

201318056A

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

平成25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 26 年 3 月

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

平成25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 26 年 3 月

平成 25 年度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 25 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）

- II. 分担研究報告書
 1. 地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動・・・ 1 1
研究分担者：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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 5
研究分担者：大西 真（国立感染症研究所 細菌第一部）

 3. 地方衛生研究所における検査機能について・・・・・・・・・・・・ 2 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・・・・・・・・ 3 3
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・・・・・・・・・・ 3 9
研究分担者：野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部）

 6. ジフテリア、ボツリヌス症、および、ボツリヌス症以外の
クロストリジウム属菌による感染症に関するラボネットワーク構築・ 4 3
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・・・・ 4 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活動について・・・・・・・・・・ 5 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	57
	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	61
	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・風疹	75
	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における病原体サーベイランス活動	97
	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	101
	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 25 年度活動報告 炭疽菌 DNA の PCR 検査における検出限界の算定	105
	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	109
	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.	新しい 48 型関連組換え型アデノウイルスの 結膜炎患者からの検出・同定	111
	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	117

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食物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

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：国立感染症研究所長をはじめとする感染研のスタッフと、地方衛生協議会全国協議会会長、および、感染症対策部会の委員が協議を行った。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：これまでに行ったレファレンスセンターに関する調査結果、地域保健総合推進事業において調査されている自治体における検査項目などを利用して考察を行った。

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

■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：輸入寄生虫症について、成田・羽田・中部・関西の主要4国際空港検疫所との相互研修を利用して、マラリア以外の寄生虫症に関する検疫のニーズと可能性に関して情報交換をし検討した。ヒトのエキノコックス症に関して検査依頼数は5例あり、ウエスタンプロットによる検査キットを用いて抗体検出を行った。

■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* 感染症の細菌学的検査に関する研修会を行った。

■フラビウイルス・トガウイルス：ロスリバーウイルス病原体検出法の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：マニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価、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(エンテロウイルス)：エンテロウイルス検査に関するアンケート調査を行った。

■百日咳:Prn 欠損株の流行調査を行った。

■動物由来感染症：炭疽菌に関して、参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめを行った。

■HIV 関連感染症：衛生微生物技術協議会第 34 回研究会（名古屋）における HIV 関連感染症に関する会議で、地方衛生研究所等との協議・議論を進め、その後も適宜、情報交換を行った。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。

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：型別率の低下が認められる Penner 法について、その原因の解析を行った。

■寄生虫：医療施設から検査依頼があった有症のマラリア患者の検体で、検査結果が食い違った 2 例について検討を加えた。イムノクロマト法による迅速診断キットについて比較検討した。

■フラビウイルス・トガウイルス：リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) および RT-PCR 従来法を評価した。チクングニアウイルスとの交差反応性について検討した。日本脳炎ウイルスに関して、リアルタイム PCR 系を再構築し、ウイルスを含む細胞培養上清、ヒト血清、ブタ血清を用いて非特異反応の有無を検討した。

■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 2012 変異株の VLP と抗血清を作製した。ノロウイルスの新規 genotyping 法と、それに対応した RT-PCR

法を開発した。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：リアルタイム RT-PCR 法を評価した。

■百日咳：*B. holmesii* の遺伝子検査として、LAMP 法を用いたキットを作製した。

■抗酸菌：結核菌株を選択し、VNTR 分析によるコピー数の確認を行った。

■動物由来感染症：炭疽菌芽胞液から DNA 調整を調製し、低濃度 DNA 溶液の安定性の検証を行った。

■アデノウイルス：眼科定点医療機関を受診した結膜炎患者から分離された新型アデノウイルスの塩基配列解析を行った。

C. 研究結果

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：感染研と地衛研の間で常時連携して特定の疾病に対応する機能的な枠組みとしてレファレンスセンターをおくこととし、その概要につき設置、対象疾患、設置期間、実施項目、危機対応、研究利用につき明文化した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：地方衛生研究所において①精度管理、GLP 対応が必要と思われる感染症（インフルエンザ・麻疹・風疹・ノロウイルス・新興感染症）、②検査の強化が必要と思われる感染症（薬剤耐性菌）、③病原体検出マニュアル整備等が必要と考えられる疾患を明確にした。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌

1.1 EHEC のサーベイランス：2013 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3084 株（平成 26 年 1 月 16 日現在）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 (2012-2013 年用) 15 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 54 株が収集され、そのうち 2 症例は集団感染事例の可能性が示唆された。2013 年 6 月末現在で、合計 280 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 4 種を試作した。

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別：2012 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌 1240 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：2012 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 95 症例あった。最も多く分離された型は T1 型で全体の 51.6%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 95 例中、emm1 型(M1 型)が 49 例 (51.6%)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：2012 年に分離された *C. jejuni* 265 株を Lior 法によって、260 株について、Penner 法で型別を行い、それぞれの検査法の特徴が判明した。

2. 薬剤耐性菌の出現状況の把握：2012 年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株(NA、NFLX、OFLX、CPFx)の割合は、47.7%、*C. coli* では、10 株中 6 株(60%)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 1.1%、*C. coli*では

20%で増加傾向は認められなかった。

■寄生虫

1. マラリア：2 例のマラリア検査のうち、1 例目は迅速診断キットでは陰性であったが、形態検査および遺伝子検査で熱帯熱マラリアと確定診断された。2 例目は顕微鏡検査・迅速診断キットおよび遺伝子検査で 4 種のマラリア原虫による混合感染と判明した。

2. エキノコックス症：ヒトの 5 疑診例〔北海道への渡航歴のある 3 例(多包虫症疑い)、ネパール人 2 名(単包虫症疑い)] およびイヌの 1 疑診例(多包条虫症疑い)について検査を行った。

■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。参加研究所へは、ボツリヌス診断用抗毒素、および毒素遺伝子検出 PCR 用陽性コントロールを配布した。

2. 症例報告(論文作成)の支援：創部から分離された破傷風菌の解析について、論文報告した。

■フラビウイルス・トガウイルス

1. ロスリバー熱：ロスリバーウイルスの遺伝子検出系で 4 株すべてが検出できた。また、初めてオーストラリアからの輸入ロスリバー熱患者血清により、抗ロスリバーウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築し、交差反応性・偽陽性を検討した。

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 による遺伝子 1-3 型型別検出系を確立し、十分な感度と特異性を有していた。

■リケッチア

1. マニュアル改訂：つつが虫病および日本紅斑熱のマニュアルの改訂作業を実施し

た。

2. 全国共通となる検査法の評価：改訂マニュアルに新規に追加された日本紅斑熱のリアルタイム PCR について、標準化のための準備を行った。

3. 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。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)

1. ノロウイルス：ノロウイルスの GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製に成功した。ノロウイルスの第三世代プライマーセットを用いたノロウイルス新規 genotyping 法を各ブロックレファレンスセンターと準備中で来年度より試験的運用開始予定している。

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、マイクロチップ電気泳動装置を用いて RNA-PAGE 条件の最適化を行った。本装置が導入されている衛研にレファレンスブロック拠点として活動を依頼し、本法による分子疫学を推進する。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：アンケート調査を行い、合計 79 衛生研究所のうちエンテロウイルス検査を行っている 67 機関から回答を得た。検査を担当する人員数、年間検体数、検体搬入、検査材料、ウイルス分離方法、ウイルス同定法、塩基配列による同定法、品質管理について回答を得た。基盤的な技術(細胞培養、分離同定)や遺伝子解析による同定検査に関する研修要望が多かった。

■麻疹・風疹

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR：10 カ所の麻疹・風疹レファレンスセンターで実

施した計 33 回の検量線解析の結果を分析した。ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であった。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR：段階希釈した参照 RNA を各麻疹風疹レファレンスセンターにおいて 3 回の測定を実施した。各レファレンスセンターにおいて、安定して Ct 値 40 未満で検出可能な風疹参照 RNA の希釈段階の一点が陽性コントロールとして設定された。

■百日咳

1. レファレンス関係：レファレンスセンターおよび他の地衛研へ *B. holmesii* LAMP キット、4Plex リアルタイム PCR キット、陽性コントロール DNA を配布した。4Plex リアルタイム PCR と LAMP 法との検査不一致や偽陽性の問題が指摘された。

2. Prn 欠損株の流行状況：国内臨床分離株(184 株)における Prn 欠損株の出現状況について疫学的解析を行った。

■抗酸菌

1. 結核菌 VNTR 分析普及のための活動：VNTR 分析を各地域の衛生研究所に普及するために、VNTR 分析用の 18 座位のプライマーセット、4 種類のゲノム DNA、陽性コントロール DNA を希望する施設に送付した。

2. 結核菌遺伝子解析に関するアンケート調査：結核菌型別の実施状況を調査したところ、79 施設の内、41 施設では結核菌を扱っており遺伝子型別等が可能との回答が得られた。

3. 精度保証用ゲノム DNA パネルの準備：30 座位のコピー数を調べるための本精度保証のパネルテストを準備した。

■動物由来感染症：炭疽菌芽胞液からの DNA 調整を行い、低濃度 DNA 溶液の安定性を検証した。参加衛生研究所へ検体を送

付したところ、検出限界の濃度は施設間で差異がみられた。

■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。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：得られた新型アデノウイルス分離株は、A549 での増殖性が良くウイルス分離は比較的容易であった。全ゲノム塩基配列の決定および系統樹解析・組換え解析を行った。

D. 考察

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：レファレンスセンターの概要について明文化したことにより、わが国の病原体検査が円滑に実施できることが期待される。実際に運用し修正が必要な事項等が明らかになれば、協議の上変更が必要と考える。

■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。より効率的なレファレンスセンター運営方法の検討。

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：国際的に認められて

いるカンピロバクター型別法の 1 つである Lior 法は、操作は容易であるが、判定はやや困難であるという欠点がある。一方、Penner 法の操作は煩雑であるが、判定は容易である。2012 年の *C.jejuni* キノロン耐性菌の出現率は 47.7% で、昨年(47.6%)とほぼ同等であるが、高い値を示していることから、十分な監視が必要である。

■寄生虫：マラリアの検査にあたっては、顕微鏡による形態検査、PCR などの遺伝子検査、イムノクロマト法による迅速診断キットでの検査結果が一致しないことがある。また、マラリア以外の寄生虫症も含めた検査に関する相互研修では、ヨーロッパ諸国では大きな問題とされる消化器系の寄生蠕虫症は、日本の検査では殆ど注意が払われていないことがわかった。輸入寄生蠕虫症についても、国内で感染が拡大することはないが、今後は注意を払っていく必要性が認識された。

■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、食中毒事例が起きた場合には、地方衛生研究所には迅速・適切な対応が求められる。今年度の講習会では、動物実験に大きくフォーカスを絞った点が評価できると考えられた。

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。今年度は、*C. difficile* 細菌学的検査の研修をしながら、保健所・地方衛生研究所として何が必要とされているのか協議したことは非常に有意義であった。

3. ジフテリア：レファレンスセンターではない地方衛生研究所より、菌株などの配布希望があった。

■フラビウイルス・トガウイルス

1. ロスリバーウイルス：ロスリバー熱の流行は、オーストラリアおよびその周辺で発生している。輸入症例に備えて実験室診断系を構築したところ、本年5月に初輸入症例を確認することができた。また、より安全な遺伝子検出用合成陽性コントロールの構築を開始した。

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。

■リケッチア：レファレンスセンターの全国共通基盤を構築することを目指し、つつが虫病と日本紅斑熱のマニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価の準備、全国情報の共有の機会と担当者のスキルアップを行った。地衛研を中心としたリケッチアレファレンスセンターを強化し、地域ごとに適切な実験室診断が行われ、地域に即した情報発信を行えるようにすることが、患者発生に対応する医療と地域公衆衛生に大きな貢献になると考えられる。

■腸管ウイルス感染症(エンテロウイルス)：人事異動により十分な技術継承が行われていない現状を踏まえ、習得に時間を要するエンテロウイルス検査に関する基盤的な研修(細胞の維持管理、ウイルス分離・同定検査)の実施、及び当該マニュアル整備の必要性が認められた。VP4・VP2 部分領域に基づく遺伝子検査法を実施している機関が多いことから、VP1 配列データと統合した情報を整備して行く必要性が認められた。

■麻疹・風疹

1. 麻疹検出用リアルタイム RT-PCR 法：擬陽性の問題では、試薬と機器の組み合わせにより起こった可能性が高いと推測できた。今後、本評価の際に各施設で用いられた試

薬や機器、反応条件等の情報を共有することで、この問題は解決しうると考えられる。

2. 風疹検出用リアルタイム RT-PCR 法：検出限界コピー数は、概ね 5~50 コピー/反応であることが分かった。今後、臨床検体を用いた検証が必要である。

■百日咳：平成 25 年度から新たに 4Plex リアルタイム PCR キットを配布し、本法の臨床評価を地研とともに開始した。これまでの評価により、本法に非特異的反応が確認されることが指摘された。現在、非特異的反応を解消する条件について検討を進めている。Prn 欠損株の流行調査により、わが国でも欧米と同様に欠損株の流行が継続していることが確認された。Prn 欠損株については継続した監視が必要であり、平成 26 年度も引き続き調査を行う予定である。

■抗酸菌：79 箇所の衛生研究所の中で 41 か所の施設で扱うことが可能で型別も行われていることが明らかになった。また、VNTR 法についての精度保証パネルを作成して配布すべきということが確認できた。今後、新規登録患者数が低下することで結核菌の全数型別も可能となれば、これらの手法で感染経路の推定もできるようになると考えられる。

■動物由来感染症：遺伝子間の検出感度の差はコピー数に由来することが考えられる。しかしながら、conventional PCR 検査系では低濃度 DNA での増幅に影響する他の要因も考えられる。過去に生物テロで使われた芽胞粉末(いわゆる白い粉)の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、First screening としての PCR 検査系としては十分な検出限界を有していると考えられる。

■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。

■アデノウイルス：新型アデノウイルス分離株はこれまで日本において検出されたことがなく、本研究は日本における HAdV-48 関連ウイルスの最初の報告である。このような株は、今後に流行する可能性がある。また、その全塩基配列からユニークな株であり、新しい genotype とされるべきものと考ええる。

E. 結論

■地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動：レファレンスセンターの概要について明文化した。

■地方衛生研究所検査室の機能・病原体マニュアル編集：特定の感染症について定期的に EQA を課すことにより地方衛生研究所のレベルはある程度保障する必要がある。GLP への対応としてプロトコルの作成、機器の保守管理、職員の資格の規定などが今後求められる。

■大腸菌・レジオネラ・レンサ球菌：病原体検出マニュアルの記載事項の整備、改訂等を定期的に行なう必要がある。そのためにも、共同作業に当たっている各地方衛生研究所のスタッフ間、感染研の担当者との間の日頃の情報交換が必須である。また、ラボネットワークの充実度を検証する必要がある。外部精度評価システムが構築されるべきである。

■カンピロバクター：2012 年にヒトから分離された *C. jejuni* 265 株について血清型分類を実施したところ、検査法の特性が判明した。また市販血清の力価に問題があるこ

とが示唆された。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は言えないので、今後も地研、保健所、医療研究機関との監視体制強化が求められる。また、検疫感染症に指定されているマラリアのみならず、他の寄生原虫症や寄生蠕虫症についても、輸入感染症の視点で注意を払っていくことが望まれる。

■ジフテリア・ボツリヌス：ボツリヌス症の検査技術の継承のためには継続して講習会を行うことが必要と考えられた。地方衛生研究所において、*C. difficile* 感染症に関する知識・技術を必要としていることが明らかとなった。

■フラビウイルス・トガウイルス：オーストラリアで流行しているロスリバー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に技術供与した。また、本邦初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 系を構築、確立した。

■リケッチア：遺伝子検出系・血清診断・BSL3 での取り扱いなどの検査体制を維持できる施設は限られている。地域特性が強い感染症であることも踏まえ、全国のラボネットワークの構築方法の検討、各ブロックのレファレンスセンターを中心とした地衛研の検査体制を維持するために、その専門性を考慮した人員配置と組織作りに取り組むことが、臨床に即した迅速対応と情報発信が可能となり、患者のみならず住民の QOL に資する。

■腸管ウイルス感染症(下痢症ウイルス)：ノロウイルスの便検体パネルを充実させ、抗原・抗体パネルの整備を継続した。GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製を実施

した。新規 genotyping 法に対応可能な long distance RT-PCR 法を開発した。ロタウイルスの全長ゲノムを対象とした分子疫学基盤構築のためのマイクロチップ電気泳動法導入に向け、基盤技術の構築となった。

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

■麻疹・風疹: 本麻疹風疹リアルタイム RT-PCR 法はコンベンショナル RT-nested PCR と比較して感度が低い可能性があるものの、簡便性、迅速性、実験室コンタミネーションの危険性回避の観点から考えるとその導入は必要且つ有益であると考え。今後、臨床検体を用いた解析を進める。

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

■抗酸菌: 結核菌 VNTR 分析用の精度保証用パネルを作成して実際に分析を行っている衛生研究所に配布することで、これまで独自に行われている VNTR 分析に関する精度保証を進める。異なる施設間で型別結果を直接比較することができるようになり、結核感染動態の把握等、結核対策に利用できる。

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

■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: 本研究で分離したウイルス株は、日本における初の 48 型関連ウイルスであり、これまで報告された中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。今後も継続的な監視が必要であり、レファレンス活動をさらに強化する。

F. 健康危険情報

■ジフテリア・ボツリヌス: 米国 CDC からは urgent threat 「緊急なる脅威」として報道されている *C. difficile* 感染症が、日本の臨床現場でも問題となっており、保健所・地方衛生研究所で知識・技術を必要としていることが再認識された。

■リケッチア: 特定の疾患に固執した対応を行うと、有効な治療法がありながら、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡、重症化に至る危険性がある。

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

G. 研究発表

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

地方衛生研究所と感染研が共同で実施すべきレファレンス活動

研究分担者	宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部
研究協力者	小澤 邦壽	群馬県衛生研究所
	調 恒明	山口県環境保健研究センター
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	平田 輝昭	福岡県保健環境研究所
	皆川 洋子	愛知県衛生研究所
	倉根 一郎	国立感染症研究所
	渡邊 治雄	国立感染症研究所

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連携し、各種の病原体情報を共同で発信している。しかし、互いに独立した組織であり連携の明確な根拠は無いため、国内の危機的感染症の察知、正確な感染症状況の把握に向けて、感染研と地衛研の連携が必要と相互に認識する事項について協議し、レファレンスセンターの設置等につき明文化した。レファレンスセンターの設置、対象疾患の選定法、設置期間、活動内容、その他の事項について記載した。

A. 研究目的

危機管理等の目的で厚生労働省・日本政府が正確な感染症情報を入手するためには、信頼に足る病原体検査体制の構築と維持が必要である。国立感染症研究所（感染研）と全国の地方衛生研究所（地衛研）は病原体検査に関して連携し、各種の病原体情報を共同で発信している。しかしながら、感染研は国の機関であり、地衛研は自治体等に所属する機関であるため、互いに独立した組織であり連携の明確な根拠は無い。

このような状況の中、国内の危機的感染症の察知、正確な感染症状況の把握に向けて、感染研と地衛研の連携が必要と相互に

認識する事項について協議した。

B. 研究方法

国立感染症研究所長をはじめとする感染研のスタッフと、地方衛生協議会全国協議会会長、および、感染症対策部会の委員が協議を行った。

C. 研究結果

感染研と地衛研の間で常時連携して特定の疾病に対応する機能的な枠組みとしてレファレンスセンターをおくこととし、その概要につき以下のように明文化した。

1. 設置

感染症法で指定される疾病を主な対象として、地衛研と感染研の双方が必要と認める疾病（群）の病原体等の診断のために必要なより効率的な活動（レファレンス活動）を目的としたレファレンスセンターを設置する。感染研に中央レファレンスセンターを、地衛研全国協議会会長が指定する地衛研に支部レファレンスセンターを置く。その活動のとりまとめは衛生微生物協議会レファレンス委員会が中心になり行い、年次総会で活動状況を報告する。

2. 対象疾患の決定

各々の疾病に対応するレファレンスセンターの設置は、地衛研全国協議会感染症対策部会と感染研レファレンス委員会と協議し、地衛研全国協議会会長と感染研所長両者の合意により決定する。決定事項は衛生微生物協議会総会で報告する。

3. 設置期間

継続、統合、休止等に付いて、3年毎に地衛研全国協議会感染症対策部会と感染研レファレンス委員会と協議を行う。

4. レファレンスセンターで実施することが適切と考えられる項目

- 1) 病原体検査の標準的マニュアルの作成
- 2) 検査実施に必要な標準品の整備；例：対照株、診断血清や抗原、プライマー等
- 3) 検査方法の開発（研究を含む）
- 4) 検査能力と検査体制の維持（研修等）
- 5) 病原体株の収集と保管および分与
- 6) 検査の精度管理

5. 危機対応

パンデミックやテロなどに際し危機対応が必要とされる場合には、病原体検査の実施に係る連携全般について、厚生労働省、感染研所長と地衛研全国協議会会長の間で必要事項について直ちに協議する。

6. 研究利用

レファレンスセンター活動から派生する①保存株や検体の研究利用、②附属情報の研究利用や公共への発信、については主体となる研究者が、全国協議会感染症対策部会あるいは感染研レファレンス委員会と協議し、適切に対応を行う。窓口は、全国協議会感染症対策部会長と感染研レファレンス委員長とする。その結果については、各組織に報告する。

D. 考察と結論

レファレンスセンターの概要について明文化したことにより、わが国の病原体検査が円滑に実施できることが期待される。実際に運用し修正が必要な事項等が明らかになれば、協議の上変更が可能と考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect*

- Dis. 2013, 66(1):51-5.
2. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis. 66:216-221, 2013.
 3. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278, 2013.
 4. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.

石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 安藝恭子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 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

学会発表

国際学会

1. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

国内学会

1. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
2. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文,

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
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 下痢原性大腸菌、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を構築するために、病原性遺伝子検出法、血清診断法、各種型別法および菌分離法等について必要な検査マニュアルを作成することを目的としている。これらのマニュアルは、国立感染症研究所ならびに地方衛生研究所において、多施設間で比較可能な情報を菌株に付けることで、精度の高いサーベイランスを全国的に実施するために不可欠であり、また技術的基盤の継承に補助的な役割を果たすことになる。平成25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。機能的なラボネットワークの構築とその維持のためには、**External Quality Assurance**のシステムの構築が重要である。しかしながら、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用意ではない。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

下痢原性大腸菌

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。2013年も4,000例を超える感染者数が報告されており、このうち、1,400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（IDWR）。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、2012年以降各カテゴリーのマーカーとなる病原性遺伝子の検出が同定の必須条件となった（IASR 2012年1月号）。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。

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。

下痢原性大腸菌

A: EHEC を主とした血清型・病原性遺伝子型解析の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

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。

2. レジオネラ SBT 法

L. pneumophila については、EWGLI (European Working Group of *Legionella* Infections)の提唱する SBT (sequence-based

typing)法に従い、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) (参考文献 1,2)。

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

2013 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3,084 株 (平成 26 年 1 月 16 日現在) であり、分離数の多い順に、O157 (55%)、O26 (24%)、O111 (5.4%)、O103 (4.2%)、O121 (3.3%)、O145 (2.9%)、O91 (0.97%)、O165 (0.32%)、その他 (3.9%) となっていた。

1.2 コントロール株、プライマーの配布および情報提供

下痢原性大腸菌の各カテゴリー (EHEC, EPEC, EAaggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [lenteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌]) 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、およびこれらを検出する PCR プライマーの配布または情報提供を次の各衛生研究所へ行った：千葉市環境保健研究所、福岡県保健環境研究所、神奈川県衛生研究所、福岡市保健環境研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、

東京都健康安全研究センター、大阪府立公衆衛生研究所、石川県保健環境センター、大分県衛生環境研究センター、岡山県環境保健センター、愛知県衛生研究所、山口県環境保健センター、福島県衛生研究所、足立区衛生試験所。配布を行ったいくつかの地研からは、解析結果に関する問い合わせを受け付けた。

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 (2012-2013 年用) 15 株を用いた。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血清型 (O:H 型) および病原性遺伝子型 (*stx1a*, *stx1c*, *sxt1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *invE*, *eae*, *lt*, *st*, *aggR*, *ehx*) の解析結果が感染研と大阪府ですべて同じで、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、54 株が追加された (表 1)。すべて *Legionella pneumophila* で、血清群は 2、3、5、9、10 が各 1 株ずつあった以外は全て血清群 1 であった。感染源が、温泉・公衆浴場などの浴槽水と推定・確定されている例が 21 例 (39%)、田・畑作業と推定されている例が 1 例、使用している給水タンクの疑い例が 1

例、旅行後に発症している例が 2 例で、29 例 (54%) は感染源不明であった。同一の公衆浴場が感染源と推定された 2 例は、同じ ST で、集団感染事例の可能性が示唆された。

2013 年 6 月末現在で、合計 280 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 284 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 273 株 (97.5%) で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 85% を占めた。

2008-2012 年には 195 株のレジオネラ菌株 (集団感染に由来する異なる患者に由来する同一菌株の重複を除いた菌株数で、発生动向調査未報告 3 株を含む) が収集された (発表 1)。複合感染によりひとりの患者から異なる血清群あるいは遺伝子型の株が分離されることがあるため事例数は 187 である。そのうち環境調査で得られた菌株とパルスフィールドゲル電気泳動によるパターンが一致したのは 16 事例あった (すべて風呂関連)。欧米では空調の冷却塔が感染源となることが多く、その場合広域の感染源調査が必要なこともあり、散発事例で感染源が判明することはほとんどなく、感染源の違いが、欧米より感染源調査が進んでいる一因となっている。反面、入浴施設を利用していないおよそ半数の事例のほとんどは感染源不明であるが、一部は農作業などとの関連が推定されている。菌種の内訳は 191 株が *Legionella pneumophila* (SG1 が 165 株、SG2 が 4 株、SG3 が 8 株、SG5 が 2 株、SG6 が 5 株、SG9、10 が各 2 株、SG12、15、群別不能が各 1 株) で、それ以外の菌種は *Legionella feeleii*、*Legionella londiniensis*、*Legionella longbeachae*、*Legionella rubrilucens* 各 1 株だった。

L. pneumophila 191 株は 100 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。そのうち、66 種類の遺伝子型は日本独自の型であった。1 株しかない遺伝子型は 68 種類 (うち国外では報告のないものは 48 種類) で、SBT 法の疫学的有用性が確かめられた。一方、多数分離される ST もあり、ST23 及び ST138 は 13 株、ST120 は 10 株、ST1 及び ST93 は 8 株分離されている (表 3)。ST23 は国外でも多数の臨床分離例があり、病原性が高い ST と考えられている。ST138 は 13 例中 11 例について感染源は浴槽水と確定あるいは推定されており、日本固有の ST である。ST120 は感染源不明事例が多いが、意外な感染源の可能性が最近示唆された (発表 2)。ST1 は、世界各地で患者からも環境からもよく分離され、ST1 の臨床分離株の感染源は 1 事例のみ浴槽水と推定されているが、多くは浴槽水以外から感染していると推測される。ST93 (参考文献 3) については、岡山県で 2008 年から 8 株が分離され、PFGE 法を実施した 7 株は同一のパターンを示した。*L. pneumophila* SG1 環境分離株 (冷却塔水由来 50 株、浴槽水由来 50 株、土壌由来 34 株) について SBT を行ったところ、8 つの遺伝子型グループを形成した (浴槽水分離株が多いグループ B-1、B-2、B-3、冷却塔水分離株が多いグループ C-1、C-2、土壌由来株が多い S-1、S-2、S-3) (参考文献 1)。臨床分離株の ST は、環境分離株では見られない ST であっても、上述のグループのいずれかに属するものが多かった。調べた環境分離株との対応がつくと考えられる SG1 株についてみると、S グループに属したのが 63 株 (ST23、ST120 を含む)、B グループに属したのが 67 株 (ST138 を含む)、C グループに属したのが 10 株 (ST1 を含む) であった。また、15 株 (8 種類の ST) については

新たな遺伝子型グループを形成したので、環境での由来が不明ということでUグループと名付けた。残りの10株はいずれのグループにも属さなかった。すなわち、まだ未解明の感染源の存在が示唆された。Bグループに属する臨床分離株の75%が、実際に浴槽水が感染源と推定・確定されていて、他のグループの臨床分離株においては、浴槽水が感染源と推定・確定された割合は、Sグループでは30%、Uグループでは27%、Cグループでは10%となっており、臨床分離株のSTは、起因菌の生息環境を反映している可能性があり、感染源不明の事例において臨床分離株の遺伝子型別を行うことは、感染源推定の手がかりとなると考えられた。例数は少ないが、感染原因が土木作業、農作業と報告されている4菌株(3種類のST)はすべてSグループに属していた。一方、臨床分離株では見出されない環境分離株の遺伝子型も多く、一部特定の遺伝子型のものが感染すると考えられた。

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。

最後に、散発事例と思われていた事例が菌株のSBTにより集団感染疑いと判明した事例を紹介する。A都道府県とB都道府県の臨床分離株*L. pneumophila* SG1の遺伝子型がST1275と一致し、珍しい型であった。菌株送付票に、A都道府県の患者は管内のC入浴施設を利用したとあった。一方、B都道府県の患者の菌株送付票では潜伏期間内にA都道府県の入浴施設を利用したとあっ

た。聞き取りにより、2人の患者は、ほぼ同時期に、A都道府県の同じC入浴施設を利用していたと判明した。しかし、患者発生後の環境調査によっては、C入浴施設からは患者分離株と同じ血清群の株は分離されていなかったのが集団感染疑いとなった。

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4種を試作した。*L. pneumophila* SG2~SG15の全ての菌抗原を凝集させる免疫血清、これを3つに分けたグループ血清(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)。これらの利用状況については、来年度以降報告する。以下には、これまでレファレンスセンターで配布した免疫血清(およびその後市販されるようになった免疫血清を含む)による検査事例を紹介する。

事例1 *Legionella feeleii* SG1と特定された臨床分離株

参考資料2のように対応する菌抗原とともに試作した免疫血清を配布した。*L. feeleii*には血清群が2つあるが、感染研で検査した4株(1臨床分離株、3環境分離株)のいずれも血清群1であった。

事例2 *L. pneumophila* SG8, SG9, SG11, SG14が水溜まりから分離された

平成12年5月に、最初の市販されていないレジオネラ免疫血清の配布をレジオネラ・レファレンスセンターで行なった。*L. pneumophila* SG7, SG8を特異的に凝集するニューモフィラ7群と8群の2種であった。その翌年は同様にしてニューモフィラ9群と10群を配布した。幸いにして需要が多いことから、その後は、デンカ生研からSG7

～SG15 までが、研究用試薬として市販されるようになった。

これらの試薬を用いて、道路の水溜まりからの多数の環境水試料の検査により、*L. pneumophila* SG1, SG2, SG5, SG6 のみならず、*L. pneumophila* SG8, SG9, SG11, SG14 の菌株が分離されることが判明した。これまで感染源が不明であった臨床分離株のうち、SG1 で ST120 の遺伝子型の菌が道路の水溜まりから初めて環境分離株として見出された（発表 2）。

事例 3 *L. pneumophila* SG12 による感染事例の日本で最初の報告

尿中抗原陰性であったがレジオネラ肺炎を疑い、喀痰から菌が分離され、免疫血清で SG12 と同定された。マイクロプレート凝集反応による血清抗体価も、単一血清で 1:8,192 倍と高かった。（発表 3）

3.1 咽頭炎患者分離株の T 型別

2012 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、1240 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、T1 (332/1240, 26.8%)、T12 (291/1240, 23.5%)、TB3264 (180/1240, 14.5%) であった。T1、T12 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。2011 年増加した T1 型は、2012 年減少した (2010 年, 19.9%、2011 年, 31.1%、2012 年, 26.8%)。T12 型は、毎年 20% 台を維持している (2009 年, 26.2%、2010 年, 20.2%、2011 年, 21.5%、2012 年, 23.5%)。TB3264 型の分離比率は、2010 年、急激に上昇し、2011、2012 年も 10% 台を維持している (2009 年, 5.3%、2010 年, 12.6%、2011 年, 11.1%、2012 年, 14.5%) (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

2012 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 95 症例あった。94 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、昨年同様 T1 型であったが、昨年と比較して分離比率が減少した (2011 年, 69.0%；2012 年, 51.6%)。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、昨年同様 TB3264 型が多く、その分離比率は昨年と比較して上昇した (2011 年, 10.7%；2012 年, 18.9%)。この 2 つの型で全体の 70% 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 95 例中、*emm1* 型 (M1 型) が 49 例 (51.6%) と最も多く、次いで *emm89* 型 (M 型別不能) が 17 例 (17.9%)、*emm12* 型 (M12) が 8 例 (8.4%)、*emm28* (M 型別不能) が 6 例 (6.3%) と多かった。

2011 年と比較し、*emm1* 型は、69.0% (58/84) から 51.6% (49/95) に減少し、*emm89* 型が 10.7% (9/84) から 17.9% (17/95) 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 (O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165) と *stx1*, *stx2*, *eae* の 10 種類を検出可能なワンショット PCR を実際に使用した例からプロトコールを起こし、EHEC 検査マニュアルに追加する。

2) EQA の実施

SSI から 2013-2014 年用 EQA 株 (10 株)

が分与されている。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) ウシ由来 EHEC 株のサーベイランス

岡山県環境保健センター、大分県衛生環境研究センター、宮崎大学との共同研究で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ことで、EHEC の感染源と考えられているウシにおける EHEC の分布解析を行う。

4) レジオネラサーベイランス

さらなる菌株収集と遺伝子型別を実施し、情報を蓄積していくことで感染源推定の精度をあげることが望まれる。

5) レジオネラ免疫血清の配布

免疫血清を利用した事例集をまとめて、レファレンス活動のより効率的な運営方法を検討する。

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。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) Dale JB et al. Group A streptococcal vaccines: paving a path for accelerated development. Vaccine 31S (2013) B216-B222.

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、改訂等を定期的に行なう必要がある。その基盤となるのは多施設において比較解析可能なデータ取得が可能なマニュアル／プロトコルの制定が必要となる。また、各施設において実施可能であること、技術的継承が用意であることも安定的なネットワーク形成には必要である。そのためにも、共同作業に当たっている各地方衛生研究所のスタッフ間、感染研の担当者との間の日頃の情報交換が欠かせない。

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重要である。これらの活動から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、各地方衛生研究所で実施可能か、参加施設を増やして検討したい。また、レジオネラ感染症における SBT 解析の実際の事例解析への応用について情報を蓄積する。また、溶血性レンサ球菌感染症における *emm* 型別の普及の現実性について検討する。それらの項目についての問題点を整理し、必要なツールの開発とマニュアル化、現実的な EQA の整備戦略を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

- 1) 前川純子、倉 文明、大西 真、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司：レジオネラ臨床分離株の型別 - レファレンスセンター活動報告として、病原微生物検出情報2013年6月号
- 2) 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

学会発表

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

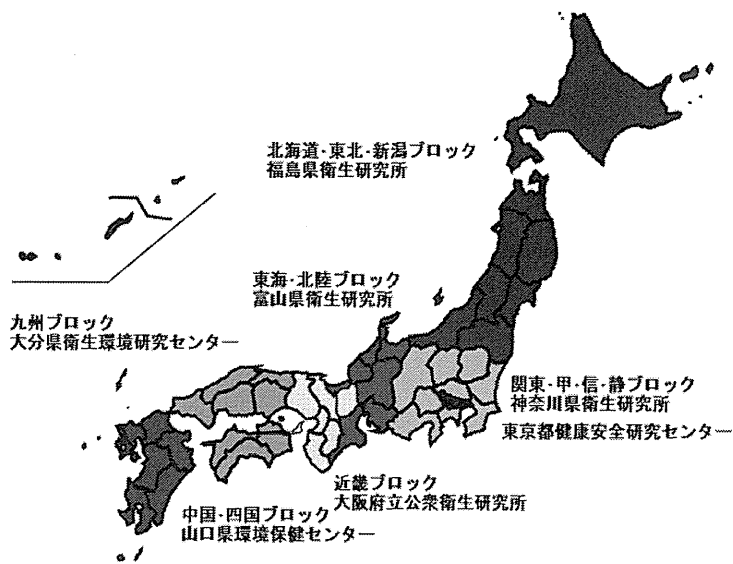


図1 溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター

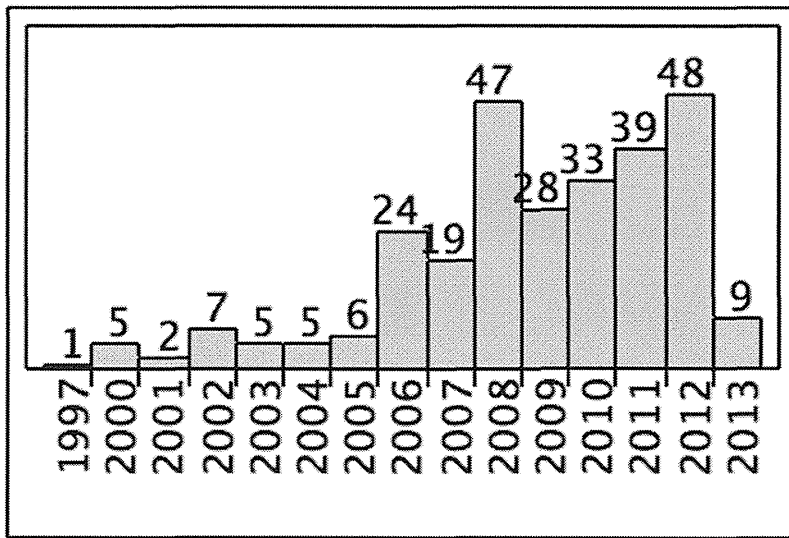


図2 分離年別レジオネラ臨床分離株 (2013年6月現在)

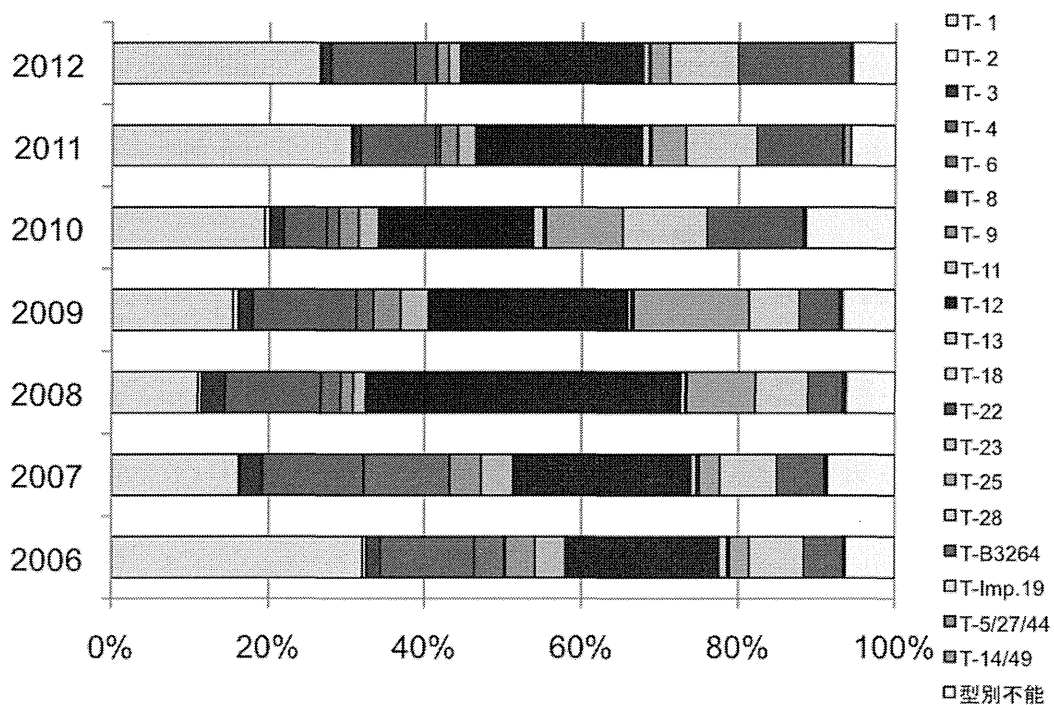


図3 咽頭炎由来株の T 型別 (2006-2012)

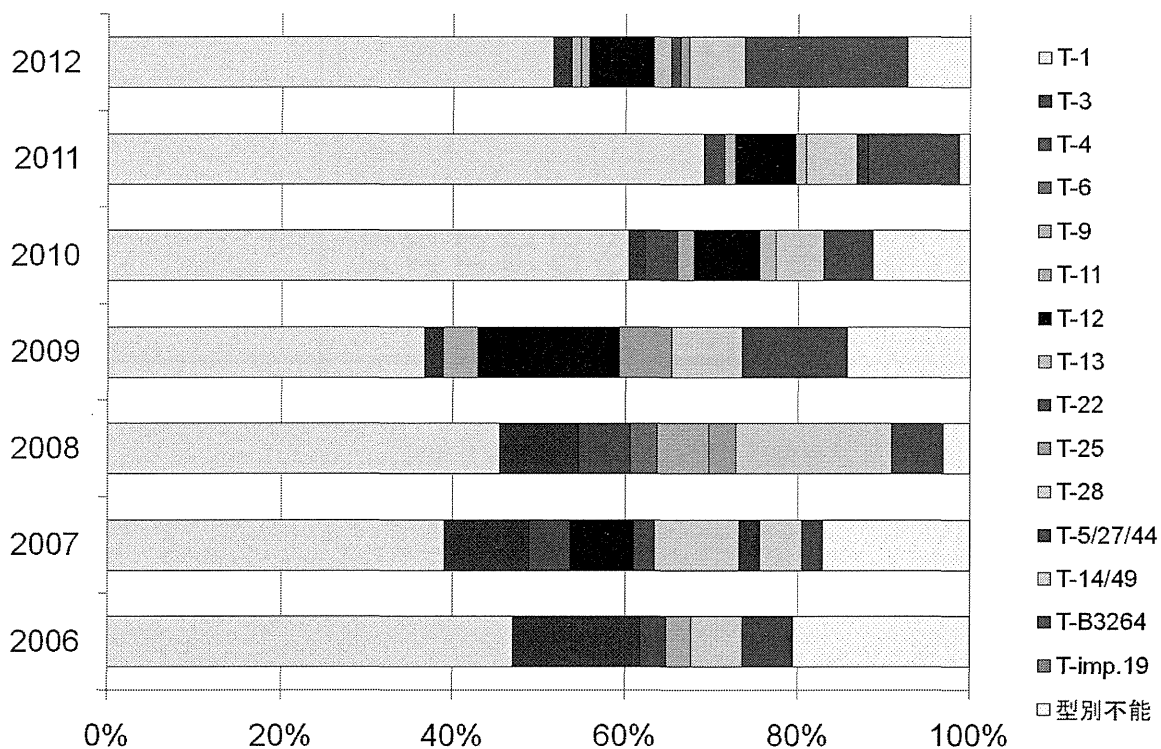


図4 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の T 型別

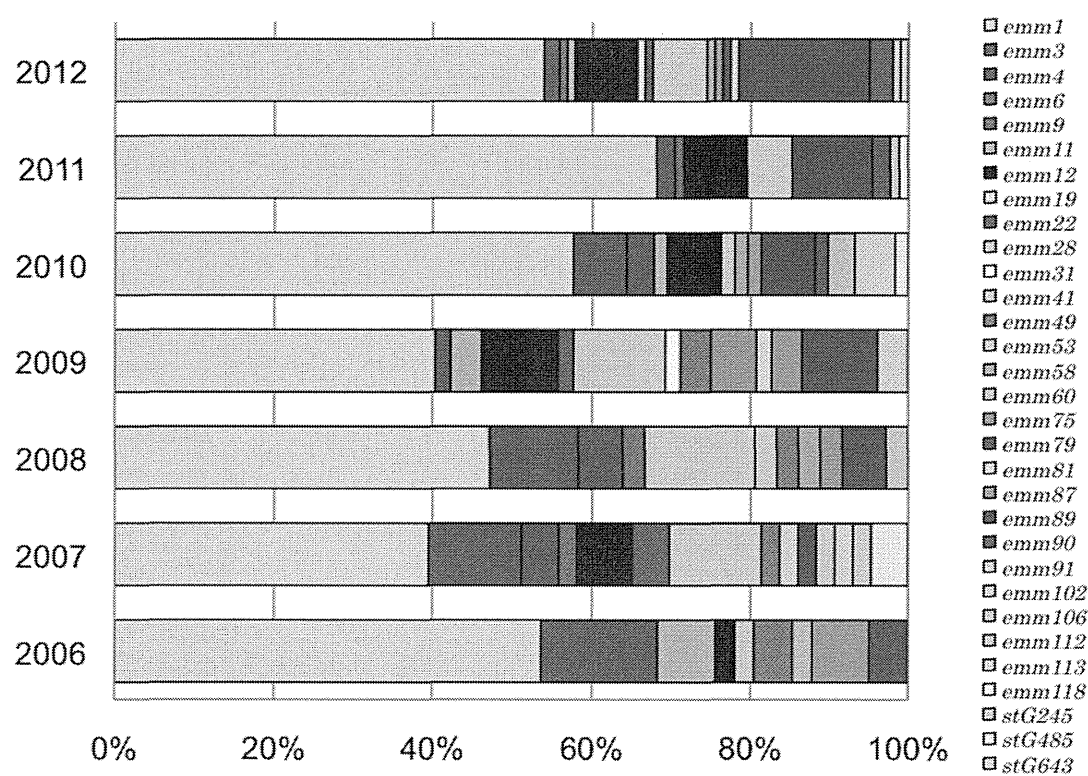


図5 劇症型溶レン菌感染症患者由来株の emm 型別

No.	年齢	性別	分離 推定感染源	NIB (菌 株受付 番号)	種名	血 清 群	ST (Sequence Type)	遺伝子型										Group	同LSTの報告があるか
								flaA	pilE	asd	mip	mompS	praA	neuA					
230	2012	男	不明(発症12日前に循環式温泉に入浴)	2878	<i>L. pneumophila</i>	1	1251	6	10	15	13	21	7	6	(B1)	無			
231	2012	男	不明(調査したが不明、営業職)	2898	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内16例目、国外			
232	2012	男	公衆浴場(推定)	2902	<i>L. pneumophila</i>	1	1273	7	6	17	10	13	11	6	B2	無			
233	2012	男	公衆浴場(推定)	2903	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内3例目、国外			
234	2012	男	不明	2904	<i>L. pneumophila</i>	1	2	6	10	19	3	19	4	9	B1	国内3例目、国外2例			
235	2012	男	不明(発症5日前に2923と同一スーパー銭湯利用)	2911	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11	(B2)	無→国内			
236	2012	男	不明(製麺業、給水タンク疑い)	2912	<i>L. pneumophila</i>	1	850	2	3	9	50	2	1	6	S1	国内2例目			
237	2012	男	不明	2913	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内13例目、国外			
238	2012	女	不明	2914	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	-	国外多、県内8例目			
239	2012	男	浴槽水(温泉)	確定 2915	<i>L. pneumophila</i>	10	1427	3	12	1	6	14	9	220	-	国内			
240	2012	男	不明(配管工)	2920	<i>L. pneumophila</i>	1	1346	7	6	17	3	14	11	6	B2	無			
241	2012	男	温泉(推定、浴槽水からは検出されず、ろ材からの菌とPFGE一致)	2921	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内15例目			
242	2012	男	温泉(推定、毎週日曜利用、直近は発症3日前)	2922	<i>L. pneumophila</i>	1	18	2	10	9	13	2	5	6	S1	国外(欧州)9例			
243	2012	男	不明(発症5日前に2911と同一スーパー銭湯利用)	2923	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11	(B2)	国内2例目			
244	2012	男	不明	2924	<i>L. pneumophila</i>	1	609	3	13	1	1	14	9	1	U	国内5例目、国外1			
245	2012	男	不明(運転手)	2925	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内9例目			
246	2012	男	浴槽水(推定)	2926	<i>L. pneumophila</i>	2	39	3	5	1	7	14	9	8	-	国内3例目 国外10例 SG2			
247	2012	男	不明	2927	<i>L. pneumophila</i>	1	1347	12	1	2	5	3	17	15	N	無			
248	2012	男	不明	2930	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11	U	国内3例目、国外4例			
249	2012	男	浴槽水(推定)	2931	<i>L. pneumophila</i>	1	1389	4	7	11	3	11	9	9	N	無			
250	2012	男	温泉(推定)	2932	<i>L. pneumophila</i>	1	530	6	10	20	6	9	4	9	B1	国内3例目			
251	2012	男	田・畑作業(推定)	2933	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内3例目			
252	2012	男	不明	2943	<i>L. pneumophila</i>	1	644	6	10	20	10	9	14	11	B1	国内4例目			
253	2012	男	不明	2944	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内15例目、国外			
254	2012	男	不明(建設関係、清掃関係の仕事)	2945	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内16例目、国外			
255	2013	男	不明(運転手)	2946	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内4例目			
256	2012	男	不明(京都旅行後翌日から体調不良、15日後に診断)	2947	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内17例目、国外			
257	2013	男	不明	2948	<i>L. pneumophila</i>	9	1283	2	3	18	40	2	1	2	-	国外で1例			
258	2010	男	不明	2951	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内17例目、国外			
259	2010	男	温泉(推定)	2952	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11	B1	国内3例目			
260	2012	男	温泉(推定)	2953	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内16例目			
261	2012	男	浴槽水(推定、自宅の共同浴場)	2954	<i>L. pneumophila</i>	1	1447	6	10	20	13	9	4	11	B1	無			
262	2012	女	不明	2955	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内2例目			
263	2012	女	温泉(推定、自宅が温泉)	2956	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11	B1	国内4例目			
264	2012	男	不明(建設解体業)	2957	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内4例目、国外			
265	2012	男	不明	2958	<i>L. pneumophila</i>	1	1458	10	14	16	16	15	13	2	C2	無			
266	2012	女	自宅風呂(推定)	2959	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内15例目、国外			
267	2012	男	不明	2960	<i>L. pneumophila</i>	1	1448	2	3	6	10	51	1	9	S1	無			
268	2013	女	不明	2961	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	-	国内4例目(1例はSG10)			
269	2013	男	不明	2962	<i>L. pneumophila</i>	1	352	12	8	11	13	10	12	2	S3	国内3例目			
270	2011	男	不明(技術工)	2963	<i>L. pneumophila</i>	1	1449	2	3	6	3	51	1	6	S1	無			
271	2011	男	不明	2964	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	S1	国内10例目			
272	2011	男	不明(運送業)	2965	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	S1	国内5例目、国外			
273	2011	男	温泉(推定)	2967	<i>L. pneumophila</i>	1	1450	3	10	19	14	4	4	3	B1	無			
274	2012	男	不明(インドネシア出張、その後ゴルフ)	2969	<i>L. pneumophila</i>	1	1446	7	43	31	3	48	15	1	(B2)	無			
275	2012	男	不明	2971	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内14例目、国外			
276	2013	男	不明(週2回特定の浴用施設利用、施設検査結果は陰性)	2995	<i>L. pneumophila</i>	1	1480	3	13	1	14	14	9	6	-	無			
277	2012	男	不明	2996	<i>L. pneumophila</i>	1	224	4	8	11	16	42	12	2	S3	国内2例目、国外			
278	2012	男	温泉(集団感染、2998と同一事例)	確定 2997	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内17例目			
279	2012	男	温泉(集団感染、2997と同一事例)	確定 2998	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内17例目			
280	2012	男	不明	3003	<i>L. pneumophila</i>	1	306	6	10	15	13	9	14	11	B1	国内7例目			
281	2013	男	スポーツジム(推定、プールまたは温泉)	3004	<i>L. pneumophila</i>	1	129	6	6	15	28	4	14	11	B1	国内2例目、国外			
282	2013	男	不明	3012	<i>L. pneumophila</i>	1	114	3	6	1	6	14	11	9	U	国内3(SG1が1、SG6が1)、国外(SG6)			
283	2013	男	不明(旅行歴なし、公衆浴場の利用なし)	3013	<i>L. pneumophila</i>	1	1510	2	6	3	6	9	4	11	(B1)	無			
284	2013	男	不明(2箇所の公衆浴場を何度か利用していた)	3014	<i>L. pneumophila</i>	1	1511	2	23	17	3	11	4	2	N	無			

表1 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2012年6月～2013年6月)

表2 収集臨床分離株の内訳

2013年6月末日現在

<i>L. pneumophila</i>	273株 (97.5%)	<i>L. feeleii</i>	1株 (0.4%)
SG1	232株 (85.3%)	<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.4%)
SG2	6株 (2.2%)	<i>L. longbeachae</i>	4株 (1.4%)
SG3	11株 (4.0%)	<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.4%)
SG4	2株 (0.7%)		
SG5	7株 (2.6%)		
SG6	7株 (2.6%)		
SG9	3株 (1.1%)		
SG10	2株 (0.7%)		
SG12	1株 (0.4%)		
SG15	1株 (0.4%)		
Untypable	1株 (0.4%)		
		計	280株 (100%)

表3 *L. pneumophila* 国内臨床分離株の遺伝子型 (ST)、2008-2012

株数	ST (かっこ内はグループまたは SG)†
13	ST23 (S1), ST138* (B3)
10	ST120 (S1)
8	ST1 (C1), ST93 (SG3)
6	ST384* (S1)
5	ST609 (U)
4	ST42 (N), ST89 (S1), ST644* (B1)
3	ST131* (B1), ST132* (S1), ST353* (S1), ST1077* (U)
2	ST2 (B1), ST39 (SG2), ST59 (B2), ST68 (SG6, SG12), ST211 (U), ST224 (S3), ST256 (B1), ST354* (SG2), ST505* (B2), ST530* (B1), ST537* (SG6), ST550* (S1), ST566* (B1), ST679* (S1), ST687* (B2), ST850* (S1), ST876* (S1), ST1136* (SG9, UT)
1	68種類 (国内固有は48種類)

†S1, S3: 土壌分離株グループ、B1, B2, B3: 浴槽水分離株グループ、C1: 冷却塔水分離グループ、U: 感染源不明グループ、N: いずれのグループにも属さない。

*2013年4月現在、日本固有の遺伝子型

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

研究分担者 調 恒明（山口県環境保健センター）

研究要旨 地方衛生研究所が準備すべき感染症の検査機能と検査の現状について考察を行い、今後の病原体サーベイランス及びレファレンスセンターのあり方を検討した。

A. 研究目的 地方衛生研究所は、地域における公衆衛生の技術的・科学的中核としての役割を担うため地方自治体（都道府県、政令市、特別区）に79機関が置かれている。その主な役割は、住民に健康被害をもたらす感染症や食中毒の原因となるウイルス、細菌などの病原体、あるいは化学物質を同定することにより、自治体の対策に必要な科学的根拠となるデータを提供し、感染症の拡大防止、食中毒の早期探知・解決を図ることにある。地方衛生研究所における検査は、感染症法、食品衛生法に基づいて行われる行政依頼検査（行政が主体となって行う検査）であり、新型インフルエンザ疑い患者のウイルス遺伝子検査では患者の入院の根拠となり、麻疹の検査では感染拡大防止のため学校閉鎖が検討され、食中毒事例の病原体検査では飲食店の営業停止の根拠となるなど地方自治体にとって重要なものである。患者検体から病原体を分離同定する病原体検査の現場は地方衛生研究所にあるため、地方衛生研究所の役割は、自治体だけでなく、我が国全体の感染症対策において極めて重要である。一方、地域

保健法などにおいて自治体における設置義務が規定されていないため自治体における予算削減などによりその実力が低下しつつある事が懸念されている。本研究では、今後病原体サーベイランスをどのように維持発展させるべきかを提言することを目的として考察を行った。

B. 研究方法 これまでに行ったレファレンスセンターに関する調査結果、地域保健総合推進事業において調査されている自治体における検査項目などを利用して考察を行った。

C. 結果と考察 各類型の感染症に対する中国四国の地方衛生研究所の対応状況をみると、二類、三類の感染症であっても感染症の頻度や重要性に応じて検査の準備を行っていることがわかる（図1, 2, 3）。このことから、今後重要なことは、対応が出来ている検査の精度を確保することと、新たに対応が必要となる新興感染症の検査を迅速に確立できる体制を整えておくことであると考えられる。

1. 精度管理、GLP 対応が必要と思われる感染症

個別の検査結果が、その後の行政対応に反映される感染症については厳格な精度管理が必要となると思われる。それに対して発生动向調査における流行状態の把握を目的とした検査では個々の検査結果の正確性は厳密に求められない。従って、前者に含まれる感染症を認識し高度な体制を確立していくことが重要である。

インフルエンザ：特に新型インフルエンザでは、患者の入院措置のみならず、交通の制限などに及ぶ可能性もあることから高い診断の精度及び迅速性が求められる。インフルエンザでは、2008年8月に全国の地方衛生研究所及び検疫所の検査担当職員に対して研修が行われ検査の標準化がなされた。この研修が2009年の新型インフルエンザの検査対応を可能にした。今後も、H7N9など新たなパンデミックの発生が危惧されていることから引き続き研修、精度管理が必要である。

麻疹、風疹：麻疹、風疹は特定感染症予防指針により排除が目標づけられている感染症である。診断されると保健所による積極的疫学調査が行われ、学校の出席停止等の措置が必要となる場合もある。これらのことから麻疹、風疹の診断は迅速性、正確性が求められる。

ノロウイルス：ノロウイルスを原因とする食中毒では、調理者及び患者から検出されるノロウイルスの遺伝子型が一致することを示すことが求められている。食中毒事例

では、食品提供者は一時的に業務停止の行政処分を科せられることから検査の正確性は重要である。検査は厚生労働省の公定法に基づいて行われており、陽性と判定するウイルス量も決められていることから定量性も求められる。

新興感染症：H7N9, MERS, SFTS のような新興感染症の場合、検査対応は地方衛生研究所が担っており、結果がもたらす社会的影響が大きいことから厳密な正確性と迅速性が求められる。検査体制の確立には時間的制約があるが、日頃から柔軟な対応が出来る様に技術力を高めておく必要がある。

2. 検査の強化が必要と思われる感染症

薬剤耐性菌：VRE 感染症とバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 感染症は感染症発生动向調査事業実施要綱において5類全数把握疾患に定められていることから、地方衛生研究所においてはこれらの菌種の検査・解析技術を導入することが必須であり、検査技術の導入が最優先されるべきであると考えられる。その他の薬剤耐性菌についても、今後、検査が可能となるように研修、マニュアルの整備、陽性コントロールの配布等が必要である。

D. 結論

EQA (external quality assurance) と GLP (good laboratory practice) について

全ての感染症について EQA を行う事は不可能であり、またその必要もないと考えられる。しかし、特定の感染症について定期的に EQA を課すことにより地方衛生研究所のレベルはある程度保障されるようにな

るであろう。EQAが必要な疾患は、インフルエンザ、麻疹、風疹、ノロウイルス、新興感染症があげられる。GLPへの対応としてプロトコルの作成、機器の保守管理、職員の資格の規定などが今後求められると思われる。

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

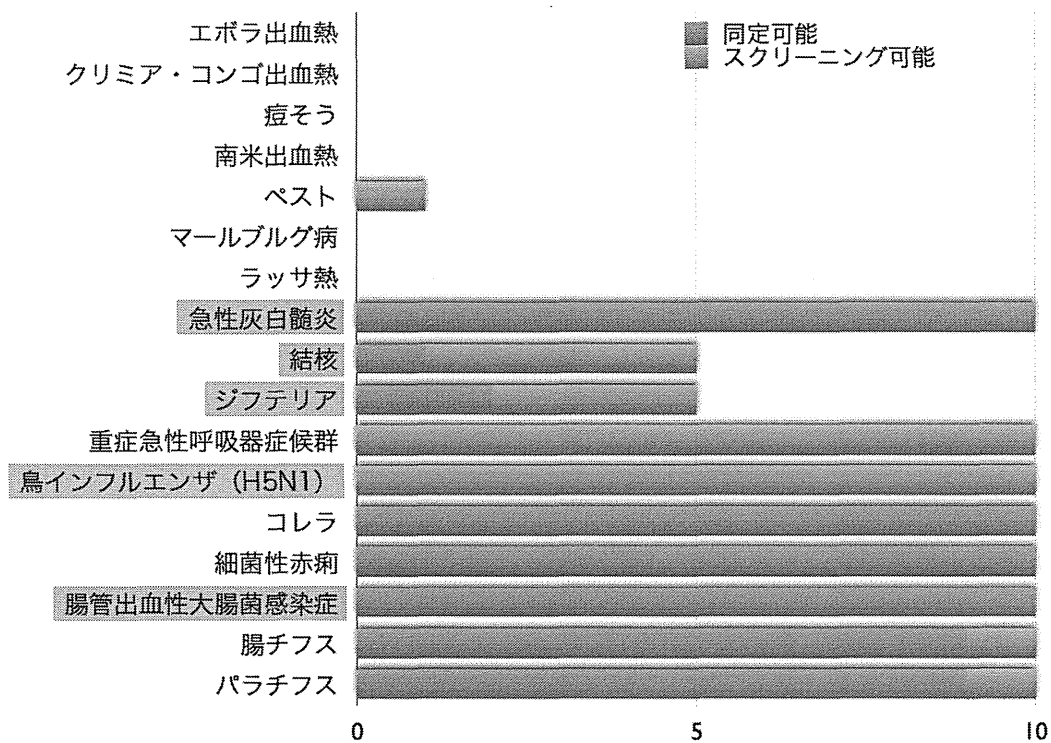
国内学会

なし

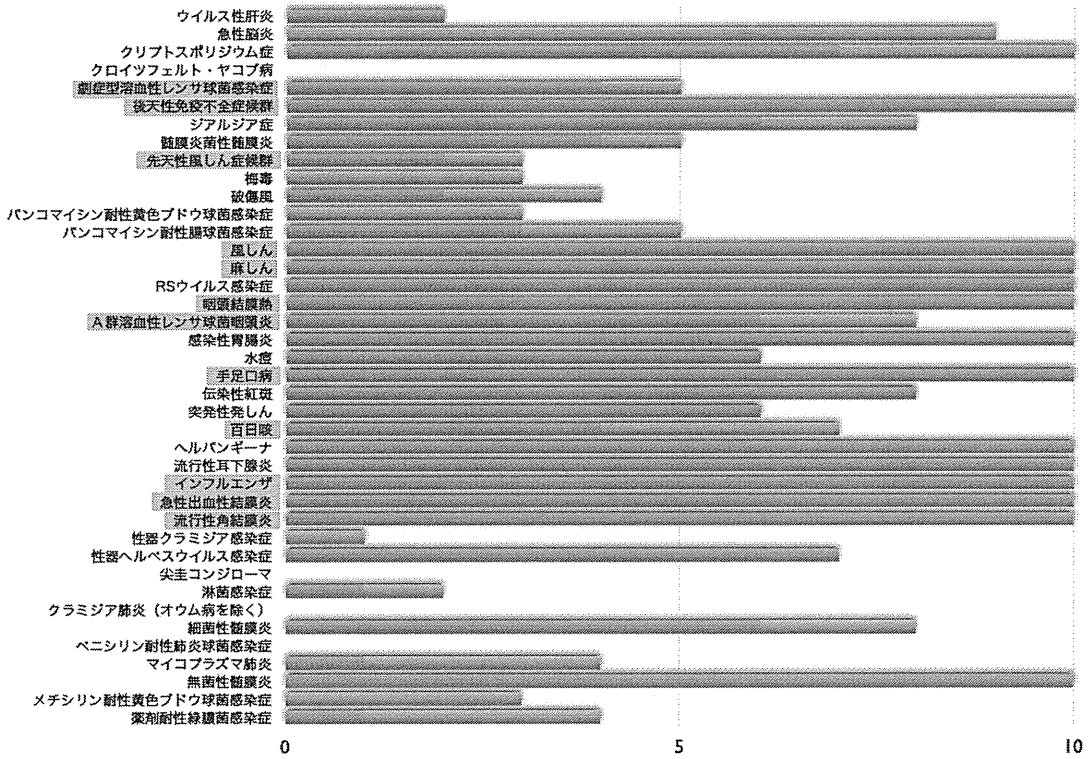
H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

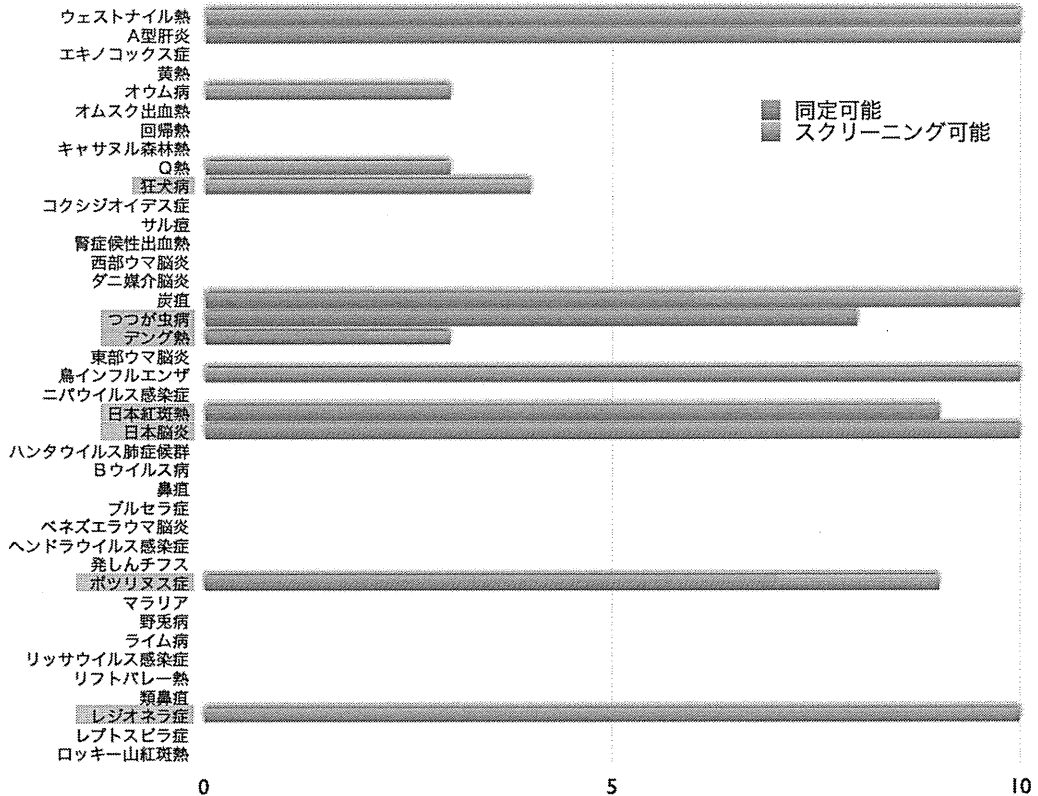
一類、二類、三類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



五類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



四類感染症の検査準備状況（中国、四国10施設）



厚生労働科学研究費助成金（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」

平成 25 年度 研究分担報告書

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	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所
	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
	福祉山 郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター

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、2012年にヒトから分離された *C. jejuni* 265株について Lior 法および Penner 法による血清型別を実施した。その結果、Lior 法では265株中213株(80.4%)、Penner 法では260株中130株(50%)が型別された。Penner 法による型別率が低い原因を検討したところ、B群血清の抗体価の低い可能性が示唆された。2012年分離のキノロン耐性率は、*C. jejuni* では47.7%、*C. coli* では60%であった。EM耐性率は*C. jejuni*では1.1%、*C. coli*では20%であった。

A. 研究目的

カンピロバクターは、食中毒起因菌として非常に重要であり、地方衛生研究所では、本菌による胃腸炎集団発生時に原因食の推定や汚染経路調査などのために分離菌株の血清型別が実施できることが望ましい。この検査サービスを全国地方衛生研究所の協力によって普及し、同菌による胃腸炎予防に資することを目的としてカンピロバクター血清型別レファレンス・サービスが1989年に開始された。これまで、Lior 法による型別用血清は、研究協力者が協働して作製してきたが、その作業には限りがある。一

方、Penner 法による型別用血清は市販品（デンカ生研）がある。そこで、本研究は、① Lior 法による診断血清を用いた分離菌株の型別状況調査、②市販血清を用いた Penner 法による型別の検討、また、③薬剤耐性菌の出現状況の把握を目的として実施した。

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
支部センター及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. Penner 法による型別不能 (UT) 株の検討

Penner 法による UT 株について，Lior 法による型別結果と比較検討した。また，Penner 法による UT 株について，自家免疫血清を用いて解析を行った。

4. 薬剤耐性菌の出現状況の把握

エリスロマイシン(EM)，ナリジクス酸(NA)，ノフロキサシン(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 法及び Penner 法による血清型別

2012 年に全国 7 地域で散発下痢症患者

から分離された *C. jejuni* 265 株の Lior 法による型別成績を表 2 にまとめた。最も多く検出された血清型は LIO 4 (33.6%)，続いて，LIO 1 (8.7%)，TCK 1 (6.8%)，LIO 11 (4.9%) であった。UT 株は 52 株(19.6%)であった。

次に，2012 年に分離された 260 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，B 群 44 株(16.9%)，D 群 19 株(7.3%)，C 群 10 株(3.8%)であった。UT 株が 130 株(50.0%)と非常に多い結果であった(表 3)。UT 株の割合は，過去 4 年間(2009 年：45.1%，2010 年：38.1%，2011 年 39.0%)で最も高い状況であった。

3. Penner 法による型別不能株の検討

東京都で検討した散発下痢症由来 *C. jejuni* について，Penner 法による UT 株の割合を分離年別にまとめた(表 4)。2000 年に比較して，UT 株の割合が年々上昇している。次に，これらの Penner の UT 株を Lior 法で型別してみると，LIO 11 や LIO 4 に多く型別された。LIO 11 に型別される株は，以前より Penner 法では UT と型別されており，対応する血清群が市販血清に含まれていない可能性が考えられた。

一方，LIO 4 は，Penner B 群の株が多い。そこで，B 群の免疫株(HS：2)，また，東京都で分離された HS：2 遺伝子の保有の確認されている分離株 12 株(HP11336 株など)を用いて，市販の B 群血清，HS：2 を用いて作製した自家免疫血清，また HP11336 株の自家免疫血清を用いて反応性を比較検討した。その結果，市販の B 群血清の抗体価が低いのではないかという結果が得られた(表 5)。

4. 薬剤耐性菌の出現状況の把握

2012年分離の *C. jejuni* のキノロン耐性株(NA, NFLX, OFLX, CPMX)の割合は、47.7%で、2010年以降45%以上という傾向が続いている(図1)。*C. coli* では、10株中6株(60%)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*では1.1%、*C. coli*では20%で増加傾向は認められなかった。

D. 考察

国際的に認められているカンピロバクター一型別法の1つであるLior法は、易熱性抗原を標識抗原としてスライド凝集反応により型別する方法である。私共は、自家免疫によって作製した30種類の血清群をセットとして利用している。操作は容易であるが、判定はやや困難であるという欠点がある。

一方、Penner法も国際的に認められている型別法であり、耐熱性抗原を標識抗原として受身血球凝集反応により型別する。市販血清があり、25種類の血清群をセットとして利用している。操作は煩雑であるが、判定は容易である。しかし、価格が高い(1検体2000円)という問題もある。

1989年以来、カンピロバクターの型別用血清の作製を地方衛生研究所の協働で行って来た。しかし、最近の地方衛生研究所のマンパワー不足のため、診断用血清を自家調製することは非常に困難になってきている。そこで、可能であれば市販血清の使用に切り替えたいと検討しているが、型別率の低さが最大の課題である。今回、その原

因について、一部検討した結果、B群血清の力価の問題が推定された。現在、この結果に基づき、さらに型別率を上昇させるための検討を行っている。

2012年の *C. jejuni* キノロン耐性菌の出現率は47.7%で、昨年(47.6%)とほぼ同等であるが、高い値を示していることから、十分な監視が必要である。

E. 結論

2012年にヒトから分離された *C. jejuni* 265株について血清型別を実施したところ、Lior法に比べPenner法による型別率が低いことがわかった。原因の検討を行ったところ、市販血清の力価に問題があることが示唆された。

次に、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共に例年とほぼ同様の耐性率であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

衛生微生物技術協議会第34回研究会(名古屋)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/H25_Campylobacter.pdf

H. 知的所有権の取得状況

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. *C. jejuni* 散発事例由来株のLior血清型別成績(全国・2012年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
LIO 4	12	26	6	7	31	7	-	89	33.6
LIO 1	2	1	-	-	14	6	-	23	8.7
TCK 1	-	6	1	1	10	-	-	18	6.8
LIO 11	2	6	1	-	3	1	-	13	4.9
LIO 7	-	3	1	-	1	1	-	6	2.3
LIO 10	-	1	-	-	1	4	-	6	2.3
LIO 6	1	-	1	-	2	1	-	5	1.9
LIO36	-	5	-	-	-	-	-	5	1.9
その他*	2	12	3	0	3	3	-	23	8.7
小計	19	60	13	8	65	23	0	188	71.0
(%)	63.3	72.3	48.1	57.1	73.9	100.0	0.0	71.0	
複数血清	4	1	10	-	10	-	-	25	9.4
型別不能	7	22	4	6	13	-	-	52	19.6
合計	30	83	27	14	88	23	0	265	100

* 13種類

表3. Penner 法による*C. jejuni* 散発事例由来株の型別推移(全国)

血清型	2009年	2010年	2011年	2012年	合計	(%)
A群	10	14	12	2	38	(2.5)
B群	27	78	49	44	198	(12.9)
C群	23	28	28	10	89	(5.8)
D群	58	54	42	19	173	(11.3)
G群	11	10	9	4	34	(2.2)
J群	13	9	8	5	35	(2.3)
O群	19	26	20	3	68	(4.4)
R群	18	9	4	3	34	(2.2)
Y群	26	22	12	6	66	(4.3)
その他*	28	33	42	29	132	(8.6)
小計	233	283	226	125	867	
(%)	(54.2)	(61.7)	(58.7)	(48.1)	(56.5)	
複数血清	3	1	9	5	18	(1.2)
型別不能	194	175	150	130	649	(42.3)
合計	430	459	385	260	1534	(100.0)

*8種類

表4. 散発下痢症由来*C.jejuni*のPenner血清型UT株の検討

分離年	供試 菌株数	Penner:UT 菌株数	(%)	Penner : UT					
				LIO : UT 菌株数	(%)	LIO 11 菌株数	(%)	LIO 4 菌株数	(%)
2000年	180	52	(28.9)	23	(12.8)	11	(6.1)	2	(1.1)
2001年	174	44	(25.3)	24	(13.8)	10	(5.7)	2	(1.1)
2002年	205	43	(21.0)	16	(7.8)	15	(7.3)	2	(1.0)
2003年	212	55	(25.9)	22	(10.4)	9	(4.2)	6	(2.8)
2004年	203	38	(18.7)	24	(11.8)	3	(1.5)	3	(1.5)
2005年	205	59	(28.8)	33	(16.1)	9	(4.4)	5	(2.4)
2006年	168	46	(27.4)	29	(17.3)	5	(3.0)	6	(3.6)
2007年	184	71	(38.6)	28	(15.2)	14	(7.6)	3	(1.6)
2008年	206	67	(32.5)	28	(13.6)	14	(6.8)	4	(1.9)
2009年	155	75	(48.4)	40	(25.8)	9	(5.8)	10	(6.5)
2010年	143	70	(49.0)	26	(18.2)	5	(3.5)	27	(18.9)
2011年	109	44	(40.4)	15	(13.8)	2	(1.8)	13	(11.9)
2012年	82	42	(51.2)	16	(19.5)	6	(7.3)	15	(18.3)

表5. 散発下痢症患者由来 *C. jejuni* Penner B群 の反応性

菌株No.	HS: 2 gene*	デンカB群**	自家血清 (HS:2)	自家血清 (HP11336)
HS :2	+	+(X 4)	X 1,280	X 320
HP11336	+	-	X 320	X 320
HP11380	+	-	X 320	X 640
HP11381	+	-	X 320	X 320
HP11387	+	-	X 320	X 320
HP11394	+	-	X 320	X 320
HP11396	+	-	X 320	X 320
HP11405	+	-	X 320	X 320
HP11422	+	-	X 640	X 320
HP11446	+	-	X 640	X 640
HP11451	+	-	X 640	X 640
HP11475	+	+	X 640	X 320
HP11488	+	-	X 640	X 320

* JCM 49, 1750, 2011. ** Lot No.17116. *** 感作血球調製は、亜硝酸抽出抗原を使用

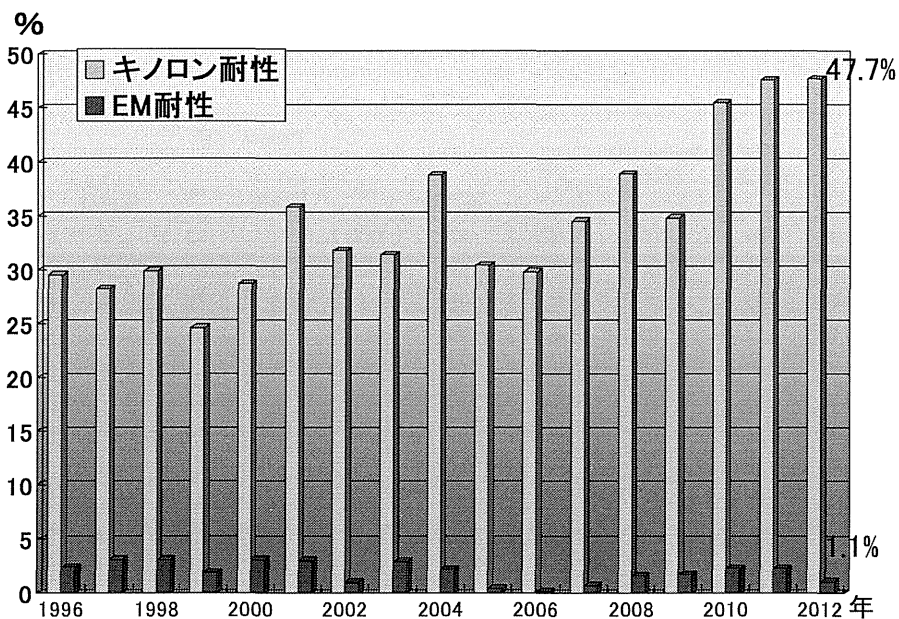


図1. キノン剤およびエリスロマイシン耐性株の出現状況
 キノン耐性: NFLX・OFLX・CPFx・NA耐性

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

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	山崎浩	国立感染症研究所寄生動物部	第2室長
同	大前比呂思	国立感染症研究所寄生動物部	第3室長

研究要旨 感染症法で第四類に分類されるマラリアとエキノコックス症について、国内における検査ネットワーク強化に関する研究を行った。マラリアについては、主要な国際空港検疫所との間で、相互研修を行い遺伝子診断用試料の配布を行った。また、医療施設からの確定診断依頼例では、顕微鏡的診断、迅速診断キットによる診断、及び遺伝子診断の結果が一致しなかった2例について検討した。マラリアの確定診断を単独で行える医療施設は限られており、各々の検査の特徴を理解したうえで、複数のマラリア検査法で確認することの重要性が再認識された。エキノコックス症では、発生動向、あるいは生活環の定着に関する情報収集のために、地方衛生研究所等から送られてくるヒト、およびイヌのエキノコックス症疑診例の検査をそれぞれ3件と1件実施した。その結果、ヒトでは輸入症例として単包虫症が2例（いずれも在日ネパール人）確認され、うち1例は*Echinococcus ortleppi* という種による感染例であることが国内で初めて確認された。イヌの疑診例ではエキノコックス虫卵は検出されなかった。また、市販のエキノコックス症検査キット2種類（フランス製と国産）について評価を行ったところ、フランス製キットによる検出率が高かった。

A. 研究目的

寄生虫症のうちマラリアとエキノコックス症（多包虫症と単包虫症）は、感染症法で第四類に分類され、届出が義務付けられている。現在マラリアは、全て輸入例だが、国内にマラリア原虫を媒介できるハマダラカが生息しているため、寄生虫症の中では唯一検疫感染症にも指定されている。そこで、本年度は主要な国内国際空港の検疫所と協力して、マラリアを中心とした相互研修を行い、検疫における昆虫媒介性感染症や寄生虫症関連の検査のありかたについて

検討した。また、致死性の疾患でもあるマラリアでは、受診した医療施設での鑑別診断が重要だが、現在単独で確定診断できる施設は限られている。そこで、当部に検査依頼があった検体で、各種検査法での診断結果に差異が出た2例について検討した。

国内のエキノコックス症はそのほとんどが北海道で流行する多包虫症であるが、本州など北海道以外の地域における流行拡大が懸念されているために、本州におけるエキノコックスの生活環の定着の有無を監視することが重要課題である。一方、単包虫

症は、輸入症例として単包虫症の流行国から来日する外国人、あるいは流行国へ渡航した邦人の症例が報告されている。そこで、本分担課題では、地研、または全国の医療研究機関から送られてくるヒトのエキノコックス症、あるいはイヌのエキノコックス症に関する依頼検査例をもとに、発生动向やエキノコックスの生活環の定着状況を監視し、疫学、公衆衛生の向上に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

1. マラリア

マラリアの診断では、顕微鏡を用いた形態検査が基準とされるが、最近では、迅速診断キットによる検査や遺伝子検査も、目的に応じて利用される。ただし、複数の検査を利用する場合、各々の検査の特性と限界を十分に理解しておかないと、検査結果の差異に戸惑うことが多い。そこで、本年度は、医療施設から検査依頼があった有症のマラリア患者の検体で、検査結果が食い違った2例について検討を加えた。特に、イムノクロマト法による迅速診断キットについては、**Aldolase** と熱帯熱マラリア原虫の **Histidine Rich Protein (HRP)** を検出する **Binax NOW Malaria** と **HRP-2** と三日熱マラリア原虫の **Parasite lactate dehydrogenase(pLDH)** を検出する **ENTEBE Malaria** の抗体系が異なる2キットについて比較検討した。

また、輸入寄生虫症としては、日本ではもっぱらマラリアが問題とされることが多いが、ヨーロッパ諸国では、消化管寄生原虫症や各種寄生蠕虫症も問題とされることが多い。そこで、成田・羽田・中部・関西の主要4国際空港検疫所との相互研修を利用して、マラリア以外の寄生虫症に関する

検疫のニーズと可能性について、情報交換をして検討した。

2. エキノコックス症

当部には全国の地研や国内外の医療機関から寄生虫症の依頼検査のために血清、糞便や虫体などが送付されてくる。平成25年4月以降、平成26年1月末までに計61件の検査依頼があり、そのうち、エキノコックス症の行政検査を含めた検査依頼数はヒト5例、イヌ1例の計6例あった。

ヒトのエキノコックス症に関しては、抗エキノコックス **IgG** 抗体検出のために市販されているウエスタンブロットによる検査キット（フランス製）を用いて抗体検出を行った。最近、国内でもイムノクロマト法による検査キットが市販されるようになったために、一部の検体についてはこのキットを用いた検査も併せて実施した。

ヒト症例で外科的に摘出された病巣については、病巣の一部から **DNA** を抽出し、ミトコンドリア **DNA** の **cox1** 遺伝子の塩基配列解析からエキノコックスの種を同定した。また、エキノコックス感染が疑われたイヌでは、イヌ糞便中にエキノコックスの虫卵が検出されるために、糞便検査、ならびに **12S rRNA** 遺伝子を標的とした糞便内 **DNA** 検査を実施した。

C. 研究結果

1. マラリア

マラリアの原虫密度が $10/\mu\text{l}$ 程度で、顕微鏡による形態検査で熱帯熱マラリア原虫の生殖母体が主に検出された例では、2種類の迅速診断キット、**Binax NOW Malaria** 及び **ENTEBE Malaria** とも陰性を示した。また、マラリア遺伝子検査では **Nested PCR** で、熱帯熱マラリアと確定診断された。また、マラリアの原虫密度が 200

／ μ l程度で、熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、及び卵形マラリアの混合感染が顕微鏡検査で疑われた例では、Binax NOW Malaria で熱帯熱マラリアと他のマラリアの混合感染が疑われた。さらに、遺伝子検査では、second PCR での種特異的 reverse primer 4 種 (falciparum-F2, malariae-M1, ovale-O2, vivax-V1) 全てに反応し、4 種マラリア原虫による混合感染と判明した。

2. エキノコックス症

ヒトの 5 疑診例の内訳は、北海道への渡航歴のある 3 例 (九州在住者 1 名、関東在住者 2 名 (多包虫症疑い)、それに沖縄と兵庫在住のネパール人 2 名 (単包虫症疑い)、イヌの疑診例 1 例 (多包条虫症疑い、山梨県) であった。

多包虫症疑いの 3 例はいずれも抗体検査では陰性であった。一方、兵庫在住のネパール人症例については、病巣の生検材料中にエキノコックスの原頭節が検出されたために、原頭節から DNA を抽出し、PCR を行った。その PCR 増幅産物の塩基配列から、原因種は単包虫の一種、*Echinococcus ortleppi* と同定された。沖縄在住の患者は抗体検査キットにより単包虫症と診断されたが、用いたフランス製キットで抗体が検出されたが、国産キットでは抗体は検出されなかった。山梨県のイヌについては、糞便検査では虫卵は検出されなかったために、糞便内 DNA 検査による精査を行ったが、エキノコックス DNA は検出されなかった。

D. 考察

マラリアの検査にあたっては、顕微鏡による形態検査、PCR などの遺伝子検査、イムノクロマト法による迅速診断キットでの検査結果が一致しないことがある。特に

に、途上国のフィールドで熱性疾患の鑑別の中で熱帯熱マラリアを容易に診断する目的を主としてきた迅速診断キットを、輸入マラリアの診断に利用する場合、その限界をよく知る必要があると思われた。また、マラリア以外の寄生虫症も含めた検疫に関する相互研修では、ヨーロッパ諸国では大きな問題とされる消化器系の寄生蠕虫症が、日本では殆ど問題になっていないことがわかった。

わが国では、北海道では現在でも多包虫症が流行しているために、北海道への渡航歴があると多包虫症の疑いで検査依頼があるが、平成 25 年度の 3 例はいずれも多包虫症ではなかった。しかし、在日ネパール人 2 例はいずれも単包虫症と診断され、とくに兵庫在住の患者では、DNA 検査で *E. ortleppi* という単包虫による感染事例であったことが判明した。この種はわが国には分布しておらず、患者は単包虫症の流行国ネパールで感染したと推定された。

ところで、マラリア以外の寄生虫症も含めた検疫に関する相互研修では、ヨーロッパ諸国では大きな問題とされる消化器系の寄生蠕虫症は、日本の検疫では殆ど注意が払われていないことがわかった。しかし、これまでに単包虫症の原因種として報告されてきた、*Echinococcus granulosus* や *E. canadensis* とは異なる *E. ortleppi* による単包虫症が初めて国内で確認された。単包虫症の患者から、国内で感染が拡大することはないが、輸入寄生蠕虫症についても、今後は注意を払っていく必要性が認識された。

E. 結論

エキノコックス症に関する監視体制は十分とは言えないので、今後も地研、保健所、

医療研究機関との監視体制強化が求められる。また、国内初の *E. ortlepp* による単包虫症が確認されたことから、検疫感染症に指定されているマラリアのみならず、他の寄生原虫症や寄生蠕虫症についても、輸入感染症の視点で注意を払っていくことが望まれる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

誌上発表

Plasmodium 属 マラリアの検査

大前比呂思 ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫便覧 324-327 検査技術協会 2014年2月 東京

発熱で受診した生殖母体を有する輸入熱帯熱マラリアの1例 太田昭生, 高木積, 大前比呂思, 中野由美子, 藤井充
渡航医学における住血吸虫症 24;74-77
2013

学会発表

発熱で受診した生殖母体を有する輸入熱帯熱マラリアの1例 太田昭生, 高木積, 大前比呂思, 中野由美子, 藤井充 第24回日本臨床寄生虫学会 2013年6月 奈良

旅行医学における住血吸虫症 大前比呂思, 桐木雅史, 林尚子, 千種雄一 第7回日本渡航医学会 2013年9月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

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

ジフテリア、ボツリヌス症、および、ボツリヌス症以外のクロストリジウム属
菌による感染症に関するラボネットワーク構築

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、山本明彦、小宮貴子、妹尾充敏、鈴木里和（国立感染症研究所）、菊地理慧（福島県衛生研究所）、池田徹也（北海道立衛生研究所感染症センター）、菊池 俊（千葉県衛生研究所）、門間千枝、赤瀬 悟（東京都健康安全研究センター）、久高 潤（沖縄県衛生環境研究所）、小泉充正（横浜市衛生研究所）、清水亜希子（川崎市健康安全研究所）、鷺谷則子（相模原市衛生試験所）、天野肇（横須賀市健康安全科学センター）、古川一郎（神奈川県衛生研究所）、藤戸亜紀（高知県衛生研究所）、堀田真紀（宮上病院）

研究要旨

ボツリヌス症は、稀少感染症である上、検査に動物実験が必要であるために、レファレンス・センターであっても地方衛生研究所における技術継承は難しい。一方、*Clostridium difficile*感染症は、医療関連感染として重要であり、院内アウトブレイク発生や劇症腸炎例では保健所・地方衛生研究所の支援が求められる事例が少なくない。4 地方衛生研究所を対象に、動物実験を中心に「ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会」を行った。また、*Clostridium difficile*感染症の細菌学的検査に関する講習会の希望が 5 地方衛生研究所からあったため、県内の医療機関でアウトブレイク疑事例連絡のあった 1 施設を加え、6 地方衛生研究所を対象に「*Clostridium difficile*感染症の細菌学的検査に関する研修会」を行った。

A. 研究目的

ジフテリアは日本では 1999 年を最後に発症が認められていないため、疑い症例が認められた場合に地方衛生研究所で対応が難しい場合がある。ボツリヌス症は、日本において稀少感染症であるものの、乳児ボツリヌス症だけでなく 2012 年には 5 年ぶりに食中毒事例が認められ、少なくともレファレンス・センターでは適切な対応が必要である。しかしボツリヌス毒素検出に動物を使用した試験が必要であるため、技術継承が容易ではない。一方、最近、レファレンス・センター活動の対象ではないが、破傷風や *Clostridium difficile* 感染症などの「ボツリヌス菌以外のクロストリジウム属菌による感染症」に関する問い合わせが少なくない。特に、医療関連感染で重要な C.

difficile 感染症に関しては、欧米での高病原性 NAP1/027 株の流行の報告を受け、平成 19 年(2007 年) 4 月 2 日に厚生労働省より「医療機関は保健所および地方衛生研究所に技術的支援を求めるよう」事務連絡が出ており、地方衛生研究所において検査体制を整える必要がある。

本研究では、ジフテリアおよびボツリヌス症を含めたクロストリジウム属菌感染症に関して、レファレンス・センター活動を含め、地方衛生研究所、保健所、医療機関、さらには、検査センターとのラボネットワークについて検討することを目的とする。

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

2013年12月11日から12月13日まで、国立感染症研究所村山庁舎において、講習会を行った。福島県衛生研究所、北海道立衛生研究所感染症センター、千葉県衛生研究所、および、東京都健康安全研究センター4施設より5名が参加した（10月16日から18日までの予定であったが、台風のため延期した）。

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

2014年2月4日および2月5日に「院内感染関連病原体の細菌研修」を行うにあたって、神奈川県地方衛生研究所から希望があったため、耐性菌関連の研修に加え、*C. difficile* 感染症に関する実技・座学の研修を組み込んだ。横浜市衛生研究所、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生試験所、横須賀市健康安全科学センター、神奈川県衛生研究所の5施設に加え、県内の医療機関でアウトブレイク疑事例連絡のあった高知県衛生研究所の6施設が参加した。

3. 症例報告（論文作成）の支援

鹿児島県環境保健センターより依頼があり、行政検査を行った破傷風症例について医療機関（宮上病院）が論文報告をすることを支援した。本事例では、外部委託先である民間の検査センター（埼玉県）で、創部の組織からの破傷風菌分離培養に成功し、国立感染症研究所へは、その民間検査センターより直接菌株が送付され行政検査が行われた経緯があった。

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

マウス試験によるボツリヌス毒素の検出と、コロニー観察およびグラム染色観察等、国立感染症研究所でしか体験できない試験を中心に研修を構成した。今回は、様々なボツリヌス症事例を経験している東京都健康安全研究センターより、事例紹介と説明があり座学も充実していた。参加研究所には、A型、B型、E型、F型のボツリヌス診断用抗毒素、および毒素遺伝子検出PCR用陽性コントロールを配布した。

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

実際の糞便検体を用いた *C. difficile* の分離培養、酵素抗体法による毒素検出を行った。また、細菌学的検査を中心に地方衛生研究所として、*C. difficile* 感染症に関して何が求められているか、意見交換を行った。参加研究所には、*C. difficile* 毒素遺伝子検出PCR用陽性コントロールを配布した。

3. 症例報告（論文作成）の支援

医療機関での検体採取、外部委託検査センターでの検査、さらに、地方衛生研究所を通しての国立感染症研究所での行政検査というネットワークの上で、創部から分離された破傷風菌の解析が可能であったという事例について、論文報告した。

D. 考察

ボツリヌス症は、稀少感染症であるが、食中毒事例が起きた場合には、地方衛生研究所には迅速・適切な対応が求められる。特に2012年に5年ぶりの食中毒事例が認められ、検査体制の必要性・重要性が再認識された。動物実験によるボツリヌス毒素検出の技術継承は大きな課題であり、今年度の講習会では、動物実験に大きくフォーカスを絞った点が評価できると考えられた。

一方、*C. difficile* 感染症は、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。近年、医療機関から、劇症腸炎症例やアウトブレイク事例に関して保健所に相談が持ち込まれることが増加し、保健所や地方衛生研究所では、細菌学的検査施行とともに、医療機関検査室の指導を行わなければならなくなった。今年度は、神奈川県地方衛生研究所からの要望に応じて、*C. difficile* 細菌学的検査の研修をしながら、保健所・地方衛生研究所として何が必要とされているのか協議したことは非常に有意義であった。

昨今は、医療機関から民間の検査センターへの細菌学的検査の依頼が増加している。ラボラトリー・ネットワークのなかで、検査センターは重要な鎖の輪である。破傷風は、臨床症状から診断されることがほとんどであり、創部から破傷風菌の分離培養が

なされることは稀である。医療機関、検査センター、地方衛生研究所、さらに、国立感染症研究所のネットワークの歯車がかみあって検査が可能であった貴重な事例として、論文報告する価値のあるものであると考えられ、論文作成の指導・支援を行った。

ジフテリアに関しては、レファレンス・センターではない地方衛生研究所より、菌株などの配布希望があったが、地方衛生研究所からの特記すべき要望はなかった。

E. 結論

ボツリヌス症の検査技術の継承のためには継続して講習会を行うことが必要と考えられた。地方衛生研究所において、*C. difficile* 感染症に関する知識・技術を必要としていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

米国 CDC からは urgent threat 「緊急なる脅威」として報道されている *C. difficile* 感染症が、日本の臨床現場でも問題となっており、保健所・地方衛生研究所で知識・技術を必要としていることが再認識された。

G. 研究発表

論文発表

鈴木真紀、黒崎貴子、加藤はる、佐藤隆也、古畑健司、山本明彦、宮上寛之。外部委託検査で創部から *Clostridium tetani* が分離された破傷風の1例。医学検査 62(6) 698-702, 2013.

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

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

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
(H25-新興-指定-002) H25 年度分担研究報告書

「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」

分担研究者 高崎智彦（ウイルス第一部・室長）
協力研究者 中山絵里（ウイルス第一部・研究官）
モイ メンリン（ウイルス第一部・研究官）
田島茂（ウイルス第一部・主任研究官）
小滝徹（ウイルス第一部・非常勤職員）

研究要旨 海外からの昆虫媒介性ウイルス感染症のなかで、オーストラリアで流行しているロスリバー熱は、世界的な広がりがないためにそれほど注目されていない。しかし、日本人のオーストラリアへの渡航者は年間 30 万人以上にのぼるため、その診断系を立ち上げ、病原体診断系に関しては地方衛生研究所に提供した。その結果、5 月にオーストラリアから帰国したロスリバー熱患者を始めて確定診断した。日本脳炎に関して、現在国内で検出される日本脳炎ウイルスは遺伝子 1 型であるが、1980 年代以前は遺伝子 3 型であった。現在も遺伝子 3 型が国内で活動している可能性は存在する。そのために 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系を構築改良した。

A. 研究目的

近年、デング熱やチクングニア熱など世界的に蚊が媒介するウイルス感染症の流行が拡大している。そのなかで、世界的な広がりを見せていないが、チクングニアウイルスと近縁のロスリバーウイルスによるロスリバー熱が、オーストラリアで近年流行している。日本からのオーストラリアへの旅行者は年間 30 万人以上であるためロスリバーウイルスの実験室診断系を構築し、地方衛生研究所に提供することを目的とした。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の感染が原因の中枢神経の疾患である。

感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は 20~40%に達する重篤な感染症である。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は 1990 年以降 10 例以下で推移しているが、日本国内でも JEV は現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは 90 年代初頭に 3 型から 1 型へと変化した。同様の変化は日本だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近

年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の現象（遺伝子型変化）が認められている。しかし、遺伝子 3 型日本脳炎ウイルスが日本から完全に消えてしまったという確証はない。そのため 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系を構築していたが、共通検出用セットが偽陽性をきたす傾向があったためこれを改良し、診断マニュアルに掲載した。

B. 研究方法

オーストラリアのロスリバーウイルス株を 4 株（T48A, QML#1, QML#2, Couper）入手し、表 1 のリアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）および RT-PCR 従来法を評価した。その結果を踏まえて、ロスリバーウイルス病原体検出法の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。また、オーストラリアから帰国の輸入ロスリバー熱患者血清を用いて、IgM 抗体捕捉 ELISA 法を構築し、チクングニアウイルスとの交差反応性について検討した。

日本脳炎ウイルスに関しては、Genbank に登録された遺伝子配列データに基づいて 1 型、3 型を区別するリアルタイム PCR 系と 1 および 3 型をともに検出できるリアルタイム PCR 系を E 領域に設定して構築していたが、さまざまな評価の結果 1 型-3 型共通検出系が、非特異反応を来たしやすいことが判明したため、あらたに NS5 領域に 1 型-3 型共通検出系を設定しなおした。ウイルスを含む細胞培養上清、ヒト血清、ブタ血清を用いて

非特異反応の有無を検討した。

C. 研究結果

ロスリバー熱の病因ウイルスであるロスリバーウイルスの遺伝子検出系は、4 株（T48A, QML#1, QML#2, Couper）すべてについて検出できた（図 1）。また、初めてオーストラリアからの輸入ロスリバー熱患者血清により、抗ロスリバーウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築し、チクングニア熱患者血清を用いて交差反応性を検証した結果、交差反応は示さなかった。また、そのロスリバー熱患者血清もチクングニアウイルス IgM 捕捉 ELISA に対して偽陽性反応を示さなかった。

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たすことが多かった。今回 NS5 領域に設定した 1-3 型共通検出系は、感染細胞上清、ブタ血清、ヒト血清および蚊乳剤による検討の結果、非特異反応を認めなかった。

D. 考察

オーストラリアの昆虫媒介ウイルス感染症は、ウイルス学的にも媒介蚊の面でも他の地域と若干の相違がある。ロスリバーウイルスは世界的流行を起こしているチクングニアウイルスと同じトガウイルス科アルファウイルス属のウイルスで近縁ウイルスである。ロスリバーウイルスによるロスリバー熱の流行は、オーストラリアおよびその周辺で発生している

が、チクングニア熱ほどの世界的拡大傾向はみられていない。しかし、日本人のオーストラリアへの渡航者数は年間 36 万人程度であり、ロスリバー熱もチクングニア熱と同じく急性症状が治まっても関節炎が持続し、時に再燃することから輸入症例に備えて実験室診断系を構築したところ、本年 5 月に初輸入症例を確認することができた。その結果、実験室診断のうち病原体診断系はすでに地方衛生研究所アルボウイルスセンターに技術移転していたが、ロスリバー熱血清診断系も構築することができた。また、より安全な遺伝子検出用合成陽性コントロールの構築を開始した。

一方、我が国に常在する日本脳炎ウイルスの検査は、近年でも検査会社では赤血球凝集阻止 (HI) 抗体、補体結合反応 (CF) 抗体検査で実施されており必ずしも感度は高くない。そこで、より高感度で特異性の高い遺伝子型 1 - 3 共通の日脳ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 系を構築、確立した。

E. 結語

- 1) オーストラリアで流行しているロスリバー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に技術供与した。また、本邦初の輸入症例を確定診断した。
- 2) 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 系を構

築、確立した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

朽谷健太郎、篠原 浩、土戸康弘、清水恒広、モイメンリン、高崎智彦. 本邦初報告となるロスリバーウイルス感染症の輸入症例(IASR Vol. 34 p. 380-381: 2013 年 12 月号)

学会発表

国内学会

1. 朽谷健太郎、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン. オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症の 1 例. 第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 2013 年 11 月 6-8 日 (大阪)

2. 高崎智彦、池田真紀子、谷ヶ崎和美、モイメンリン、中山絵里、小滝徹、山口幸恵、斎藤悠香、田島茂、倉根一郎、Youngmee Jee. ワクチンによる予防可能感染症 (VPD) としての WHO 日本脳炎ラボネットワーク. 2013 年 5 月 24-25 日 (静岡県熱海市)

3. 高崎智彦. 輸入感染症と感染対策 - ウイルス -. 第 163 回 ICD 講習会 (於: 第 61 回日本化学療法学会総会) 平成 25 年 6 月 4 日 (神奈川県 横浜市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

表1 ロスリバーウイルス リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法)
プライマー、プローブ

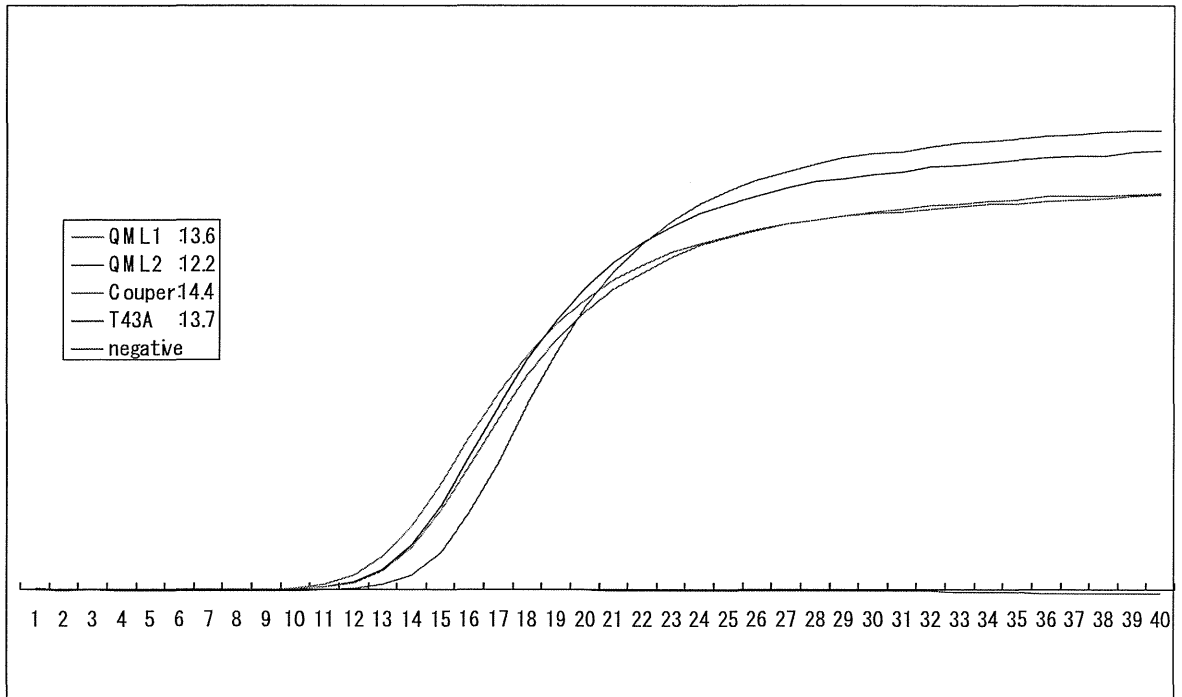
Primer & Probe	Sequence (5' to 3')	Region
RRV/NSP3/F	CCG TGG CGG GTA TTA TCA AT	NSP3
RRV/NSP3/R	AAC ACT CCC GTC GAC AAC AGA	
RRV/NSP3_probe	AAT AAG AGT AGT GTA GCC ATC C	

Ref. Reed S. Shabman et al. JV 82. 12374-12382, 2008

表2 日本脳炎ウイルス リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) プライマー、プローブ

Primer & Probe	Sequence (5' to 3')	Region
● 1&3 型遺伝子検出共通セット		
JENS5s269AF092550	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	NS5
JENS5r330AF092550	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GGA A	
JENS5p294AF092550	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	
● 1 型遺伝子検出セット		
JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	E
JE1en1119c-1082	GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA	
JEen1082pb	FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB	
● 3 型遺伝子検出セット		
JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	E
JE3en1119c-1082	AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA	
JE3en1082pb	FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB	

図1 ロスリバーウイルス遺伝子検出 (リアルタイム逆転写 PCR TaqMan 法)



BHK 細胞で増殖させたロスリバーウイルス QML#1 株、QML#2 株、Couper 株、T43 株ともに TaqMan 法で検出できた。

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

リケッチア・レファレンスセンターの活動について

研究分担者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
研究協力者	門馬直太	福島県衛生研究所
	東海林彰	青森県環境保健センター
	山本徳栄	埼玉県衛生研究所
	新開敬行	東京都健康安全研究センター
	赤地重宏	三重県保健環境研究所
	名古屋真弓、滝澤剛則	富山県衛生研究所
	寺杣文男	和歌山県環境衛生研究センター
	北本寛明	兵庫県健康生活科学研究センター
	木田浩司、岸本寿男	岡山県環境保健センター
	島津幸枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	松本道明	高知県衛生研究所
	御供田睦代	鹿児島県環境保健センター
	矢野浩司	宮崎県衛生環境研究所

研究要旨 リケッチア症は、国内発生を考慮した場合、バクターの種類、リケッチアの種類によって、発生時期や患者発生地域の集中など地域特性が強く表れる疾患であるため、本研究では、全国ブロックの横糸となるリケッチア・レファレンスセンターの地方衛生研究所を中心とした全国共通基盤を構築することを目指し、初年度、つつが虫病と日本紅斑熱のマニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価の準備、全国情報の共有と担当者自身のスキルアップの機会を積極的に行った。マニュアルに関してはつつが虫病と日本紅斑熱を優先し、順次進めている。あわせて日本紅斑熱のリアルタイムPCR系標準化のための準備等を行った。リケッチア関連の情報共有として、特定の疾患が話題になった際、それに固執し、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡または重症化する症例が増える危険性があることが指摘された。レファレンスセンターを中心とした地域の診断体制を確固としたものとすると同時に、情報発信のあり方を再考すべき時期である。

A. 研究目的

リケッチア症(つつが虫病と日本紅斑熱など)においては、現在も国内感染の患者が多数報告され、抗菌薬があるにもかかわらず、死亡例、重症化例もいまだ報告されている。その発生状況は、発生時期やつつが

虫病リケッチアの血清型が地域によって異なり、診断用抗原の選択など地域の状況に即した対応が必要となる。また、リケッチアの培養には BSL3 を要し、特定病原体に指定されるものが多く、検査担当者の異動に伴う変更を行い難い。

地王衛生研究所(以下、衛研)を中心とした地域、全国のラボネットワークの構築方法の検討により、臨床に即した迅速対応と情報発信が可能となり、患者のQOLに資することになる。

本研究では、リケッチア・レファレンスセンターの活動を通じ、リケッチア症の病原体サーベイランスに必要となる実験室診断系の質的標準化、疫学情報の発信、相互信頼と連携、機能強化を目的とし、臨床現場に対応する迅速な診断、情報発信、地域性への柔軟な対応が期待される。

B. 研究方法

リケッチア症は、国内発生を考慮した場合、ベクターの種類、リケッチアの種類によって、発生時期や患者発生地域の集中など地域特性が強く表れる疾患であるため、本研究では全国共通となるレファレンスセンターの共通基盤を構築することを目指し、以下について検討した。

1. マニュアル改訂

リケッチア症として国内で遭遇しやすい疾患として、つつが虫病と日本紅斑熱の検査マニュアルの改訂を進めた。遺伝子検出に供するベクターの刺し口(痂皮)や皮膚生検材料などこれまで記載のない点を加えるとともに、リアルタイムPCR系などの適用を検討した。それぞれの疾患から同様の流れで漏らさず検討できるように検討し、年度内に公開を予定している。

2. 全国共通となる検査法の評価

リケッチア症(つつが虫病、日本紅斑熱)検査マニュアルの改訂にあたり、新規に盛り込まれた日本紅斑熱のリアルタイムPCRについて、全国導入への条件を検討、レファレンスセンター間の相互評価を実施、標準化するための陽性コントロールと作業

手順書の準備を進めた。

3. 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

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。また、衛研担当者が自身のスキルアップを行うための機会として学会・研究会等への積極的な参加と発表を推し進めた。

C. 研究結果

1. マニュアル改訂

つつが虫病および日本紅斑熱のマニュアルの改訂がほぼ完了しつつある。遺伝子検出等の新たな情報を加える一方、国際的にもリケッチア症の実験室診断では、血清診断などでは従来通りの感染細胞抗原を用いたものがGold standardとなっているため、古典的といえる手法も残すことも心がけた。また、マニュアルはWebで一般に広く公開されるため、未発表(投稿中)の手法を今しばらく掲載できないという問題もあった。

2. 全国共通となる検査法の評価

改訂マニュアルに新規に盛り込んだ日本紅斑熱のリアルタイムPCRについて、全国導入への条件を検討、レファレンスセンター間の相互評価を実施、標準化のためのPCプラスミドの準備、その他手順書の準備を完了した。

3. 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うとともに、相互の連携を可能とする調整を行った。また、衛研のレファレンスセンター担当者は、「ダニと疾患のインターフェース」「リケッチア研究会」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が可能な場として活用、より深い情報の蓄積をその後も積極的に継続している。

D. 考察

リケッチア・レファレンスセンターの存在目的として、①標準株、分離株の維持（リスク分散）、②診断用抗原並びにPCR陽性コントロールの分担作製と供給、③実験室診断技術の相互評価（技術の維持）、④新規診断法等の相互評価（標準化）、⑤疫学情報、診断情報の収集・分析と共有、⑥緊急時のバックアップ体制、⑦検査マニュアルの作成、改訂、⑧検査技術の研修、⑨地域ごとの課題対応（調査、特定ツールの検討）、⑩その他（個々の担当者のスキルアップ）等が挙げられる。本研究班では、横糸となるレファレンスセンターの全国共通基盤を構築することを目指し、初年度、つつが虫病と日本紅斑熱のマニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価の準備、全国情報の共有の機会と担当者のスキルアップを行った。

マニュアルについては、つつが虫病、日本紅斑熱それぞれの疾患から同様の流れで漏らさず検討できるように検討し、年度内に公開を予定し、新規に盛り込まれた日本紅斑熱のリアルタイム PCR について、全国導入への条件を検討、レファレンスセンター間の相互評価を実施、標準化するための陽性コントロールの準備と作業手順書の準備を行い、次年度早々に実施を計画している。さらに、日本紅斑熱と同時に検討すべきつつが虫病のリアルタイム PCR 系の評価について、2 年次の実施を目指し、準備を開始している。このことにより、多様なリケッチア症に柔軟に対応できる

Multiplex な診断系の現場導入を試みる。また、地域常在が想定されながら届出疾患になっていないため不明な発疹熱は、今年度国内発生が報告されており、その状況を確認する体制も必要であろう。

リケッチア症において、つつが虫病の血清診断の一部は民間検査所でも可能である。しかしながら、現在患者の多数を占める Kawasaki 型や Kuroki 型に関しては対応していない。共通抗原に対する抗体も上昇する症例がある一方、感染した型にしか抗体上昇を認められない症例もある。医療現場では保険適用の問題から、急性期の検体を特定の型にのみしか検討されないことも多く、多くの症例が見落とされている可能性が高い。つつが虫病は適切な治療を速やかに始めなければ、いまだ死に至る感染症である。そのためにも衛研を中心としたリケッチアレファレンスセンターを強化し、地域ごとに適切な実験室診断が行われ、地域に即した情報発信を行えるようにすることが、患者発生に対応する医療と地域公衆衛生に大きな貢献になると考えられる。

全国ならびにブロック毎に地域情報、疫学情報、診断情報の収集・分析と共有、情報交換を行った結果、年間、数 100 例のリケッチア症が確定報告されながらその認知度はいまだ低く、本年度のように新規のダニ媒介感染症が大きく取り上げられると、それに固執し、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ死亡に至った、重症化したと考えられる症例の情報が散見された。このことから、レファレンスセンターを中心とした地域の診断体制を確固としたものとすると同時に、情報発信のあり方について再考すべき時期であることで意見が一致した。

E. 結論

つつが虫病、日本紅斑熱は確定報告数だけでも数百にのぼるが、多くの症例が届けられていないことが強く推察される。より容易に実験室診断が行われるために、遺伝子検出系などの導入なども進められているが、それだけで確定できない症例も多い。血清診断も感染細胞抗原を用いた系がいまだ国際的にも Gold standard であり、リケッチアの偏性細胞内寄生細菌という特徴に加え、BSL3 での取り扱い、さらに一部は特定病原体に指定されていることから、検査体制を維持できる施設は限られている。地域特性が強い感染症であることも踏まえ、全国のラボネットワークの構築方法の検討、各ブロックのレファレンスセンターを中心とした地衛研の検査体制を維持するために、その専門性を考慮した人員配置と組織作りに取り組むことが、臨床に即した迅速対応と情報発信が可能となり、患者のみならず住民の QOL に資することになる。

F. 健康危険情報

特定の疾患に固執した対応を行うと、有効な治療法がありながら、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡、重症化に至る危険性がある。

G. 研究発表

論文発表

1. 岸本寿男, 尾内一信, 沼崎啓, 安藤秀二, 山崎勉, 中浜力: ELISA 法による抗 *Chlamydophila pneumoniae* IgM 抗体測定キットの比較, 小児感染免, 25(2): 163-168, 2013

学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 安藤秀二: リケッチアと関連疾患, 平成 25 年度希少感染症診断技術研修会, 2014 年 2 月 20 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

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

下痢症ウイルスのレファレンスにかかる研究

研究分担者	清水博之	国立感染症研究所	ウイルス第二部第二室
研究協力者	片山和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	朴 英斌	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	戸高玲子	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室
	三木元博	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室

研究要旨 ヒトに感染するノーウォークウイルス（ノロウイルス、HuNoV）は、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。本研究では、ウイルスの抗原性パネルウイルス様中空粒子の作製と抗血清の作製、ノロウイルス検出システムの開発と、それに用いる標準物質の開発を行う。

A. 研究目的

各ブロックレファレンスセンター（九州沖縄：佐賀県衛生薬業センター、長崎市保健環境試験所 中国四国：愛媛衛研、広島県衛生研究所 近畿：堺市衛生研究所、大阪市立環境科学研究所 北陸中部：愛知衛研、名古屋市衛生研究所 関東甲信静：千葉市環境保健研究所、埼玉県衛生研究所医科学課、北海道東北新潟：宮城県保健環境センター）との連携の下、地方衛生研究所で実施しているノロウイルス・ロタウイルス検査の状況を把握し、検査の質を向上させることが本分担研究の主な目的である。具体的には、ノロウイルス・ロタウイルス検査におけるウイルス分離、遺伝子検査手法のマニュアル作成、及びウイルスゲノムの情報共有化を目的とする。

本年度は、第一に、ノロウイルスの便検体パネルを充実させ、抗原・抗体パネルの整備を継続すると共に、GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製を行う。第二に、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーが提唱した新規 genotyping 法に対応

可能な long distance RT-PCR 法を開発し、供給する。ロタウイルスの全長ゲノムを対象とした分子疫学基盤構築のためのマイクロチップ電気泳動法導入の検討を行う。以上を目的とした。

B. 研究方法

1. ノロウイルスの GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製

ノロウイルス GII.4 2012 変異株は、2012/13 シーズンの史上 2 番目の大流行を引き起こした GII.4 のバリエーション株である。GII.4 2012 変異株は、ウイルス粒子表面の突起部分（P ドメイン）に 2-3 アミノ酸の変異を有し、その抗原性を従来の GII.4 2006b 変異株などから若干変化させ、流行を引き起こしたと考えられている。

本年度は、幾つかの GII.4 2012 変異株の塩基配列を人工合成して、バキュロウイルスベクターに組み込み、リコンビナントバキュロウイルスを作製して、ウイルス様中空粒子（VLP）の作出を行った。

2. ノロウイルスの新規 genotyping 法と、

それに対応した RT-PCR 法の開発

1) 便検体：埼玉県衛生研究所より、譲渡され、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で保管管理されている NoV 陽性便検体パネルを用いた。本パネルは、譲渡後も国立感染症研究所にて新規 genotype 便検を補充し、現在報告されているほぼすべての genotype を含むパネルとして維持し続けている。加えて、2012/13 シーズンに史上 2 番目の大流行を引き起こした GII.4 2012 変異株の便検体も用いた。

2) GII.4 2012 変異株の全塩基配列解析
全長塩基配列は、次世代 sequencer (イルミナ MiSeq) によって解析を行った。

3) 第三世代 Uni3KY, UnilKY primer デザインと RT-PCR

HuNoV 全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1 にコードされたプロテアーゼ切断モチーフ付近に、新規 Universal primer set (Uni3KY primers) を設計した。設計した新規 primer set と、Takara PrimeStar GXL を用いて約 4.5 kb の long distance RT-PCR を実施し、PCR amplicons が得られなかった場合、UnilKY primers を用いた nested PCR を実施した。1st step RT-PCR amplicon, 2nd step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2 (VP1) 全長をカバーする。

3. 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構築

ロタウイルスは、11本の二重鎖RNAをゲノムとして持つ。11本のゲノムセグメントは、インフルエンザウイルスのようにセグメントリアソートを起こし、高頻度にリアソータントウイルスが出現する。ロタウイルスの分子疫学は、リアソータントの動向を把握することが重要である。このうち、粒子

最外郭蛋白質をコードするVP7 遺伝子がG typingに、最外郭の突起物をコードするVP4 遺伝子がPタイピングに、それぞれ用いられている。ヒトに感染するロタウイルスのうち、最も典型的な株はWa型と呼ばれる G1P[8]の遺伝子型を示す株である。Waの全遺伝子セグメントを

G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1と表す。ヒトノロウイルスのもう一つの主要株は、Wa型よりもマイナーなDS-1型が存在する。DS-1の全遺伝子セグメントを G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2と表す。各種セグメントのリアソータントは、便検体に大量に含まれるロタウイルスのゲノムRNAを抽出し、RNA-PAGEを行い、PAGE パターンを比較検討することで検出可能である。ラボ間差、アッセイ間差をコントロールし、異なる地域、異なる実験室間でのデータ比較できれば、全ゲノム塩基配列を決定すること無く、RNA-PAGEパターン解析のみで、ロタウイルスの分子疫学が実施可能となる可能性がある。そこで、マイクロチップ型RNA-PAGEの導入の可能性について検討した。

C. 研究結果・考察

1. ノロウイルスの GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製

4株の GII.4 2012 変異株の遺伝子配列を合成し、組換えバキュロウイルスを作製した後、VLP の作製を実施した。GII.4 2012 変異株の VLP 作製に成功し、抗体作製にも成功した。シードウイルスと抗体は、パネルとして保管した。

2. ノロウイルスの新規 genotyping 法と、それに対応した RT-PCR 法の開発

HuNoV genome 3' end に存在する poly A tail をターゲットとした Tx30SXN primer

と SuperScript version III を用いた逆転写反応により合成した cDNA を用いて、第三世代プライマーセットを用いた RT-PCR, 1st step, 2nd step を行った。その結果、10⁴ copies/g stool 以上の RNA titer があれば、テストした全ての遺伝子型で約 4.5kb もしくは、1kb の増幅産物が得られることが明らかになった。第二世代プライマーセットに比べ、約 10%程度の検出率向上が認められた。第三世代プライマーセットは、2nd step PCR まで持ち込めば、SK シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。また、第三世代プライマーセットの PCR amplicon は、これまで構築された様々な PCR 検出系の増幅領域をカバーしており、SK シリーズ amplicon を用いた従来の Capsid N/S 領域の genotyping, RdRp 領域を用いた genotyping, キメラウイルスの解析、genome 全長において最も多様性に富む VP1/P2 domain を用いた分子疫学にも対応可能である。本システムを用いたノロウイルス新規 genotyping 法を各ブロックレファレンスセンターと準備中。来年度より試験的運用開始予定している。

3. 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構築

マイクロチップ電気泳動装置を用いて RNA-PAGE 条件の最適化を行い、ロタウイルス 11 本のゲノム 2 本鎖 RNA を再現性良くパターン化することが可能であった。マイクロチップ電気泳動装置は、ロタウイルスの異なる遺伝子型のパターンライブラリーを構築することで、パターン比較による全国規模のロタウイルスの分子疫学解析基盤となり得ると考えられた。しかし、装置の価格が高いことが導入に際して障害となることが予測された。現在、本装置が導入され

ている地研は、12 以上存在することも明らかになった。これらの地研をレファレンスブロック地研として活動を依頼し、本方法による分子疫学を推進する。

D. 結論

ノロウイルスの便検体パネルを充実させ、抗原・抗体パネルの整備を継続した。GII.4 2012 変異株の VLP と抗血清の作製を実施した。ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーが提唱した新規 genotyping 法に対応可能な long distance RT-PCR 法を開発した。ロタウイルスの全長ゲノムを対象とした分子疫学基盤構築のためのマイクロチップ電気泳動法導入に向け、基盤技術の構築を行った。

E. 健康危険情報

特記事項無し

F. 研究発表（英文論文発表のみ記載）

論文発表

1. Murakami K., Kurihara C., Oka T., Shimoike T., Fujii Y., Takai-Todaka R., Park YB., Wakita T., Matsuda T., Hokari R., Miura S., and Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. 2013 PLoS One, 14: e66534
2. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.

G. 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