterial species in fecal DNA samples from patients with foodborne illnesses. Jpn J Infect Dis. 2015 Jul 10.
4. Kimura H, Saitoh M, Kobayashi M, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Tsukagoshi H, Shirabe K, Nishina A, Kozawa K,

Kuroda M, Takeuchi F, Sekizuka T, Minakami H, Ryo A, Takeda M.

Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus. Sci Rep. 2015 Jul 1;5:11648.

5. Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan. J Infect Dis. 2015 Mar 11.
6. 調恒明. 地方衛生研究所の感染症危機管理機能の現状と強化に向けて. 公衆衛生 79 (1): 2-3, 2015.

学会発表

国際学会

該当無し

国内学会

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

平成 27 年 9 月 10 日

季節性インフルエンザ（五類感染症）の病原体定点サーベイランスについて

厚生労働省健康局結核感染症課

課長 井上 肇 様

地方衛生研究所全国協議会

会長 調 恒明（山口県環境保健センター）

副会長 田原なるみ（東京都健康安全研究センタ

ー）

副会長 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

副会長 皆川洋子（愛知県衛生研究所）

感染症対策部会長 四宮博人（愛媛県立衛生環境研究所）

感染症法の一部改正に基づく季節性インフルエンザの病原体検査について、第 10 回厚生科学審議会において報告し承認された平成 26 年度厚生労働科学研究「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」（研究代表者：調 恒明）に基づき、地方衛生研究所の検査体制について以下の通り集約した。法律改正によって、検査の質の確保が制度化されると同時に、季節性インフルエンザについては検体数及び検査方法が、平成 28 年 4 月 1 日改正法施行に向けて省令及び通知により定められる予定であると認識している。

なお、検体数の設定と結果の報告は、迅速なインフルエンザ亜型の決定と情報提供を基本としており、これと共に可能な限り速やかに薬剤耐性、抗原性の変化の解析を行うことを目的としている。

1. 季節性インフルエンザの検査検体数

検体採取に関して、流行期と非流行期に分けて対応するが、いずれの時期もインフルエンザ（臨床診断による Influenza-like Illness を含む）の検査は実施することとする。都道府県単位のインフルエンザ患者定点あたりの患者数が 1 以上となった場合に流行期に入ったと判断し、1 を下回った時を流行の終息とする。これまでのインフルエンザの発生状況を踏まえると 16 週程度と想定される。従って、それ以外の期間である非流行期は 36 週程度である。

| | | |
|--------|----------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | 流行期（16 週程度を想定） 定義：各都道府県単位の患者定点あたり 1 以上を超えて開始し、1 を下回ったときに終了。 | 非流行期（36 週程度） 定義：流行期以外 |
| 検体提出頻度 | 週ごと | 月ごと |

| | | |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|
| 頻度ごとの検体数 | 1 検体 | 1 検体 |
| 予想総検体数 | 16 週×530 病原体定点×1 検体 =8,480 検体 | 9 か月×530 病原体定点×1 検体 =4,770 検体 |

2. 季節性インフルエンザの検査方法

規定数の検体については、全例リアルタイム PCR を行う。リアルタイム PCR の結果、陽性となった検体のうち半数以上についてウイルス分離を行う。リアルタイム PCR 法とウイルス分離を同時に行ってもよい。すべての都道府県においてウイルス分離が行われる必要がある。分離されたウイルスのうち、H1N1 pdm については原則として全例について薬剤耐性マーカー検出のための検査を行う。また必要に応じて、HI, HA 試験による抗原性の解析、遺伝性配列決定による系統樹解析を行う。

3. 季節性インフルエンザの検査結果の報告

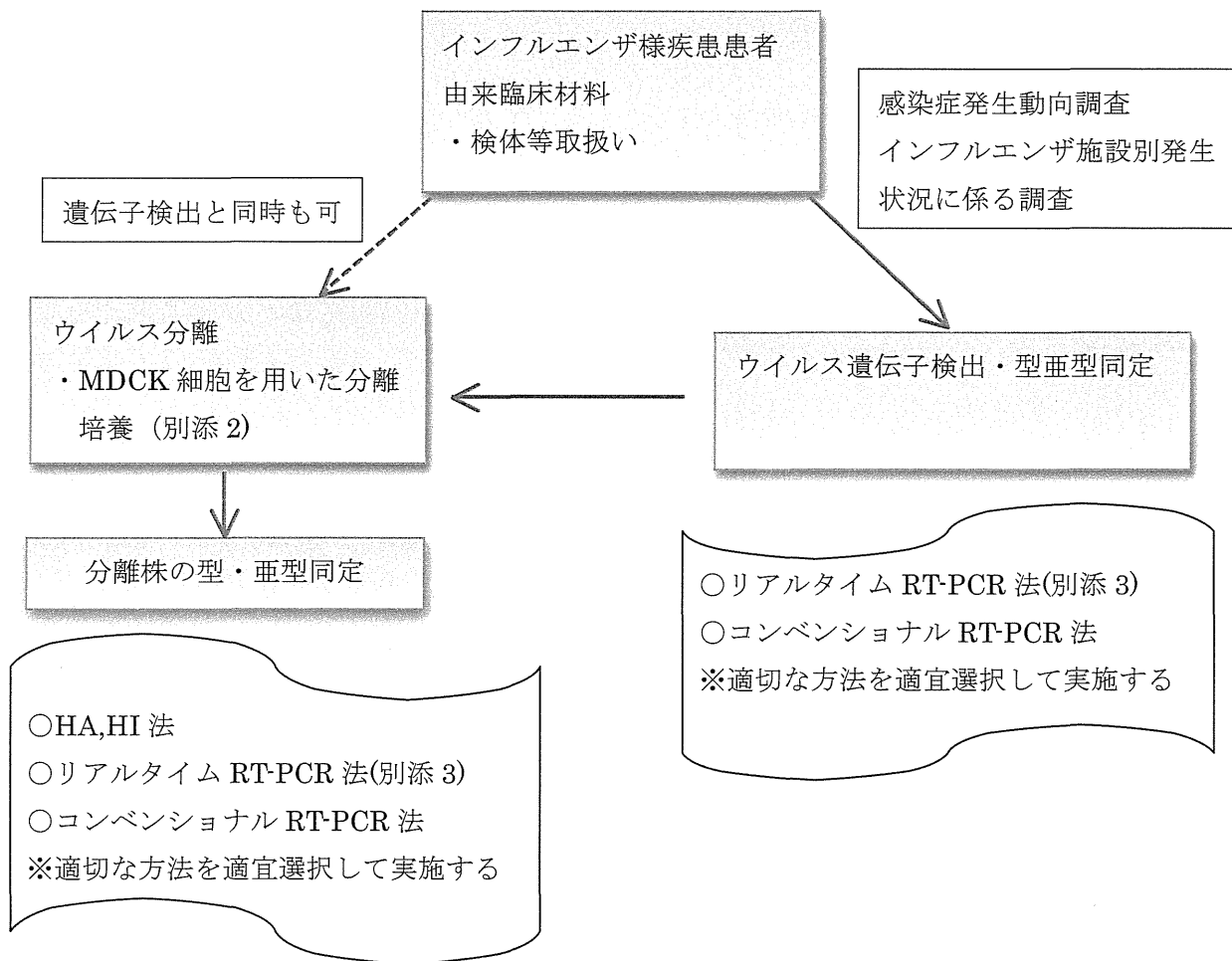
検査の結果を可能な限り迅速に報告し、感染対策、医療体制に資するため、結果の報告については以下の通りとする。

| | 隔週（2 週間以内）（流行期） | 月報（非流行期） | 年報 |
|------|------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 報告内容 | -検査結果（陽性・陰性） -型・亜型 -薬剤耐性の有無（可能な限り） | -検査結果（陽性・陰性） -型・亜型 -薬剤耐性の有無 | 左記に加え -抗原性解析結果 |

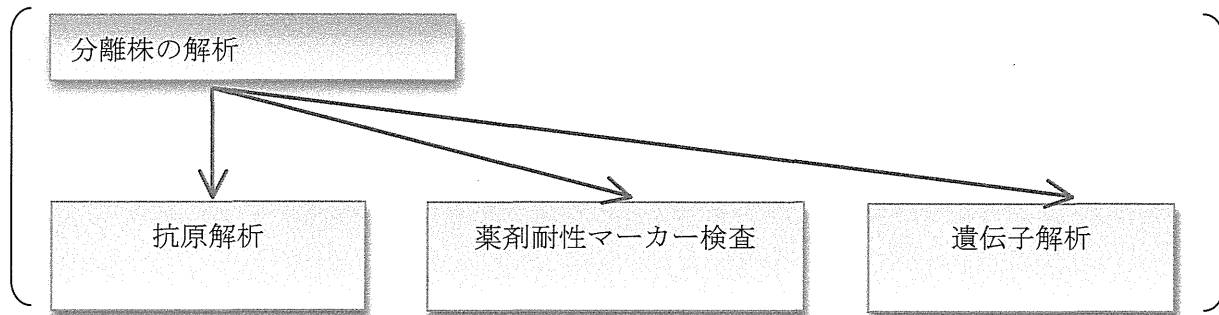
4. 地方衛生研究所における季節性インフルエンザ検査の流れ

地方衛生研究所における季節性インフルエンザ検査の流れを図に示し（別添 1）、その標準作業書ひな形（案）を別添 2（ウイルス分離）及び別添 3（リアルタイム RT-PCR 検査）とする。

地方衛生研究所における季節性インフルエンザ（五類感染症）検査の流れ



以下の [] 内の項目は、一部の亜型等に対して必要に応じて実施する



注 1：図示した項目に加えて、試薬の調製・管理、機器の管理・保守点検、検査結果報告（検査成績書発行、NESID 入力を含む）、検査に関する記録の作成、従事者の研修等に関する手順書・記録簿・マニュアル等を準備することが望ましい。但しこれらの手順書・記録簿等が他のウイルス等の検査手順において既に整備されている場合は、共用若しくは省略することができる。

注 2：手順に従って検査を実施中に、インフルエンザ以外のウイルスや、使用中の試薬に反応を示さない変異株の分離・検出等が疑われ、積極的疫学調査・感染症発生動向調査、若しくは調査研究が必要と考えられる場合は、追加検査若しくは解析等を実施する。

検査実施標準作業書

SOP No. B-1

試験品の種類 咽頭ぬぐい液等

検査項目 インフルエンザウイルス分離

試験法 インフルエンザ診断マニュアル第 3 版
 (平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日 平成 27 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ウイルス課 ○○○○

承 認 者 □□□□□
(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

〇〇県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

検査実施標準作業書

[インフルエンザウイルス分離]

| | 年 月 日 | 作成・改訂者署名 | 承認者署名 | 改訂理由 |
|-----------|------------------|----------|-------|------|
| 作 成 | 平成 27 年 8 月 19 日 | 〇〇〇〇 | □□□□□ | |
| 第 1 回改訂 | | | | |
| 第 2 回改訂 | | | | |
| 第 3 回改訂 | | | | |
| 第 4 回改訂 | | | | |
| 第 5 回改訂 | | | | |
| 第 6 回改訂 | | | | |
| 第 7 回改訂 | | | | |
| 第 8 回改訂 | | | | |
| 第 9 回改訂 | | | | |
| 第 1 0 回改訂 | | | | |

〇〇県保健環境研究所

保健科学部 ウイルス課

「季節性インフルエンザウイルス分離」標準作業書

1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス分離

2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

3 検査法

出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版（平成26年9月 国立感染症研究所監修）

原理

MDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離

4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

検体接種：第〇無菌室（BSL2）の安全キャビネット内

5 検査に使用する試薬

1) 試薬

① MDCK細胞の単層培養（組織培養用12.5cm²プラスチックフラスコ）

② DMEM液体培地（SIGMA）同等品

③ ペニシリン/ストレプトマイシン（GIBCO）同等品

④ ファンギゾン溶液（250 µg/ml）（GIBCO）同等品

⑤ アセチルトリプシン（10 mg/ml）（SIGMA）同等品

⑥ リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）（GIBCO）同等品

2) 分離用培地の調整

| 試薬 | 最終濃度 | 使用量 |
|-----------------|------------------------------------------|--------|
| DMEM | — | 500 ml |
| ペニシリン/ストレプトマイシン | 100 単位/ml ペニシリン G 100 µg/ml ストレプトマイシン | 5 ml |
| アムホテリシン B | 0.5µg/ml | 1 ml |

6 検査に使用する機械器具

1) 器具

- ① 天秤（クボタ）同等品
- ② ボルテックスミキサー（デルタミキサー Se-08）同等品
- ③ 炭酸ガス培養装置（パナソニックヘルスケア MCO-170AICUVH）同等品
- ④ 冷却遠心器（KUBOTA 6000）同等品
- ⑤ 超低温槽（パナソニックヘルスケア MDF-594AT）同等品
- ⑥ マイクロ冷却遠心器（KUBOTA 1920）同等品
- ⑦ マイクロピペット（ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000 μ l）同等品
- ⑧ 倒立顕微鏡
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 冷蔵庫
- ⑪ 高圧蒸気滅菌器（平山製作所 HV-50）同等品
- ⑫ 安全キャビネット

2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管（15 ml）
- ④ マルチプレート
- ⑤ フィルター付き滅菌チップ（P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P-200 用、P-1000 用）
- ⑥ ピンセット

7 検体等の取扱

1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

3) 検体の保存

処理済みの検体は、 -80°C 以下で保存することが望ましい。

8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- ② 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心する。
- ③ 分離、同定の作業の際はクラス 2 以上の安全キャビネットを使用する。
- ④ 観察記録を記入する。(必須項目：接種日、CPE 確認日、観察終了日)

9 検査の手順

接種に供する細胞は、「清浄区域」で準備することが望ましい。

1) MDCK 細胞シート法*1

24 well プレート*2を使用する方法

- ① 単層培養したプレートから培養液を除去し、PBS+, Medium, Hanks 液等 1 ml で洗う。
- ② 接種試料を 0.1 ml 接種する。
- ③ 30～60 分 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）でウイルスを吸着させる。
- ④ 0.5～5 µg/ml アセチルトリプシン添加 - 分離用培地を 1 ml 加えて 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）で培養する。
- ⑤ 7 日後までに CPE が認められない場合は回収し、その 0.1 ml を新たな well に継代(blind passage)接種する。(標準検査は CPE を認めない場合 2 継代目*3で終了する)
- ⑥ CPE が全体に広がったら培地を全量回収する。

注意

*1: 24 穴プレート以外のプレート及びチューブ若しくは培養フラスコを使用しても差し支えない。

*2: インフルエンザ診断マニュアル第 3 版に記載されている MDCK 細胞浮遊培養法で行っても差し支えない。

*3: 状況に応じて 3 継代目以上も行う。

2) 分離株の保存

分離されたウイルス株は-80℃以下で保存する。

3) 分離株の取扱い

分離株は、HI 試験、リアルタイム PCR 等による同定・型別を行い、抗原性解析等に供する。

10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取日、検体搬入日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検査台帳に記載する。
- ② 検査記録（細胞名、検体接種日、検体番号、観察記録、観察終了日）を記録用紙に記載する。
- ③ 検査結果を成績書に記載する。

2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。(案)

検査実施標準作業書

SOP No. B-2

試験品の種類 咽頭ぬぐい液等

検査項目 季節性インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査

試験法 インフルエンザ診断マニュアル第 3 版
(平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日 平成 27 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ウイルス課 ○○○○

承 認 者 □□□□□
(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

〇〇県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

検査実施標準作業書

[インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査]

| | 年 月 日 | 作成・改訂者署名 | 承認者署名 | 改訂理由 |
|----------|------------------|----------|-------|------|
| 作 成 | 平成 27 年 8 月 19 日 | 〇〇〇〇 | □□□□□ | |
| 第 1 回改訂 | | | | |
| 第 2 回改訂 | | | | |
| 第 3 回改訂 | | | | |
| 第 4 回改訂 | | | | |
| 第 5 回改訂 | | | | |
| 第 6 回改訂 | | | | |
| 第 7 回改訂 | | | | |
| 第 8 回改訂 | | | | |
| 第 9 回改訂 | | | | |
| 第 10 回改訂 | | | | |

〇〇県保健環境研究所

保健科学部 ウイルス課

「季節性インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査」標準作業書

1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス（五類感染症）のリアルタイム RT-PCR 検査

2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

3 検査法

出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版(平成26年9月 国立感染症研究所監修)

原理

リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe) を用いたインフルエンザウイルスの検出

4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2 かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

RNA 抽出：第〇無菌室

試薬の調製：準備室内の安全キャビネット

陽性コントロールの調製：準備室内のクリーンベンチまたは安全キャビネット（試薬の調製とは別の場所）

リアルタイム RT-PCR 反応：第〇検査室

5 検査に使用する試薬

1) 試薬

- ① QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 同等品
- ② Ethanol(99.5%) (和光純薬) 同等品
- ③ QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 同等品
- ④ RNase Inhibitor (20 nits/ µl ABI) 同等品
- ⑤ Distilled water DNase・RNase free (和光純薬) 同等品
- ⑥ リアルタイム RT-PCR 用プライマー及びプローブ
(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

MP-39-67For 5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC

MP-183-153Rev 5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA

MP-96-75ProbeAs 5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ : 146bp

(AH1pdm09*1 亜型同定用)

AH1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-swH1 TaqMan Primer-F1 5'

AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT

NIID-swH1 TaqMan Primer-R1 5'- TGT'TTCACAATGTARGACCAT

NIID-swH1 Probe2 5'-(FAM)CAGCCAGCAATR'TTRCATT'TACC(MGB)

PCR 産物の長さ : 187bp

*1:AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない。

(H3 亜型同定用)

H3HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H3 TaqMan Primer-F1 5'- CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA

NIID-H3 TaqMan Primer-R1 5'- GTCATTGGGRATGCTTCCATT'TGG

NIID-H3 Probe1 5'-(FAM)AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG(MGB)

PCR 産物の長さ : 178bp

(H1*2 亜型同定用)

H1HA 遺伝子 (A ソ連型) 検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H1 TaqMan Primer-F1 5'- CCCAGGGYATTTTCGCYACTATGAG

NIID-H1 TaqMan Primer-R1 5'- CATGATGCTGAYACTCCGGTTACG

NIID-H1 Probe1 5'-(FAM)TCTCAAAYGAAGATACTGAACT(MGB)

PCR 産物の長さ : 133 bp

*2: H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない

(B 型同定用)

TypeB NS 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-B TaqMan Primer-F1 5'- GGAGCAACCAATGCCAC

NIID-B TaqMan Primer-R1 5'- GTKTAGGCGGTCTTGACCAG

NIID-B Probe1 5'-(FAM)ATAAACTTTGAAGCAGGAAT(MGB)

PCR 産物の長さ : 105 bp

(B 型ビクトリア系統同定用)

Type B ビクトリア系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

TypeB HA F3vic v2 5'-CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATG

TypeB HA R3vic v2 5'-GTTGATARCCTGATATGTTCGTATCCTCKG

FAM-Type B HA Victoria 5'-(FAM)TTAGACAGCTGCCTAACC(MGB)

PCR 産物の長さ： 98 bp

(B 型山形系統同定用)

Type B 山形系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

TypeB HA F3yam v2 5'-CCTGTTACATCCGGGTGCTTYCCTATAATG

TypeB HA R3yam v2 5'-GTTGATAACCTKATMTTTTCATATCCTCTG

FAM-Type B HA Yamagata 5'-(FAM)TCAGGCAACTASCCAATC(MGB)

PCR 産物の長さ： 98 bp

6 検査に使用する機械器具

1) 器具

- ① ボルテックスミキサー (デルタミキサー Se-08) 同等品
- ② マイクロ遠心機 (スピンドウン用) 同等品
- ③ 冷却遠心器 (KUBOTA 6000) 同等品
- ④ 超低温槽 (パナソニックヘルスケア MDF-594AT) 同等品
- ⑤ マイクロ冷却遠心器 (KUBOTA 1920) 同等品
- ⑥ マイクロピペット (ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000 μ l) 同等品
- ⑦ 7500 Fast Real-Time PCR System (ABI) 同等品
- ⑧ 高圧蒸気滅菌器 (平山製作所 HV-50) 同等品
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 安全キャビネット
- ⑪ クリーンベンチ
- ⑫ 製氷機

2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管 (15 ml)
- ④ マイクロチューブ (1.5 ml、2.0 ml)
- ⑤ MicroAmp Fast 8-Tube Strip(0.1 ml) または MicroAmp Fast Opitcal 96-Well Reaction Plate with Barcode(0.1 ml)(ABI) (使用機器に対応した器材)
- ⑥ MicroAmp Optical 8-cap Strip または MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI) (使用機器に対応した器材)
- ⑦ フィルター付き滅菌チップ (P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P-200 用、P-1000 用)

7 検体等の取扱

1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

3) 検体の保存

処理済みの検体は、 -80°C 以下で保存することが望ましい。

8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- ② 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心する。
- ③ リアルタイム PCR は高感度な検出法であるため、コンタミには十分注意する。試薬の調整とサンプルを混合する場所は分けることが望ましい。RNA 抽出からサンプル混合においては動線を遡ることのないよう留意して作業する。
- ④ 検査記録を記入する。(必須項目：検査日、検査結果)

9 検査の手順

1) RNA 抽出

(1) 検体の前処理

- ① 1.5 ml チューブに Carrier RNA を添加した Buffer AVL 560 μl を予め分注する。
- ② 処理済みの検体あるいは陰性対照 140 μl を ①に入れ、サンプルと Buffer を充分混合するため 15 秒間 Vortex にかき、室温 ($15\sim 25^{\circ}\text{C}$) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。
- ③ エタノール (96~100%) 560 μl をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、スピンドウンする。
- ④ 混合液 630 μl を QIAamp スピンカラム (2 ml コレクションチューブ付) に注入し、蓋を閉め、 $6,000\times g$ (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。
- ⑤ QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、残りの液 630 μl を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (サンプル量が 140 μl のときには、通常この操作は 2 回で終わる)。
- ⑥ QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、Buffer

AW1 500 μ l を入れる。

- ⑦ 蓋を閉め、6,000 \times g(8,000rpm)で1分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい2mlのチューブに移す。ろ液の入っているチューブは捨てる
- ⑧ QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500 μ l を加え、20,000 \times g (14,000rpm)で3分間遠心する。
- ⑨ QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき1.5 mlのチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- ⑩ QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60 μ l を加え、蓋を閉めて1分間置いた後、6,000 \times g (8,000rpm)で1分間遠心する。
- ⑪ このろ液が抽出 RNA であり、直ちに使用しない場合、抽出 RNA は-80 $^{\circ}$ Cで保存する。

2) リアルタイム RT-PCR

(1) カクテルの調製

- ① 表1. に従い必要な分量(検体数+陰性コントロール+陽性コントロール+予備1)を1.5 ml チューブ(滅菌済み)にまとめて調製し、MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode(0.1 ml)または MicroAmp Fast 8-Tube Strip(0.1 ml)の所定の位置に20 μ l ずつ分注する。

表 1.

| 試薬 | 容量 | 最終濃度 |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------|
| 2 \times QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix | 12.5 μ l | 1 \times |
| Forward primer (10 μ M) | 1.5 μ l | 0.6 μ M |
| Reverse primer (10 μ M) | 1.5 μ l | 0.6 μ M |
| Probe (5 μ M) | 0.5 μ l | 0.1 μ M |
| QuantiTect RT Mix | 0.25 μ l | |
| RNase Inhibitor (20 U/ μ l) | 0.1 μ l | |
| RNase free Water | 3.65 μ l | |
| RNA template | 5 μ l | |
| Total 容量 | 25 μ l | |

(2) RT-PCR 反応 (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合)

- ① 7500 Fast Real-Time PCR System を起動し、サンプルリストの作成、反応チューブのセッティングを行い、「Start RUN」を押し、反応を開始する。
- ② RT-PCR 反応は、Standard モードで使用し以下の反応条件で行う。
50 $^{\circ}$ C 30分、95 $^{\circ}$ C 15分、(94 $^{\circ}$ C 15秒、56 $^{\circ}$ C 75秒) \times 45回(約3時間分)

(3) 結果の解釈と判定

検査結果の判定は、以下の条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つ事ができなかった事が推察されるので、原因を究明した上で再検査を行う。

- ① 各々の検出系で陽性コントロールに蛍光シグナルの立ち上がりがあり、かつそれが予測された Ct 値の範囲内であること。
- ② 全ての陰性コントロールについて、規定のサイクル内において蛍光シグナルの立ち上がりを確認されないこと。

10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取日、検体搬入日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検体台帳に記載する。
- ② 検査記録（検査実施日、検体番号、リアルタイム RT-PCR 結果）を記録用紙に記載する。
- ③ 検査結果を成績書に記載する。

2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。(案)

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

カンピロバクターの型別方法の検討と分離株の特徴

| | | |
|-------|-------|---------------|
| 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 |
| | 赤瀬 悟 | 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 |
| | 坂田 淳子 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 田内 敦子 | 広島市衛生研究所 |
| | 亀山 光博 | 山口県環境保健センター |
| | 原田 誠也 | 熊本県保健環境科学研究所 |

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、2014年に散発下痢症患者から分離された*Campylobacter jejuni*（以下*C. jejuni*）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388株中286株（73.7%）、Penner法では388株中187株（48.2%）が型別された。Penner型別法に関し、市販血清を用いたPHA法およびマルチプレックスPCR法との型別率を比較したところ、PCR法の型別率が高くその有用性が示唆された。2014年分離株のキノロン系薬剤に対する耐性率は、*C. jejuni*で57.1%、*C. coli*では82.4%であった。EM耐性率は*C. jejuni*で1.3%、*C. coli*では35.3%であった。

A. 研究目的

カンピロバクターレファレンスセンターでは、Lior型別用血清の作製およびLior法による*C. jejuni*分離菌株の血清型別を実施している。しかし、近年、*C. jejuni*の血清型別法として、耐熱性抗原を認識するPenner法（市販血清）が主流となってきた。さらに、地方衛生研究所職員の頻繁な人事異動や、予算の削減等により、カンピロバクターレファレンスセンター事業として、型別用血清の安定的な供給が困難となりつつある。

そこで、本レファレンスセンターとして、血清型別方法をLior法からPenner法に切

り替えることを、各支部センター間で検討した。従来実施してきたLior法（自家調製血清）とPenner法（市販血清）の両型別法の比較を行い、問題点および改良点について検討した。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引き続き調査した。

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 *C. 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。

現在，PCR 法による型別が実施可能なものは，市販 Penner 血清 25 種類のうち 10 種類の血清群である。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.* (*J. Clin. Microbiol.*, 49:1750-1757, 2011) の方法を改変した。

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
2014 年に本レファレンスセンターで散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 388 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 LI0 4 ; 86 株 (22.2%)，続いて TCK 1 ; 21 株 (5.4%)，LI0 1 ; 17 株 (4.4%)，LI0 7 ; 16 株 (4.1%) であった (表 2)。

Penner 法による型別成績は，O 群 34 株 (8.8%) が最も多く検出され，次いで B 群 21 株 (5.4%)，L 群 21 株 (5.4%)，G 群 20 株 (5.2%) であった。UT 株は，201 株 (51.8%) で，2013 年の 47.9% よりやや増加し，依然として型別不能株の割合は高い状況である (表 3)。

2. PCR 法による型別法の検討および臨床分離株での試行

Poly らの方法を用いた PCR 法による型別では，一部の型の反応性が低下することが確認されたため，マルチプレックス PCR 法の反応系を 2 本から 4 本に分けた。また，Penner B 群の型別用プライマーの増幅サイズが，原法では 62bp で判定が難しいため，増幅を 102bp となる様にプライマーを改良した。

2012~2014 年にヒトから分離された *C. jejuni* 90 株について PHA 法および改良 PCR 法により Penner 型別を実施した。その結果，PHA 法では 33%，PCR 法では 72.2% が型別でき，PCR 法の有用性が示唆された。

3. 薬剤耐性菌出現状況の把握

2014 年分離の *C. jejuni* 380 株中のキノロン (NA, NFLX, OFLX, CPFX) 耐性株は，57.1% で，本レファレンスで耐性菌出現率を調査してきた中で最も高いものであった。*C. coli* 17 株では，その 82.4% 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 1.3%, *C. coli* で 24.7%であり、増加傾向は認められなかった (図 1, 2)。

D. 考察

市販試薬 (デンカ生研) を用いた PHA 法による Penner 型別率は 48.2%であった。食中毒事例等の原因究明に、血清型別成績を活用することを考えると、現在の型別率では不十分であり、型別率の向上が急務である。特に、血清群 B 群の型別率の低下が著しいことから、B 群血清の力価の低さが問題視された。そこで、免疫株 (Sero strain) に対する抗体価を測定したところ、問題が無いことが確認された。しかし、患者由来株に対する抗体価を調べると、菌株による抗体価のバラつきが認められたことから、さらに検討が必要であると考えられた。

E. 結論

従来から実施している Lior 法 (自家血清) と Penner 法 (市販血清) 法の型別率を比較したところ、Penner 法による型別率が低いことが確認された。原因については、現在も検討を行っている。PCR 法による型別を検討し、その有用性が確認された。しかし、日常業務に用いるためには、今後、型別可能な血清群を増やすこと、多数検体について検査を実施するために、その操作性を簡便にすること等が課題である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 今野貴之, 高橋志保, 樫尾拓子, 熊谷裕

子, 圓子隆信, 袴田知之, 金 和浩:カンピロバクターの Penner PCR 型別が有用であった食中毒疑い事例への対応—秋田県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 36: 161-162, 2015.

学会発表

国際学会

1. なし

国内学会

1. 甲斐明美: 衛生微生物技術協議会第 36 回研究会 (仙台) レファレンスセンター等報告: カンピロバクター

http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H27_Campyrobacter.pdf

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) |

表2. 散発下痢症由来*C. jejuni* のLior血清型別成績
(全国・2014年)

| 血清型 | 秋田 | 東京 | 愛知 | 大阪 | 広島 | 山口 | 熊本 | 合計 | (%) |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| LIO 4 | 9 | 27 | 10 | 6 | 28 | 6 | 0 | 86 | (22.2) |
| TCK 1 | 2 | 12 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 21 | (5.4) |
| LIO 1 | 2 | 4 | 0 | 0 | 7 | 4 | 0 | 17 | (4.4) |
| LIO 7 | 0 | 8 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 16 | (4.1) |
| LIO 11 | 1 | 6 | 0 | 2 | 3 | 2 | 0 | 14 | (3.6) |
| LIO 28 | 0 | 4 | 3 | 0 | 4 | 3 | 0 | 14 | (3.6) |
| その他* | 8 | 23 | 6 | 3 | 34 | 13 | 3 | 89 | (22.9) |
| 小計 | 22 | 83 | 20 | 13 | 85 | 31 | 3 | 257 | (66.2) |
| (%) | (47.8) | (66.4) | (62.5) | (61.9) | (72.6) | (72.1) | (75.0) | (66.2) | |
| 複数血清 | 6 | 5 | 7 | 0 | 10 | 0 | 0 | 28 | (7.2) |
| 型別不能 | 18 | 37 | 5 | 8 | 22 | 12 | 1 | 103 | (26.5) |
| 合計 | 46 | 125 | 32 | 21 | 117 | 43 | 4 | 388 | |

*20種類

表3. 散発下痢症由来*C. jejuni*のPenner血清型別成績
(全国・2014年)

| 血清型 | 秋田 | 東京 | 愛知 | 大阪 | 広島 | 山口 | 熊本 | 合計 | (%) |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|--------|--------|
| O群 | 0 | 7 | 1 | 0 | 17 | 9 | 0 | 34 | (8.8) |
| B群 | 2 | 4 | 6 | 0 | 7 | 2 | 0 | 21 | (5.4) |
| L群 | 1 | 14 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 21 | (5.4) |
| G群 | 7 | 10 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 20 | (5.2) |
| D群 | 6 | 6 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 18 | (4.6) |
| Y群 | 1 | 4 | 5 | 0 | 3 | 4 | 0 | 17 | (4.4) |
| その他* | 11 | 16 | 4 | 4 | 9 | 5 | 0 | 49 | (12.6) |
| 小計 | 28 | 61 | 16 | 8 | 45 | 22 | 0 | 180 | (46.4) |
| (%) | (60.9) | (48.8) | (50.0) | (38.1) | (38.5) | (51.2) | (0) | (46.4) | |
| 複数血清 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | (1.8) |
| 型別不能 | 12 | 63 | 16 | 13 | 72 | 21 | 4 | 201 | (51.8) |
| 合計 | 46 | 125 | 32 | 21 | 117 | 43 | 4 | 388 | |

*14種類

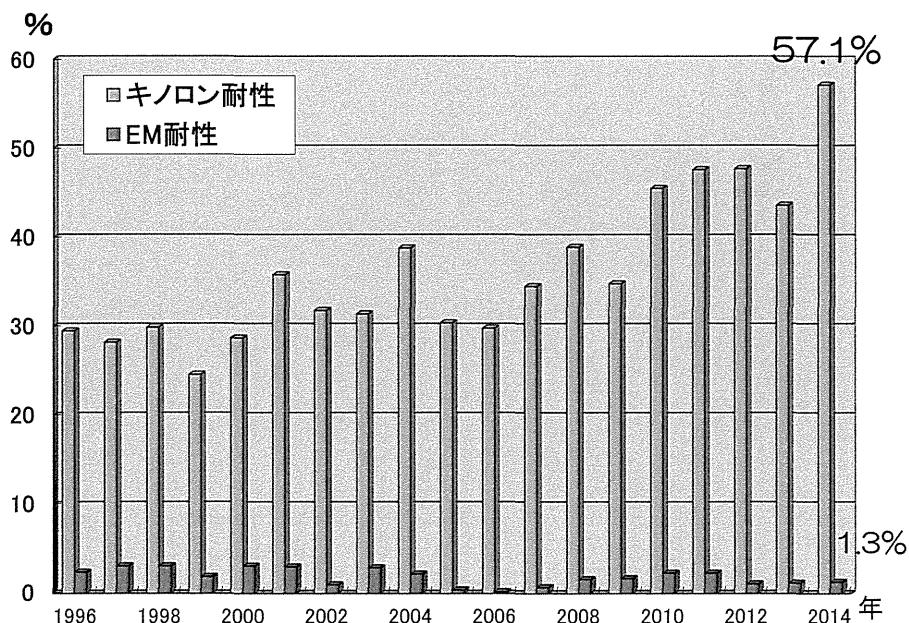


図1. *C. jejuni* キノロン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況
キノロン耐性: NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性

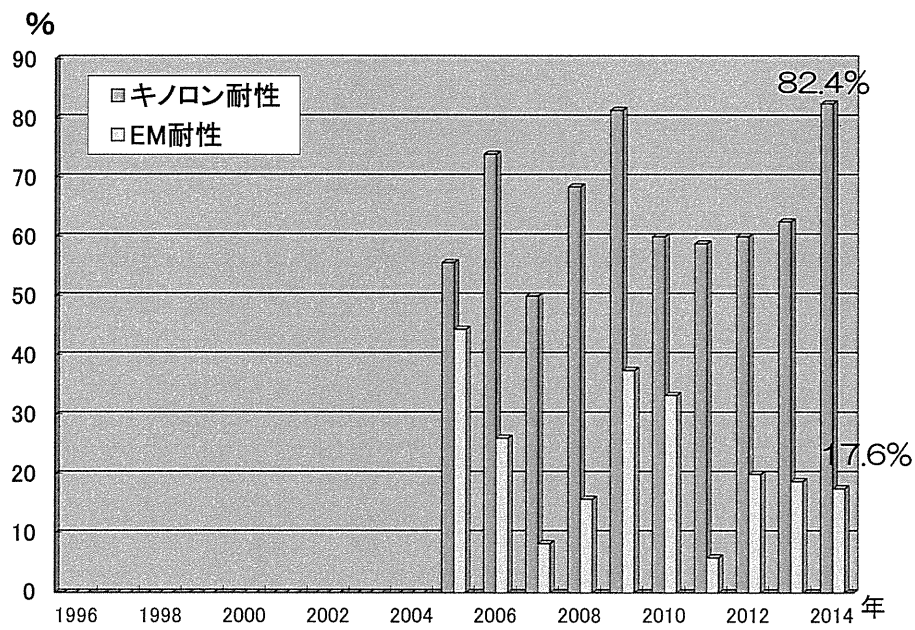


図2. *C. coli* キノロン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況
 キノロン耐性: NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性