

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

「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、2013年から2014年にポリネシアなど太平洋の島嶼国で流行していたジカ熱（Zika fever）は、デング熱とよく似た病状を呈するが、死に至ることは稀であるため、それ程注目されていない感染症であった。しかし、近年デング熱に紛れていた症例が見出されるようになった結果、時に大きな流行が報告されるようになってきた。その結果、フランス領ポリネシア・ボラボラ諸島から帰国した Zika 熱患者 2 例を確定診断した。また、8月にタイからの輸入症例も確定診断した。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。2015年には 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 系の非特異反応を抑える改良を行った。

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。デング熱とよく似た病状を呈するが、死に至ることは稀であるため、それ程注目されていない感染症としてジカ熱がある。しかし、デング熱流行地域では、デング熱に紛れている可能性もある。2013年から太平洋島嶼国でこのジカ熱（Zika fever）の流行が始まった。そのため、Zika ウイルスの実験室診断法を確立し、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 JEV は現在もブタから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 年代の初頭に 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、さらにデング熱患者検体を用いて評価し診断マニュアルに掲載した。

B. 研究方法

ジカウイルス (Zika virus) 表 1 のリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) を評価した。その結果を踏まえて、ジカ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、フランス領ポリネシアから帰国の輸入ジカ熱患者血清を用いて、IgM 抗体捕捉 ELISA 法を構築し、ジカウイルスとの交差反応性について検討した。

日本脳炎ウイルスに関しては、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。本年度は、ヒト血清 (デング熱患者血清) を用いて非特異反応の有無を検討した。

C. 研究結果

ジカ熱患者をウイルス学的に確定し、その血清を用いて、抗ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA 系を構築した。デング熱患者血清を用いて交差反応性を検証した結果、交差反応はわずかに示す患者血清が存在した。ジカウイルス検出用リアルタイム PCR 法のプロトコールを作成し、希望する地方衛生研究所には Zika ウイルス遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

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 型に対する型別検出系は確立され、十分な感度と特異性を有していた。しかし、E 領域に設定された 1-3 型共通検出系は非特異反応を来すことが多かった。そのため NS5 領域に設定した 1-3 型共通検出系を日脳疑い患者血清 (非日脳急性脳炎患者) を用いて評価を継続した。

D. 考察

ジカウイルス (Zika virus) は世界的に流行しているデングウイルスと同じフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで近縁なウイルスである。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。ジカ熱はデング熱やチクングニア熱ほどの世界的流行拡大傾向はみられていない。しかし、臨床症状がデング熱に似ている上に、抗原性もデングウイルスと近似である。したがってデング熱流行地域では流行があっても見過ごされている可能性がある。ジカウイルスも日本に生息するヒトスジシマカが媒

介可能とされている。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整えておく必要がある。そのため、希望する地方衛生研究所には Zika ウイルス遺伝子検出用陽性コントロールの配布を開始した。

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。

E. 結語

- 1) ポリネシアなど太平洋島嶼国で流行しているジカ熱の実験室診断系を確立し、アルボウイルスレファレンスセンターと情報共有した。3例の輸入症例を確定診断した。
- 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 系を改良した。

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、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、モイ メンリン、高崎智彦. オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス

感染症の本邦発報告. 感染症学雑誌. 88(2):155-159 (2014)

学会発表

国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26 年 6 月 30 日 (東京)
3. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第 46 回日本

- 小児感染症学会. 平成 26 年 10 月 18-19 日 (東京)
6. 高崎智彦. 緊急企画: 70 年を経ての再来～デング熱国内流行 2014. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成 26 年 10 月 23-25 日 (岡山市)
 7. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
 8. MoiMeng Ling, 白井顕治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
 9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
 10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに
なし
 3. その他
なし
- 対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10-12 日 (横浜市)
 11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るために～忍び寄る地球温暖化～」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
 12. 高崎智彦. ー市民公開講座ーデング熱これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
 13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー. 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
 14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ～70 年の時を経て～ (特別講演). 第 21 回リケッチャ研究会. 平成 26 年 12 月 20-21 日 (東京 国立感染症研究所)
 15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし.
 2. 実用新案登録

表1 Zika virus リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) プライマー、プローブ

	sequence (5' to 3')	genome position
ZIKV 835F	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857
ZIKV 860-FAM	FAM-CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG- TAMRA	860-886
ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102
ZIKV 1107-FA M	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA -TAMRA	1107-1137
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139

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	

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

リケッチア・レファレンスセンターの2014年度活動について

リケッチアMultiplex Realtime PCRの多施設間相互検証

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	川森文彦 千葉一樹 木村政明 山本徳栄 新開敬行 赤地重宏 滝澤剛則 寺杣文男 近平 雅嗣 濱野雅子、岸本寿男 島津幸枝 松本道明 御供田睦代 野町太朗 大橋典男 佐藤寛子	静岡県環境衛生科学研究所 福島県衛生研究所 青森県環境保健センター 埼玉県衛生研究所 東京都健康安全研究センター 三重県保健環境研究所 富山県衛生研究所 和歌山県環境衛生研究センター 兵庫県健康生活科学研究所健康科学研究センター 岡山県環境保健センター 広島県立総合技術研究所保健環境センター 高知県衛生研究所 鹿児島県環境保健センター 宮崎県衛生環境研究所 静岡県立大学(研究分担者) 秋田県健康環境センター

研究要旨 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の構築を目指している。発生するリケッチア症は、地域によって、つつが虫病、日本紅斑熱、その両方、また発生時期等に差があるものの、現在のリケッチア症の国内での広がりを考慮すると、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましい。このことから、本年度は日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病オリエンチアを同時に検出できるmultiplex realtime PCRについてその特異性、汎用性、また様々な血清型等が混在する各地の臨床検体を用いてその有効性と、各施設での再現性について検討した。その結果、検討したmultiplex realtime PCRは、国内のリケッチア症の遺伝子検出スクリーニングに有効である事が示された。

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

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。発生するリケッチア症は、地域によって、つつが虫病、日本紅斑熱、その両方、また発生時期等に差があるものの、現在のリケッチア症の国内での広がりを見れば、いずれの地域でも同レベルで確実な検出技術を有することが望ましいことから、研究班 2 年目は日本紅斑熱を含む紅斑熱群リケッチアとつつが虫病オリエンチアを同時に検出できる multiplex realtime PCR の有効性について、各施設間で検証を行った。

B. 研究方法

1. 全国共通となる検査法の評価 multiplex real time PCR

静岡県環境衛生科学研究所において検討していた multiplex realtime PCR はつつが虫病 *Orientia tsutsugamushi* と日本紅斑熱リケッチア *Rickettsia japonica* の 16S rRNA の 120bp の領域を標的とし、二つのプライマーにオリエンチアとリケッチアそれぞれに対するプローブ (FAM 標識と VIC 標識) を用いたものである (現在、投稿準備

中のため、本報告書ではデザインを記載しない。)。感染研においては、*O. tsutsugamushi* の各種血清型標準株 (Karp, Gilliam, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi) 他国内に分布する各種血清型、輸入感染症も考慮した各種リケッチア種 (*R. japonica*, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. prowazekii*, *R. typhi* 他) との特異性、汎用性、反応性を検討し、衛研のリケッチア・レファレンスセンターを中心に各地で発生した様々な血清型のつつが虫病や日本紅斑熱患者材料について、定法となっているコンベンショナル PCR と血清診断を並行して検査を実施し、臨床現場での有効性、再現性について検討した。

2. 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。

(倫理面からの配慮について)

臨床検体の取り扱いについては、各施設の検査と並行し、それぞれの施設の取り扱いによって行った。

C. 研究結果

1. multiplex realtime PCR の特異性と汎用性

表 1 に示す通り、標準血清型の各 *O. tsutsugamushi* は全て検出可能であった。また、発疹チフス群で日本を含め世界中で今なお発生する *R. typhi*、リケッチア目に含まれる *Anaplasma phagocytophilum*、*Ehrlichia chafensis* は検出できなかったも

の、非病原性、マダニの共生体とも考えられている LON type を含めた検討した全ての紅斑熱群リケッチアが検出可能であった。

2. 臨床検体に対する有効性

表 2 に一部示す通り、つつが虫病、日本紅斑熱のそれぞれの患者検体に対し、血清診断やコンベンショナル PCR と同等以上の検出率、適性を示した。

3. 全国情報の共有と担当者スキルアップ

前年度と同様、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を積極的にすすめ、より深い情報の蓄積を継続している。

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、各地域の中心となり、各地域を横に繋ぐために、さまざまな機能が期待されている。研究班 2 年目においては、その中の新規診断法等の相互評価（標準化）を目的に、つつが虫病と日本紅斑熱を同時に検討する multiplex real time PCR について多施設間での評価検討を行った。

近年の国内におけるつつが虫病における Shimokoshi 型の発生地域の拡大、紅斑熱群リケッチア症の多様化から、従来のコンベンショナル PCR 系ではシーケンス解析まで行わないと、型別ならびに種別の鑑別ができず、迅速に対応できないケースが想定されている。つつが虫病も日本紅斑熱も

治療においてはテトラサイクリン系抗菌薬により可能である事から、まずスクリーニング的にリケッチア症であるかを確定することが発生時の実験室診断に負担とならない。今回、多施設間で検討した multiplex real time PCR は、型間、種間の鑑別はできないものの、標準株等を用いた検討ではすべての型が検出可能であった。また、*R. japonica* の全ゲノム解析情報から設計したプローブは、検討した紅斑熱群リケッチア種の全てが検出可能であった。紅斑熱群リケッチアでは多種を検出することになるが、患者が多い日本紅斑熱 *R. japonica* のみならず、一例報告のみであるが、国内での患者発生が今後もありうる *R. tamurae*、*R. heilongjiangensis* も検出可能である事から、臨床現場に近い衛研の一次スクリーニング検査法として迅速対応に適用できるものと考えられる。さらに、臨床検体を用いた検討でも、コンベンショナル PCR、血清診断での結果とも一致、検体によっては同等以上の検出結果を示した。今回の多施設間での評価においては用いたプローブ標識を測定可能であれば特に測定機器を選ばなかった事から、応用範囲は広いと考えられる。昨今、多様な感染症検査に対応を求められる衛研においては、単発症例として検査依頼が多いリケッチア症の検査をできるだけ負担を少なくかつ確実に診断していく上で、有効な検査系である。

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発生状況が不明な発疹熱対応体制、民間検査所ではできない血清診断への対応などまだまだ課題は多いが、レファレンスセンターを中心とした地域内、レファレンスセンター同士を結び付けた地域間の全国的なネットワークを維持する事が、決して少なくない、また対応の遅れにより

いまだ死者をだすリケッチア症対策の基盤となる事が期待できる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 安藤秀二，リケッチア，平松啓一監修、中込治、神谷茂編集，標準微生物学，第12版，p307-315，2015年2月

学会発表

国内学会

1. 山本徳栄、近真理奈、伊佐拓也、杉山 郁、根岸 努、新井陽子、小山雅也、三田和正、岸本寿男、安藤秀二：埼玉県内のイヌ、ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価—第3報—、第21回リケッチア研究会、平成26年12月20-21日、東京
2. 御供田睦代、岩元由佳、中堂園文子、岩切忠文、福盛順子、藤田博己、山本正悟、角坂照貴、高橋 守、川端寛樹、本田俊郎、坂元修治、蔵元 強、北野智一、矢野浩二、藤田信子、島崎裕子、門馬直太、安藤匡子、高野 愛、矢野泰

弘、糸川健太郎、田原研司、及川陽三郎、川森文彦、大橋典男、高田伸弘、安藤秀二：薩南諸島のリケッチア症について、第21回リケッチア研究会、平成26年12月20-21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

表1. 各種リケッチアとの反応性の検討

Species	Strain	Isolation source	Multiplex realtime PCR
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Gilliam	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Karp	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kato	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kawasaki	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Kuroki	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Shimokoshi	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	JP-2-Sato	Human	+(Ot-FAM)
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	JG-Kasei	Human	+(Ot-FAM)
<i>Rickettsia asiatica</i>	IO-1	<i>Ixodes ovatus</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia conorii</i>	Malish 7	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	CH8-1	<i>Haemaphysalis concinna</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia helvetica</i>	IP-1	<i>Ixodes persulcatus</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia honei</i>	TT-118	<i>Ixodes</i> sp.	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia japonica</i>	YH	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia japonica</i>	FT	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Sheila Smith	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia sibirica</i>	246	Human	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia tamurae</i>	AT-1	<i>Amblyomma testudinarium</i>	+(Rj-VIC)
<i>Rickettsia typhi</i>	Wilmington	Human	-
<i>Rickettsia</i> sp. LON	LON-2	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	+(Rj-VIC)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			-
<i>Ehrlichia chaffensis</i>			-
<i>Ehrlichia muris</i>			-

表2. 血清学的にリケッチア症と確定した臨床検体を用いた検証

Patient no.	Serodiagnosis by the indirect immunofluorescent test	Specimen	Multiplex real-time PCR		<i>O. tsutsugamushi</i> nested PCR	
			Ot-PAM	Rj-VIC		
1	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	37.2 ^a	Negative	Positive	
		Escher	30.0	Negative	Positive	
2	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	41.0	Negative	Negative	
		Escher	25.6	Negative	Positive	
3	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	34.4	Negative	Positive	
		Escher	28.8	Negative	Positive	
4	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	33.8	Negative	Positive	
		Blood	28.6	Negative	Positive	
5	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	28.0	Negative	Positive	
		Blood clot	33.8	Negative	Positive	
6	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	31.5	Negative	Positive	
		Blood	32.0	Negative	Positive	
7	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	25.5	Negative	Positive	
		Escher	23.5	Negative	Positive	
8	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	35.8	Negative	Positive	
		Escher	27.0	Negative	Positive	
9	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	36.1	Negative	Positive	
		Escher	24.4	Negative	Positive	
10	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	Negative	
		Escher	22.6	Negative	Positive	
11	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	31.9	Negative	Positive	
		Blood	37.0	Negative	Positive	
12	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	36.0	Negative	Positive	
		Blood	37.9	Negative	Positive	
13	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	33.5	Negative	Positive	
		Blood	35.6	Negative	Positive	
14	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	25.8	Negative	Positive	
		Blood	39.0	Negative	Negative	
15	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	30.8	Negative	Positive	
		Blood	38.8	Negative	Positive	
16	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Escher	27.9	Negative	Positive	
		Blood	29.5	Negative	Positive	
17	<i>O. tsutsugamushi</i> positive	Blood	Negative	Negative	Negative	
		Escher	33.0	Negative	Positive	
21	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	29.5	NT	
		Blood clot	Negative	30.1	NT	
		Escher	Negative	31.3	NT	
22	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	37.1	NT	
		Blood clot	Negative	32.7	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
23	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	38.8	NT	
		Escher	Negative	26.5	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
24	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	36.5	NT	
		Blood clot	Negative	34.5	NT	
25	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	28.5	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	24.7	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	31.9	NT
26	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT
27	<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood clot	Negative	37.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	36.3	NT
28	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	31.0	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	40.1	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	38.9	NT
29	<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	Negative	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	35.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Blood	Negative	35.9	NT
30	<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	26.3	NT	
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	30.3	NT
		<i>R. japonica</i> positive	Escher	Negative	29.8	NT
31	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
32	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
33	Negative	Escher	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood clot	Negative	Negative	NT	
34	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
35	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
36	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
37	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
38	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
39	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
40	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
41	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
42	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
43	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
44	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
45	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
46	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
47	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
48	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
49	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
50	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
51	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
52	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
53	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
54	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
		Blood	Negative	Negative	NT	
55	Negative	Blood	Negative	Negative	NT	
		Escher	Negative	Negative	NT	

^a Spotted fever group rickettsia.

^b Threshold cycle (Ct).

^c Not tested.

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
	藤井克樹	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。ロタウイルスは乳幼児の重症下痢症のウイルスとして知られている。本研究では、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行っている。

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、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、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 法の普及活動を行った。また、ロタウイルス検出マニュアルの作成、全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学ツールとして、マイクロチップ電気泳動法導入へ向けた基礎検討を行った。

B. 研究方法

1. ノロウイルスの抗原・抗体パネルの整備を継続（GII.4 バリエントの VLP 特異的モノクローナル抗体の作製）

ノロウイルス GII.4 には、2000 年以降 2005 年までに流行したバリエント、2006/7 年に史上最大の流行を起こした 2006b バリエント、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 のバリエント株がある。それぞれのバリエントは、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、その抗原性をわずかに変化させ、流行を引き起こしたと考えられている。

GII.4 2004 (Narita104)、2006a (Saga-1),

2006b (Aomori), 2008a(Sakai), 2012 変異株(NI, LM)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た。それぞれのバリエーションのウイルス様中空粒子 (VLP) の作出を行った後、これらを用いてモノクローナル抗体を作製した。

2. 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 法の普及活動

1) IASRS 月号にノロウイルスの遺伝子型 2014 年度版を執筆した。

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、粒子最外層蛋白質をコードするVP7 遺伝子がG typingに、最外層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の検討を昨年につき、検討した。

4. ロタウイルス検出マニュアルを執筆した。

C. 研究結果・考察

1. ノロウイルスの抗原・抗体パネルの整備を継続 (GII.4 バリエーションの VLP 特異的モノクローナル抗体の作製)

GII.4 2004 (Narita104)、2006a (Saga-1)、2006b (Aomori), 2008a(Sakai), 2012 変異株(NI, LM)のリコンビナントバキュロウイルスから、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作出に成功した。これらを用いてモノクローナル抗体を作製したところ、全てのバリエーションに反応するモノクローナル抗体とバリエーション特異的なモノクローナル抗体の作出に成功した。バリエーション特異的モノクローナル抗体は、便検体のバリエーションを判定するために有用であると思われた。

これらのシードウイルスとモノクローナル抗体は、パネルとして保管した。

2. 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 法の普及活動

従来の genotyping 法は、ウイルスキャプシド蛋白質をコードする ORF2 領域の上流約 300 塩基を標的としており、ウイルスの抗原性の違いを反映する方法として広く用いられてきた。一方、新規 genotyping 法は従来の領域に加え、非構造蛋白質コード領域での genotyping も可能とした。ORF1/ORF2 ジャンクション領域で多発する

ノロウイルスゲノムの組換えにより生ずるキメラウイルス(ゲノム組換えにより、ORF1とORF2より下流では異なる genotype となるウイルスのこと)を考慮した方法として開発された。この genotyping は、Web に (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) に公開されているツールを用いて簡単に、誰でも実施することができる。

そこで、IASR に従来の genotyping 法と、新規 genotyping 法の genotype 番号対応表を作り、同時に genotyping tool の解説を加えたノロウイルス特集号を発行し、どちらの typing を行っても、互換性のあるデータが得られるようにした。さらに、レファレンス活動報告を通じて、これらの解説と互換表を配布し、国内における genotype 法規方法に関する啓発活動を展開した。

現在、次年度に向け RdRp 領域の genotyping 法の意義づけを行うため、各種 genotype の RdRp 活性の比較測定を計画している。

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

昨年の検討では、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た。しかし、アッセイ間変動の値を詳細に取り直したところ、移動度の近似している 3 本のバンドの移動度が誤差の中に吸収されてしまい、型判別が困難になる場合があることが分かった。この原因は、移動度測定に用いる泳動先端のマーカーと泳動後端のマーカーが

DNA であり、二重鎖 RNA の移動度を計算するための指標に成り得ないことが一因であった。そこで、x 軸方向に泳動で得られた波形を伸び縮みさせ、ピークのパターンを一致させるパターンフィッティングの手法を用いて RNA-PAGE のグループ化を実行したところ、同一配列は、ほぼ 100% 同じパターンを示すことが示された。つまり、従来のように 11 本のバンドの相対移動度を泳動先端と泳動後端マーカーから算出して数値化する方法よりも、X 軸方向に伸び縮みさせパターンのフィットを図り、一致したパターンを示した検体を、同一配列の検体として分別する方法(数値では無く、画像をベースにする)によるタイピングが優れていることが明らかになった。この方法を RNA-PAGE パターンフィッティング法と命名した。現在、国内外の標準株、臨床分離株を入手し、パターンの蓄積、自動判定ソフトウェアの開発を行っている。

4. ロタウイルス検出マニュアルを執筆した。

本年度までに構築した各種ロタウイルス試験法については、ロタウイルス検出マニュアルとして配布すると共に、感染研ホームページに記載した。また、啓発・普及活動としてレファレンス活動報告、稀少感染症技術研修での報告活動を実施すると共に、IASR にロタウイルス特集を組み、出版した。

D. 結論

以上をまとめると

- (1) ノロウイルス・サポウイルスの糞便パネルを充実させ、バリエーションに対するモノクローナル抗体を作製した。
- (2) マイクロチップ RNA-PAGE を用いたロタウイルス分子疫学手法にパターンフィッティングの手法を導入した。

(3) ロタウイルス検査マニュアルを完成させた。

(4) ノロウイルス・ロタウイルスの IASR 特集号を出版し、啓発活動を行った。

E. 健康危険情報

特記事項無し

F. 研究発表（論文発表のみ記載）

論文発表

1. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y. H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.
2. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* doi: 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.
3. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One.* 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.
4. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol.* 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.
5. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* 174, 577-583, 2014.
6. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.
7. 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014 年版 IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.
8. ロタウイルス検出マニュアル 2014 年版 国立感染症研究所・病原体検出

マニュアル

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

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

腸管ウイルス感染症（下痢症ウイルス、エンテロウイルス等）のレファレンス

研究分担者 清水博之 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究実施者： 吉田弘 国立感染症研究所ウイルス第二部
エンテロウイルスレファレンスセンター：

福島衛研（北海道・東北・新潟）、神奈川衛研（関東・甲信・静岡）、愛知衛研（東海・北陸）、神戸市環保研（近畿）、愛媛衛環研（中国・四国）、福岡保環研（九州）

WS講師：濱崎光宏（福岡保環研）、山下育孝（愛媛衛環研）

WS参加者（8名）：荒畑沙織（静岡県）、水村綾乃（千葉市）、清水耕平（横浜市）、杉本大地（奈良県）、高橋剣一（名古屋市）、村田達海（北九州市）、辰己智香（島根県）、古舘大樹（札幌市）

研究要旨 初年度実施したエンテロウイルス検査に関するアンケート調査に基づき、内部精度管理技術ワークショップ（WS）を実施した。WSの狙いは①細胞感受性試験、②マイコプラズマ否定試験、の標準作業手順書のひな形を参加者とともに作成することとした。WSは11名が参加（うち8名は公募）し、2泊3日で実施。制度として普及するために、①SOPの項目の検討、②教材、SOP案の作成、③持続可能な実施スケジュールの検討、④標準参照品の供給体制の確立（含む保管）、⑤意義を理解する目的の精度管理導入研修、など検討してゆく必要性が認められた。

A. 研究目的

感染症発生動向調査事業における5類病原体定点把握疾患としてエンテロウイルス感染症とインフルエンザは、地方衛生研究所で実施するルーチン検査の上で多くの比重を占めている。

初年度は各ブロックレファレンスセンターとの協力の下、79地方衛生研究所に対し検査体制に関するアンケート調査を行った。

うち67衛研からの回答では、エンテロウイルス検査に関する基盤的技術の研修要望が多かった。このため2年目は、検査の信頼性確保のため、地衛研職員との共同作業によりエンテロウイルス検査に関する内部精度管理に関する研修、マニュアル作成のためのワークショップを企画し実施することとした。

B. 研究方法

1. エンテロウイルス検査に関するワークショップの企画

2014年6月26-27日に開催された衛生微生物技術協議会にて、ワークショップの開催について周知

8月WS企画調整

9月8-15日レファレンスセンターとの調整期間。

9月16-25日レファレンス委員会内の調整

9月25日地全協感染症部会より全衛研へ发出

10月10日募集締め切り（各ブロック）

10月30日結果通知

12月2-5日WS開催

2. 教材準備

1) 細胞感受性試験には 1 型ポリオワクチン株 (Sabin1) を使用。WHO ポリオラポネットワークで用いる標準法にて SOP 案を作成し、WS 期間中 2 種類の細胞の感受性を比較。

2) 細胞は感染研で用意した RD-A, L20 B 細胞と、参加者が持参した細胞を比較できるようにアレンジした。(WS 終了後は研究実施者が観察を継続し、参加者に結果返付)

3) マイコプラズマ否定試験は感染研で実施するプロトコールをもとに SOP 案を作成した。細胞感受性試験用に感染研で準備した検体と、参加者が持参した検体から 2 種類のキットを用いて検出するようデザインした。

4) 細胞培養浮遊液 50ul を 95 度 10 分処理後、従来用いている①タカラマイコプラズマ PCR キットと②e-Myco Plus Mycoplasma PCR 検出キット (コスモ扱い) を用いてマイコプラズマ感染の有無を比較した。なお①は主に 11 種、②は 209 種類検出できるとされている。

5) 細胞の品質管理 (QC) に関する教材は別途準備した。

6) 感受性試験、マイコプラズマ否定試験とも、感染研で用いている細胞との比較のため、任意で持参することを事前に周知している。

C. 結果

1) WS 応募結果

定員 6 名の募集に対し。九州 (7)、中国四国 (3)、近畿 (1)、北陸中部 (1)、関東甲信静 (5)、北海道東北新潟 (3) 計 20 人の応募があった

予算上(旅費)の制約から 6 名としたが、研修実施を行う村山庁舎への通勤可能な応募者にも協力いただくこととした。結果 8 名の参加者と 3 名の講師で WS を開催した。

2) 内部精度管理試験と SOP ひな形作成 エンテロウイルス検査に必要な細胞の QA に関する資料説明後、WS 前に準備した SOP 案に基づき実習。

実習後、グループディスカッションにより改定した SOP を成果品とした。

3) 細胞感受性試験

同一力価の Sabin1 を使用し、現在感染研で使用する RD-A と過去分与した細胞 (持参した RD-A) をすることで、明確に感受性の違い、と形態の変化につき比較可能であった。また力価試験であるため、細胞の状況を定量的な指標として示すことが可能である。

4) マイコプラズマ否定試験

タカラマイコプラズマ PCR キットと② e-Myco Plus Mycoplasma PCR 検出キット (コスモ) を用いて、使い勝手の良さ、につき評価するため参加者が持参した細胞浮遊液など用いて、比較試験を行った。RD-A, L20B ではいずれもマイコプラズマ汚染は見られなかったが、一施設が提供していただいた、RD-A, L20B 以外の 2 種類の細胞では、タカラのキットは陰性、コスモのキットは陽性という結果になった。これは検出対象とする種類が大きく異なるためと考えられる。

5) 細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験の SOP について、実習終了後グループディスカッションを行い、ひな形を作成した (別添資料)。しかし SOP の項目について現状基準がないため、今後検討が必要である。なお追加すべき SOP は、細胞継代法、細胞数カウント法、培地作成法、細胞保存・リカバリー法、であり、分担して今後 SOP 案を作成する予定としている。

D. 考察

(1) 初年度実施したアンケート調査では、ウイルス分離に用いる細胞の種類、維持、

継代法が施設間で大きくことなっていることを示した。このことはウイルス分離率に影響が想定される。WS 期間中、複数の機関で維持されている同じ系統の細胞が、異なる感受性、形態を示すことを参加者が認識。ウイルス分離における細胞の維持管理の重要性を認識する機会となっている。

(2) マイコプラズマ否定試験も細胞維持管理において重要なファクターである。今般二つのキットを比較することで、ひとつの施設が提供した細胞 2 種類でマイコプラズマ汚染が確認されている。マイコプラズマ否定試験を制度として位置付けるためには、汚染が見つかった時の措置の検討、特に細胞保管、新たなシード細胞の供給体制を確立する必要がある

(3) 細胞感受性試験におけるウイルス力価に与える影響は細胞のみならず、参照ウイルスの保管温度条件、FBS ロット、他様々な要因が存在するため、制度として位置付けるためには、各種標準品の保管、供給体制の確立も必要である。

(4) 内部精度管理は、意義を理解しないと、ワークロードが増えるだけで形式的になる恐れがある。初年度のアンケート調査により、細胞感受性試験、マイコプラズマ否定試験とも導入している施設はごく一部であったため、制度として普及するために、① SOP の項目の検討、②教材、SOP 案の作成、③持続可能な実施スケジュールの検討、④標準参照品の供給体制の確立（含む保管）、⑤意義を理解する目的の精度管理導入研修、など検討してゆく必要がある。

なおエンテロ・ポリオウイルスに関しては WHO が提供する RD-A, L20B 細胞が利用できるため感染研ウイルス二部ですでに実施している品質管理試験後、供給可能である。

(5) WS には 20 名の応募があり 8 名のみ参

加いただいた。参加者が問題を発見し、グループディスカッションで討議をおこなう参加型研修コースは今後も実施につき検討する必要がある。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1) 北川和寛 千葉一樹 鈴木理恵 五十嵐郁美 柏木佳子 金成篤子, 吉田学, 笹原賢司, 門馬直太, 吉田 弘 無菌性髄膜炎患者から検出されたエコーウイルス 9 型、2002～2013 年—福島県, IASR Vol. 35 p. 249-250: 2014 年 10 月号

2) 伊藤雅, 岩切章, 内野清子, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 板持雅恵, 筒井理華, 濱崎光宏, 山崎謙治 中田恵子, 吉田弘 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4～12 月) に検出されたエンテロウイルスについて. IASR Vol. 35 p. 275-276: 2014 年 11 月号”

3) 筒井理華 古川紗耶香 木村政明 工藤真哉 笹けい子, 吉田弘 無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス 30 型の検出—青森県, IASR Vol. 35 p. 242-243: 2014 年 10 月号

4) 島津幸枝、久常有里、池田周平、東久保靖、谷澤由枝、重本直樹、高尾信一、米倉圭二、白石泰尚、谷博雄、原三千丸、吉田弘 エンテロウイルス D-68 型が検出された小児・乳児の 4 症例ー広島県 IASR Vol. 35 p. 295- 296: 2014 年 12 月号

学会発表

なし

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

検査実施標準作業書

SUP No. XXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 マイコプラズマ汚染否定試験

試験法 PCR法によるマイコプラズマゲノムの検出

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 山田太郎

承認者 数寄屋様次郎
(検査部責任者)

実施日 平成 年 月 日

○○○研究所
○○課

細胞感受性試験標準作業書

- 検査の項目
マイコプラズマ汚染否定試験
- 試験品の種類
培養細胞
- 検査法
原理：細胞培養液の上清について、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いたPCRでマイコプラズマ遺伝子を検出する。判定は電気泳動でPCR産物の有無で行う。
出典：タカラバイオ社製PCR Mycoplasma Detection Setの取扱説明書
- 検査等に用いる試薬
① PCR Mycoplasma Detection Set: TAKARA
② 蒸留水
- 検査等に用いる機器・器具及び器材
1) 機器・器具
① 炭酸ガス培養装置
② ボルテックス
③ 冷却离心机
④ サーマルサイクラー
⑤ マイクロ冷却离心机
⑥ マイクロピペット
⑦ チューブオープナー
2) 器材
① マイクロチューブ(1.5ml)及びマイクロチューブラック(冷蔵冷凍用)
② フィルター付き滅菌チップ(p=2, 10用, p=20用, p=100用, p=200用, p=1000用)
③ PCR用チューブ・蓋及びチューブラック(冷蔵冷凍用)

6 作業環境、操作上の注意

- 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
- 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、チューブの口を開ける時はその前に軽く遠心し、チューブオープナーを使用すること。
- 試薬の調整は試薬専用のクリーンベンチ内で行うこと。その際クリーンベンチのファンを止め、コンタミ防止、EtNase及びRNaseの侵入防止に細心の注意を払うこと。

検査実施標準作業書

[マイコプラズマ試験]

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成26年 月 日	山田太郎	数寄屋様次郎	
第1回改訂	平成26年 月 日	浦島太郎	山田太郎	検出キットの変更
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				

○○○研究所

○○課

4) 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
試験品の前処理	無菌室(病原体取扱室)
試薬の調製	専用クリーンベンチ
PCR	化学実験室
電気泳動	化学実験室

5) 作業工程の検体は、検査工程管理チェックシート(別添No1-3)で確認する。

7 検査法

- PCR反応に使用する試薬は、全てキットに付属のものを用いる。
- 試験品の前処理
 - 産代後、3~6日間細胞培養を行った培養上清1mlを1.5mlのマイクロチューブに移す。
 - 3000rpm×10分遠心、上清を検査に用いる。
 - 上清を94度、5分加熱後、冷却(4度)、検査を当日行わないなら-20度保管
 - 試薬の調製
 - 表1に従いPCRカクテルを調整する。冷却用ラックを用いる

表1 1×PCR反応液の調整

試薬	容量
10×PCR Buffer	5μl
dNTP Mixture	4μl
MCCp F1 Primer	0.5μl
MCCp R1 Primer	0.5μl
Taq DNA Pol	0.25μl
Distilled water	34.75μl
Subtotal	45μl
細胞培養上清	5μl
Total	50μl

- サーマルサイクラーの電源を入れる
- PCRチューブのラベリング(サンプル番号、器種、陰性コントロール)
- PCR用チューブに反応液を45μlずつ分注する。
- 細胞培養上清5μlを加え、しっかりと蓋を閉める。
- 別のPCRチューブに陰性対照として水5μlを加え、しっかりと蓋を閉める。
- PCR用8連チューブを速やかに転倒混和した後にスピンドルダウンする。
- 8連チューブをサーマルサイクラーにセットする。
- 液晶画面でマイコプラズマ検査プログラムを選択する。反応条件は、94℃で30秒後、[94℃、30秒間-55℃、2分間-72℃、1分間]を30サイクル後に4℃に保持する。
- "RUN"を選択し反応容量を入力する。50μl

14. 反応が終了したら PCR 用チューブを取り出しサーマルサイクラーを止める。
 ・電気泳動
 15. 25%アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の鑑別を行う。

8 結果判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陰性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること、370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性。バンドが確認できないものは陰性と記載する。

作成上の留意点

作業に用いる機器、基材、消耗品、試薬名などは各検査室の状況にあわせ、名称、操作方法など変更訂正する。

マイコプラズマ検出には PCR のほか、リアルタイム PCR、IF など別の原理で測定できる各種キットが販売されている。キットの種類により操作方法、判定法など適宜変更する。

電気泳動、細胞培養についても別途、マニュアルあるいは SOP の作成が望ましい

細胞の調製 (検査に用いた種類を記載)

- ①使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ②使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ③使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ④使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ⑤使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;

PCR 開始日時: 試験実施者

10 × PCR Buffer	5µl	×	=	µl
dNTP Mixture	4µl	×	=	µl
MCGp F1 Primer	0.5µl	×	=	µl
MCGp B1 Primer	0.5µl	×	=	µl
TaKaRa Taq	0.25µl	×	=	µl
Distilled water	34.75µl	×	=	µl
Subtotal	45µl		=	µl

45 µl ずつ分注し、細胞培養上清を 5 µl 加える

94°C	30 秒	
↓		
94°C	30 秒	
55°C	2 分	30cycle
72°C	1 分	
↓		
4°C	∞	

使用した試薬又はキット:
 タカラバイオ PCR Mycoplasma Detection Set Lot.

電気泳動

25%アガロースゲル

調製日:

開始日時:

試験実施者



(レーンの説明)

結果の判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陰性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること、370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

結果判定表

結果判定表

検体番号	判定

判定

測定日時: 判定者:

細胞感受性試験(ひな形)

〇〇〇〇研究所
〇〇部 〇〇課
検査実施標準作業書

検査実施標準作業書(ひな形)

[細胞感受性試験]

SOP No. XXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 細胞感受性試験

試験法 参照ウイルスを用いた力価試験

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ウィルス課 山田太郎

承認者
(検査部門責任者)

実施日 平成 年 月 日

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成26年 月 日	山田太郎	木下静吉郎	
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				

細胞感受性試験標準作業書

- 1 検査の項目
ポリオウイルスに対する細胞感受性試験
- 2 試験品の種類
RD-A細胞およびL20B細胞
- 3 検査法
原理：弱毒参照ポリオワクチン株（B.S.L.1）を用いて力価試験を行う。
出典：World Health Organization. Polio Laboratory manual 4th edition, WHO/TYD/04.10, page 73-79, 2004
- 4 検査毎に用いる試薬
試薬
① イーグルMEM培地：和光(薬番)
② FBS(-)：和光(薬番)
③ FBS：シグマ
④ EDTA-トリプシン溶液：シグマ(薬番)

⑤ トリパンブルー溶液：シグマ(薬番)
※培地作製については、「培地作製標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
参照ウイルス
弱毒参照ポリオワクチン株（NIHSC株）
※参照ポリオウイルスの調製（in house 参照ウイルス）、保管条件は「培地作製標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
- 5 検査毎に用いる機器・器具及び器材
1) 機器・器具
① 脱炭ガス培養装置（バナソニックヘルムスケア）
② 顕微鏡（ニコン）
③ ボルテックス（デルタミキサー-08）
④ マイクロピペット
⑤ 数取器
⑥ 試験管立て
⑦ マルチチャンネルマイクロピペット

- ⑧ 冷蔵庫
⑨ 冷蔵庫
- 2) 器材
① 細胞培養用96穴マイクロプレート
② 15ml 滅菌チューブ
③ 細胞培養プラスチック 25cm²
④ ビルケルチュルク血球計算盤
⑤ フィルター付き滅菌チップ（φ=200用, p=1000用）
⑥ 25ml リザーバー

5 作業環境、操作上の注意

- 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
- 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こと。
- 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
細胞の調製	無菌室（細胞調製室）
ウイルス接種	無菌室（病原体取扱室）
CFEの観察	無菌室（病原体取扱室）

4) 作業工程の地図は、検査工程管理チェックシートで確認する。

7 検査法

- カルチャーボトルの培養液を捨てる。
- FBSで細胞を3回洗浄する。
- トリプシン溶液を1ml加える。
- トリプシン溶液で細胞を消化したあとトリプシン溶液は捨てる。
- 細胞がすべて壁面から剥がれたのを確認し、10%細胞懸濁液培地5mlで懸濁し細胞懸濁液とする。（注：懸濁時、泡が立たないようにする。）
- 細胞懸濁液とトリパンブルーを等量混合する。
- ビルケルチュルク血球計算盤の片側に5の混合液10μlを入れ、顕微鏡下で細胞を計測する。

8. $1 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml になるように細胞懸濁液を希釈する。
9. 10^3 から 10^8 までの希釈系列用チューブを準備する。
10. それぞれのチューブに 2ml 細胞維持培地を 9ml 入れる。
11. マイクロピペットを用いて 10^4 と記載されたチューブにウイルス溶液 1ml 加え 10 回転倒混和でよく攪拌し 10^3 希釈とする。
12. 10^8 希釈まで同様に調整する(図 1)。
13. 10^8 から 10^3 まで希釈したウイルス溶液 100 μ l をウェル番号 1 から 10 番に 2 列ずつ計 20 回に加える(図 2)。
14. 100 μ l の 2nd細胞維持培地をウェル番号 11 と 12 番すべてに加えて細胞コントロールとする。
15. すべてのウェルに $1 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml の細胞懸濁液を 100 μ l 加える。
16. プレートに蓋をして、36°C、5%炭酸ガス存在下で培養する。
17. 7 日間観察し、毎日、CPE の出現を記録する。
18. ウイルス力価を Kärber の式を用いて計算する(例 1)。
19. 求めたウイルス力価の log 値が内部基準の ± 0.5 の範囲に入っていることを確認する。

図 1

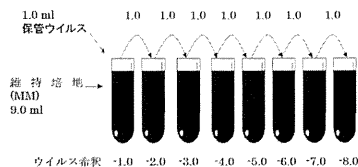
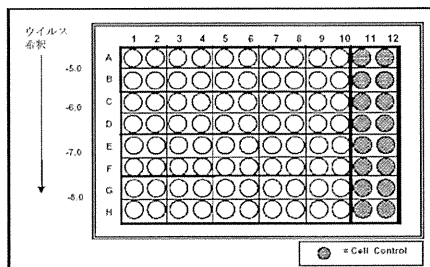


図 2



8 結果判定

In house 参照ウイルス株のウイルス力価の log 値が内部基準の ± 0.5 の範囲ならば合格、再度試験を行っても範囲外ならば細胞のリカバリー、あるいは新たな細胞入手、ウイルス保管温度管理条件等を検討し適切な対応をとること。

作成上の留意点

培地作製、in house 参照体の調整方法、保管方法は「試験などの調整」の項で別の SOP を作成する。特に in house 参照株の保管は温度管理モニター導入が望まれる。

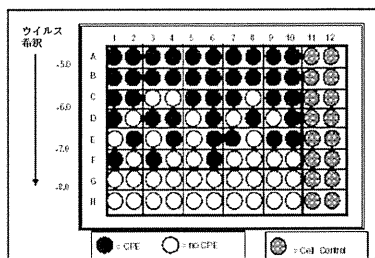
ウイルス同定時のウイルス力価測定試験の SOP は異なる。

細胞の保存、リカバリー、継代の SOP は、「試験などの調整」の項で SOP を作成すること。

別紙

Kärber 法によるウイルス力価の計算

公式 $\log CCID_{50} = L - d(S - 0.5)$
 L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)
 d = 各希釈倍率間(対数)の差;
 S = 各希釈倍率における、CPE が出現したウェル数の比率



-5: 20/20=1
 -6: 13/20=0.65
 -7: 9/20=0.45
 -8: 0/20=0

上記の結果を得た時の、計算例

(20ウェル中何個のウェルにCPEが現れたか数え、比率を求め、各希釈列の割合を足す)
 $L = -5.0$; $d = 1.0$; $S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.1$;
 $\log CCID_{50} = -5 - 1(2.1 - 0.5) = -6.6$
 ウイルス力価 = $10^{6.6} CCID_{50} / 0.1$ ml

5 発性試験工程管理チェックシート

No. 1

細胞の調製

① 使用細胞(継代数): _____ 継代日(実検定): _____

② 使用細胞(継代数): _____ 継代日(委検定): _____

開始日時: _____ 試験実施者: _____

1. ガルナーボトムの培養液を捨てる
2. PBS で細胞を洗浄する。
3. トリアフィン溶液を 1ml 加える。
4. トリアフィン溶液で細胞を洗い出したトリフィン溶液は捨てる。
5. 全ての細胞が脱落したのがわかるまで細胞を洗浄し細胞懸濁液とする。
6. 細胞懸濁液をトリフィンブルーで染色混合する。
7. セルカウント用計算用紙の穴に 1ml の細胞懸濁液を入れ、顕微鏡下で細胞を計数
8. $1 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml になるように細胞懸濁液を希釈する。

検体番号	細胞数		1ml 当たりの細胞数	希釈	培地
	実測	平均			

使用した試薬又はキット

イグA/MEM Lot: _____ 使用期限: _____

トリフィン Lot: _____ 使用期限: _____

PBS Lot: _____ 使用期限: _____

FBS Lot: _____ 使用期限: _____

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

麻疹検査診断法（RT-PCR法）の外部精度管理（EQA）法の検討

研究分担者 竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第3部部長

研究協力者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長

研究要旨 麻疹はWHOが排除を目指す感染症であり、排除認定には検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制が求められている。また「麻疹に関する特定感染症予防指針」において全数の遺伝子検査が求められている感染症である。現在、地衛研で実施されている麻疹の遺伝子検査（RT-PCR法）の質を担保する目的で外部精度管理（EQA）法を検討し、EQAとして検査感度、特異度、遺伝子解析技術について実施する事とした。またEQAに用いるRNAを含む検体を安定的に、かつ安価に少ない労力で送付する方法を検討した。これらの方法を用いて精度管理を試行し、今後の麻疹検査診断法の精度管理法についてさらに検討していく予定である。

A. 研究目的

麻疹は天然痘、ポリオに続き WHO が排除を目指している感染症である。麻疹排除は「優れたサーベイランス体制が存在する下で、その地域に常在（土着）する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が1年間以上ないこと」と定義されており、排除認定を受けるためには、麻疹症例数を一定数以下にする事とともに、検査診断によるサーベイランス体制の確立や検出された麻疹ウイルス株の鑑別が求められている。日本においては、麻疹検査診断の血清学的診断は民間検査センターで、RT-PCR法による病原体検査は地方衛生研究所に担われている。今後、麻疹排除にむけてより重要になる病原体検査による麻疹診断は、現在のところ外部精度管理（EQA）が実施されておらず、サーベイランスの質の担保のために、EQAの導入を検討する事が求められてくる。本研究は麻疹の病原体検出による検査診断に対するEQA

の方法について検討した。

B. 研究方法

1. RNA 検体の安定性

FTA カードに検体を吸収させ、十分に乾燥させた後、6 mm 口径の穴をパンチでくりぬき、くりぬいた FTA カードを 1.5mL チューブに保存した。RAN を抽出後、real-time PCR 法により RNA 量を定量した。同様に RNastable (Baiomatorica) を含んだチューブに一定量の RNA を加え、遠心エバポレーターで乾燥し、保存した。RNA 量を real-time PCR 法により RNA 量を定量した。

C. 研究結果

1. EQA のデザインの検討

感度、特異度、ならびに遺伝子解析技術に対する EQA の方法を検討した。現在推奨されている麻疹検査診断法は nested RT-PCR 法であるが、病原体マニュアルにはプライ

マー、PCR 反応条件の記載はあるが、検査に使用するキット、機器等を含む具体的な実施法は原則、各施設に任せている。よって施設毎で異なる行程（例えば One-step RT-PCR 法と RT 反応と PCR を別々に実施する Two-step 法等）で検査が行われている事が予想される。感度の EQA 法としては、濃度が一定の標準 RNA（合成 RNA）を送付し、各施設に 10 倍階段希釈液を作製してもらい、それを一定量、日常実施している方法の最初の反応液に添加し、検出限界を調べる方法を採用した。また、検査の特異度、並びに遺伝子解析技術の評価には、ブラインド検体（陽性検体、陰性検体）を配布する事とした。日常用いている方法でブラインド検体を検査し、陽性、陰性を判定してもらい、さらに陽性検体の遺伝子解析、遺伝子型解析を実施してもらい遺伝子解析の精度を評価する事とした。

2. RNA 検体の送付法の検討

麻疹ウイルスは RNA ウイルスであることから、EQA には RNA を検体として送付する必要がある。よって分解されやすい RNA 検体を劣化なく、手間、コストを最小にして送付する方法が求められる。FTA カードは病原体を失活させ、RNA を一ヶ月程度、室温で保持しても RNA の品質に大きな変化を与えないことから、ブラインド検体の送付法として採用した。また、汎用されている RNA 抽出キット（Qiagen、Roche）を用いて、使用説明書とほぼ同じ方法で、FTA カードからの RNA 抽出が可能である事から RNA 抽出行程の評価にも適当である。一方、濃度管理が求められる標準 RNA（合成 RNA）の送付には RNastable（Biomatrix）を採用した。これらは事前に 1 ヶ月程度の期間保管し、実際に RNA の劣化がほとんどない事を確認した。

D. 考察

麻疹は、WHO が排除を目指す感染症であり、その排除認定には検査診断に基づいた質の高いサーベイランス体制を求められている。また、検査診断の質を担保するために、WHO が認証した国家検査機関（National Laboratory; NL、日本においては感染研）か、NL によって精度管理された検査施設において検査が実施される事を求めている。日本においても平成 25 年 4 月より改正された「麻しんに関する特定感染症予防指針」において、麻疹ウイルスの遺伝子検査を可能な限り全数、国立感染症研究所、または地方衛生研究所で実施するとしており、地方衛生研究所での検査診断の質を担保するために精度管理は必要になってくる。

EQA を実施するにおいて、検体の品質は最も留意しなければならない点である。RNA は非常に不安定である事から、劣化を許容範囲内にとどめ、さらに費用、手間を考慮した検体の送付法が求められる。正確な濃度が求められる感度試験に使用する標準 RNA は RNastable（Biomatrix）を、特異度、遺伝子解析用の検体であるブラインド検体には FTA カードを使用する事とした。ともにおよそ 1 ヶ月の保存期間に大きな品質の低下はなかった。これらによって、ドライアイスによる梱包等の手間なく、安価な普通郵便での発送が可能となった。EQA の効果的な方法について今回のデザインに従って試行し、実施施設に過度に負担のかからない、効果的な方法を検討していく。

平成 28 年 4 月より感染症が改正になり、感染症の発生を予防し、原因を明らかにするための必要な調査を知事の権限で実施できる事となり、地方衛生研究所での検査がより重要になる事が予想される。一方で検査に使用する機器の維持・管理や、EQA を実施するためのコスト、労力が確保

されているとはいえない。これは実施する側である感染研においても同様である。また、地方衛生研究所では多くの病原体の検査を実施している。検査項目毎に EQA を求めるのか、個別の検査項目よりも施設の検査体制全体を評価していくのかも今後検討していく必要がある。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

a 英文

1. Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *Journal of Virological Methods*. 207, 73-77. (2014)
2. Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K, Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill R response J* 16; 5(2) 31-3 (2014)

b. 和文

1. 駒瀬勝啓、竹田誠 海外の麻疹の情報 2013病原微生物検出情報 35 (4) ; 97-98 (2014)
2. 山岸拓也、伊東宏明、八幡裕一郎、中島一敏、松井珠乃、高橋琢理、木下一美、砂川富正、奥野英雄、多屋馨子、大石和徳、駒瀬勝啓、三崎貴子、丸山絢、大嶋孝弘、清水英明、岩瀬耕一、岡部信彦、小泉祐子、平岡麻理子、瀬戸成子、杉本徳子、荷見奈緒美、熊谷行広、大塚吾郎、杉下由行、甲賀健史、鈴木理恵子、阿南弥生子、舟久保麻理子、弘光明子、坂本洋、阿部勇治、氏家無限 潜在的な疫学リンクが疑われたD8型ウイルスによる麻疹広域散発事例 病原微生物検出情報 35 (4) ; 100 - 102 (2014)
3. 古川英臣、梶山桂子、宮代守、佐藤正、伊藤孝子、酒井由美子、井出瑤子、植山誠、眞野理恵子、衣笠有紀、戸川温、高田徹、猪狩洋介、駒瀬勝啓 フィリピン渡航者からのD9型麻疹ウイルスの検出-福岡市 病原微生物検出情報 35 (5) ; 132 (2014)
4. 竹田誠、駒瀬勝啓 輸入麻疹と国内伝播感染症 44(6) 206-217 (2014)

学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 岡部信彦、駒瀬勝啓、砂川富正、竹田 誠、多屋馨子、中野貴司、蜂谷正彦、三崎貴子、吉倉 廣、渡瀬博敏、国内の麻疹排除 (measles elimination) 状況に関する考察、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～7 日 福岡

2. 多屋馨子、佐藤弘、奥野英雄、新井智、神谷元、八幡裕一郎、伊東宏明、福住宗久、砂川富正、駒瀬勝啓、竹田誠、大石和徳、麻疹・風疹に関する最近の国内疫学情報について、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～7 日 福岡

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

百日咳レファレンスセンター

研究分担者	蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	大塚菜緒	国立感染症研究所	細菌第二部
	平松征洋	国立感染症研究所	細菌第二部
	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、地方衛生研究所を対象に遺伝子検査キットを含むレファレンスの配布を行った。平成26年度は6施設に10件のレファレンスを配布するとともに、パートタクチン(Prn)欠損株とマクロライド耐性菌の国内分離状況を調査した。その結果、2014年の臨床分離株はすべてPrn発現を示し、2011年以降Prn欠損株は減少傾向にあることが判明した。また、2013~14年の分離株はすべてエリスロマイシン感性菌 (MIC, <10 µg/mL) であることを確認した。

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症であり、その主な起因菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) である。同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌 (パラ百日咳菌, *Bordetella holmesii*), *Mycoplasma pneumoniae*, その他ライノウイルスなどの呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、現在の報告患者数には多くの紛れ込みを含むことが示唆される。百日咳の正確な診断には遺伝子検査が有用であり、アウトブレイクなどの病原体検索では必須の検査法となる。

百日咳菌は種々の定着因子を産生するが、近年世界的に定着因子パートタクチン (Prn) の欠損株が出現している。現行の精製百日せきワクチンには感染予防抗原として Prn が含まれることから、Prn 欠損とワクチン

有効性との関係が世界的に論議されている。現在までに Prn 欠損株は日本、欧米、オーストラリアなどで確認されているが、その出現理由はまだ明らかとなっていない。米国では流行株の85%をPrn欠損株が占めたことから、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。また、中国ではマクロライド高度耐性の百日咳菌が出現し、臨床現場から高頻度に分離されていることから本菌に対するサーベイランスも重要となる。

本研究は百日咳レファレンス活動として、遺伝子検査キットを含むレファレンスの整備・配布、さらに国内におけるPrn欠損株とマクロライド耐性菌の流行調査を行った。

B. 研究方法

1. レファレンス関係

百日咳類縁菌 *B. holmesii*-LAMP は既報に従ってキット化し、48試験分を1キットとした。百日咳菌、パラ百日咳菌、*B.*

holmesii, *M. pneumoniae* を標的とする 4Plex リアルタイム PCR は一部改良を加え、プライマーとプローブ濃度を至適化した (ver.3.2)。陽性コントロール DNA は conventional PCR およびリアルタイム PCR 用に濃度を調整したものを整備した。

2. Prn 欠損株の流行調査

地方衛生研究所および国内医療機関に百日咳臨床分離株の分与を依頼し、2014 年の国内分離株 15 株を収集した (感染研での分離株を含む)。このうち 2 株は兄弟からの分離株であったことから、疫学的関連性を除いた 14 株をイムノブロット解析に供試した。また、これまでに国内分離された Prn 欠損株と Prn 発現株について、分離月と患者年齢を比較解析した。

3. マクロライド耐性菌の調査

2013~14 年の国内臨床分離株 26 株について、エリスロマイシン (EM) に対する MIC を測定した。中国で報告されている EM 高度耐性菌の MIC は 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であったことから、EM 濃度が異なる 3 種類の CSM プレート (0, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を試験に用いた。判定は 7 日後の菌増殖を指標に行った。

C. 研究結果

1. レファレンス関係

平成 26 年度のレファレンスセンターへの配布は 0 件であった。一方、センター以外の地研には *B. holmesii*-LAMP キット 1 件、4Plex リアルタイム PCR キット 8 件、陽性コントロール DNA 1 件を 6 施設に配布した。

2. Prn 欠損株の流行調査

国内臨床分離株 (260 株) における Prn 欠損株の出現状況を図 1 に示した。Prn 欠損株は 1997 年に初めて出現し、その後増加

傾向を示し、2011 年では最多の分離数 (13 株) を示した。2014 年は 14 株すべてが Prn 欠損株となり、2011 年以降 Prn 欠損株は減少傾向にあることが判明した。なお、Prn 欠損株と発現株の分離月と患者年齢を比較したところ、両者に統計学的な有意差を認めなかった。

3. マクロライド耐性菌の調査

2013~14 年の国内臨床分離株 26 株を EM 添加培地で培養したところ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ならびに 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EM 濃度で菌増殖は全株で認められなかった (表 2)。このことから、26 株の EM に対する MIC は <10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と判定した。

D. 考察

百日咳レファレンスセンターでは遺伝子検査の拡充・整備を進め、平成 26 年度から新たな遺伝子検査キットとして 4Plex リアルタイム PCR キット (ver. 3.2) の配布を開始した。今年度は 8 キットの配布を行ったが、レファレンスセンターへの配布は減少傾向を示し、昨年度は 3 件、今年度は 0 件となった。これはレファレンスセンター内における遺伝子検査の整備が完了したことを意味し、今後は検査キットの更新・補充への対応が必要課題となる。

Prn 欠損株の流行調査により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少していることが新たに判明した。Prn 欠損株は Prn を含有する DPT ワクチンが接種された時期に多く分離されたが、Prn 不含の DPT-sIPV が導入された 2011 年 11 月以降は顕著に減少傾向を示した。このことは Prn 含有ワクチンが Prn 欠損株の選択圧となる可能性を示唆するが、流行株の遺伝子型自体が入れ替わっている可能性も否定出来ない。また、2014 年からは Prn 含有の

DPT-cIPV が導入されたことから、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。

中国西安市ではマクロライド高度耐性の百日咳菌が多数分離されるとともに、北京市でも耐性菌の増加が報告されている。これまでわが国ではマクロライド耐性菌の報告例はなく、今回の小規模調査でも耐性菌は検出されなかった。ただし、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。

E. 結論

遺伝子検査キットを始めとするレファレンス関係の配布・整備を行った。また、百日咳流行株の解析により、わが国では2011年以降 Prn 欠損株が減少傾向にあること、近年の臨床分離株はすべてマクロライド感受性菌であることを確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

a. 英文

1. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J,

Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5:e01074, 2014.

2. Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J Infect Chemother.* 20:635-8, 2014.
3. Allahyar Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol.* [Epub ahead of print]

b. 和文

1. 蒲地一成. 微生物 ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2):18-21, 2014.

学会発表

国際学会

1. 該当なし

国内学会

1. 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第88回日本細菌学会総会, 平成27年3月, 岐阜
2. 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第88回日

本細菌学会総会，平成 27 年 3 月，岐阜	該当なし
	実用新案登録
H. 知的財産権の出願・登録状況	該当なし
（予定を含む。）	その他
特許取得	特記事項なし

表 1. 平成26年度のレファレンス関係の配布実績（平成27年1月現在）

レファレンス	地方衛生研究所	
	レファレンスセンター	その他
<i>Bordetella holmesii</i> LAMPキット	0	1
4PlexリアルタイムPCRキット	0	8
陽性コントロール 百日咳菌	0	0
DNA 百日咳類縁菌	0	1
計	0	10

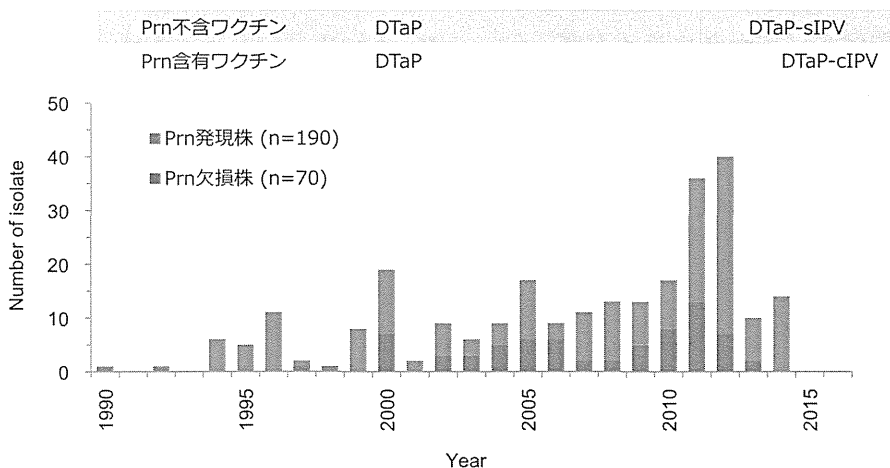


図 1. 日本におけるPrn欠損株の分離状況（1990~2014年）
2014年に臨床分離された14株はすべてPrn発現株であり，Prn欠損株は2011年以降減少傾向を示した

表 2. 国内臨床分離株のエリスロマイシン添加寒天培地での増殖数（2013~14年分離株）

EM添加濃度	供試株数	増殖株数
0 µg/mL	26	26
10 µg/mL	26	0
100 µg/mL	26	0

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

結核菌型別分析における精度保証

研究分担者 御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部長

研究協力者 前田伸司 公益財団法人結核予防会懸隔研究所抗酸菌部
結核菌情報科長

研究要旨 結核菌の反復配列多型（VNTR）分析に関する外部精度評価を行った。全79箇所の衛生研究所のうち54施設が参加を希望した。3種類の精製結核菌DNAを送付し、2ヶ月半で全施設から型別結果報告があった。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株の分析結果では、全ローサイ完全一致だったのは36施設（66.7%、36/54）、1ローカセット違いが7施設（13%、7/54）、2ヶ所以上の違いが11施設（20.3%、11/54）であった。また、分析方法については、37施設（68.5%、37/54）が、最もシンプルなアガロースゲルを用いた電気泳動による分析、次いで7施設（13%、7/54）がシークエンサーを用いたフラグメント解析を利用していた。正答率に関しては、アガロースゲルによる電気泳動が、シークエンサーを用いたフラグメント解析よりわずかであるが高いという結果だった。さらに、VNTR-4052やVNTR-2163aのローカセットは、正答率が低いことが明らかになり、今後プライマーの変更等の対策が必要であることが判明した。

A. 研究目的

結核菌の型別方法は、IS6110制限酵素断片長多型法から反復配列多型（VNTR）法に世界的な流れとしてシフトしている。VNTR分析法に関しては2006年、フランスパスツール研究所のSupplyらによって国際標準型別法が報告されている。しかし、欧米で広まっている結核菌遺伝型は、日本をはじめとした東アジアで広まっている結核菌の遺伝系統と異なり、国際標準VNTR法の型別能力が低いことが判明した。そこで、国内で分離される主要な結核菌遺伝型に対して型別能力が高いVNTRシステムを当研究所で樹立し、衛生微生物技術協議会結核レファレンス会議の協力を得て普及に努めてきた。実際に結核菌の型別を行って

る施設でのPCR産物の分析方法、分析座位等はアンケート調査でしか調べられていない。

そこで、本研究では、各衛生研究所や専門病院で利用されているVNTR法に関して外部精度評価を行うことで、型別結果を地域間で比較ができる体制を作ることや分析実態の調査を行うことを目的とした。正確に型別が可能な施設のデータを集めることで将来的な全国規模の結核菌型別データベースの構築が可能となる。

B. 研究方法

参加施設の募集：レファレンス会議の各ブロックの代表を通してVNTRに関する外部精度評価への参加希望を取った。

配布結核菌ゲノム DNA のコピー数算出(標準検体の作製): 当研究所と神戸市環境保健研究所で分析を行い、各ローカスのコピー数を算出し、一致することを確認した。

結果報告と分析法の調査: 結果報告用の様式を作成し、実際の分析ローカスや分析手法等の調査も同時に行った。

C. 研究結果

1) 参加希望施設の調査

調査の結果 79 施設の内、54 箇所の施設が本外部精度評価への参加を希望した。当研究所で準備した 3 種類の評価 (EQA) 用結核菌ゲノム DNA を送付した。送付から約 2 か月半で送付施設から型別結果の報告を受け取った。

2) 各施設における VNTR 分析に利用しているローカセット

VNTR 分析システムには、JATA (12)、JATA (15)、ハイパーバリアブル (HV) 及びその他のローサイ (Supply[15]分析システムに含まれる) がある。今回の外部精度保証では最低限 JATA (12) での分析を依頼した。その他に JATA (15) (JATA[12]に追加 3 ローサイ)、HV は 3 ローサイ、他に Supply らの 6 ローサイなどが分析対象ローサイとして想定されるため対応した報告様式を準備した。各分析システムを利用している施設数は、JATA (15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 37、28、14 であった (図)。HV のローカスは、変化頻度が高く、また高分子 PCR 産物が得られる頻度も高い。そのため分析には困難を伴う。しかし、28 施設 (51.9%、28/54) が型別分析に利用していることがわかった。分析法としては、アガロースゲル電気泳動が 15 施設、次いで自動シークエンサーを用いた

フラグメント解析が 7 施設であった。

3) EQA 株を JATA (12) 分析した場合の正答施設数

各施設で 3 株の QC 株を JATA (12) で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのが 36 施設 (66.7%、36/54)、1 ローカス違いが 7 施設 (13.0%、7/54)、2 箇所以上違いが 11 施設 (20.3%、11/54) だった (表)。約 2 割の施設が最もシンプルで分析しやすい JATA (12) においても、2 箇所以上のローサイでコピー数換算等の間違いが生じていることがわかった。

4) PCR 産物のサイズ測定方法

PCR 産物のサイズ測定のための方法として、アガロースゲル電気泳動、フラグメント解析、マイクロチップ電気泳動装置 (マルチナ、島津製作所)、キャピラリー電気泳動装置 (QIAxcel、キアゲン)、キャピラリー電気泳動装置 (コスモアイ、日立製作所) などがあった。今回の調査では、アガロースゲル電気泳動により分析を行っている施設が、37 箇所 (68.5%、37/54) で最も多かった。次いで自動シークエンサーを用いたフラグメント解析が 7 箇所 (13%、7/54)、マルチナと QIAxcel を使っている施設が各 4 施設 (7.4%) であった。また、2 施設 (3.7%) がコスモアイを利用して分析していた。

5) 各分析法と正答率の比較

EQA 用の 3 株を送付し、各 12 ローサイの分析なので $3 \times 12 \times$ (分析施設数) で全回答数を算出して正答数の割合を算出した。アガロースゲルを用いた電気泳動を含めてほとんどの分析法であっても 95% 以上の正答率であったが、正答率が 85% 以下のキャピラリー電気泳動装置があった。

6) 各ローカスの正答率の比較

分析ローカスごとの正答率を比較すると、どのローカスも 94–100%であった。しかし、VNTR-4052 と VNTR-2163a では、それぞれ 88.9%、76.6%と正答率が低かった。

D. 考察

全国 54 の施設で行われている VNTR 型別法に関する初めての外部精度評価を行った。その結果、得られた PCR 産物のサイズ測定には、68.5%の施設が最もシンプルなアガロースゲル電気泳動を使っていた。また、本分析法は、現時点で最も進んだ技術であると考えられる自動シーケンサーを使ったフラグメント解析法よりも正答率がわずかではあるが高かった。しかしながら、今後は多くの施設がアガロースゲル電気泳動からマイクロチップあるいはキャピラリー電気泳動装置に、あるいはフラグメント解析にシフトしていくと考えられる。正確に分析できる分析システムやコピー数を算出するため、方法及び正答率が低いローカスのプライマーの変更等が必要と考えられる。

E. 結論

国内結核菌型別に用いられている当研究所で樹立した JATA(12)のローカスセットによる 3 株の分析結果比較では、全ローサイ完全一致だったのは 36 施設 (66.7%、36/54) だった。アガロースゲルを用いた電気泳動による分析が最も多く使われており、正答率もこの手法が最も高かった。幾つかのローカスで正答率が低く、増幅効率が悪いことから使用プライマーの変更を含めて再検討する必要がある。

F. 健康危険情報

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。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

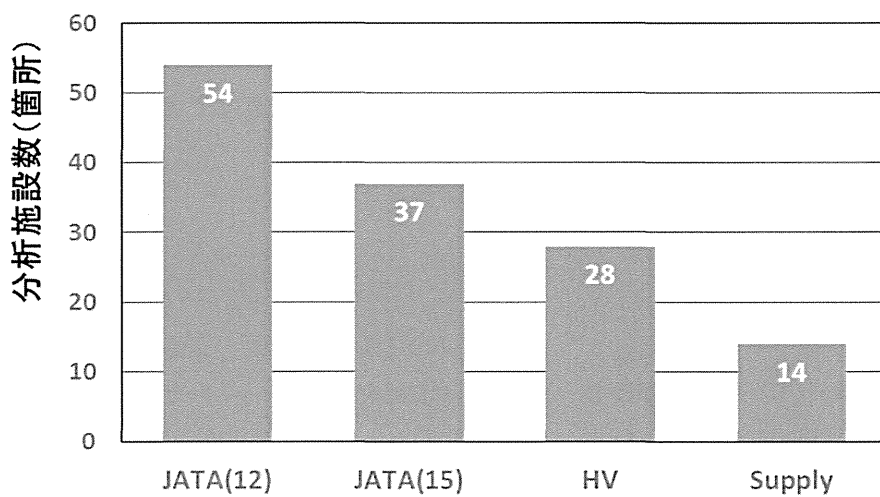


図 VNTR分析システムと報告施設数

表 3株をJATA(12)で分析した場合の正答施設数

	施設数 (54施設中の割合)	
全ローサイ完全一致	36施設	66.7% (36/54)
1ローカス違い	7施設	13.0% (7/54)
2ヶ所以上違い	11施設	20.3% (11/54)

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

動物由来感染症レファレンスセンター 平成26年度活動報告
狂犬病の検査ネットワーク構築と検査系の検証および標準化

研究分担者	森川 茂	獣医科学部長
研究協力者	井上 智	獣医科学部 第二室長
	野口 章	獣医科学部 主任研究官
	奥谷晶子	獣医科学部 主任研究官
	宇田晶彦	獣医科学部 主任研究官
	堀田明豊	獣医科学部 主任研究官
	今岡浩一	獣医科学部 第一室長

研究要旨 平成26年度は、狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、動物由来感染症レファレンスセンターに所属している7カ所の地方衛生研究所（地衛研）の協力のもとに17地衛研とレファレンスネットワークを構築して、狂犬病検査について遺伝子検査法の検証をRT-PCRブラインドテストによって行い、抗原検査の標準化を行うために必要となる陽性対照スライドの作製と配布を行った。ブラインドテストでは、国立感染症研究所（感染研）から陽性対照遺伝子と検体を送付して狂犬病検査マニュアル：第2版（感染研の病原体検出マニュアル）に準じた遺伝子診断（RT-PCR）を地衛研で行い、通常使用している機器・試薬等を使用した検査が可能であり、合成した陽性対照遺伝子も配布して使用可能なことを明らかにした。また、本ネットワークの構築によって感染研と地衛研の間でレファレンス機能向上に必要となる検査手技と関連情報の共有および検討すべき課題等が明らかとなりサーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化が期待された。

A. 研究目的

本研究は、動物由来感染症について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を行うことが目的である。平成26年度は、狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、地方衛生研究所（地衛研）の協力のもとに狂犬病のレファレンスネットワークを構築して狂犬病の検査手法の検証と標準化を行った。

B. 研究方法

1. RT-PCR ブラインドテスト

国立感染症研究所（感染研）から陽性対照遺伝子と検体を送付して、狂犬病検査マニュアル：第2版（感染研の病原体検出マニュアル）に準じた遺伝子診断（RT-PCR）を地衛研において行った後に成績等を取りまとめた。検査では各地衛研で通常使用している機器・試薬等を使用して行った。

※狂犬病検査マニュアル（第2版）
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/rabies_%2020120608.pdf

地衛研に検体番号（サンプル 1、サンプル 2、サンプル 3）のみを記した 3 本の検体を送付して、RT-PCR を行って頂いた後に、各地衛研の成績と課題等について感染研で取りまとめた。

■送付検体

- ・ 検体 RNA : 3 本（使用時まで室温保存）。
サンプル 1 = 陰性検体
サンプル 2 = 陽性検体
サンプル 3 = 陽性検体（注※）
※ サンプル 3 は、検出感度の高い One step RT-PCR で陽性となり、Two step RT-PCR で陰性となる RNA 濃度を配布（感染研で使用した機器・試薬での成績）。
- ・ Positive control RNA : 1 本（使用時まで室温保存）。
- ・ プライマー : 9 本（10g、304、JW12(C)、JW12(T)、JW6(DPL)、JW6(E)、JW6(M)、N7(C)、N7(T)）(100pmol/ul in TE)。

検体 RNA :

- ・ 陽性検体 : 狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-11 株) を感染させたマウス脳由来の抽出 RNA + 犬脳由来の抽出 RNA を使用。
- ・ 陰性検体 : 犬脳由来の抽出 RNA を使用。
- ・ Positive control RNA : RT-PCR の標的遺伝子を組み込んだプラスミド (pGEM-T Easy Posicont) を利用して、当該遺伝子の RNA 増幅後に DNaseI 処理を行ってから抽出した RNA を使用。

※ RNA は、RNAstable tube (Biomatrix) に分注後に、スピードバックで乾燥して室温で送付。検査まで、室温にて遮光・乾燥状態で保存可能。

※ 使用方法 : 狂犬病検査マニュアル (第 2

版) を参照。

- ① Positive control を含む全ての検体は 40 ul の DNase・RNase Free DW で溶解。
- ② One step RT-PCR : プライマーに N7(mix) と JW6(mix) を使用。検体 RNA は原液の 10ul を使用。Positive control RNA は原液を DNase, RNase Free DW で 10^{-5} に希釈して、その 10ul を使用。
- ③ Two step RT-PCR : RT プライマーに JW12(mix)、PCR プライマーに 10g と 304 を使用。RT には RNA 原液の 10ul を使用。

2. 直接蛍光抗体法の陽性対照スライド

狂犬病が疑われた動物の確定診断では、脳の塗抹標本を作製して直接蛍光抗体法によってウイルス抗原の検出を行う。現在、狂犬病ウイルスは感染症法で三種病原体に指定されており、ウイルス株を持たない地衛研では検査に必要となる陽性対照スライドを作成することができない。

そこで、感染症法で三種病原体の規制除外病原体（人を発病させるおそれがほとんどないものとして厚生労働大臣が指定）とされた狂犬病ウイルス固定毒 HEP 株を使用して陽性対照スライドを作製し、動物由来感染症レファレンスセンターに配布した。

C. 研究結果

1. RT-PCR ブラインドテストの結果

One step RT-PCR (図 1) :

- ・ K 地衛研のサンプル 2 と N 地衛研の陽性対照 RNA 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ K 地衛研で陽性検体が陰性となったが、

- 追試を行うことによって陽性となった。
- ・ N地衛研で使用した陽性対照 RNA が陰性となったが、使用濃度を調整することで陽性となった。

Two step RT-PCR (図 2) :

- ・ F 地衛研のサンプル 3 と K 地衛研のサンプル 2 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ F 地衛研で 2 種類の RT 試薬を使用したところサンプル 3 の検出感度が異なった。
- ・ K 施設で陽性検体が陰性となったが、追試を行うことによって陽性となった。使用した試薬と反応条件が異なっていた。

使用したサーマルサイクラー :

感染研 : ASTEC GeneAtlas

A : TaKaRa PCR

Termal cycler Dice Model TP600

B : ABI 2720 Thermal Cycler

C : BIO RAD

D : ABI GeneAmpPCR System 9700

E : ABI GeneAmpPCR System 9700

F : BIO-RAD My Cycler

G : Bio-Rad C1000 / S1000

H : ABI Veriti Thermal Cycler

I : ABI GeneAmp PCR System 9700

J : ABI veriti Thermal Cycler

K : ABI

L : ABI GeneAmp PCR System 9700

M : ASTEC PC-818-02

N : ABI GeneAmpPCR System 9700

O : ABI GeneAmp PCR System 9700

P : TaKaRa TP-600

One step RT-PCR の反応条件 (図 3) :

- ・ K 地衛研のみ異なる試薬と反応条件で

RT-PCR が行われた。

- ・ 4 地衛研で PCR 反応が半量 (25ul) であった。

2. 直接蛍光抗体法の陽性対照スライド

狂犬病ウイルス固定毒 HEP 株を脳内接種したサックリングマウスの脳をガンマ線照射することによって塗抹組織内の感染性ウイルスを検出限界以下 (10FFU) に不活化することができた。また、ガンマ線照射された脳組織で作成した塗抹スライドを、アセトン固定処理した後に陽性対照スライドに使用することとした。

スライドの取り扱いについて

- ・ 受け取り後、検査に使用するまで冷凍庫にて保存してください (-80°C、なければ可能な範囲で低温の冷凍庫)。
- ・ 冷凍庫からスライドグラスを取り出して 5-10 分・室温で風乾 → 25 倍希釈した FITC 標識抗体 (1%エバンスブルーを 500 倍希釈で添加して使用) をスライドの塗抹ウェルに約 100ul 重層 → 湿潤箱内で室温・暗所 30 分反応 → PBS(-)で洗浄 → DW で脱塩 → 風乾 → 封入剤を使用してカバーグラスで封入 → 蛍光顕微鏡観察 (残りの FITC 標識抗体原液は遮光・凍結保存で長期保存可能) 使用方法の詳細は狂犬病検査マニュアル (第 2 版) を参照。
- ・ スライドグラスには使用した脳材料と作成日等が記載してあり、ロット管理等を可能にしている。

D. 考察

我が国同様に狂犬病清浄を半世紀にわたり維持してきた台湾で、かなり前から野生動物 (イタチアナグマ) に狂犬病が侵淫し

ていたことが、平成 25 年 7 月に明らかとなった。これを受けて、平成 26 年 8 月 4 日付で厚生労働省結核感染症課から「国内動物を対象とした狂犬病検査実施要領」が都道府県、保健所設置市、特別区の衛生主管部（局）あてに通知された。

本研究では、積極的疫学調査の一環である狂犬病調査を地方自治体で実施可能にするために、地方衛生研究所（地衛研）の協力のもとに狂犬病のレファレンスネットワークを構築して狂犬病のレファレンス機能を向上するために狂犬病の検査手法の検証と標準化を行った。

狂犬病の遺伝子検査系を地衛研で簡便かつ容易に行うために、地衛研が RT-PCR 用に通常使用している機器と試薬でブラインドテストを行ったところ、参加した地衛研の全てで RT-PCR が可能であることが明らかとなった。

また、本レファレンスネットワークを利用することで、One step RT-PCR が Two step RT-PCR よりも高感度であることを、異なる複数の地衛研によって実践的・实际的に検証ができた。普段行わない検査系の場合は、作業工程の少ない One step RT-PCR がクロスコンタミを防止するためにも良いと考えられた。

今回、RNA stable tube kit を利用することで、陽性対照 RNA の移送を室温で安定して行えることが明らかとなったが、N 地衛研で陽性対照 RNA の至適使用濃度が異なったことから、使用前か定期的な陽性対照 RNA の使用濃度検証を行うことが望ましいと考えられた。

推奨された反応条件を変更して RT-PCR を行った K 地衛研で検査結果が異なったことから、病原体マニュアルによる検査法の標準化は重要であり、また、検査機会の少

ない検査についても定期的な検査系の検証と継続が必要であると考えられた。狂犬病検査で基本的な間違いを避けるためには、手技の検証を可能にするチェックシートの使用が推奨される。

地衛研 4 か所で、One step RT-PCR の反応を半量で行っても良好な成績を得ており、各地衛研で検証が必要と思われるが、検査を安価に行うことが可能になると考えられた。

F 地衛研で、2 種類の RT 酵素を使用して異なる成績を得たが、これは検体中の RNA 量が RT-PCR の検出限界近縁であったためと考えられる。各地衛研の異なる機器等条件下での検査成績や検出限界等の知見を共有することは、より機能的なラボネットワークの強化につながるものと考えられた。

狂犬病等の動物由来感染症ではヒトの感染源となる動物等の検査が必要となる。今後、動物由来感染症の病原体サーベイランスを可能にする機能的なラボネットワークの構築・強化を行うためには、動物検体等を取り扱う自治体の生活衛生課等が所管する動物管理センターや保健所等の担当部局と連携したレファレンスネットワークの構築が必要かつ重要であると考えられた。

E. 結論

平成 26 年度は、狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、動物由来感染症レファレンスセンターに所属している 7 か所の地衛研の協力のもとに 17 地衛研とレファレンスネットワークを構築して、狂犬病検査について遺伝子検査法の検証を RT-PCR ブラインドテストによって行い、抗原検査の標準化を行うために必要となる陽性対照スライドの作製と配布を行った。

ブラインドテストでは、感染研から陽性

対照遺伝子と検体を送付して「狂犬病検査マニュアル：第2版」に準じた遺伝子診断（RT-PCR）を地衛研で行い、通常使用している機器・試薬等を使用した検査が可能であり、合成した陽性対照遺伝子も配布して使用可能なことを明らかとした。

本ネットワークの構築によって感染研と地衛研の間でレファレンス機能向上に必要な検査手技と関連情報の共有および検討すべき課題等が明らかとなりサーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化が期待された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

国際学会

該当なし

国内学会

レファレンスセンター等報告：動物由来感染症。衛生微生物協議会 第35回研究会。

平成26年6月。タワーホール船堀。東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

図1. One step RT-PCR の結果

	感染研	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K*1)	L	M	N	O	P
サンプル-1	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
サンプル-2	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
サンプル-3	+	+	+	NT	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
陽性対照RNA	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-*2)	+	+
陰性対照(tempなし)	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*1) K: 初回に陰性。追試により陽性となる。

*2) N: 送付陽性対照 10^{-3} 希釈では陽性であったが、 10^{-4} 以上希釈で陰性となった。

NT: not tested.

図2. Two step RT-PCR の結果

	感染研	A	B	C	D	E	F*3)	G	H	I	J	K*4)	L	M	N	O	P
サンプル-1	RT(x1)	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	RT(x10)	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	NT	-	NT	-	-	-	-
サンプル-2	RT(x1)	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NT
	RT(x10)	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	NT	+	NT	+	+	+	+
サンプル-3	RT(x1)	-	-	-	NT	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	NT
	RT(x10)	-	-	-	NT	-	-	+	+	-	NT	-	NT	+	-	-	-
陽性対照RNA	RT(x1)	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NT
	RT(x10)	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	NT	+	NT	+	+	+	+
陰性対照	(tempなし)	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
							RT(Takara)	RT(Wako)									

*3) F: 2種類のRT試薬を使用して異なる成績を得た。

*4) K: 初回に陰性。追試により陽性となる。

NT: not tested.

図3. One step RT-PCR に使用した機器と反応条件

	感染研	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
試薬	QIAGEN OneStep RT-PCR kit	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	Invitrogen SuperScript II One-Step RT-PCR System with Platinum Taq	・	・	・	・	・
反応量	50ul	25ul	・	・	・	・	・	・	・	・	25ul	50ul	25ul	25ul	・	・	・
反応条件																	
RT	50 C 30m	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	55 C 30m	・	・	・	・	・
RT失活	95 C 15m	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	94 C 2m	・	・	・	・	・
解凍性	94 C 60s	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	94 C 15s	・	・	・	・	・
アニーリング	56 C 60s	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	55 C 30s	・	・	・	・	・
伸長	72 C 90s	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	68 C 60s	・	・	・	・	・
サイクル数	40回	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	40回	・	・	・	・	・
再伸長	72 C 10m	・	・	NT	・	・	・	・	・	・	・	68 C 5m	・	・	・	・	・

・ : 感染研と同じ
 NT : not tested.

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
HIV関連感染症

研究分担者	俣野哲朗	国立感染症研究所	エイズ研究センター長
研究協力者	吉村和久 草川 茂 西澤雅子 松岡佐織	国立感染症研究所 国立感染症研究所 国立感染症研究所 国立感染症研究所	エイズ研究センター室長 エイズ研究センター主任研究官 エイズ研究センター主任研究官 エイズ研究センター主任研究官

研究要旨 地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を進め、HIV感染動向・検査状況についての情報共有およびHIV検査技術・体制の維持・強化に向けた取組みを推進した。平成26年度は、特に国内17施設間で情報交換を行った。

A. 研究目的

本邦のHIV感染者数とエイズ患者数を合わせた年間新規報告件数は、2007年以降約1500件で推移しており、2013年は過去最高であった（エイズ動向委員会）。特に年間新規エイズ患者報告件数が過去最高で、新規報告件数の約30%はエイズ患者としての報告、つまりエイズ発症によりHIV感染が判明した例であった。したがって実際のHIV感染者数は報告件数を大きく上回っていると推察され、早期診断が十分になされている状況ではないと考えられる。このような状況においてHIV検査推進は重要課題である。

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

B. 研究方法

2014年6月の衛生微生物技術協議会第35回研究会（東京）におけるHIV関連感染症に関する会議で、地方衛生研究所等との協議・議論を進め、その後も適宜、情報交換を行った。また、2014年秋の国立病院機構名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とするHIV技術研修会に協力した。

C. 研究結果

国立病院機構名古屋医療センターおよび神奈川衛生研究所と共同でネットワーク体制構築を推進し、北海道立衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、江戸川区保健衛生研究センター、神奈川衛生研究所、横浜市衛生研究所、静岡県環境衛生科学研究所、愛知県衛生研究所、名古屋衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、広島市衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所、国立病院機構名古屋医療センター、国立感染症研究所等、国内17施設間で情報交換を

行った。主に、HIV 感染者・エイズ患者の報告件数、地域・年齢・感染経路等の分布、疫学的解析結果、薬剤耐性変異株動向、保健所等における検査状況・体制、献血における HIV 陽性者数、検査技術等に関する情報を共有した。特に、年齢構成について 2013 年の新規報告数を見ると、30 歳代後半（35 歳以上 40 歳未満）が最多であったが、人口統計を基にした年齢人口 10 万人当たりの HIV 感染者数を見ると、ほとんどの年代で罹患率が上昇傾向にあり、20 歳代後半（25 歳以上 30 歳未満）が最も高かった。これらの情報共有は、病原微生物検出情報（IASR）2014 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2013 および特集関連情報作成においても有用であった。また、名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力し、検査技術の維持・向上に努めた。

D. 考察

HIV の多様性は大きく、ウイルスゲノム変化に持続的に対応した検査技術の更新は重要である。本ネットワーク体制に基づく情報共有ならびに技術研修等による検査体制の維持・強化は、検査技術の維持・向上に極めて重要な役割を担っていると考えられる。なお、年齢構成について得られた情報から、若年層の HIV 罹患率の高さには、留意が必要と考えられた。

E. 結論

地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を推進し、国内 HIV 感染動向・検査状況・技術についての情報共有および HIV 検査技術強化に貢献した。このネットワーク体制は、病原微生物検出情報（IASR）2014 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2013 およ

び特集関連情報作成にも貢献した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Takebe Y, Naito Y, Raghwan J, Fearnhill E, Sano T, Kusagawa S, Mbisa J, Zhang H, Matano T, Brown AL, Pybus O, Dunn D, Kondo M. Inter-continental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan. *J Virol* 88:9864-9876, 2014.

学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

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

研究分担者 藤本嗣人 感染症疫学センター 第4室

研究協力者 花岡希 感染症疫学センター 第4室
小長谷昌未 〃
地区アデノウイルスレファレンスセンター
全国地方衛生研究所

研究要旨 日本において新型の検出頻度が高いことが推定されている。アデノウイルス同定型別法は新型アデノウイルスの出現により複雑化（フルゲノムか、部分配列で良いか）している。そこで、地方衛生研究所におけるアデノウイルス検出・同定法に関してアンケート調査をおこなって結果をまとめた。日本においては、ウイルス分離が84%で行われており、型別は感染症研究所のマニュアルで実施している施設が86%を占めた。レファレンス活動への要望として、精度管理や、マニュアルを分かりやすくしてほしいという意見が見られた。

A. 研究目的

新型アデノウイルスとは、完全長塩基配列の同定により論文報告された型であり、51型までの型が血清学的に決められてきたことと異なる。アデノウイルスは3万5千塩基対のゲノムを持ち、新型はその全塩基配列の決定により報告された(52～68型)。新型を含むアデノウイルスの流行状況を把握する。

B. 研究方法

1. 地方衛生研究所へのアンケート調査

対象：全国地方衛生研究所等 77ヶ所

方法：調査用紙：ワードファイルをE-mailに添付して、ウイルス検査担当者に送付した。

調査期間：2014年2月～2014年5月

2. アンケート項目：

①所属<自治体名、記入者名>

②アデノウイルスの検出・同定法

②-1：ウイルス分離実施の有無

②-2：使用細胞は

②-3：中和の実施の有無、使用抗体の種類

③PCRによる型別

③-1：実施の有無

③-2：PCRの手法

④眼科定点に関する質問

④-1：眼科定点からの検体の病原体検査の有無

④-2：新型である53型、54型および56型の検出事例の有無

⑤新型アデノウイルスの同定法

感染研が開発した簡易・安価な全ゲノムの制限酵素切断解析→ 実施の可否

実施している	n=58	75%
(ウイルス分離も実施)	n=57	74%
実施していない	n=19	25%
(ウイルス分離のみ実施)	n=8	10%

⑥感染研へのアデノウイルス行政依頼検査をしたことの有無

⑦定点医療機関の活性化案

⑧アデノウイルスレファレンスセンターへの要望

6. PCR を実施している 58 施設

感染研マニュアル	n=50	86%
その他	n=6	10%
感染研マニュアル+その他	n=2	3%

C. 研究結果

1. アンケート回収率

回答率は 77/77 で 100%であった。

2. アデノウイルスの分離状況

分離を行っている	n=65	84%
分離を行っていない	n=12	16%

このうち、都道府県では 45/47(96%)がウイルス分離を実施していた。

3. 分離に使用する細胞

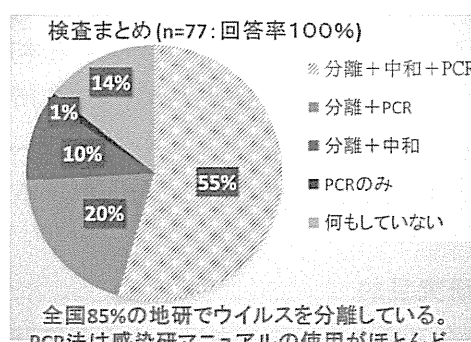
使用している細胞の種類と機関数は

- 1 種類：10 機関：A549, HEp-2, RD-18S, HEAJ
- 2 種類：10 機関：HEp-2+RD-18S, A549+ HEp-2, FL+ Vero など
- 3 種類～：45 機関：HEp-p2, RD-18S, Vero-E6, A549, CaCo2, HeLa, Vero, RD-A の組合せ

4. 中和反応と使用抗体

ウイルス分離実施している 65 施設中
中和反応を実施している n=49 64%

5. PCR による型別検査



複数の方法をまとめると上図のとおり

分離+中和+PCR	55%
分離+PCR	20%
分離+中和	10%
PCRのみ	1%
実施せず	14%

であった。

7. 眼科定点からの病原体検査

検査あり	n=36	47%
検査なし	n=41	53%

8. 新型アデノウイルス(53、54、56型)の検出の有無

検出したことがある	n=32	42%
検出したことがない	n=45	58%

9. 簡易で安価な genome typing 法を検査に導入の可否

使用してみたい	n=10	13%
詳細な方法次第	n=53	69%
分離しないので使用せず	n=8	10%
導入困難	n=1	1%
その他	n=5	6%

10. アデノウイルスの感染研への行政依頼検査

あり	n=12	16%
今後の可能性あり	n=53	69%
なし	n=10	13%
不明	n=2	3%

11. 定点の活性化案（自由記載）

情報発信の強化に関する意見が多かった。

12. アデノウイルスレファレンスセンターへの要望

精度管理の導入
 タイピング法研修会の実施
 分かりやすい型別手法の提供
 ウェブページを用いた情報還元
 など

D. 考 察

アデノウイルスの検査において、地方衛生研究所の 84%がウイルス分離を実施していた。半数以上の地方衛生研究所はウイルス分離を実施していた。

2007 年までの血清型で分類されていたので、分離とその後の中和反応による型別がゴールドスタンダードであった。2014 年春の段階でこの手法によっている施設が 10%であった。

この分離と中和による同定では、新型アデノウイルスが同定できない。2014 年度に

57 型が初めて分離・同定されたが血清学的には 6 型とされていた可能性があることを示唆する。

アデノウイルスレファレンスセンターへの要望として研修や分かりやすい型別法の提供が望まれており、その精度管理の希望もあった。未だに世界的に型別をどうするか決着がつかない状態であるので、レファレンスセンターとしてのスタンスをどうするか試行錯誤を続けている状態である。

そのため、地研で同定困難な場合は、行政依頼検査をして、感染研で詳細な解析をすることを行っているが、依頼した経験があるのは 16%であった。69%の地研は、将来的に依頼するかもしれないと考えていた。

ウイルス分離が出来ていれば、簡易・安価に制限酵素切断解析が出来る手法を開発した。その手法に関しては 82%の地研が導入する可能性があることが示唆された。この手法は、アデノウイルスのゲノムが極めて高濃度で抽出されるので、コンタミネーションを起こして、PCR 等の遺伝子増幅反応に悪影響を及ぼすことが懸念される。

この手法を用いれば、新型アデノウイルスの同定は簡易に実施できる。新型アデノウイルスは、D 種アデノウイルスが多い。D 種は流行性角結膜炎など眼感染症を引き起こす。そのため、眼科定点からの病原体検査依頼が無い場合、検出は困難である。

新型アデノウイルスのうち、日本で流行している 53、54 および 56 型は流行性角結膜炎の起因病原体である。眼科定点からの検査依頼が 47%の施設しかなかったことが、53、54 および 56 の検出施設が 42%しかなかったことにつながっていると考えられた。

情報発信としてはアデノウイルス解説ページ

(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/adenopfc-m/>)

2110-idsc/4th/4325-adenovirus-page.htm

1)を作成した。また、平成 26 年の IASR に 3 報の新型アデノウイルスに関する記事を掲載して周知に努めた。

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

E. 結論

アデノウイルスの地方衛生研究所を対象としたアンケートによりウイルス分離が多く実施されていることが明らかになった。また、眼科定点からの検査依頼がある施設が半数に満たないことが示され、それが新型アデノウイルスの検出経験がない施設が半数弱あったことにつながっていると考えられた。型別は感染症研究所のマニュアルで実施している施設が 86%を占めた。レファレンス活動への要望として、精度管理や、マニュアルを分かりやすくしてほしいという意見が見られた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ushijima H, Thongprachum A, Tran DN, Fujimoto T, Hanaoka N, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S: Rapid Diagnostic Tests Apply for Pediatric Infections at Outpatient Clinic Setting. Clin Lab 61: 195-199, 2015

2. O Matsushima Y, Nakajima E, Ishikawa M, Kano A, Komane A, Fujimoto T, Hanaoka N, Okabe N, Shimizu H. Construction of New Primer Sets for Corresponding to Genetic Evolution of Human Adenoviruses in Major Capsid Genes through Frequent Recombination. Jpn J Infect Dis 67:495-502 2014
3. O Fujimoto T, Yamane S, Ogawa T, Hanaoka N, Ogura A, Hotta C, Niwa T, Chiba Y, Gonzalez G, Aoki K, Koyanagi KO, Watanabe H. A novel complex recombinant form of type 48-related human adenovirus species D isolated in Japan. Jpn J Infect Dis 67:282-7 2014
4. O Adhikary AK, Hanaoka N, Fujimoto T: Simple and cost-effective restriction endonuclease analysis of human adenoviruses. Biomed Res Int 363790 2014
5. O 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 小児内科 46 増刊: 1022~1026 2014

学会発表

国際学会

1. Fukuda S, Fujiwara M, Ito S, Abe J, Hanaoka N, Fujimoto T, Katsumori H: Simultaneous development of Kawasaki disease associated with adenovirus infection in identical twins. Eleventh International Kawasaki Disease Symposium,

Honolulu, February 2015

2. Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Kitaichi N, Fujimoto T, Gonzalez G, Koyanagi KO. Watanabe H: Epidemiology of human adenovirus caused epidemic keratoconjunctivitis in recent Japan. The 11th International Adenovirus Meeting, San Diego, California, July 2014

国内学会

1. 藤本嗣人、花岡希、藤巻明日香、山本希：簡易で安価な制限酵素切断パターン解析による新型アデノウイルスに対応するタイピング法。臨床ウイルス学会、札幌 2014
2. 福田清香、藤原摩耶、伊藤秀一、阿部淳、花岡希、藤本嗣人、勝盛宏：アデノウイルス感染を契機に川崎病を発症した一卵性双生児症例。日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
3. Adhikary AK, 花岡希, Banik U, 野田希、藤本嗣人：Chronology of human adenovirus type 3 genome type circulation in Fukui, Japan over 23-year period. 日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
4. 藤本嗣人、花岡希、小川知子、千葉彌幸、青木功喜、渡邊日出海：エイズ関連アデノウイルスの流行：48型など日本上陸。日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
5. 松井清彦、久保遥、田中望紅、藤本嗣人：新型アデノウイルスの血清疫学。日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
6. 泉山信司、青木信和、杉山寛治、長岡

- 宏美、藤本嗣人：浴槽水、水泳プールにおけるモノクロラミン消毒の可能性。日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
7. 高橋健一郎、牧野友彦、花岡希、田村まり子、鈴木葉子、藤本嗣人：咽頭扁桃炎におけるアデノウイルスのインパクト。日本アデノウイルス研究会、東京 2014 11月
 8. 藤本嗣人：アデノウイルスレファレンスセンター報告。衛生微生物検査技術協議会第35回研究会、東京 2014 6月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤井克樹	ロタウイルス検出マニュアル		国立感染症研究所・病原体検出マニュアル			2014	
安藤秀二	リケッチア	平松啓一	標準微生物学, 第12版	医学書院	東京	2015	307-315

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O.	N pread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains.	Infect Genet Evol.	28	426-33.	2014
Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H.	A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan.	Microbiol Immunol.	58(9)	536-9	2014
Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbembiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K.	Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing.	PLoS One.		e100699.	2014
Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T.	Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer.	Vet Microbiol.	25; 171(1-2)	66-73	2014
Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K.	Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission.	Veterinary Microbiology	174	577-583	2014
登丸優子, 福本真一郎, 森嶋康之	本州以南第二例目の届出となった犬のエキノコックス (多包条虫) 症 - 愛知県	病原微生物検出情報	35	183	2014

田中照久, 平田哲生, 東新川実和, 岸本一人, 外間 昭, 金城福則, 林 裕樹, 尾下陽大, 石野信一郎, 白石祐之, 西巻 正, 森嶋康之, 杉山 広, 山崎浩, 藤田次郎	ネパール人留学生の単包虫症の1例	Clinical Parasitology	25	77-79	2014
森嶋康之, 市村静江, 山崎浩, 杉山 広	ネパール人の単包虫症. <i>Echinococcus ortleppi</i> の心寄生例	Clinical Parasitology	25	99-101	2014
杉山 広, 柴田勝優, 荒川京子, 森嶋康之, 山崎浩, 御供田睦代, 岩切忠文, 福盛順子	猪肉の生食を原因に発生が続く肺吸虫症: 鹿児島県産猪の筋肉における本虫の寄生状況調査	病原微生物検出情報	35	248	2014
杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之	肺吸虫症	臨床と微生物	41	373-378	2014
Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR	Global population structure and evolution of <i>Bordetella pertussis</i> and their relationship with vaccination	mBio	5	e01074	2014
Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y	Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria	J Infect Chemother	20	635-8	2014
Allahyar Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F	Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting <i>Bordetella pertussis</i>	J Med Microbiol			2015 (in press)
蒲地一成	微生物 ABC 百日咳	up-to-date 子どもの感染症	2(2)	18-21	2014
Takebe Y, Naito Y, Raghwani J, Fearnhill E, Sano T, Kusagawa S, Mbisa J, Zhang H, Matano T, Brown AL, Pybus O, Dunn D, Kondo M	Inter-continental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan	J Virol	88	9864-9876	2014

Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K,	Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, Marchi 2014: times of challenge and opportunity.	Western Pac Surveill Rresponse J	16; 5(2)	31-3	2014
Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y.	Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses.	Journal of Virological Methods.	207	73-77	2014
駒瀬勝啓 竹田誠	海外の麻疹の情報 2013	病原微生物検出情報	35 (4)	97-98	2014
山岸拓也、伊東宏明 八幡裕一郎 中島一敏 松井珠乃 高橋琢理 木下一美 砂川富正 奥野英雄 多屋馨子 大石和徳 駒瀬勝啓 三崎貴子 丸山絢 大嶋孝弘 清水英明 岩瀬耕一 岡部信彦 小泉祐子 平岡麻理子 瀬戸成子 杉本徳子 荷見奈緒美 熊谷行広 大塚吾郎 杉下由行 甲賀健史 鈴木理恵子 阿南弥生子 舟久保麻理子 弘光明子 坂本洋 阿部勇治 氏家無限	潜在的な疫学リンクが疑われたD8型ウイルスによる麻疹広域散发事例	病原微生物検出情報	35 (4)	100 - 102	2014
古川英臣 梶山桂子 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 井出瑤子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 猪狩洋介 駒瀬勝啓	フィリピン渡航者～のD9型麻疹ウイルスの検出-福岡市	病原微生物検出情報	35 (5)	132	2014
竹田誠 駒瀬勝啓	輸入麻疹と国内伝播	感染症	44(6)	206-217	2014
片山和彦	ロタウイルス概要	病原微生物検出情報		vol.35 No.3	2014
片山和彦	ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型 2014年版	病原微生物検出情報		vol.35 No.7	2014

