

衛生微生物技術協議会第37回研究会（広島） レファレンスセンター等報告

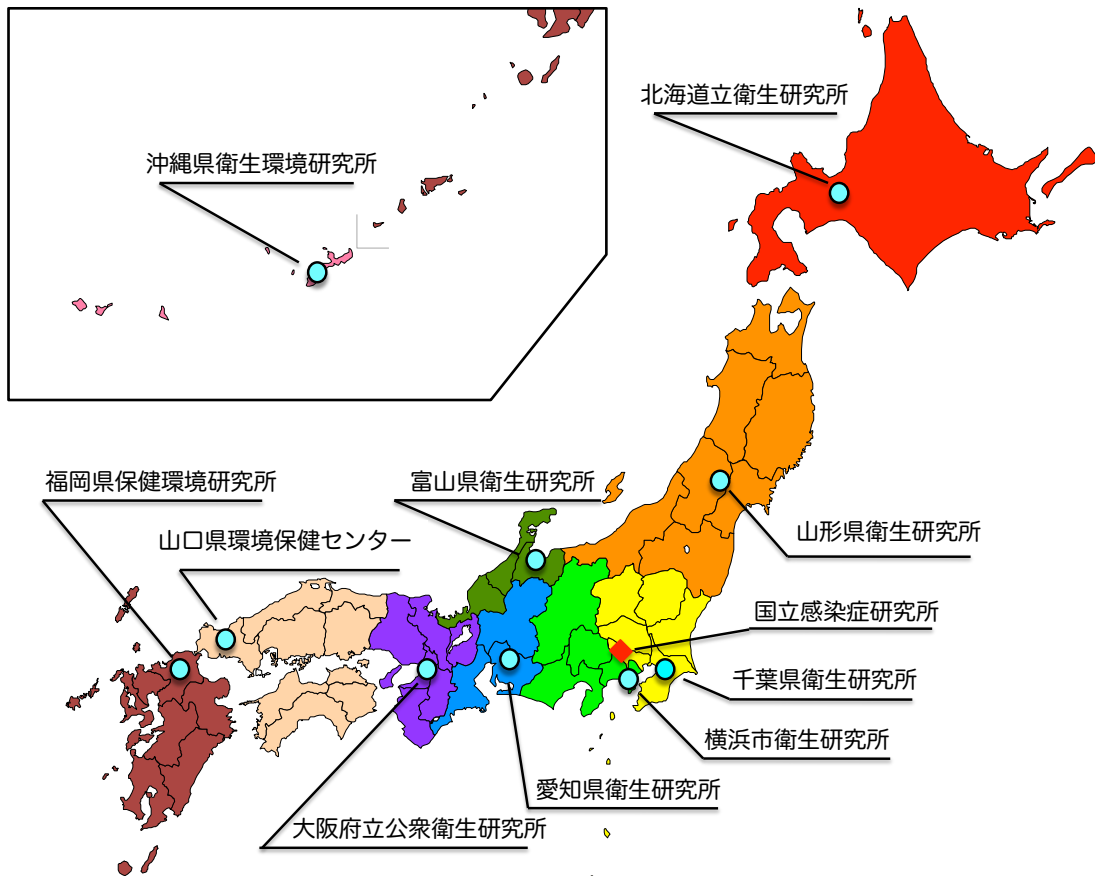
日時：平成28年7月21-22日

場所：広島県広島市南区 広島市南区民文化センター

1. [麻疹・風疹](#)
2. [薬剤耐性菌](#)
3. [HIV関連](#)
4. [ジフテリア・百日咳・ボツリヌス](#)
5. [動物由来感染症](#)
6. [インフルエンザ](#)
7. [大腸菌](#)
8. [エンテロウイルス](#)
9. [寄生虫](#)
10. [レンサ球菌](#)
11. [アルボウイルス](#)
12. [ノロウイルス](#)
13. [カンピロバクター](#)
14. [アデノウイルス](#)
15. [レジオネラ](#)
16. [結核](#)
17. [リケッチア](#)

1. 麻疹・風疹

平成27年7月22日
衛生微生物技術協議会第36回研究会
於：広島市南区民文化センター



麻しん・風しん レファレンスセンター等報告

麻しん・風しんレファレンスセンター
世話人 国立感染症研究所ウイルス第3部

駒瀬 勝啓・森 嘉生

H28年度麻しん・風しんレファレンスセンター

ブロック	所属	担当者
世話人	国立感染症研究所	駒瀬勝啓・森嘉生
北海道	北海道立衛生研究所	長野秀樹・三好正浩
東北・新潟	山形県衛生研究所	池田辰也*
北関東・千葉・東京	千葉県衛生研究所	小川知子・本間陽奈
神奈川・甲・信・静岡	横浜市衛生研究所	七種美和子
東海	愛知県衛生研究所	安井善宏・皆川洋子
北陸	富山県衛生研究所*	稲畑良*
近畿	大阪府立公衆衛生研究所	倉田貴子
中国・四国	鳥取県衛生環境研究所	佐倉千尋
九州	福岡県保健環境研究所	梶原淳睦*
沖縄	沖縄県衛生環境研究所	加藤峰史

麻疹排除等の定義 (WHO)

- 麻しん排除

適切なサーベイランス体制の下、ある特定に地域において、**土着の麻疹ウイルス**による伝播が**12ヶ月**間以上ないこと

- 風しん排除

適切なサーベイランス制度の下、**土着の風疹ウイルス**による伝播が**12ヶ月間**以上確認されず、またそれに伴うCRS症例の発生が認められないこと

地方衛生研究所における麻疹検査実績(2015年)

ブロック	検査症 例数	陽性症 例数	Genotypes						ウイルス 分離数
			D8	D9	B3	H1	A	NT	
北海道	21	2	1	0	0	0	1	0	0
東北・新潟	30	0	0	0	0	0	0	0	0
北関東・千葉 ・東京	11	12	2	3	0	1	5	1	2
神奈川・甲・信・ 静岡	162	8	5	0	0	2	1	0	4
北陸	15	0	0	0	0	0	0	0	0
東海	53	1	0	0	0	1	0	0	0
近畿	128	10	2	0	4	1	2	1	0
中国・四国	167	8	1	0	0	0	7	0	0
九州	45	1	0	1	0	0	0	0	0
沖縄	13	0	0	0	0	0	0	0	0
計	1045	42	11	4	4	5	16	2	6

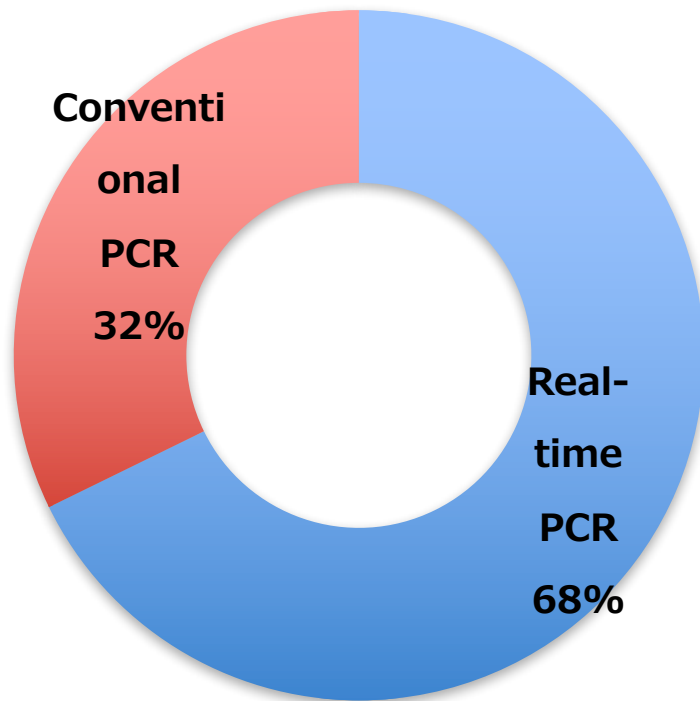
2015年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

地方衛生研究所における風しん検査実績(2015年)

ブロック	検査症 例数	陽性症 例数	Genotypes						ウイルス 分離数
			2B	1E	1j	1a	NT	N.D	
北海道	18	0	0	0	0	0	0	0	0
東北・新潟	41	0	0	0	0	0	0	0	0
北関東・千葉 ・東京	408	5	1	0	0	0	0	4	2
神奈川・甲・信・ 静岡	223	12	6	4	0	1	1	0	0
北陸	16	0	0	0	0	0	0	0	0
東海	54	2	2	0	0	0	0	0	0
近畿	100	3	0	0	0	1	1	1	0
中国・四国	154	2	0	0	0	1	0	1	0
九州	45	2	1	0	0	1	0	0	0
沖縄	0	0	0	0	0	0	0	0	0
計	978	26	10	4	0	4	2	6	2

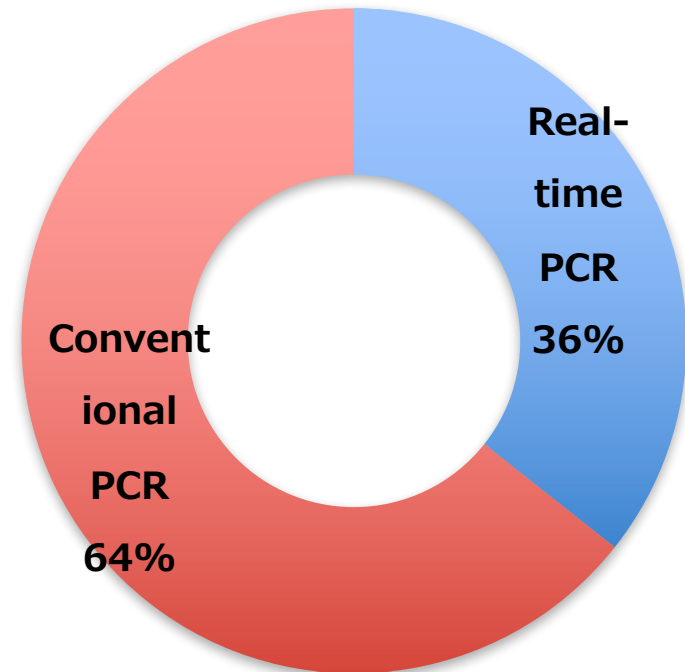
Real-time PCR 使用状況

麻疹



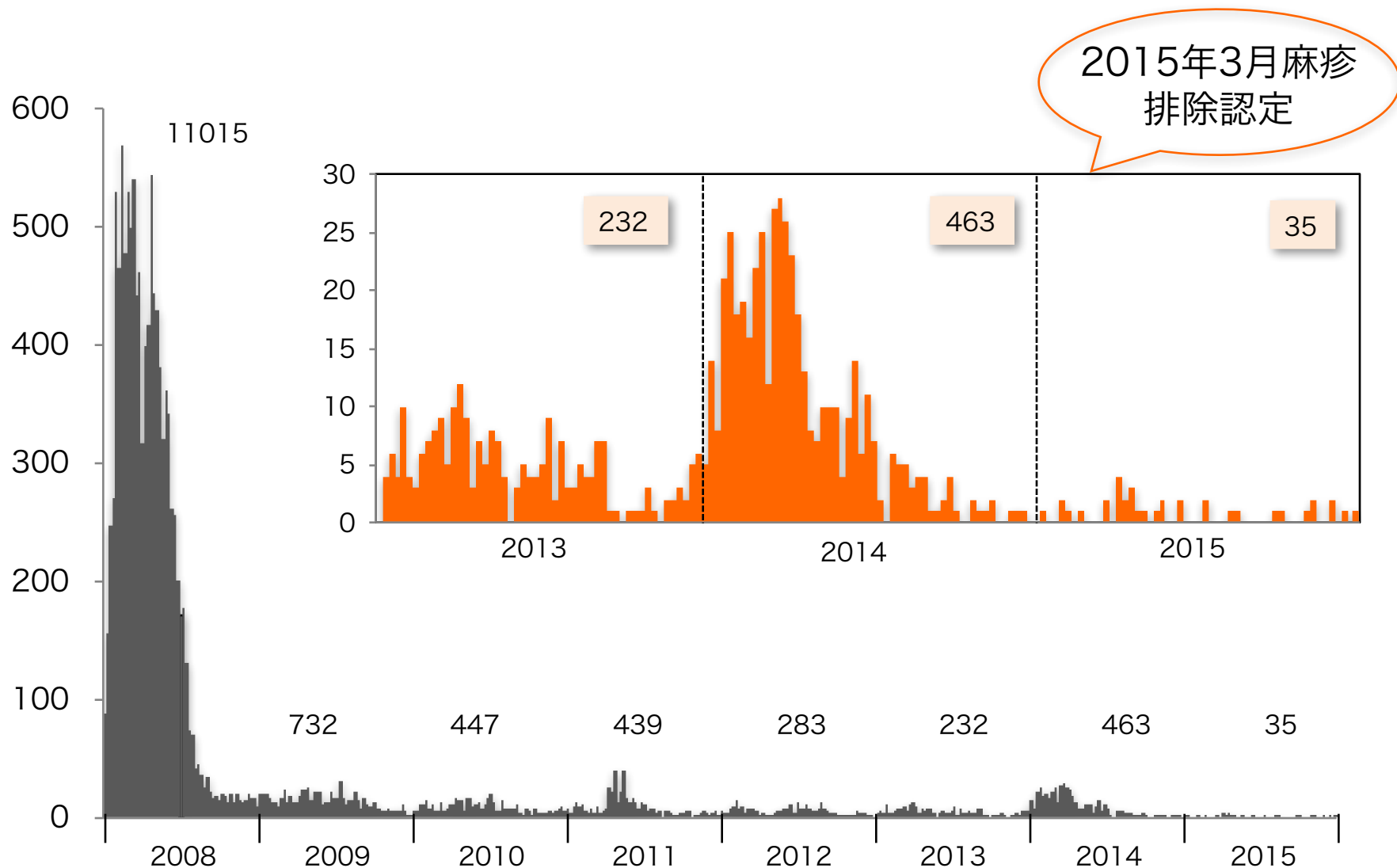
1045 検査

風疹



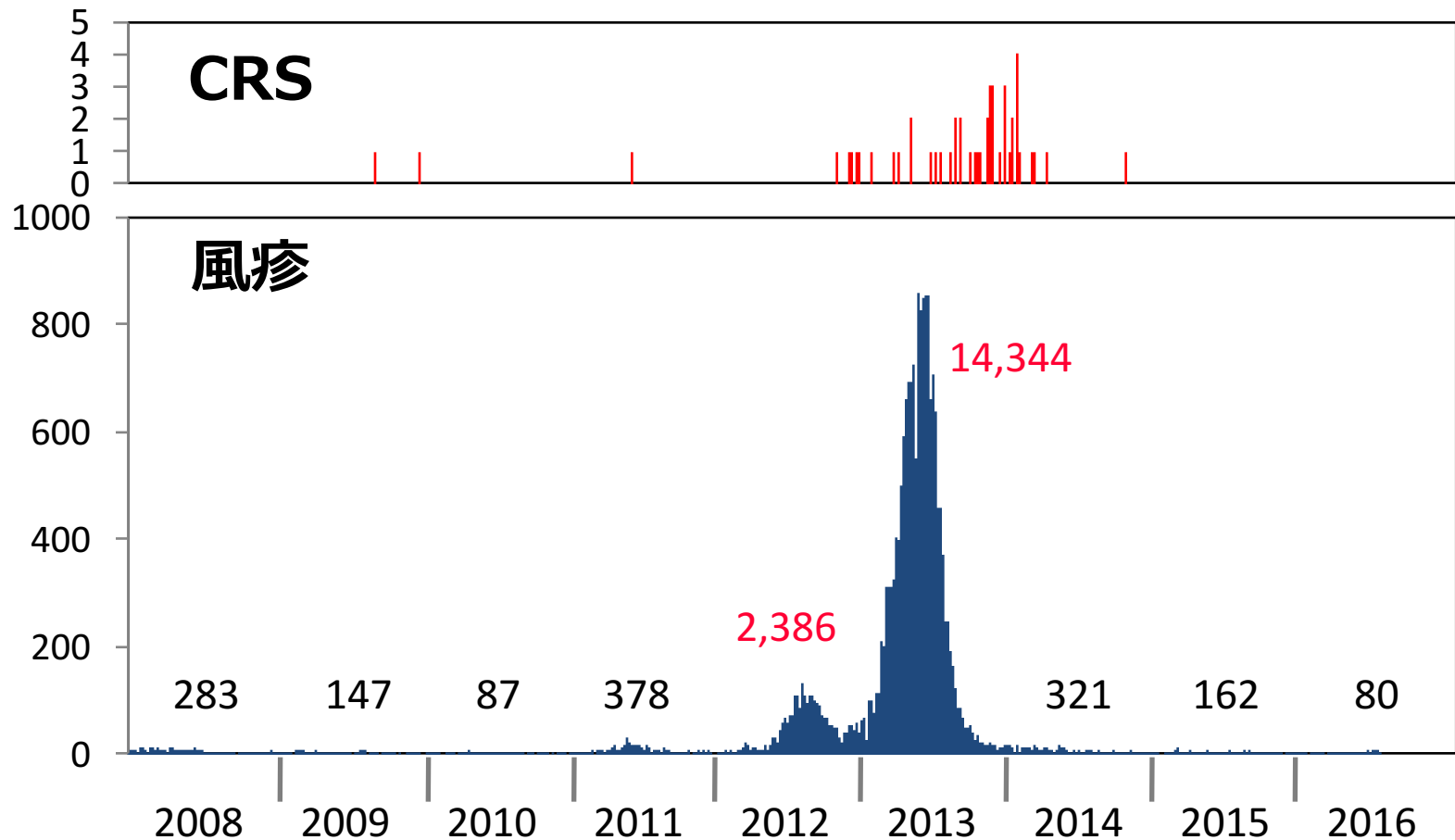
978 検査

麻疹報告数の推移 (2008 ~ 2015)

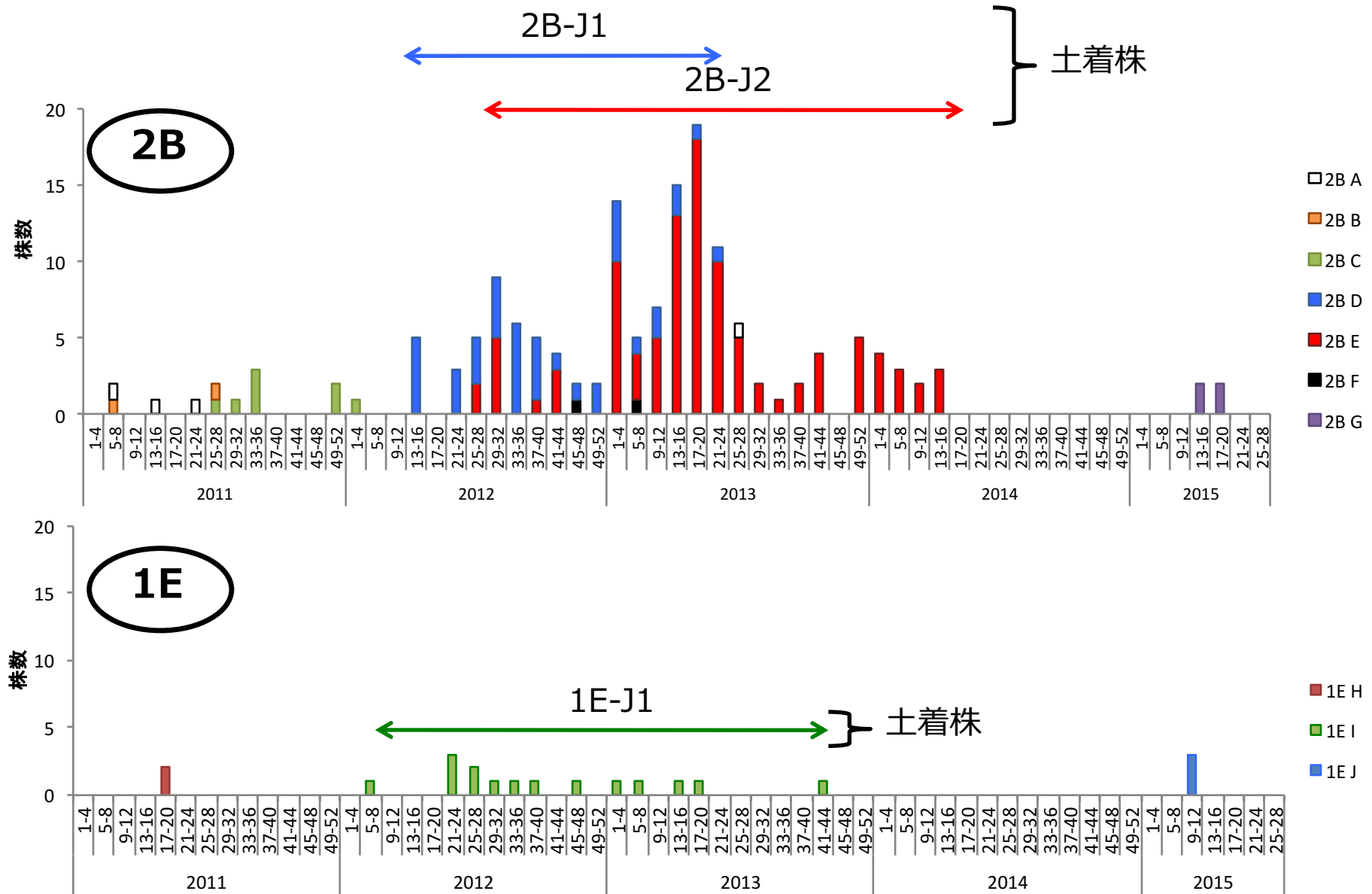


発生動向調査より作成

風疹およびCRS発生動向（2008～2016.25w）



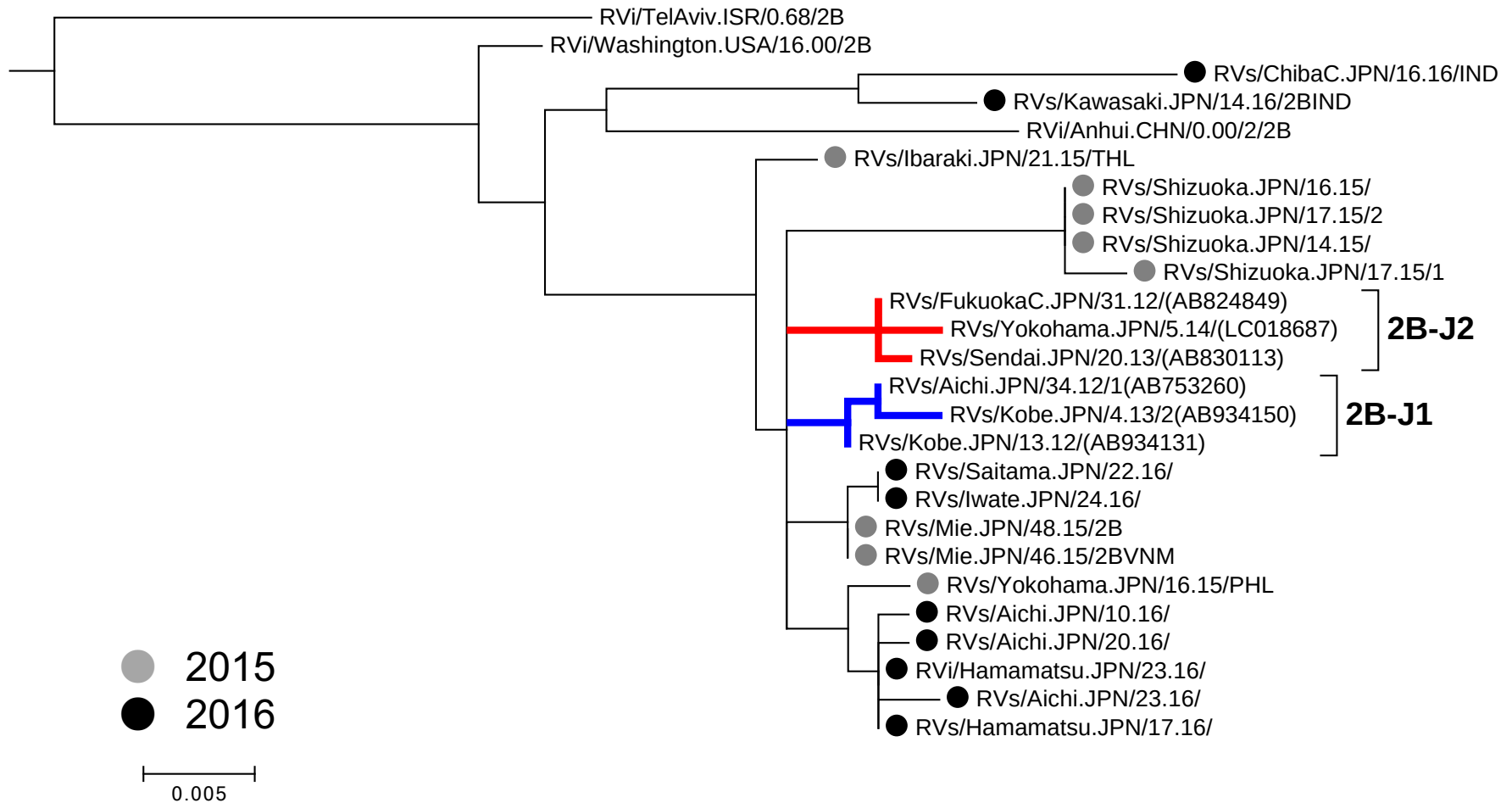
風疹ウイルス株の時系列推移



風疹ウイルス土着株の参照株

クラスター	流行期間	参照株	DDBJ accession #
2B-J1	2012-2013	RVs/Kobe.JPN/13.12/	AB934131
		RVs/Aichi.JPN/34.12/1	AB753260
		RVs/Kobe.JPN/4.13/2	AB934150
2B-J2	2012-2014	RVs/FukuokaC.JPN/31.12/	AB824849
		RVs/Sendai.JPN/20.13/	AB830113
		RVs/Yokohama.JPN/5.14/	LC018687
1E-J1	2012-2013	RVs/Aichi.JPN/23.12/	AB735189
		RVi/Kagawa.JPN/25.12/	AB739704
		RVi/Sakai.JPN/3.13/	AB820859

2015-2016年に報告された遺伝子型2Bの風疹ウイルス



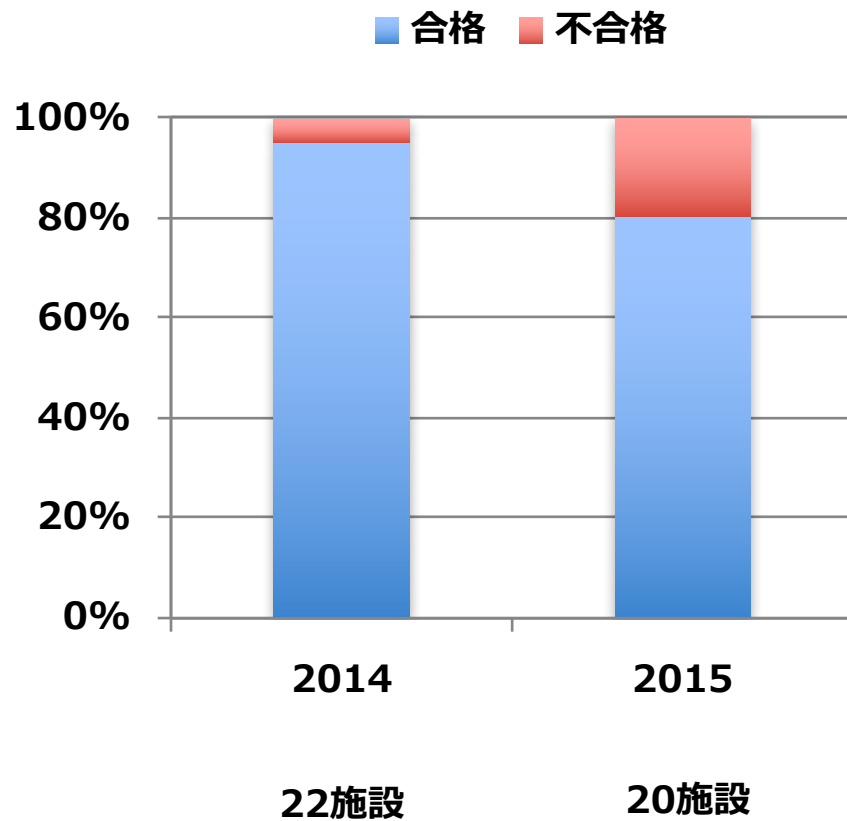
麻疹・風疹ウイルス遺伝子配列の登録のお願い

NESID 病原体検出情報システム 登録画面

The screenshot shows the NESID registration interface. At the top, there's a browser address bar and a menu bar. Below the menu bar, there's a "NESID ログイン" button. The main form area contains several input fields and buttons. The "報告機関" (Reporting Institution) is set to "感染症研究所" (Infectious Disease Research Institute). The "報告種別" (Report Type) is "1-5 発生数報告" (1-5 Occurrence Report). The "定点の種類" (Fixed Point Type) is "定点" (Fixed Point). The "登録年月日" (Registration Date) is "2024 年 06 月 18 日". The "病原体種別" (Pathogen Type) is "ウイルス" (Virus). The "検体提供者番号" (Sample Provider Number) is empty. The "検体採取年月日" (Sample Collection Date) is empty. The "検出病原体" (Detected Pathogen) is "Rubella virus genotype 2B". Below these fields, there are buttons for "登録" (Register), "連続登録" (Continuous Registration), "一時保存" (Temporary Save), and "戻る" (Back). At the bottom, there's a section for "過去の検体年月日" (Past Sample Date) and a table with columns for "検体" (Sample) and "配列" (Sequence). The "配列" column is highlighted with a red circle.

- 全国の流行株の把握
- WHOへの報告／WHO遺伝子データベース (MeaNS, RUBENS) への登録

麻疹検査診断精度管理結果 (調班との共同研究)



平成28年度日本医療研究開発機構
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

**麻疹ならびに風疹の排除およびその維持を
科学的にサポートするための実験室診断および
国内ネットワーク構築に資する研究**

木村小班「麻疹風疹実験室検査技術の研修に関する研究及び風疹ウイルスの時系列解析」

- 1 実施項目：麻疹実験室検査法の実地研修会
- 2 開催日時：平成28年12月6日（火）～8日（木）
- 3 麻疹風疹リファレンスセンターの実務担当者
- 4 旅費は全額研究班で負担します



ご清聴ありがとうございました

2. 薬剤耐性菌

レファレンスセンター等報告 薬剤耐性菌

- 平成27年度 活動報告
 - 研修
 - 陽性コントロール、マニュアル配布
- 平成28年度 アンケート報告
- 平成28年度 活動予定
 - 研修
 - 病原体検出マニュアルCREについて
 - 陽性コントロールの配布について

平成27年度 薬剤耐性菌研修

- 平成27年 3回（各回6名 計18名）の研修を実施
- 現在まで のべ50名、43地研が参加
- ブロック別 H26年度研修会参加者およびH27年度希望者数

	H26参加者数	H27 参加者数 () 希望者数
北海道東北	0	3 (7)
関東	8	3 (12)
東海北陸	2	4 (4)
近畿	2	3 (6)
中国四国	10	1 (8)
九州	1	4 (7)

H27年度 陽性コントロールDNA送付

平成27年12月：レファレンスセンターにて配布希望とりまとめ

平成28年1月下旬：感染研細菌第二部より送付

配布希望のあった64地方衛生研究所

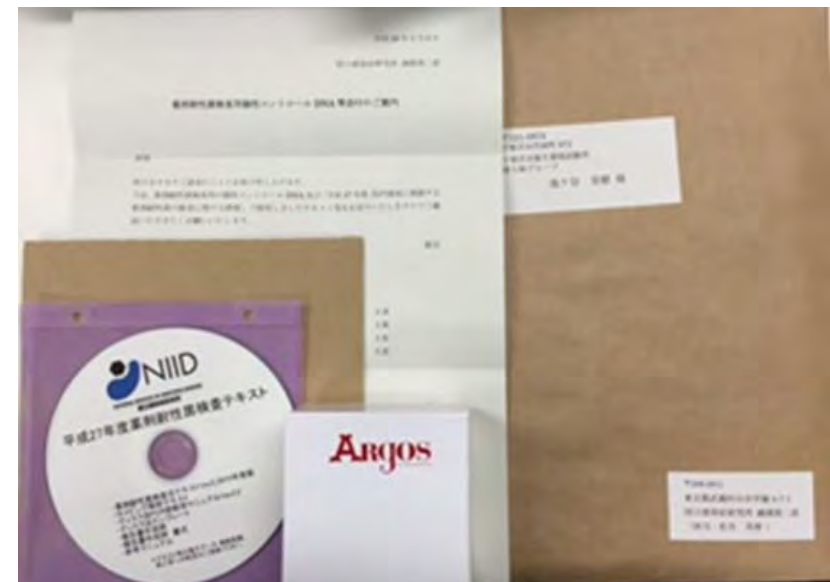
- 陽性コントロールDNA

カルバペネマーゼ遺伝子（NDM型、KPC型、IMP型、VIM型、OXA-48型）

ESBL遺伝子、AmpC遺伝子

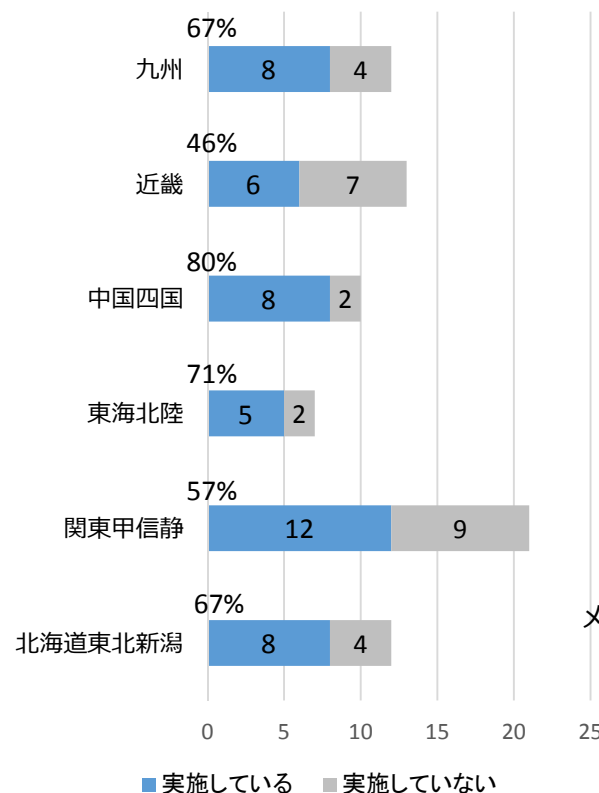
- 研修マニュアル（Ver2.2）

検査法テキスト など



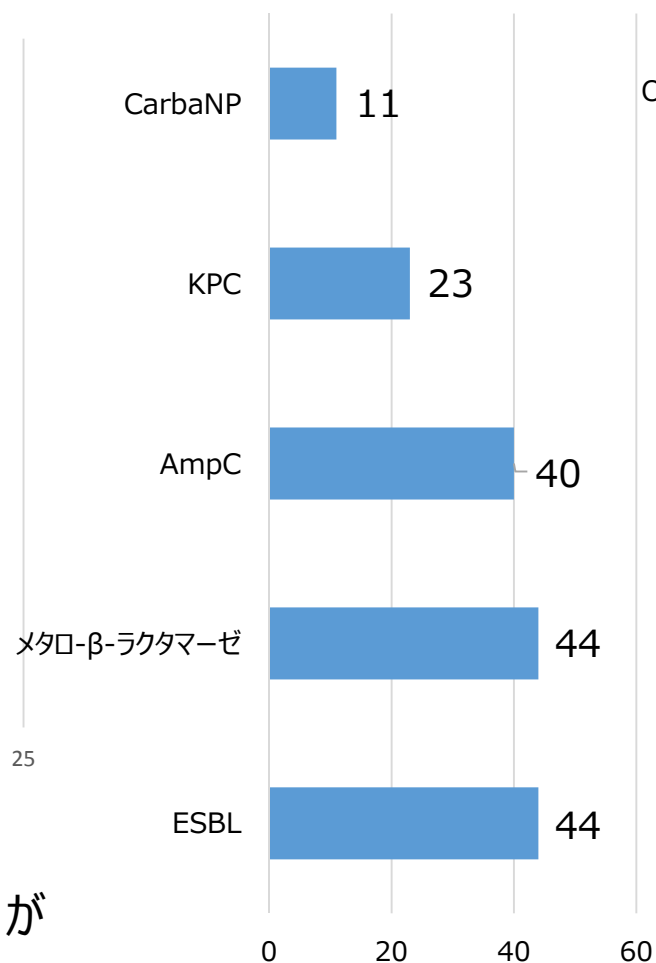
平成28年6月実施
薬剤耐性菌リファレンス事業・検査実施状況アンケート
回答数 80施設

ブロック別 薬剤耐性菌検査実施状況

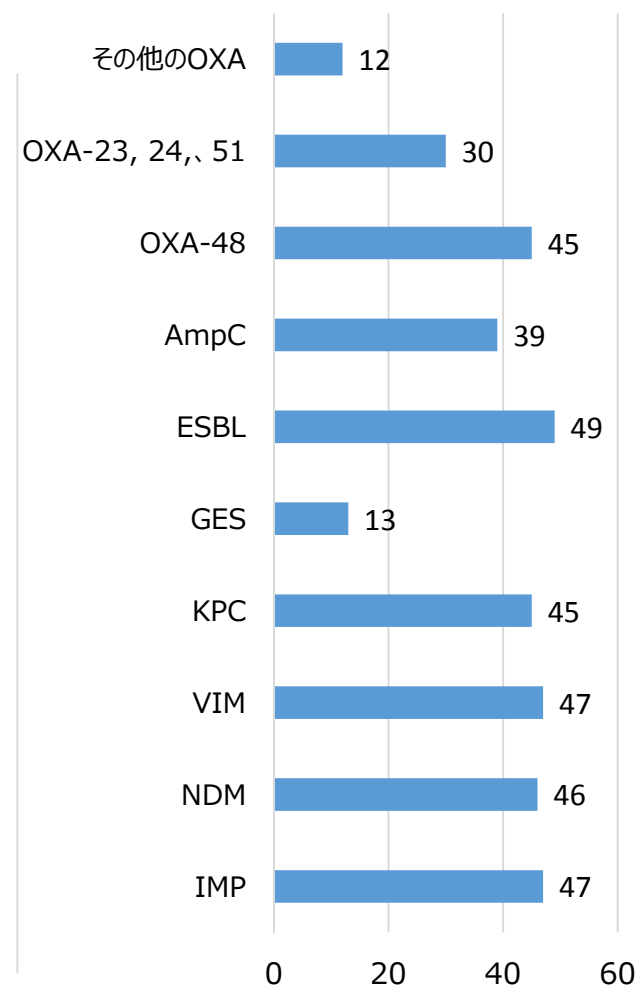


約6割（47施設/80施設）が実施

β-ラクタマーゼ鑑別試験
実施可能な検査方法

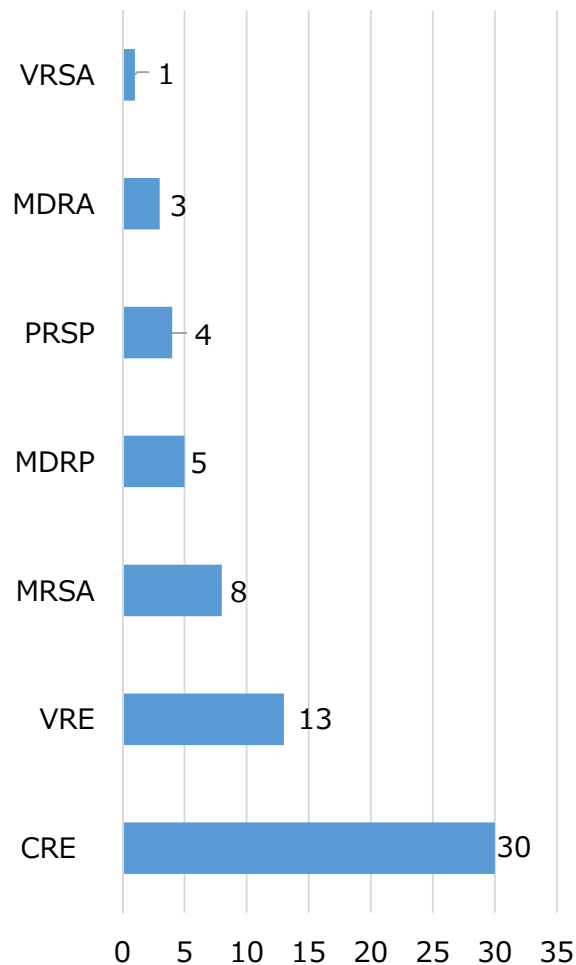


PCRによる実施β-ラクタマーゼ遺伝子の検出
実施可能なβ-ラクタマーゼ

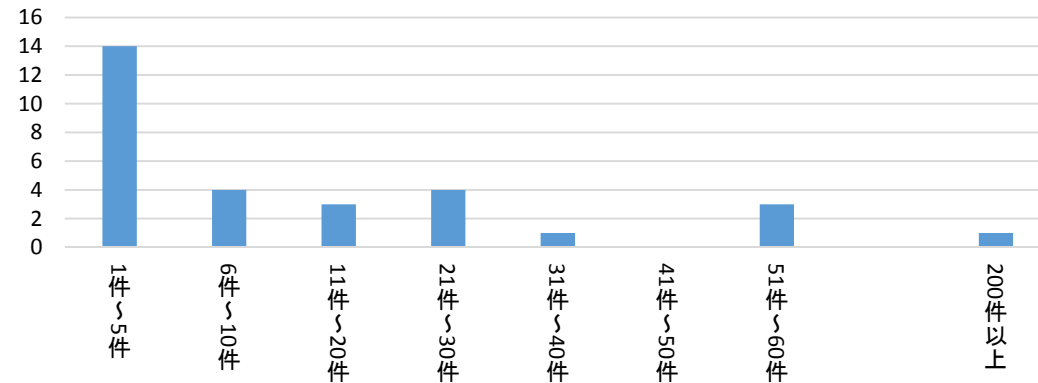


薬剤耐性菌検査実施状況

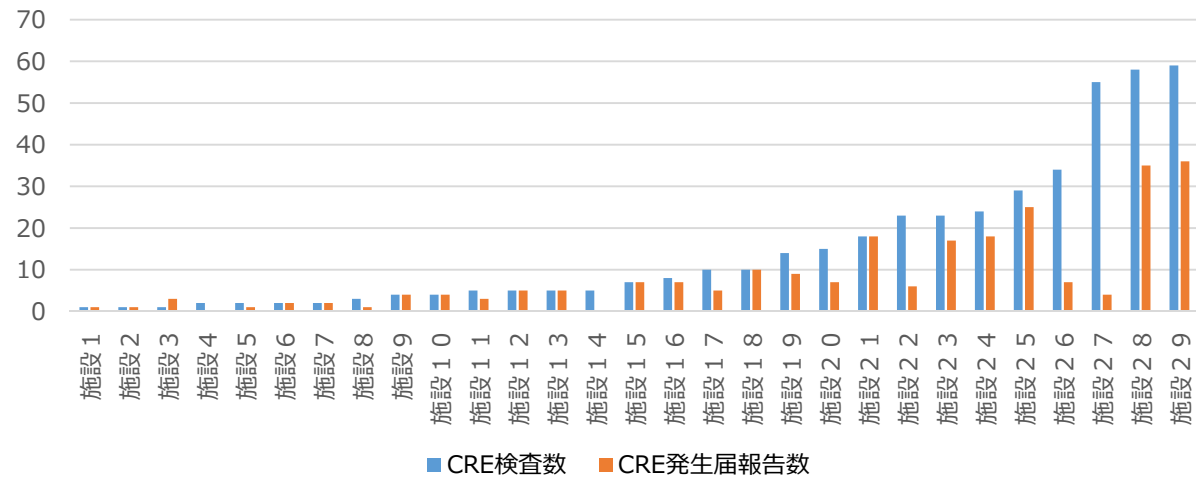
薬剤耐性菌別 検査実施施設数



CRE実施検査数 (N=30)



CRE検査数とCRE感染症発生届報告数



200件以上実施した施設は発生届報告なし

平成28年度 予定

- 薬剤耐性菌研修
 - 9月13日～15日 基本コース
 - 9月15日～16日 応用コース
- 病原体検出マニュアル
 - カルバペネム耐性腸内細菌科細菌
- 陽性コントロール配布
 - bla_{GES} のPCR用 陽性コントロール配布可
 - 一部の薬剤耐性菌については菌株（臨床分離株）
 - 分与手続きに1-2か月要する。
 - 再分与不可
 - PCR用およびディスク法の陽性コントロールとしてのみ使用可

3. HIV関連

レファレンスセンター等報告会 HIV関連

主な議題・情報提供

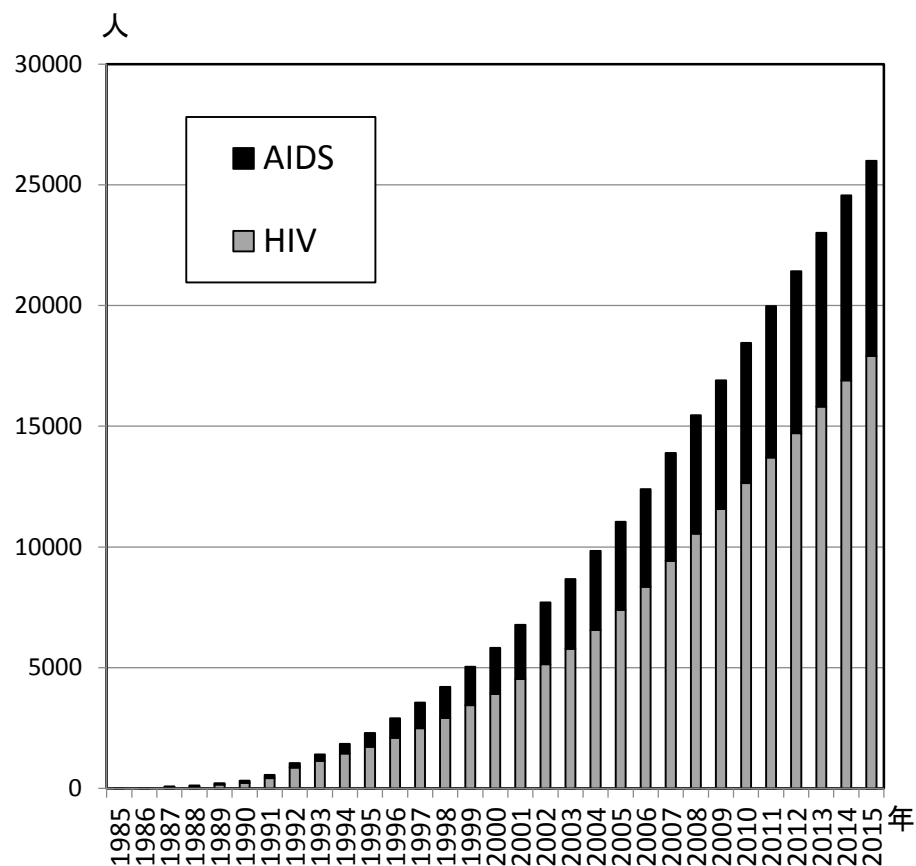
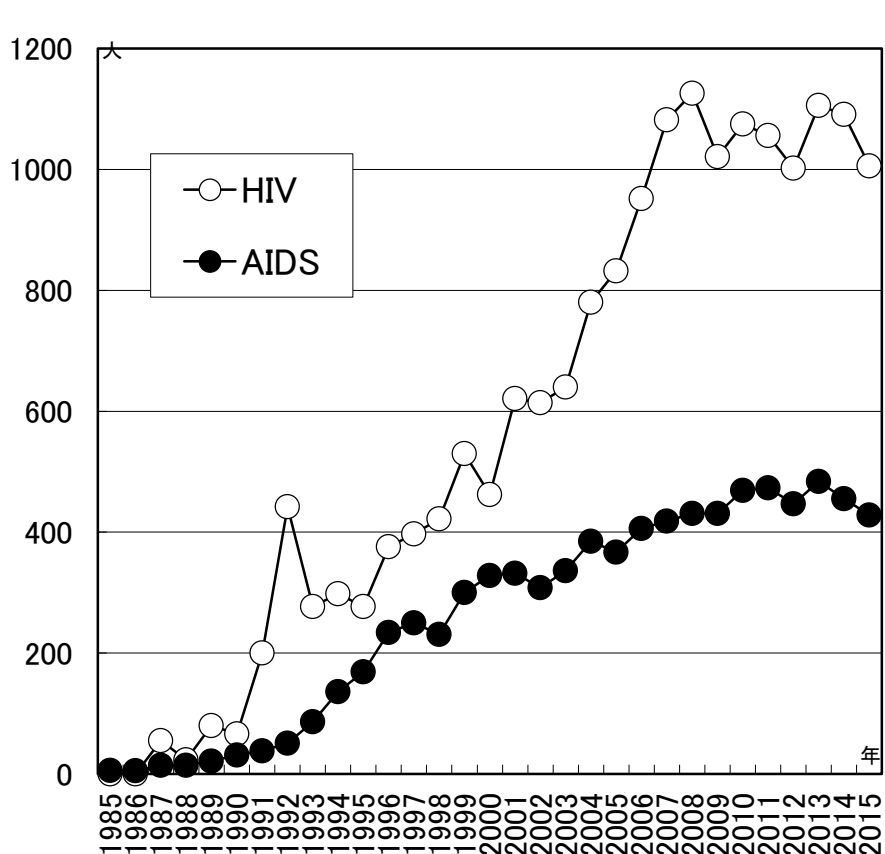
- ・ 日本国内のエイズ発生動向(2015年)の概説 (感染研・松岡)
- ・ 今後発売が見込まれる診断キットに関して(神奈川衛研・近藤真規子先生)
- ・ 診断キットの不具合に関する情報提供(大阪公衛研・川畑拓也先生)
- ・ HIV診断における地方衛生研究所の関わり

(東京都健安研 貞升健志先生 代理 長島真美先生)

新規HIV・AIDS報告数の年次推移

2015年新規報告数 1,437件（HIV感染者1,006件、エイズ患者428件）

国内HIV感染者累計報告数（2015年12月31日時点） 25,995件



HIV感染者/AIDS患者報告地別上位10県

2015年

HIV

	自治体	報告数	自治体	人口 10万対
1	東京都	364	1 東京都	2.718
2	大阪府	168	2 大阪府	1.901
3	愛知県	62	3 沖縄県	1.196
4	神奈川県	54	4 岡山県	0.884
5	北海道	35	5 愛知県	0.832
6	千葉県	32	6 徳島県	0.785
7	福岡県	30	7 奈良県	0.727
8	埼玉県	22	8 宮崎県	0.718
9	静岡県	21	9 香川県	0.714
9	兵庫県	21	10 岐阜県	0.686

AIDS

	自治体	報告数	自治体	人口 10万対
1	東京都	71	1 香川県	0.917
2	大阪府	53	2 沖縄県	0.704
3	愛知県	43	3 高知県	0.678
4	神奈川県	33	4 宮崎県	0.628
5	福岡県	27	5 大阪府	0.600
6	千葉県	22	6 愛知県	0.577
7	埼玉県	13	7 福岡県	0.530
8	北海道	12	8 東京都	0.530
9	岐阜県	10	9 岐阜県	0.490
9	広島県	10	10 滋賀県	0.424
9	沖縄県	10		

2014年

	自治体	報告数	自治体	人口 10万対
1	東京都	410	1 東京都	3.083
2	大阪府	156	2 大阪府	1.763
3	神奈川県	68	3 沖縄県	1.625
4	愛知県	67	4 福岡県	0.904
5	福岡県	46	5 愛知県	0.900
6	千葉県	36	6 石川県	0.777
7	埼玉県	24	7 大分県	0.764
8	兵庫県	23	8 神奈川県	0.749
9	沖縄県	23	9 宮崎県	0.714
10	北海道	19	10 群馬県	0.706

	自治体	報告数	自治体	人口 10万対
1	東京都	96	1 沖縄県	0.848
2	大阪府	53	2 福井県	0.755
3	愛知県	32	3 東京都	0.722
4	神奈川県	29	4 大阪府	0.599
5	福岡県	24	5 岐阜県	0.536
6	埼玉県	23	6 (鳥取県)	0.519
7	千葉県	21	7 栃木県	0.504
8	沖縄県	12	8 福岡県	0.472
9	茨城県	11	9 宮崎県	0.446
10	岐阜県	11	10 奈良県	0.434
10	兵庫県	11		

HIV発生率に地域差が認められた

HIV迅速診断試薬

(神奈川衛研・近藤先生)

抗体検査試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2

(アリーアメディカル 承認1998年)

抗原抗体検査試薬

エスプライン HIV Ag/Ab (富士レビオ 承認2008年)

ダイナスクリーン・HIV Combo

(アリーアメディカル 承認2015年)

2016年1月に販売開始、1～2年後に切り替え予定

ダイナスクリーン試薬

(神奈川衛研・近藤先生)

ダイナスクリーン・HIV-1/2 ダイナスクリーン・HIV Combo



検出項目	HIV-1抗体、HIV-2抗体	HIV-1抗体、HIV-2抗体、 HIV-1 p24抗原
検体	血清、血漿、全血	血清、血漿、全血
血液検体量	50 μ L	50 μ L
反応時間	15分(～1時間)	20分(～40分)
判定ライン	赤色	赤色

大阪府立公衆衛生研究所においては、使用期限の異なる様々なロットで不具合が確認された。

NEW LAV BLOT II

LOT 4D0322（使用期限 2015-10-30）

NEW LAV BLOT I

LOT 4G0323（使用期限 2016-01-30）

NEW LAV BLOT I

LOT 4J0324（使用期限 2016-03-30）

NEW LAV BLOT I

LOT 5D0328（使用期限 2016-11-30）

対策：

- キットを新規で購入した場合に、R6を50mLのチューブに一時的に移してみて、色・析出物の有無を目視で確認。
- 使用時にも毎回確認。

H28年度の予定

1. アンケート調査(実態把握) 【神奈川衛研 近藤真規子先生と共同】
全国衛研の調査 HIV検査(スクリーニング検査、
確認検査)の実施の有無等
2. 地方衛生研究所を対象とした精度管理(研究事業)
HIV陽性血清の送付(H28年末)

ご協力よろしく申し上げます。

問合せ: 東京都健康安全研究センター

貞升健志 Kenji_Sadamasu@member.metro.tokyo.jp

長島真美 Mami_Nagashima@member.metro.tokyo.jp

4. ジフテリア・百日咳・ボツリヌス

ボツリヌスおよびジフテリア
リファレンス・センター

ジフテリアのリファレンス・センター活動は、平成29年度より停止と決まりました。

北海道	ボツリヌス	
秋田県	ボツリヌス	ジフテリア
福島県	ボツリヌス	
東京都	ボツリヌス	ジフテリア
千葉県	ボツリヌス	ジフテリア
神奈川県	ボツリヌス	
大阪府	ボツリヌス	
大阪市	ボツリヌス	ジフテリア
神戸市	ボツリヌス	
三重県	ボツリヌス	ジフテリア
愛媛県	ボツリヌス	ジフテリア
山口県	ボツリヌス	ジフテリア
岡山県	ボツリヌス	ジフテリア
福岡県	ボツリヌス	ジフテリア
熊本県	ボツリヌス	ジフテリア
沖縄県	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

稀少感染症であること、動物実験を必要とすることから、検査の技術継承が難しい。毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。

第5回講習会

2016年11月9日～11月11日

あるいは

2016年11月16日～11月18日

開催予定

参加予定施設(定員4名)

埼玉県衛生研究所(臨床微生物)

埼玉県衛生研究所(食品微生物)

あと2名ほど募集中

診断用ボツリヌス抗毒素の標準化作業

A、B、E、F型の診断用抗毒素はすでに完備し、リクエストに応じて配布。

化学及血清療法研究所(化血研)と大阪府立大学の協力を得て、C、D、G型の抗毒素候補品を製造し、標準化試験がほぼ終了した。

ジフテリアに関する活動

ジフテリア検査に関してリクエストに応じて、試薬および菌株を配布

1. エレク法ジフテリア抗毒素
2. 培養細胞法用 標準ジフテリア抗毒素
3. *Corynebacterium diphtheriae* PW 8 (ジフテリア毒素原性検査陽性コントロール株)
4. ジフテリア毒素遺伝子検出PCR用陽性コントロール

百日咳レファレンスセンター



レファレンス関係の分与実績

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		1	1
4PlexリアルタイムPCRキット		4	7
陽性コントロールDNA	百日咳菌	0	0
	百日咳類縁菌	0	0
計		5（3施設）	8（8施設）

百日咳に関する情報還元

- Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. New Microbes New Infect. 2015 Oct 22;8:70-4.（宮崎衛研，大阪公衛研、感染研の研究成果）
- 大塚菜緒、蒲地一成. 百日咳の国際動向と検査法・ワクチンの問題点. 感染・炎症・免疫, 45: 46-56, 2015.

平成28年度の活動計画

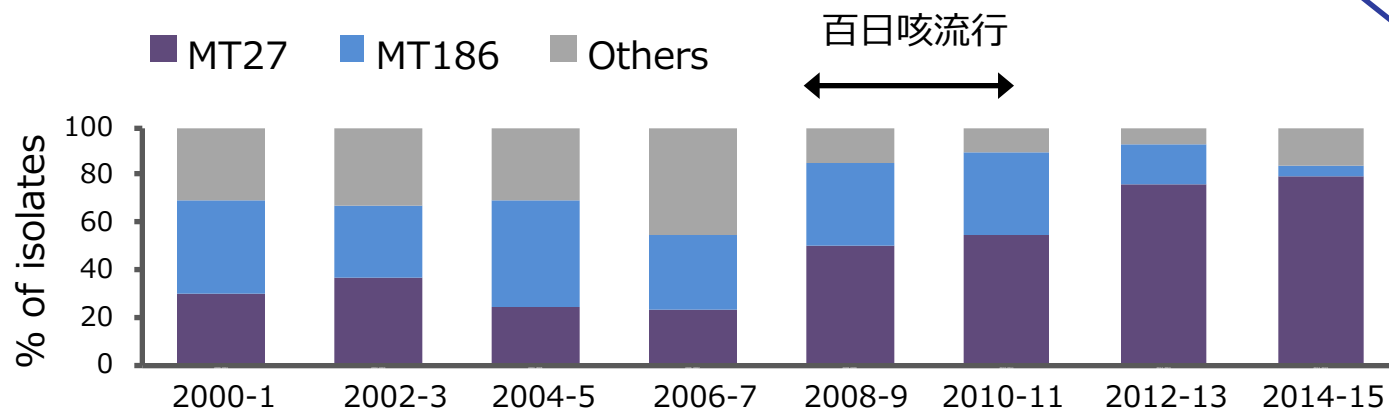
1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

2) 百日咳病原体サーベイランス（継続）

- 流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌

百日咳菌は年々変化しています。菌株解析にご協力をお願いします



5. 動物由来感染症

動物由来感染症レファレンスセンター

研究分担者 森川茂（獣医科学部長）

研究協力者 井上智、奥谷晶子、野口章、今岡浩一、
木村昌伸、堀田明豊（獣医科学部）

世話人： 井上智（国立感染症研究所獣医科学部）

動物由来感染症レファレンスセンター地衛研

- ◆山形県衛生研究所
- ◆東京都健康安全研究センター
- ◆愛知県衛生研究所
- ◆京都府保健環境研究所
- ◆広島県立総合技術研究所保健環境センター
- ◆徳島県立保健製薬環境センター
- ◆長崎県環境保健研究センター



SFTSウイルス抗体検出用ELISAのEQA

- SFTSV-ELISA抗原の供与(1,100検体分)
- 陽性対照血清の供与
- 2次血清(ImmunoPure Protein A/G-HRP)の供与
- 基質(ABTS)の供与
- IgG-ELISAのプロトコールの供与
- Blind sample set(11検体)を用いたバリデーション (EQA)

アドホック参加自治体 (12自治体)

北海道、富山県、茨城県、静岡県、名古屋市、広島市、福岡県、
福岡市、熊本県、大分県、宮崎県、沖縄県

SFTSウイルス抗体検出用ELISAのEQAのまとめ

自治体数	成績
14	0 K
3*	低感度
1	データ不良
1	未回答

*低感度の1地衛研は研修で問題解決

幾つかの自治体ではELISA経験が殆ど無いか、実施していない。

→ELISA readerが古い？

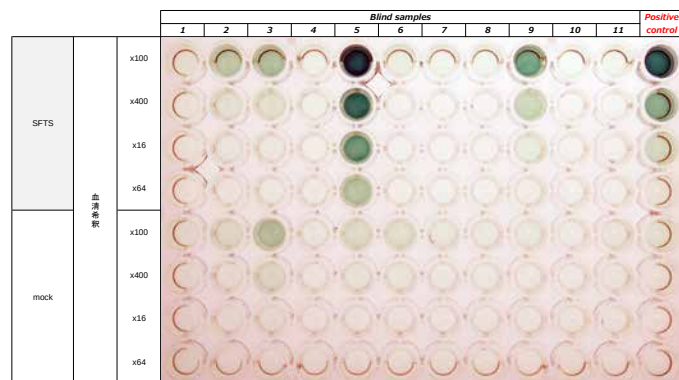
洗浄に問題？

ELISAキットの保管温度？

動物におけるSFTSウイルスの血清疫学調査に必要な検査が参加自治体で可能となった

配布用10倍希釈血清使用。proteinA/G x20000。

		Blind samples											Positive control
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
SFTS	x100	0.191	0.602	0.772	0.154	3.031	0.239	0.195	0.183	1.433	0.12	0.185	2.425
	x400	0.123	0.223	0.293	0.114	2.413	0.135	0.117	0.12	0.573	0.1	0.115	1.184
	x16	0.107	0.127	0.145	0.089	1.504	0.103	0.099	0.099	0.227	0.1	0.102	0.417
	x54	0.117	0.113	0.119	0.108	0.771	0.109	0.111	0.109	0.142	0.105	0.104	0.179
mock	x100	0.176	0.259	0.761	0.136	0.355	0.285	0.18	0.163	0.156	0.108	0.158	0.211
	x400	0.121	0.14	0.277	0.108	0.163	0.149	0.121	0.114	0.11	0.095	0.113	0.129
	x16	0.112	0.106	0.143	0.099	0.111	0.109	0.1	0.098	0.096	0.094	0.098	0.1
	x54	0.126	0.101	0.113	0.097	0.099	0.098	0.092	0.093	0.09	0.105	0.09	0.108
ΔSubtracted	x100	0.016	0.343	0.011	0.018	2.096	-0.046	0.015	0.02	1.277	0.012	0.027	2.213
	x400	0.002	0.083	0.018	0.006	2.25	-0.014	-0.004	0.006	0.463	0.005	0.002	1.095
	x16	-0.005	0.021	0.002	0	1.393	-0.006	-0.001	0.001	0.131	0.006	0.004	0.317
	x54	-0.009	0.012	0.006	0.011	0.672	-0.011	0.019	0.016	0.052	0	0.014	0.061



H28年度の取組み

野兔病の検査系バリデーション

担当：堀田明豊（獣医科学部第三室）

- レファレンスセンターへの希望調査結果
 1. 野兔病の検査（5衛研）
 2. 狂犬病の抗原検査（1衛研）
 3. 衛研全体で希望する検査等の調査（1衛研）

野兔病（感染症法で4類感染症、家伝法で届出伝染病）

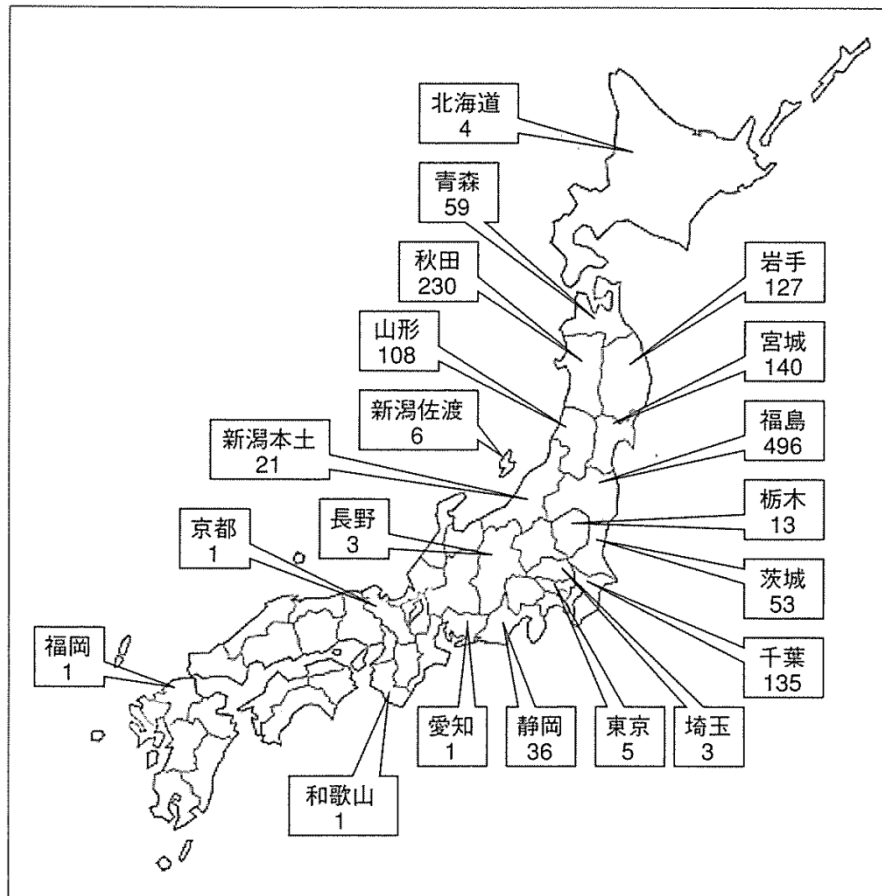


図 1 日本の県別野兔病発生数 (1921～2008 年, 数値は暫定的)

「医学のあゆみ」2010より

感染源	例数
ノウサギ	1,235
他の動物種	19
マダニ類	9
実験室内感染	34
不明	26
計	1,323

「大原綜合病院年報」1986から改変

リンパ節腫脹	病型	No.
あり	リンパ節型	627
	潰瘍リンパ節型	213
	口咽頭型	50
	眼リンパ節型	38
	鼻腔リンパ節型	5
なし	チフス型	53
	胃型	1
	不明瞭	26

Ohara Y. et al. [Infection]1991より改変

2008年7月以降の野兔病症例

年	報告地域	感染源
08	和歌山	ダニ？
14	兵庫	ダニ？
15	徳島	ダニ？
15	福島	？

いずれも当初はリケッチア感染症が疑われた症例
これまでの野兔病とは疫学情報が異なる



検査法のバリデーション、更なる情報収集が必要

感染研が実施している野兔病の行政検査

- ・ 血清学的検査（微量凝集反応）
- ・ 遺伝子検出（conventional PCR）
- ・ 分離菌同定（培養、生化学性状、抗体反応など）

- ・平成21および22年度に、5つの地方衛研（山形県、東京都、愛知県、京都府および長崎県）と感染研で実施
- ・微量凝集反応にて、擬似3検体の凝集力価確認
- ・PCR（16SrRNA および *fopA*領域）の検出感度および擬似4検体DNAによる特異性の確認



微量凝集反応：実施機関間で凝集力価の差は2倍以内

PCR（検出感度）：実施機関間で100倍の差

PCR（特異性試験）：予定通りの反応

許容範囲内であり、良好な結果

今年度の活動予定

- 血清学的検査（微量凝集反応）

抗原濃度調整

陽性(強・弱)、陰性対照および擬似3検体血清の凝集力価測定

- 遺伝子検出（conventional PCR）

16S rRNAおよび*fopA*領域の遺伝子断片の増幅

検出感度の確認

擬似検体DNAについて、各遺伝子領域断片の増幅の有無を確認

- 平成21および22年度実施の5つの地衛研（山形県、東京都、愛知県、京都府および長崎県）と、広島および徳島県＋アドホック参加の地衛研で実施を予定。

今後の予定

- 8月31日：アドホックの自治体の参加締切り。
- 10月上旬： 必要試薬等の発送。
- 12月上旬： 結果回収。
- 結果供覧、再試験（必要の場合）。

問い合わせ先

国立感染症研究所 獣医科学部

堀田明豊 メール：ahotta@nih.go.jp
tel: 03 5285 1111 (2623)

6. インフルエンザ

レファレンスセンター報告

インフルエンザ

コア地衛研：

岩手県環境保健研究センター

東京都健康安全研究センター

大阪府立公衆衛生研究所

愛媛県立衛生環境研究所

福岡県保健環境研究所

○愛知県衛生研究所

サポート地衛研：

北海道立衛生研究所

横浜市衛生研究所

富山県衛生研究所

堺市衛生研究所

沖縄県衛生環境研究所

H27年度のレファレンス活動報告

- ✓ インフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するためのアンケート調査
→ 希望地衛研での細胞培養およびウイルス培養研修
- ✓ 「インフルエンザウイルスの分離培養検査に関する追跡調査」 アンケート → 結果還元
- ✓ 73カ所の地衛研に対してインフルエンザウイルスのリアルタイムRT-PCR検査の外部精度管理試験(EQA)の実施
- ✓ 薬剤耐性株サーベイランスの実施
TaqMan PCRで検出(地衛研)、感受性試験(感染研)

これまでのEQAについて

年度	年月	参加地衛研	パネル
H23年度	～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
H24年度	～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
H25年度	～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール
H26年度	～2014年12月	72	未知6検体(RNA抽出不要)
H27年度	～2016年3月	73	1. 未知1検体(RNA抽出不要) 2. 未知5検体(要RNA抽出)

* 平成27年度まで厚生労働省科学研究補助金(小田切班)にて実施

2015/16シーズン 抗インフルエンザ薬耐性株検出状況

2016/07/01 現在

	A(H1N1)pdm09		A(H3N2)		B	
	オセルタミビル ペラミビル	ザナミビル ラニナミビル	オセルタミビル ペラミビル	ザナミビル ラニナミビル	オセルタミビル ペラミビル	ザナミビル ラニナミビル
耐性株数	44 (1.8%)	0	0	0	0	0
解析株数	2,383	288	116	116	267	267
分離・検出 報告数	3,541		577		3,029	

H28年度の実施

○ 実施予定の項目

✓ EQA(2016)の実施

✓ 薬剤耐性株サーベイランスの継続

TaqMan PCRで検出(地衛研)、感受性試験(感染研)

◆2016/17シーズンの実施要綱は8月に発送予定

平成28年度 外部精度管理事業について

実施主体

厚生労働省健康局結核感染症課
感染症情報管理室 情報管理係

事務局

国立感染症研究所(戸山庁舎)
レファレンス委員会事務局(事業の実施全般)

平成28年度事業担当部

インフルエンザウイルス研究センター第二室
(事業計画、実施方法、トラブルシューティング)

平成28年度外部精度管理事業 実施スケジュール **調整中**

- ・実施要綱及び参加登録票の送付:平成28年8月1日
(事務局から送付予定)
- ・「参加登録」の締切:平成28年8月12日
(事務局へ連絡)
- ・パネル検体発送予定:平成28年8月22日
(普通郵便または宅急便で事務局より送付)
- ・測定期間:パネル検体到着日～平成28年10月14日
- ・結果報告およびアンケート送付の締切:平成28年10月14日
(事務局へ連絡)
- ・結果報告後にパネル検体の内容およびトラブルシューティング解説書の送付
(事務局より参加施設へ個別に連絡)
- ・集計および解析結果報告:平成28年12月頃
(方法については未定)

7. 大腸菌

レファレンスセンター等報告

「大腸菌」

1) 全ゲノム配列解析 (SNP解析) を用いた腸管出血性大腸菌 (EHEC) サーベイランスの高精度化

感染研・細菌 I 部
李 謙一

2) ①大腸菌の O-genotyping について

②精度管理用菌株の配布について

感染研・細菌 I 部
伊豫田 淳

EHECの分子疫学的解析

地方衛生研究所・保健所等

↓ 菌株 (年間 3,000-4,000株)

感染研
細菌Ⅰ部

MLVA
O157, O26, O111

PFGE
その他のO群

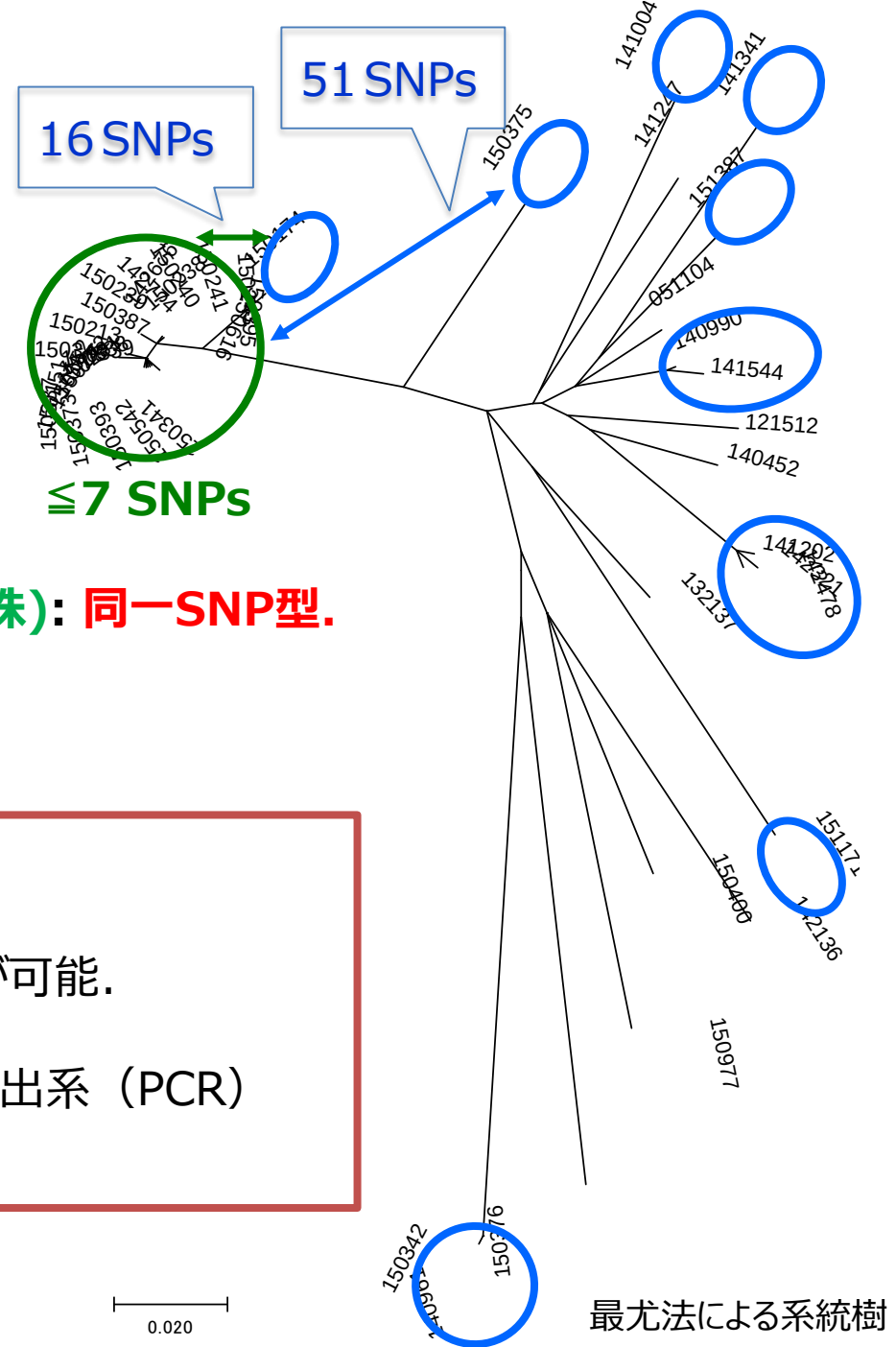
解析結果(血清型,
PFGE型, MLVA型)
の還元

型別法	型別能	時間	コスト	特徴
PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動)	○	△	○	高い汎用性
MLVA (Multilocus variable tandem repeat analysis)	○	○	○	O157, O26, O111のみ
全ゲノム配列を用いたSNP解析	◎	△	×	系統解析, 病原性遺伝子の検出等も可能

目的：従来法（PFGE, MLVA）との比較から、SNP解析によるEHECの分子疫学的解析手法を確立する。

- ・ 同一PFGE型株 + PFGE型類似株 (7株): 同一SNP型.
- ・ 他のPFGE型類似株とは別のSNP型.

- ・同一PFGE型 = 同一SNP型
- ・PFGE型類似株から同一SNP型の抽出が可能.
- ・同一SNP型特異的配列の抽出と簡易検出系（PCR）が構築可能.



MLVA法との比較

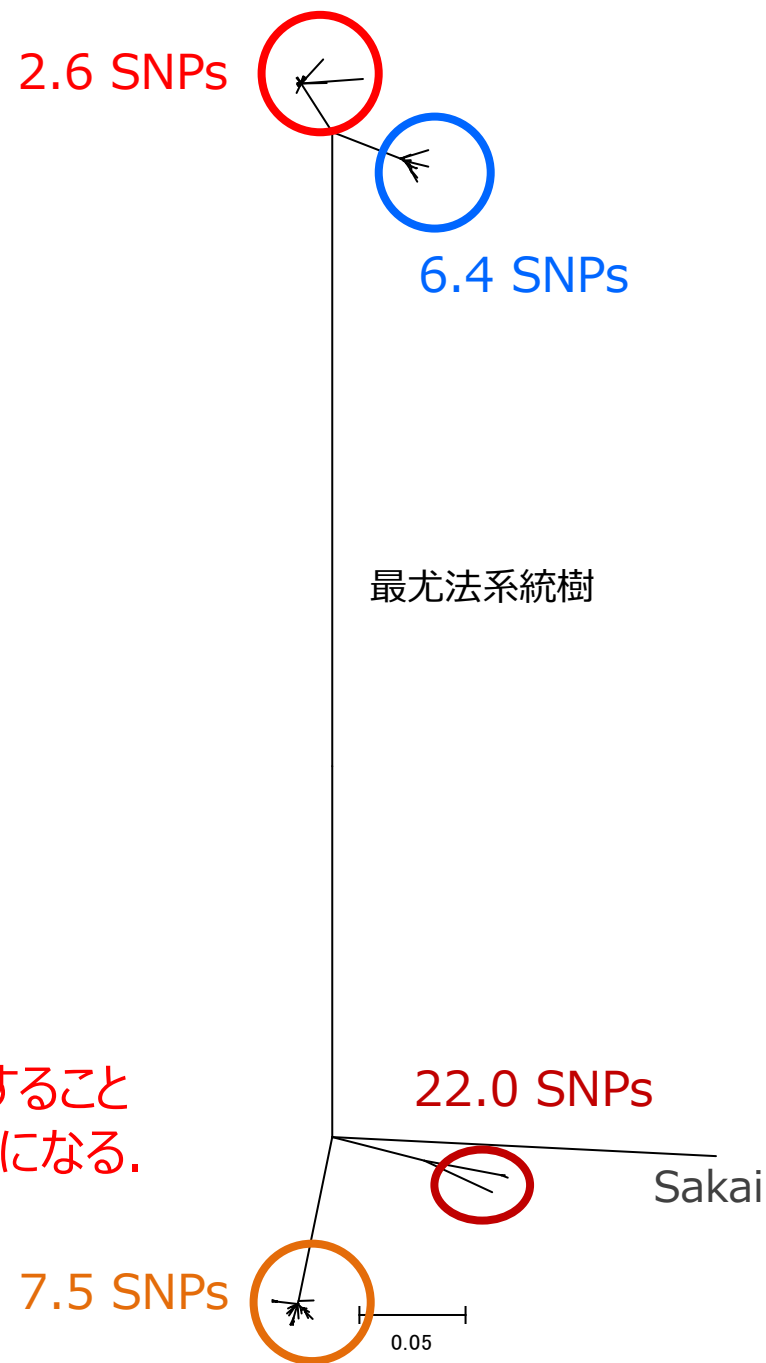
- 4つのMLVA 型の O157 (n=116) の全ゲノム解析 (SNP解析)

- 同一MLVA型 = 同一SNP型

- MLVA の型別能 < SNP 解析の型別能

まとめ：

従来法 (PFGE /MLVA) にSNP解析法を追加することで効率的かつ高精度な菌株サーベイランスが可能になる.

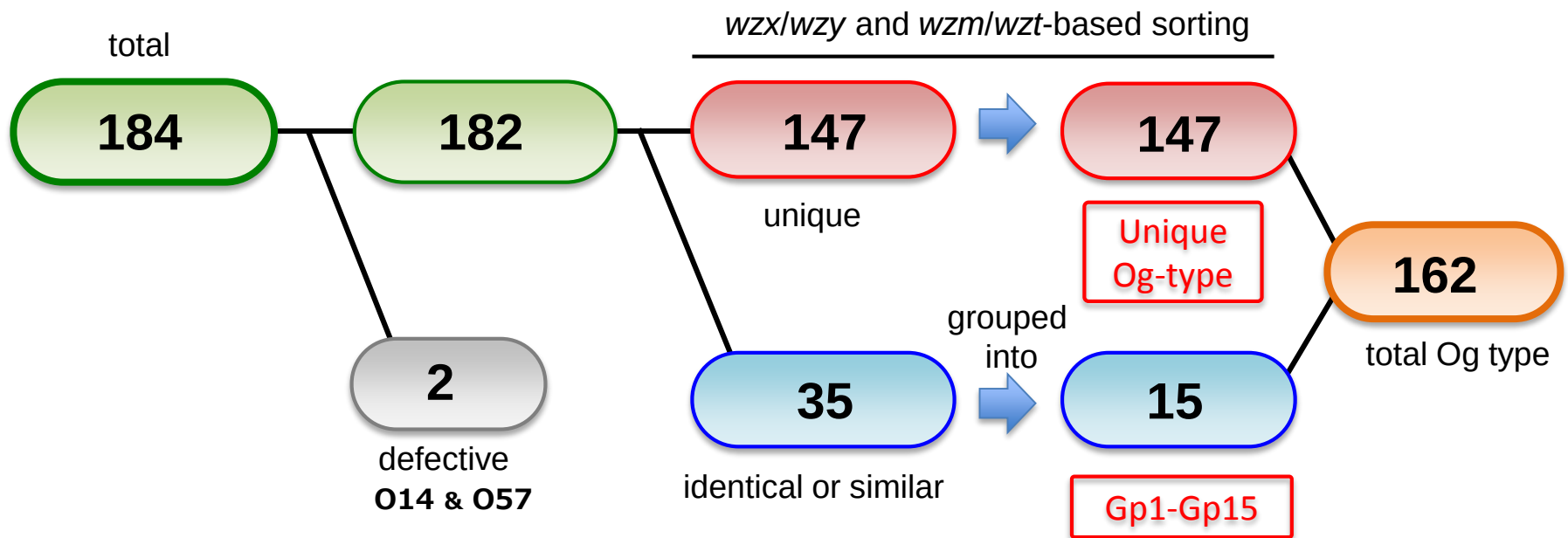


2) ①大腸菌の O-genotyping について

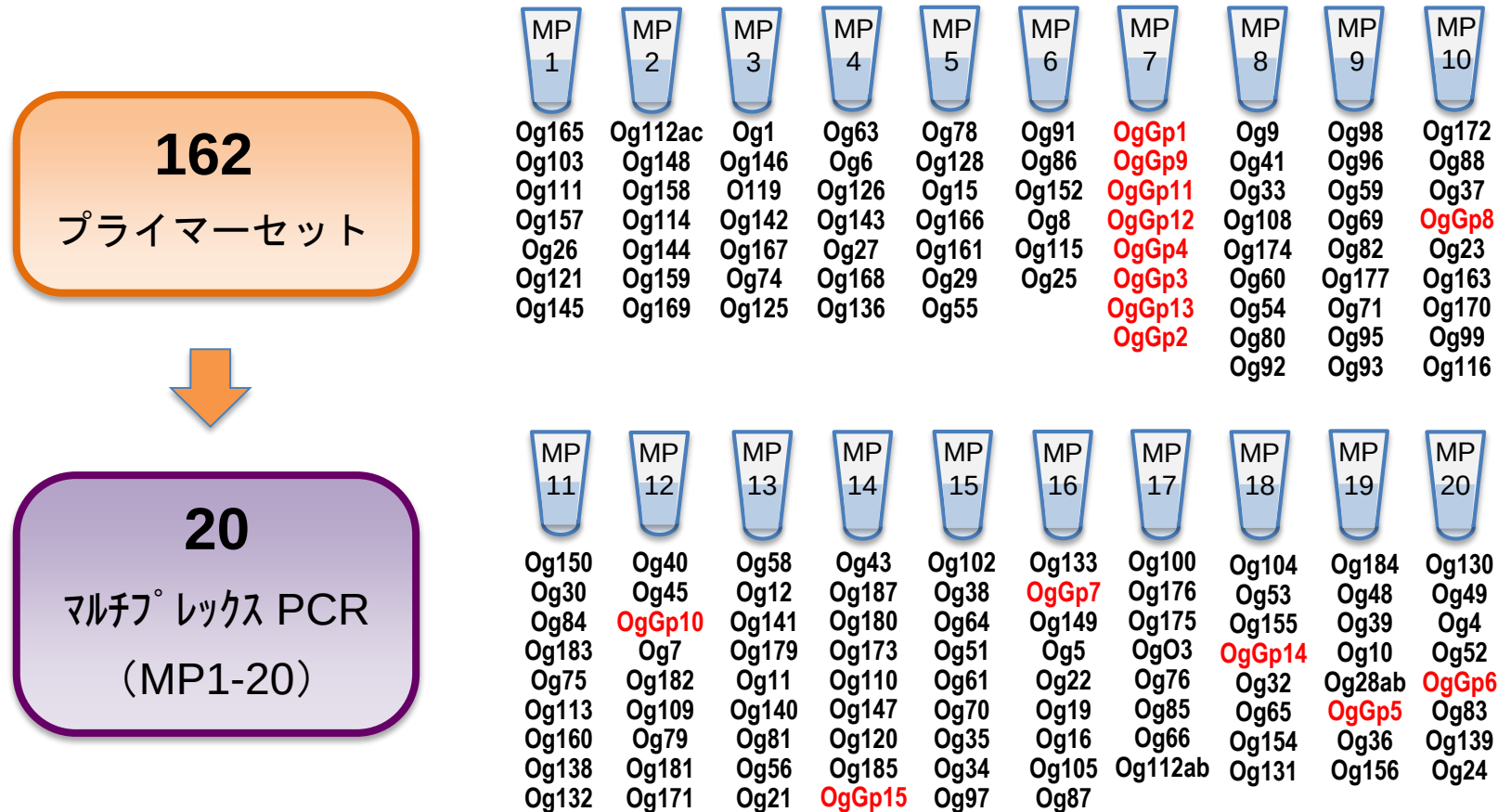
O血清群 → O遺伝子型

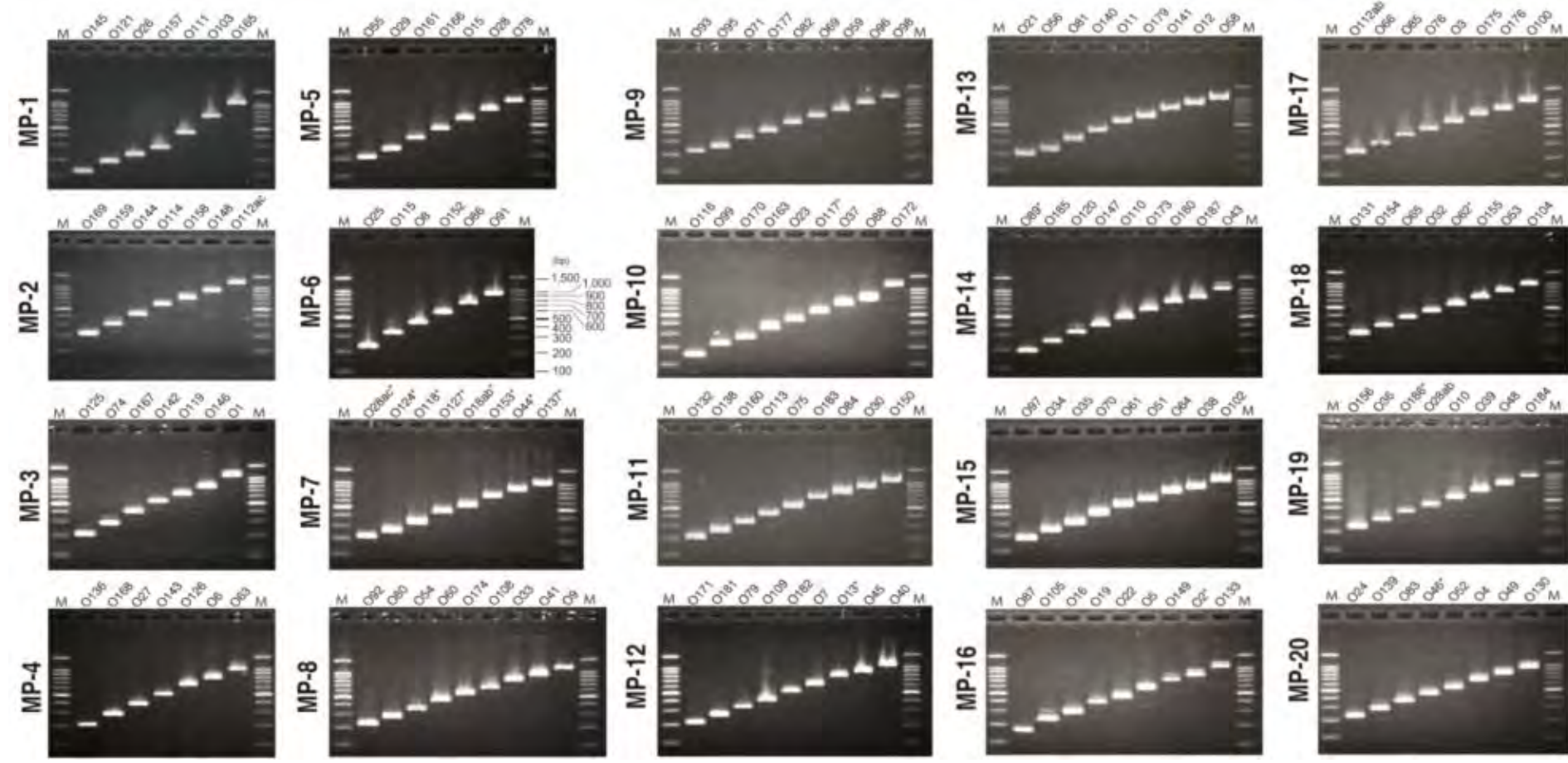
O血清群 (O serogroup)

O遺伝子型 (O genotype)



効率的検査系の確立





Og タイピングの実用化

デンカ抗血清による型別結果との整合性確認:

Og型と一致した場合: 抗血清を用いた確認は省略.

Og型が不一致 (OUT/OgUT) の場合: 抗血清で確認.



- 抗血清セット維持費用の大幅削減
- 新規Og型の同定が可能

②精度管理用菌株の配布について

配布可能菌株 (1) : 下痢原性大腸菌PCRコントロール用菌株

配布可能菌株 (2) : 志賀毒素遺伝子PCRコントロール用菌株

配布可能菌株 (3) : EQA用菌株 (EHEC)

8. エンテロウイルス

エンテロウイルス レファレンスセンター報告

福島県衛生研究所	(北海道・東北・新潟)
神奈川県衛生研究所	(関東・甲信・静)
愛知県衛生研究所	(東海・北陸)
大阪府立公衆衛生研究所	(近畿)
愛媛県立衛生環境研究所	(中国・四国)
福岡県保健環境研究所	(九州)

内容

- 2015-16シーズンのエンテロ検出状況
- H27(2015)年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査による結果サマリー(情報提供)
- ポリオウイルス封じ込めについて
- その他

平成28年度「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」皆川班について、エンテロウイルスに関わる研究計画について情報提供(岩手県環境保健研究センター高橋先生より)

エンテロウイルスレファレンスセンター業務 (H27年度実績)

抗血清分与	延べ14衛研(65種類)
細胞分与	6衛研(RD-A:4衛研、L20B:5衛研)

エンテロウイルス抗血清EP95*は各ブロックへ依頼ください。
その他の単味抗血清はウイルス二部へ照会ください。

RD-A細胞、L20B細胞は分与可能です。

*EP95とは、1995年にエンテロウイルスレファレンス支部と共同で作成したプール抗血清。
国内で流行した代表的な血清型を含む。
「無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル」に使い方など詳細を記載

EV71,CA16,CA6の検出数(2000-2016年24週まで)

NESIDデータより作成
2016.07.11アクセス

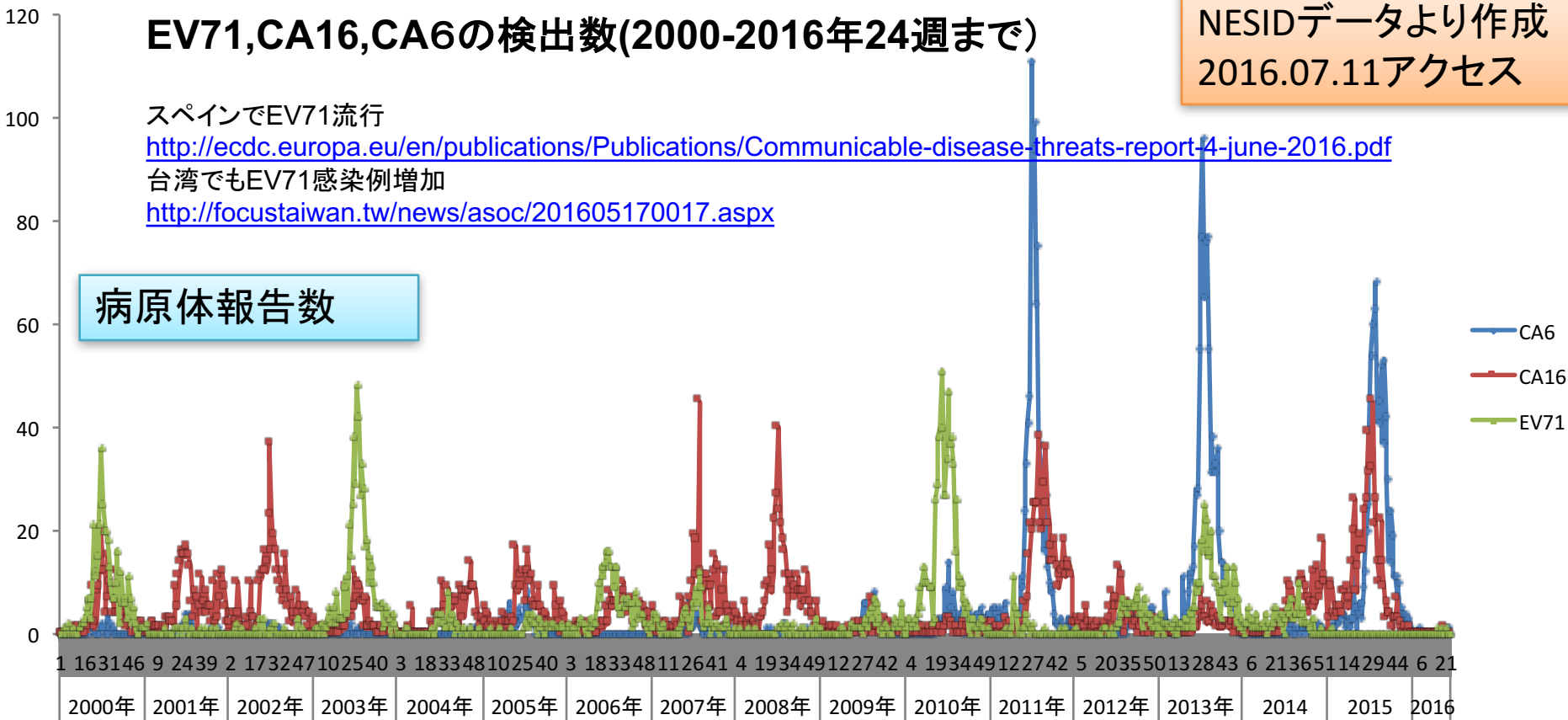
スペインでEV71流行

<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Communicable-disease-threats-report-4-june-2016.pdf>

台湾でもEV71感染例増加

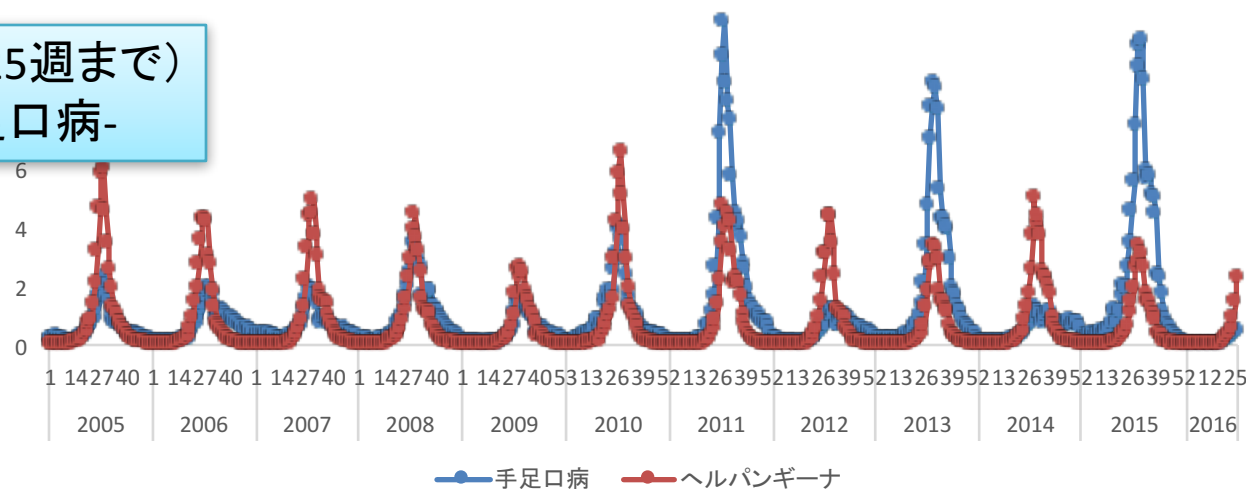
<http://focustaiwan.tw/news/asoc/201605170017.aspx>

病原体報告数



12

定点あたりの報告数(-25週まで) -ヘルパンギーナと手足口病-



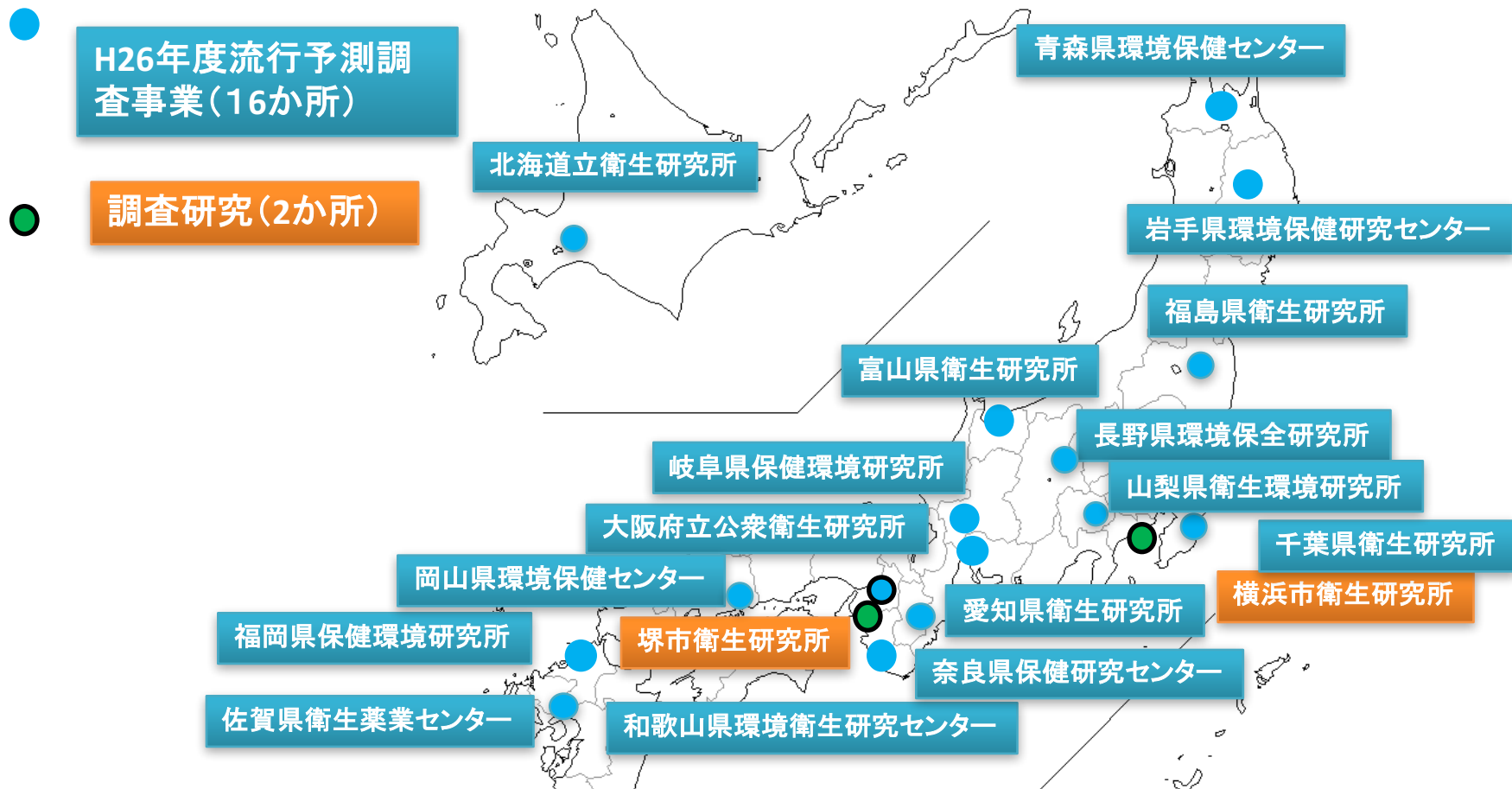
IDWRデータより作成
2016.07.12アクセス

2016.7.11現在の登録数 (年齢と血清型)																										
年齢	CA 10	CA 14	CA 16	CA 2	CA 4	CA 5	CA 6	CA 9	CB 1	CB 2	CB 3	CB 4	CB 5	E 16	E 18	E 25	E 3	E 30	E 6	E 9	EV NT	EV 71	HP eV	HP eV	HP eV	報告
0				1	4	2	1		2	3	3		20	3	5				1	2	3	1	2	12	1	66
1	1	1		1	14	2	1	3	1				12		2	1				2	4	1	2	1		49
2	1		1		11		3	2		2	1	2	7		1	1					1		1		1	35
3	1			1	3	1	1	1					6												1	15
4					2			1	1		1		6								1			2		14
5					3					1			1				1				1	1		1		9
6	1												3								2					6
7													2				1									3
8													1		1											2
9													1		1											1
10								1										1								2
11																										
12																			1							
13																										1
14																										
15																								1		1
16																										
17														1												1
18																										
19																										
20																										
21																										
22																										
23																										
25													1													1
26																										
27																										
28																								1		1
29																										
31													1													1
32					1																			1		2
33																										
34																										
35																										
36																										
37								1																		1
計	4	1	1	3	38	5	6	9	5	5	5	2	60	4	10	2	2	2	1	4	12	3	5	19	3	211

26周で比較すると昨年に比べ、手足口病の報告は少なめ。ヘルパンギーナはほぼ同じ時期の立ち上がり。

NESIDデータより作成 2016.07.11アクセス

2016年度環境水サーベイランスのご協力を頂く地方衛生研究所



	H21 (2009)以前	H22 (2010)	H23 (2011)	H24 (2012)	H25 (2013)	H26 (2014)	H27 (2015)	H28 (2016)
調査場所	1	2	2	4	13(8)**	19(14)	18(16)	18(16)
				大石班参加。 事業化準備	事業開始			

(*H25年度流行予測調査事業開始以降、事業参加衛研数)

平成28年度「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」皆川班 2016. 7. 6

分担研究: 感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査(EQA)導入の研究

国立感染症研究所 吉田弘

研究協力者(予定)

北川和寛(福島県衛) 山下育孝(愛媛県衛環研) 高橋雅輝(岩手県環保研セ)
エンテロウイルスレファレンスセンターを中心(にお願いする予定)

研究の背景となるもの

エンテロウイルスに関わる5類定点把握疾患(小児科、基幹定点)

エンテロウイルスの検査体制に関するアンケート(H25年厚生科研費研究班)

5類小児科定点把握疾患に関する国内A-E地衛研におけるウイルス検出率

研究の目標

試行を通じた方法論のパッケージ提案

評価指標の提言

9. 寄生虫

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人: 杉山 広(感染研・寄生動物)

1. レファレンスセンター会議・寄生虫

(1) 位置付けと課題

(2) 感染研と地研との活動等

2. 寄生虫症の発生状況

感染症法・食品衛生法

3. 話題の提供・情報交換

レファレンスセンター活動・寄生虫

- ・各ブロックの拠点となる地研は指定していない。
- ・課題となる寄生虫を選び、関連の地研・検疫所とメーリングリストを利用して情報交換（研修）。

・課題の寄生虫

- (1) 4類 マラリア, エキノコックス **(感染症法)**
- (2) 5類 クリプトスポリジウム, ジアルジア, 赤痢アメーバ

-
- (3) 食品媒介寄生虫 **(食品衛生法)**

クドア, サルコシスティス, アニサキス等

食中毒事件票・病因物質の種別

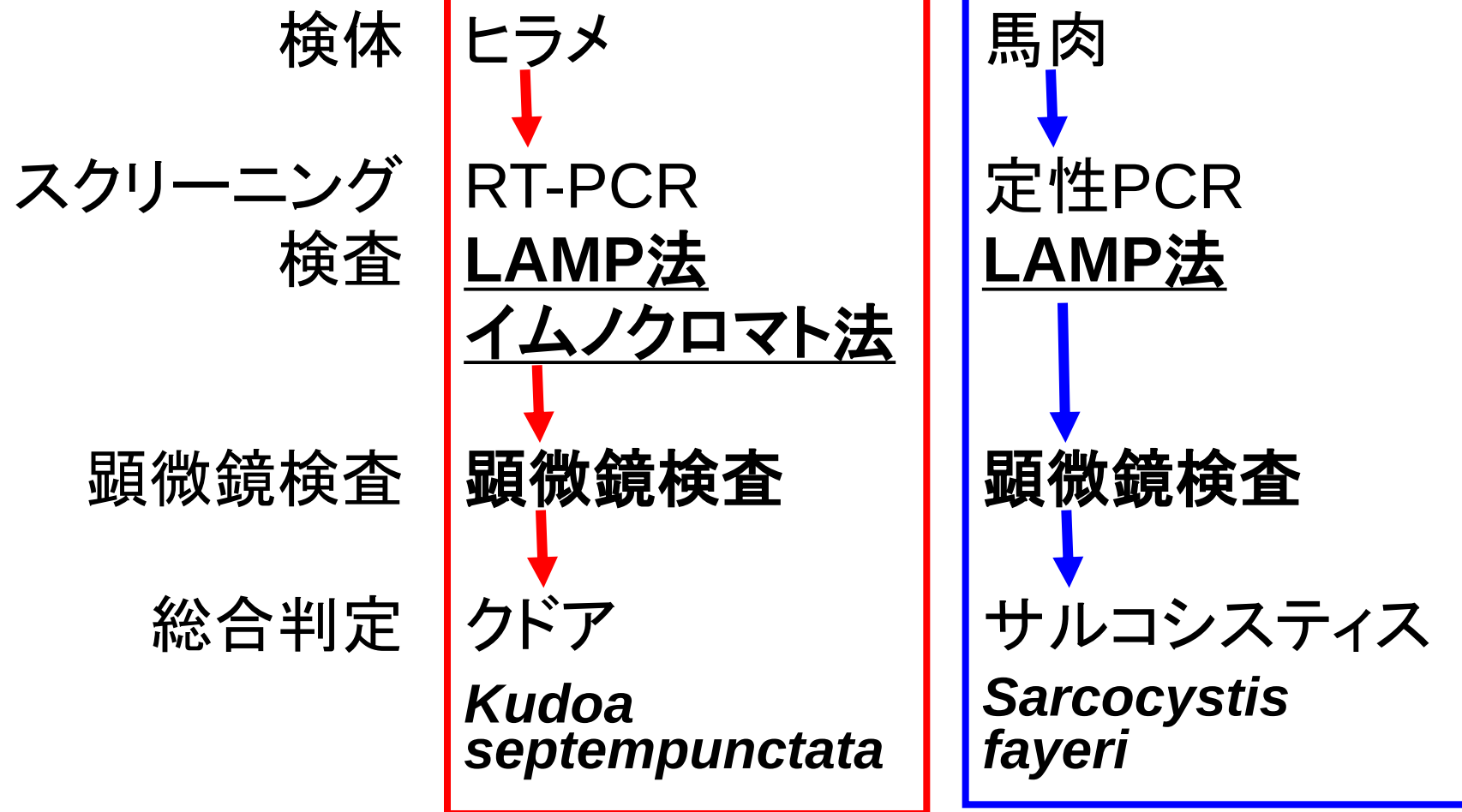
レファレンスセンター等関連会議：寄生虫

昨日の会議報告

話題の提供と情報交換（演者・所属：敬称略）.

1. **クドア**の新検査法(大西貴弘・国立衛研) 食品衛生法
2. **サルコシスティス**の新検査法(八木田健司・感染研)
3. **クリプトスポリジウム**の遺伝子検査(泉山信司・感染研)
4. **エキノコックス**: 愛知のイヌにおける陽性事例
(森嶋康之・感染研)
5. **マラリア**の検査(案浦 健・感染研) 感染症法
6. **ジビエ**による寄生虫の感染リスク(杉山 広・感染研)
7. **蟯虫**の検査(杉山 広・感染研) 法改正

クドア・サルコシステイス: 新検査法



2016年4月27日・通知 検査法改訂→暫定版の廃止

2015年7月2日・事務連絡 食中毒調査に係る病因物質不明事例の
情報提供について(協力依頼) → 国立衛研・大西貴弘室長
衛生微生物部

クリプトスポリジウム：水道（河川水等）の検査

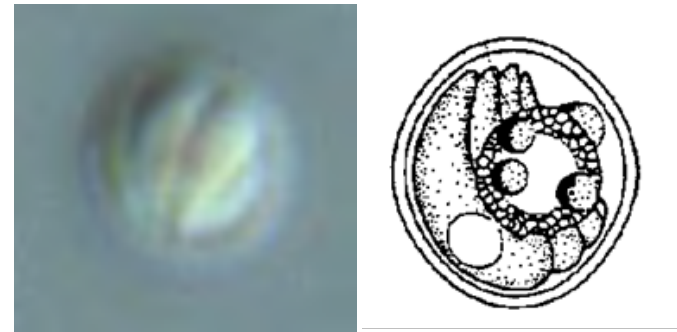
・ 遺伝子検査法の追加

（従来は顕微鏡にて検出，水道水20L，水道原水10Lに1個の検査）

rRNAからの逆転写RT-PCRで高感度に検査

→塩基配列決定→汚染源調査、対策

患者検体、食品(?) にも応用可能



水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について【健水発第0330006号通知（一部改正平成24年3月2日健水発0302 第2号）】

エキノコックス：愛知の犬における陽性事例



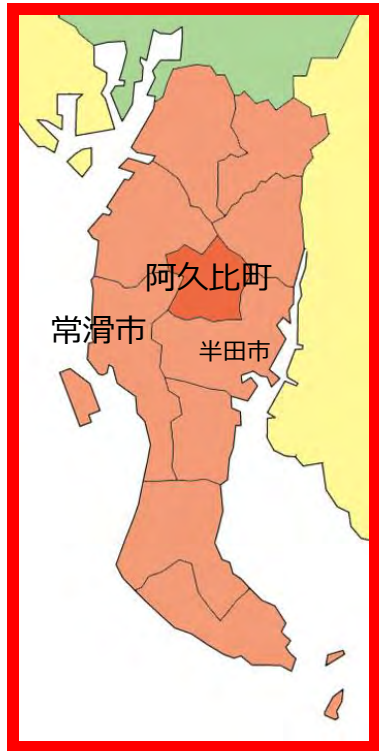
2014年3月：愛知県知多半島

抑留犬からエキノコックス虫卵検出

感染症法で本州以南の第2例(多包条虫)
(第1例：2005年・埼玉)

2015年12月：野外採集された犬糞便67検体
1検体エキノコックス遺伝子を検出

再検出は地域のエキノコックス定着を示唆



イヌのエキノコックス：獣医師に届出義務(**感染症法**・第13条)
ヒトのエキノコックス：医師に届出義務(**感染症法**・4類)

マラリア

マラリアは、エイズ・結核と共に世界三大感染症

• 世界における状況

- 年間の患者数は2億人以上であり、死亡者数は43万人以上。
- **薬剤耐性株**が多数報告され、全世界中に拡散分布

• 国内における状況（四類全数把握）

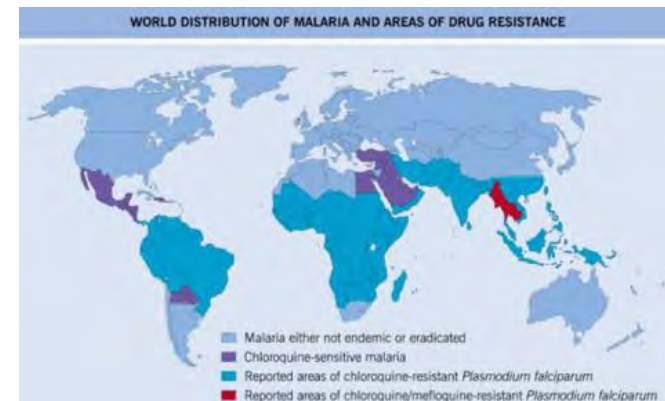
- 患者の全てが、海外渡航歴がある**輸入感染症**。
- 患者数は、**年間約50～100症例**で推移。

• 日本近隣諸国における状況

- **韓国において、再興感染症**として定着していることから注意喚起が必要（1978～1992年は撲滅）。さらに**2013年以降、患者が2年間で約83%増加**。

• 対応

- 全国検疫所を対象とした**検査技術研修会にて、講義と実習**（迅速診断キットのデモ、デジタル資料による鑑別診断トレーニング）と各検疫所の検査実施状況などの情報交換を行っている。



ジビエ(野生鳥獣肉)による寄生虫の感染リスク

鳥獣保護法 (1963) → **鳥獣保護管理法** (2015年5月施行)
「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律」

- ・シカとイノシシの増加
→ 農産物や樹木・自然生態系への被害が深刻化
- ・鳥獣を管理・生息状況を適正化(・保護)
→ 捕獲した野生鳥獣を食用として利活用
→ 野生鳥獣肉の衛生管理に関する**ガイドライン** (2014年11月)
(**食品衛生法**)
- ・野生鳥獣肉が原因の食中毒事例・寄生虫
サルコシステイス (シカ肉・イノシシ肉): 有症苦情事例・滋賀
肺吸虫 (イノシシ肉): 継続的に発生・九州南部

「**肉**は十分に加熱して喫食する」

蟯虫(ぎょうちゅう)の検査: 学校保健安全法

2014年: 蟯虫検査を必須項目から削除する(2016年度から)

- ・東京都・小学校・2013年度: 虫卵保有率 0.15%
→手洗いの励行・清潔の保持(で封じ込め可能と判断)
- ・沖縄県・小学校・男・2014年度: 虫卵保有率2.01%
→九州の一部では検査の継続を自治体が表明

1. 蟯虫の検査→セロファンシート(検査キット)使用: 常識化
2. 中小企業がセロファンシートの製造継続(大手は製造中止)
3. 受託機関・中小数社は検査継続(大手3社は検査中止)

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人: 杉山 広(感染研・寄生動物)

1. レファレンスセンター会議・寄生虫
 - (1) 位置付けと課題
 - (2) 感染研と地研との活動等
2. 寄生虫症の発生状況
感染症法・食品衛生法
3. 話題の提供・情報交換



地研に寄生虫に関する問い合わせや検査の依頼があれば、是非引き受けて下さい。感染研・寄生動物部にその内容をご照会下さい。対応にご協力します。

10. レンサ球菌

衛生微生物技術協議会溶血レンサ球菌 レファレンスシステムセンター

北海道・東北・新潟ブロック
福島県衛生研究所

東海・北陸ブロック
富山県衛生研究所

九州ブロック
大分県衛生環境研究センター

関東・甲・信・静ブロック
神奈川県衛生研究所

東京都健康安全研究センター

近畿ブロック
大阪府立公衆衛生研究所

中国・四国ブロック
山口県環境保健センター



溶血性レンサ球菌レファレンス

溶血性レンサ球菌

A群

- T血清型別
- M血清型別
- *emm*遺伝子型別など

B群

- 血清型別など

C,G群

- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

(感染症法)

5類感染症

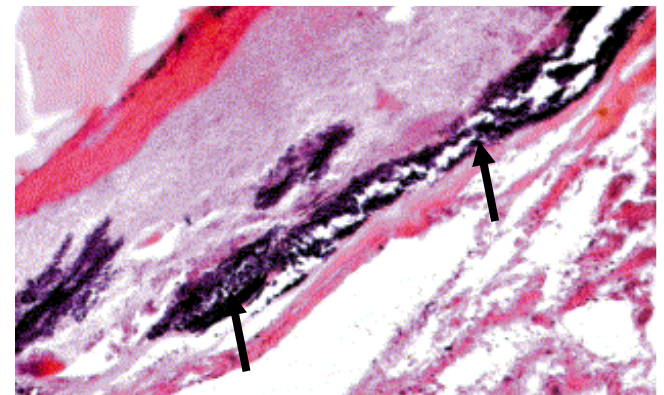
○A群溶血性レンサ球菌咽頭炎（小児科定点報告疾患）
A群レンサ球菌による上気道感染症

○劇症型溶血性レンサ球菌感染症（全数報告疾患）
 β 溶血を示すレンサ球菌を原因とし、突発的に発症して
急激に進行する敗血症性ショック病態

咽頭炎



劇症型感染症



筋膜内の菌 (Hidalgo-Grass et al. Lancet 2004)

溶血性レンサ球菌レファレンス

溶血性レンサ球菌

A群

- T血清型別
- M血清型別
- *emm*遺伝子型別など

B群

- 血清型別など

C,G群

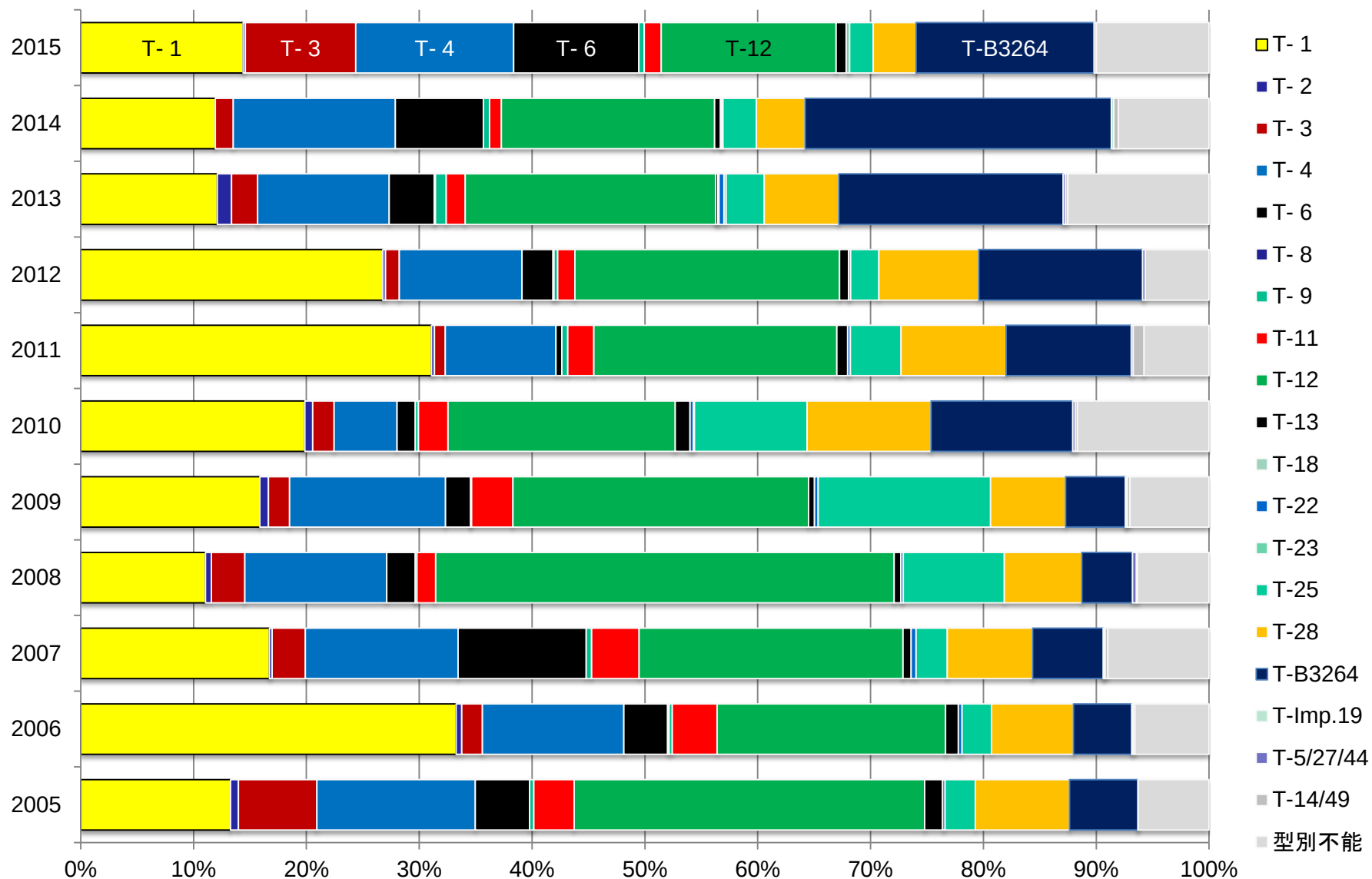
- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

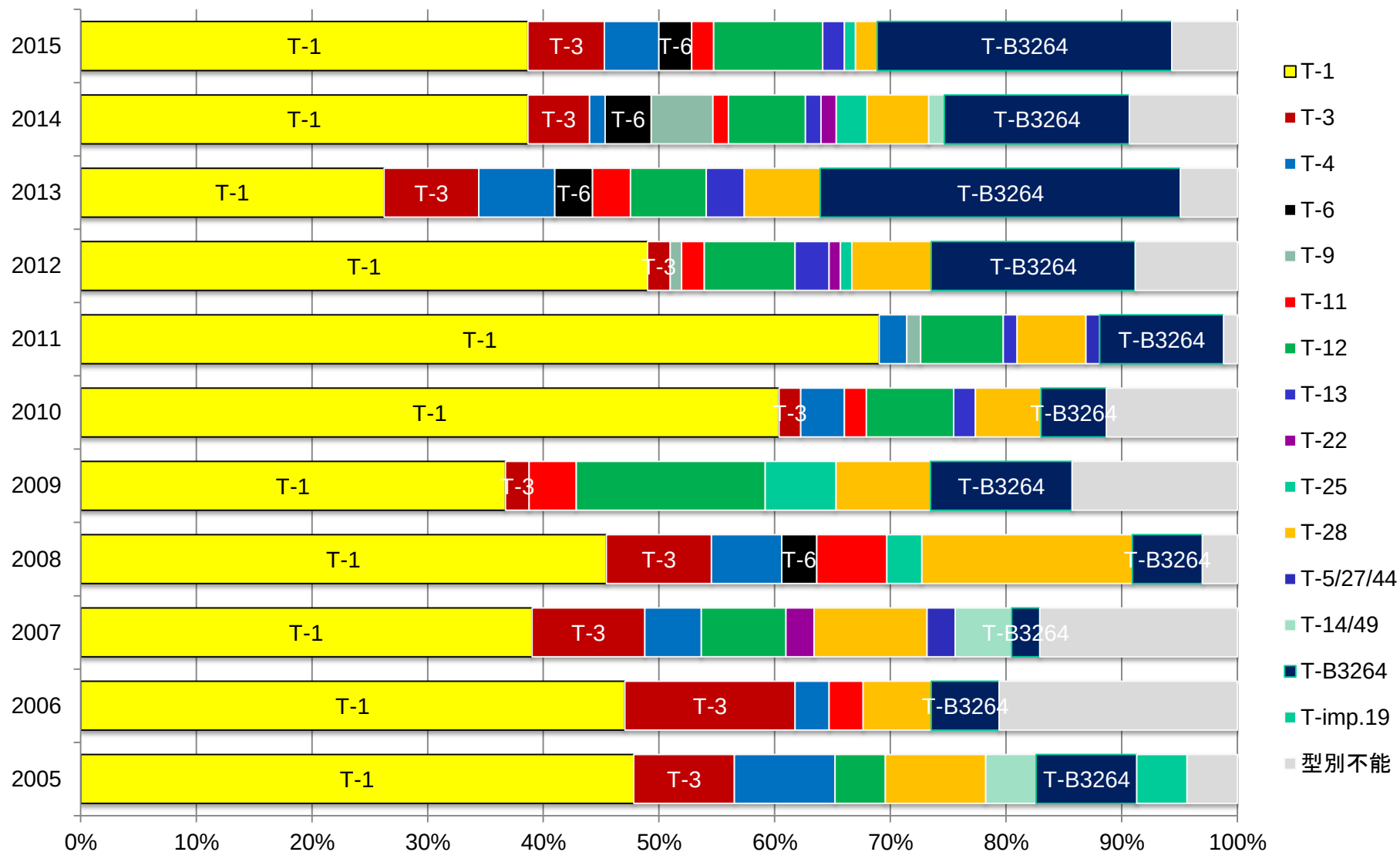
- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

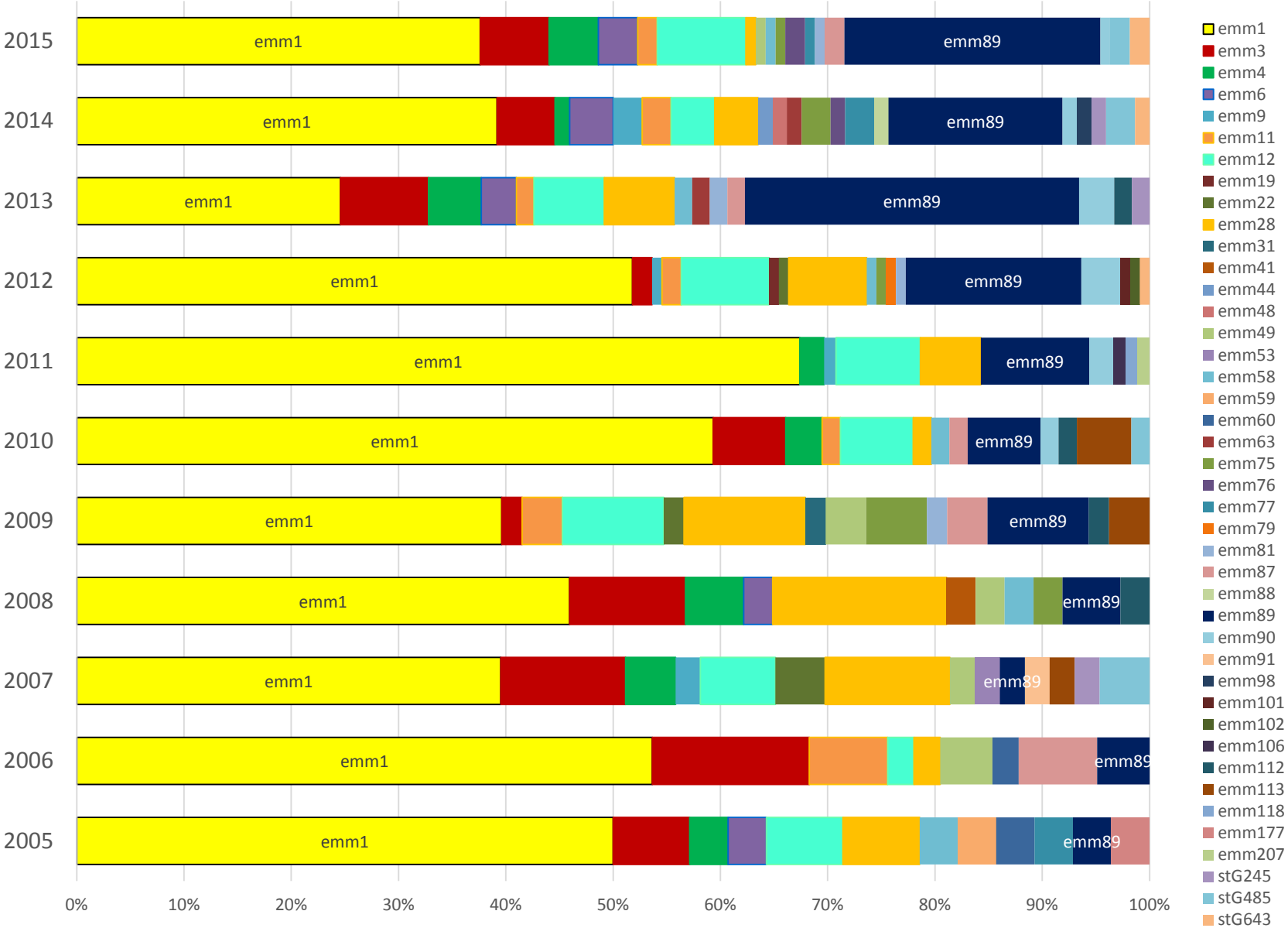
咽頭炎由来株のT型別（2005-2015）



劇症型溶レン菌感染症患者由来株のT型別（2005-2015）



劇症型溶レン菌感染症患者由来株のemm型別（2005-2015）



1 1. アルボウイルス

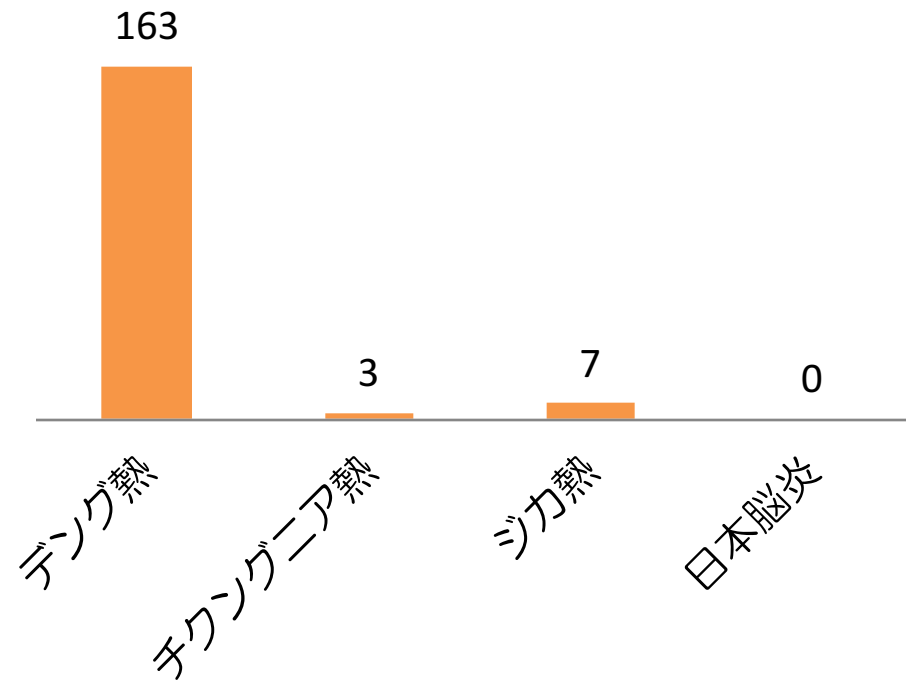
衛生微生物技術協議会第37回研究会

レファレンスセンター報告 「アルボウイルス」

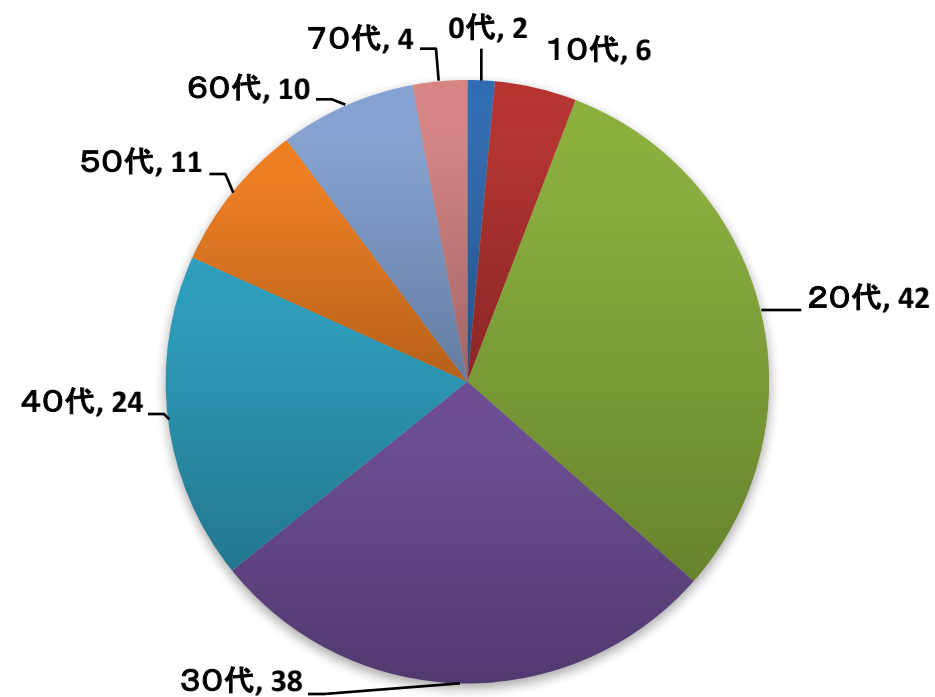
世話人
国立感染症研究所
ウイルス第一部
田島茂

平成28年7月21日

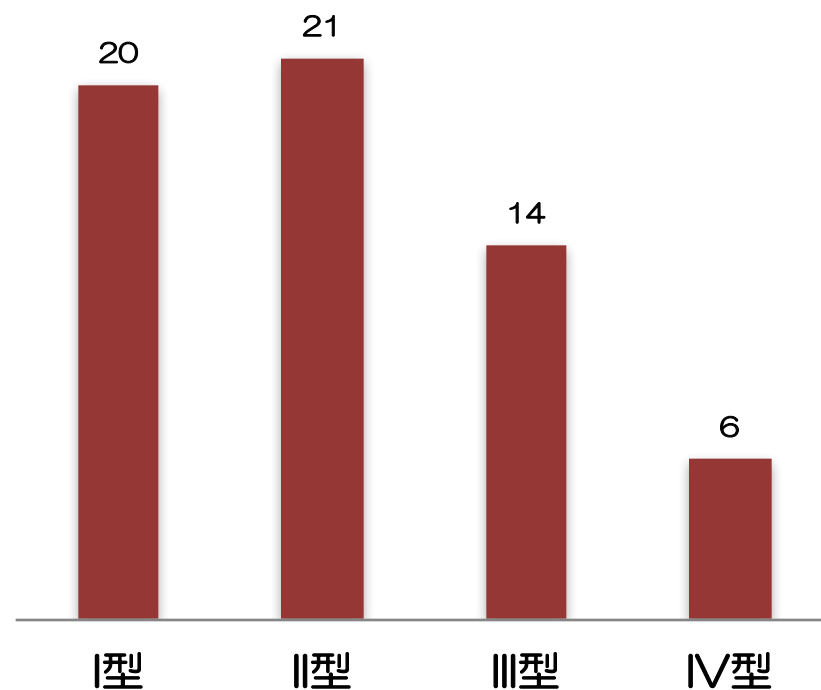
2016 27週



2016 21週までのまとめ（デング熱、137例）①

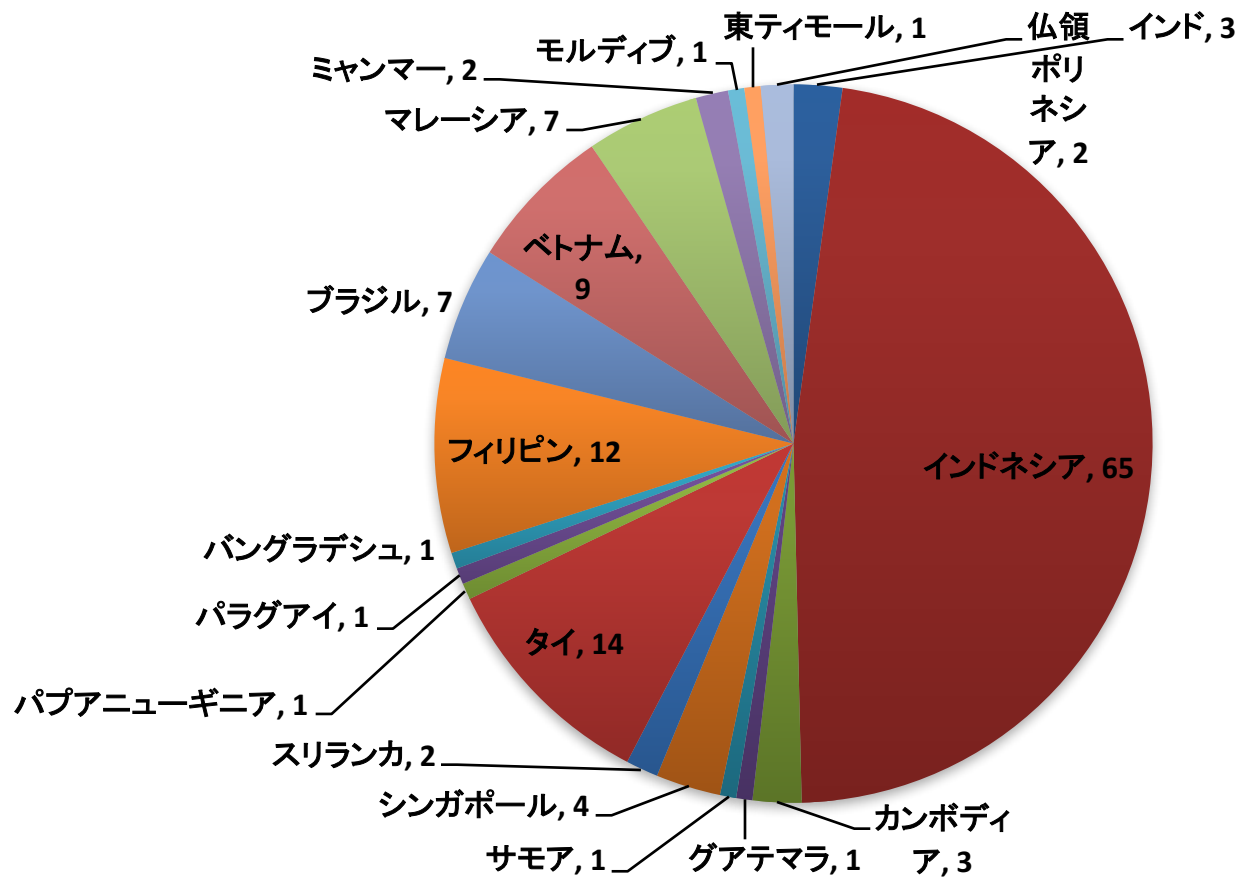


年齢層



血清型

2016 21週までのまとめ（デング熱、137例）②



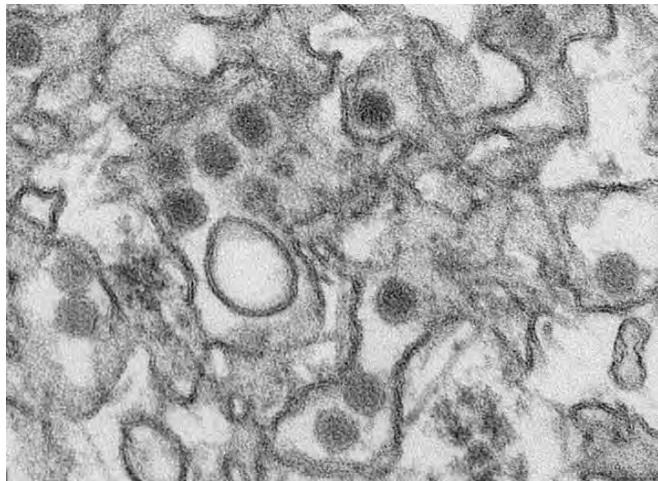
滞在国（推定感染国）

ジカウイルス感染症

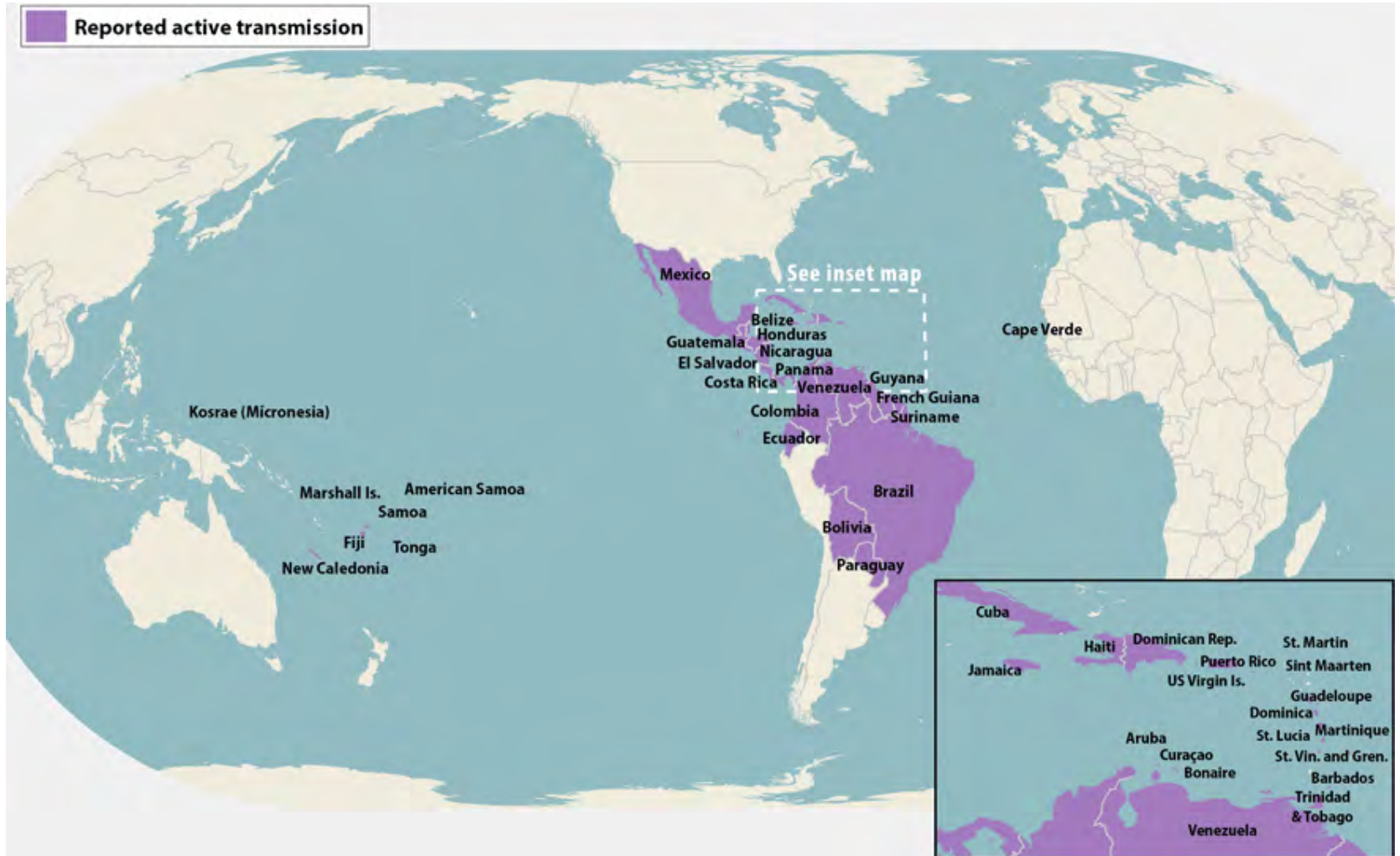
フラビウイルス科フラビウイルス属のジカウイルスによる蚊媒介性感染症。感染症法上の4種感染症に指定。潜伏期は2～12日（多くは2～7日）。症状は軽度の発熱、頭痛、関節痛、斑丘疹、結膜炎等。血小板減少もみられることがあるが、一般的にデングウイルス感染症よりも軽度である。

しかし近年の流行では、ギラン・バレー症候群や急性脊髄炎、髄膜脳炎との関連性も指摘されている。

さらに2015年からのブラジルを中心とする中南米・カリブ海地域での大流行では、妊娠中のジカウイルス感染による胎児の小頭症との関連が疑われ、最近（2016年4月）には、米国CDCがジカウイルス感染が小頭症の原因となることを認めた。

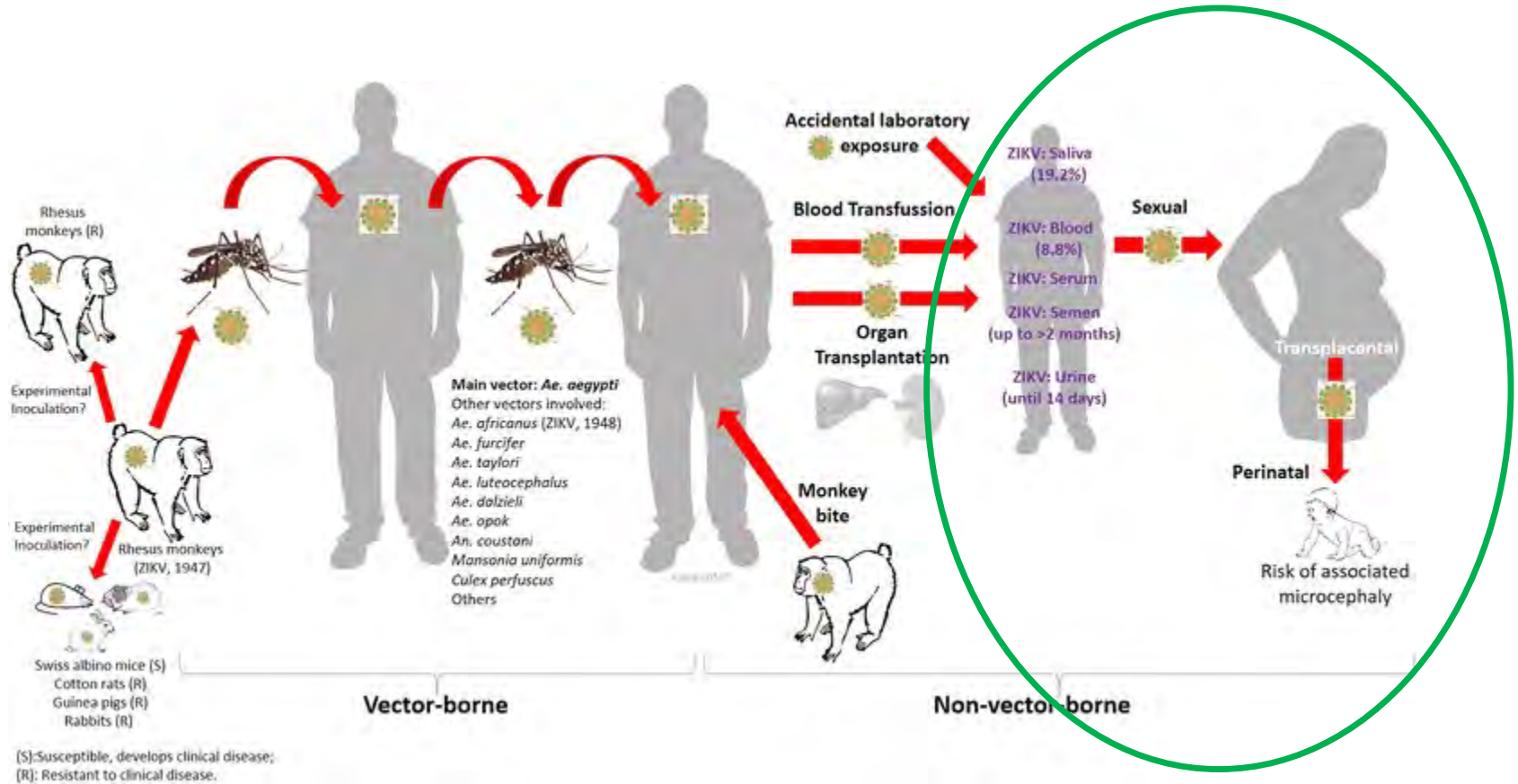


2016年4月現在のジカウイルス感染症流行地域



US CDC Web siteより

ジカウイルスの感染経路



Detection of Zika virus RNA by one-step realtime RT-PCR

Clinical samples (serum and/or urine)



RNA extraction

(High Pure Viral RNA kit (Roche))



One-step realtime RT-PCR

Fast Virus 1-Step Master Mix
(Thermo Fisher)

50°C (RT reaction)	5 min	1 cycle
95°C	20 sec	1 cycle
95°C	3 sec	40 cycles
57°C	30 sec	

*QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix
(QIAGEN) also showed similar results.
(RT reaction: 50°C, 30 min)

Set	Probe	Primer	Region
ZIKV1	ZIKV 860-FAM	ZIKV 835	E
		ZIKV 911	E
ZIKV2	ZIKV 1107-FAM	ZIKV 1086	E
		ZIKV 1162c	E

Lanciotti et al.
EID 14: 1232-1239 (2008)

日本におけるジカウイルス感染症の輸入例

(2016年6月15日現在)

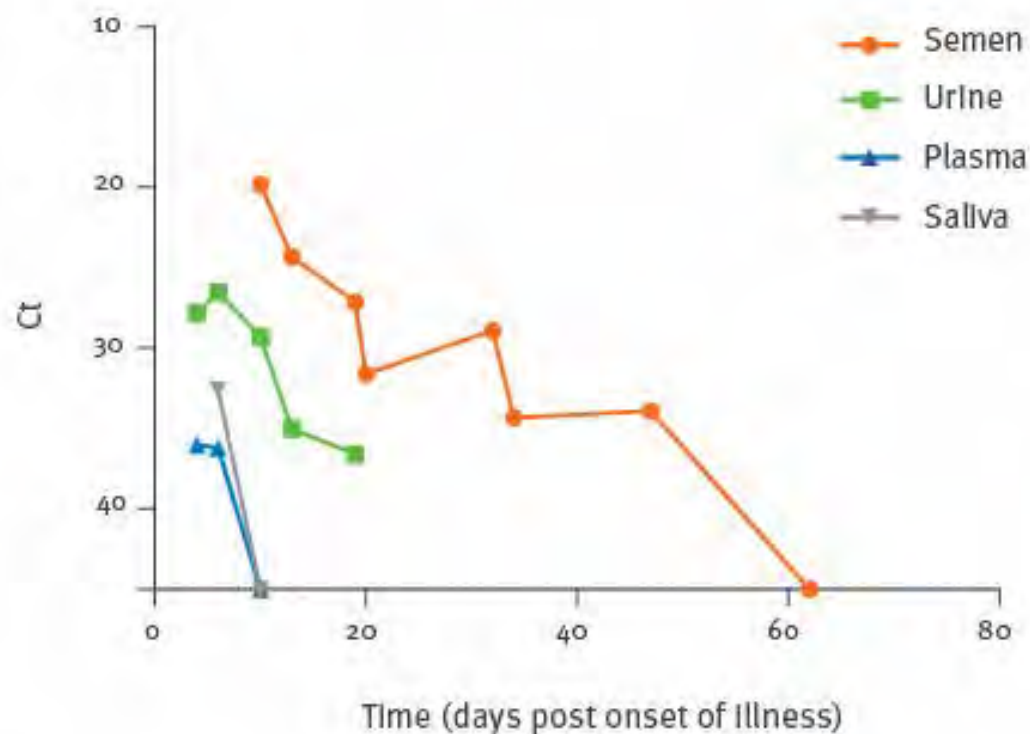
	年代	性別	発症日	感染地域	症候・合併症
1	20代	男	2013年12月09日	仏領ポリネシア	発熱, 発疹, 頭痛, 骨関節痛, 咽頭痛
2	30代	女	2013年12月23日	仏領ポリネシア	発熱, 発疹, 頭痛, 結膜充血, リンパ節腫脹, 白血球・血小板減少
3	40代	男	2014年08月02日	タイ	発熱, 発疹, 頭痛, 結膜充血, リンパ節腫脹
4	10代	男	2016年02月	ブラジル	発熱, 発疹
5	30代	女	2016年03月	ブラジル	発熱, 発疹, 関節痛,
6	-	女	2016年03月	ブラジル	関節痛, 発疹
7	40代	女	2016年03月	ブラジル以外の中南米	発疹, 発熱, 関節痛, 結膜炎等
8	10代	男	2016年04月	オセアニア太平洋諸島	発熱, 発疹
9	20代	女	2016年05月	ブラジル以外の中南米	発熱, 発疹
10	30代	男	2016年06月	ブラジル以外の中南米	発疹

※1 赤線以下が感染症法の4類感染症指定後の症例

※2 症例1, 2: IASR 35:45-6, 2014, 症例3: IASR 35:243-4, 2014

LONGITUDINAL FOLLOW-UP OF ZIKA VIRUS RNA IN SEMEN OF A TRAVELLER RETURNING FROM BARBADOS TO THE NETHERLANDS WITH ZIKA VIRUS DISEASE, MARCH 2016

C Reusken 1 2 , S Pas 1 2 , C GeurtsvanKessel 1 , R Mögling 1 , J van Kampen 1 , T Langerak 1 , M Koopmans 1 , A van der Eijk 1 , E van Gorp 1



*Zika virus RNAを検出。
感染性ウイルスは不明。

The Lancet

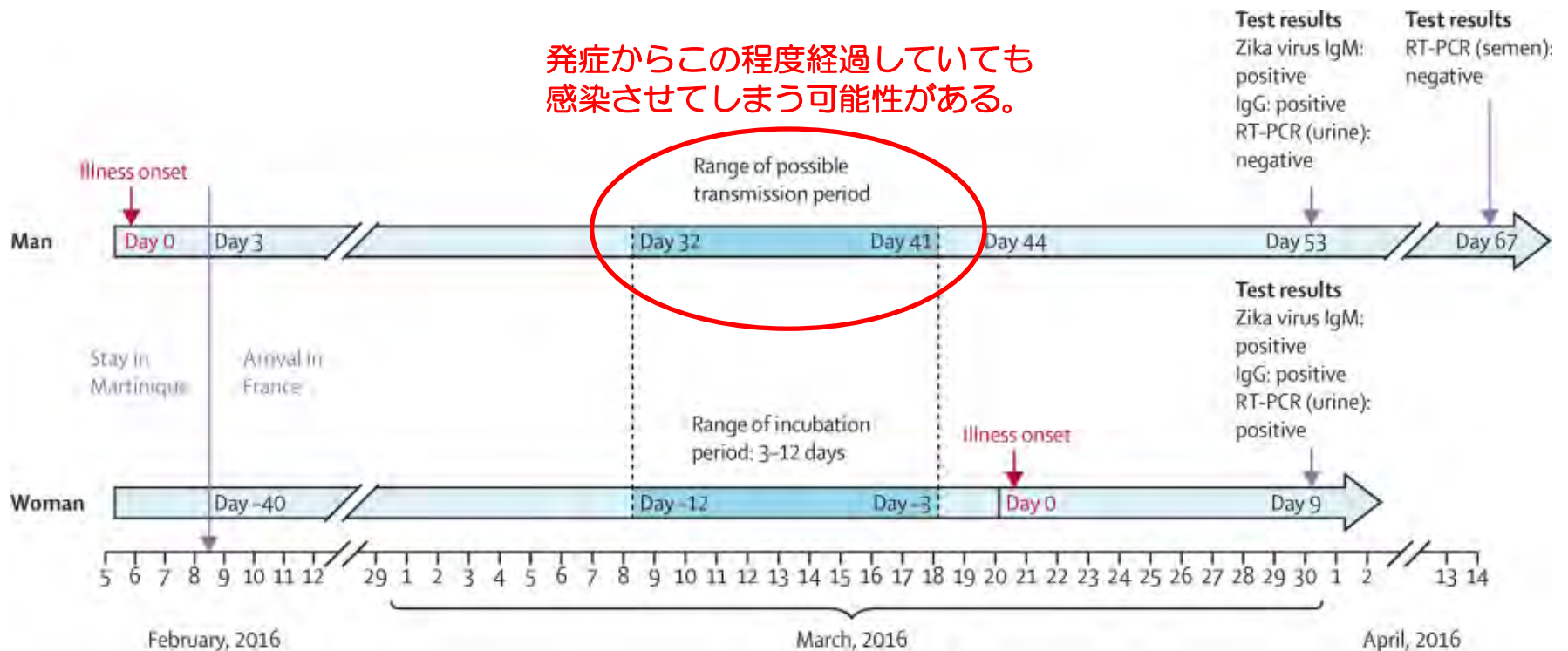
Volume 387, Issue 10037, 18–24 June 2016, Pages 2501

Correspondence

Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen

Jean Marie Turmela, Pierre Abgueguena, Bruno Hubertc, Yves Marie Vandammea, Marianne Maquartd, Hélène Le Guillou-Guillemetteb, Isabelle Leparc-Goffartd

発症からこの程度経過していても
感染させてしまう可能性がある。



ジカウイルス同定試験について

ジカウイルスゲノムの検出、ウイルス分離のためには、血清、尿、唾液以外に、**全血**を使用することも考慮すべきである。

全血はEDTA管で採血してもらい、なるべく速やかに検査作業に使用する。

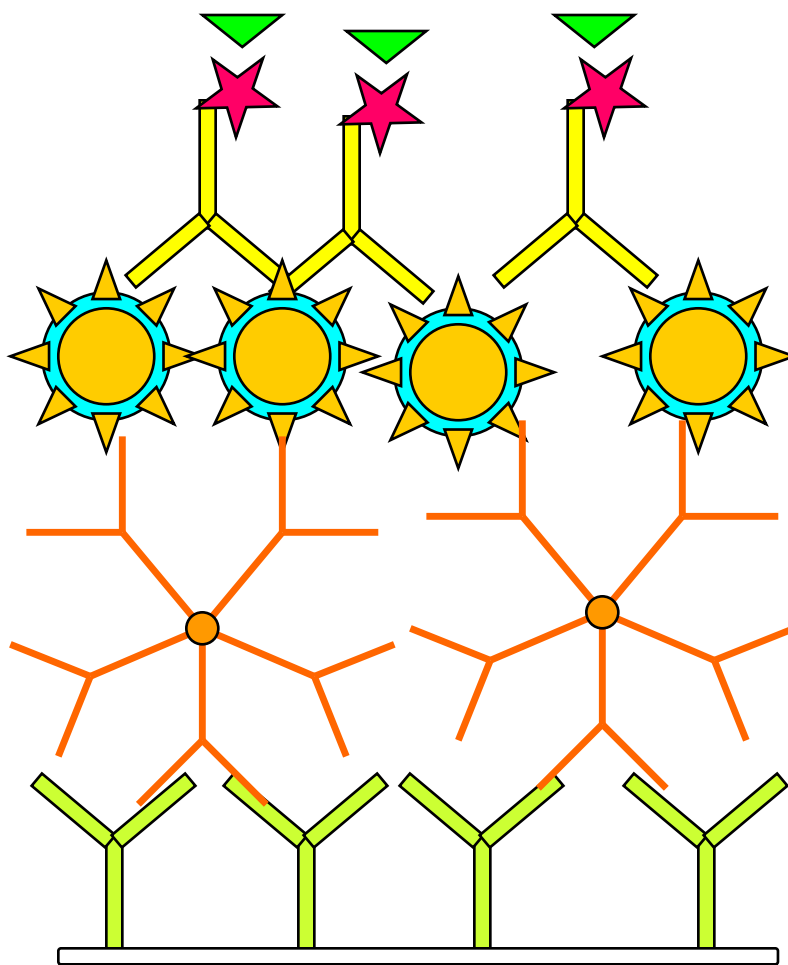
ウイルス分離する際には、細胞培養培地で10～1000倍程度に希釈して行う。
また盲継代を数回繰り返す。

蚊細胞よりもVero細胞を用いた方が良いかもしれない。

NS1抗原検出系の開発が進んでいる。

蚊からジカウイルス（遺伝子）を同定したとの報告がほとんどない。

IgM capture ELISA



Plastic Solid Phase

← Substrate (TMB)

← Conjugate(HRP, AP, etc)
Anti-Flavi MAb(6B6C)

← Virus Antigen:
(inactivated) ZIKV

← Test Serum
(containing Anti-ZIKV IgM Ab)

← Anti-human IgM MAb
(capture antibody)

← Blocking

Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results

Weekly / June 3, 2016 / 65(21)

What is already known about this topic?

Zika virus is a mosquito-borne flavivirus closely related to dengue, West Nile, Japanese encephalitis, and yellow fever viruses. Diagnostic testing for Zika virus infection can be accomplished using both molecular and serologic methods. **However, results of Zika virus antibody testing can be difficult to interpret because of cross-reactivity with related flaviviruses, which can preclude identification of the specific infecting virus, especially when the person previously was infected with or vaccinated against a related flavivirus.**

What is added by this report?

For persons with suspected Zika virus disease, a positive real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (rRT-PCR) result confirms Zika virus infection, but a negative result does not exclude infection. In these cases, antibody testing can identify additional recent Zika virus infections. If immunoglobulin (Ig) M test results are positive, equivocal, or inconclusive, performing a plaque reduction neutralization test (PRNT) is needed to confirm the diagnosis. However, recent evidence suggests that **a 4-fold higher titer by PRNT might not discriminate between anti-Zika virus antibodies and cross-reacting antibodies in all persons who have been previously infected with or vaccinated against a related flavivirus.** Thus, a more conservative approach to interpreting PRNT results is now recommended to reduce the possibility of missing the diagnosis of either Zika or dengue virus infection.

他のフラビウイルスとのCross Reactivityが問題となる。

US CDCでは10倍以上の中和抗体価が複数のフラビウイルスでみられる場合、「フラビウイルス感染の既往あり」との判断にとどめている(私信)。

デングウイルス、チクングニアウイルス遺伝子解析とデータベース構築および汎アフリカ、南アフリカ別黄熱ウイルス高感度遺伝子検出法の評価・応用

Science 352(6282) 128, 2016 (8 April)

... Angola has seen 490 confirmed cases and 198 deaths so far, but experts say the real toll may be 10 times as high.....

FORTHホームページより

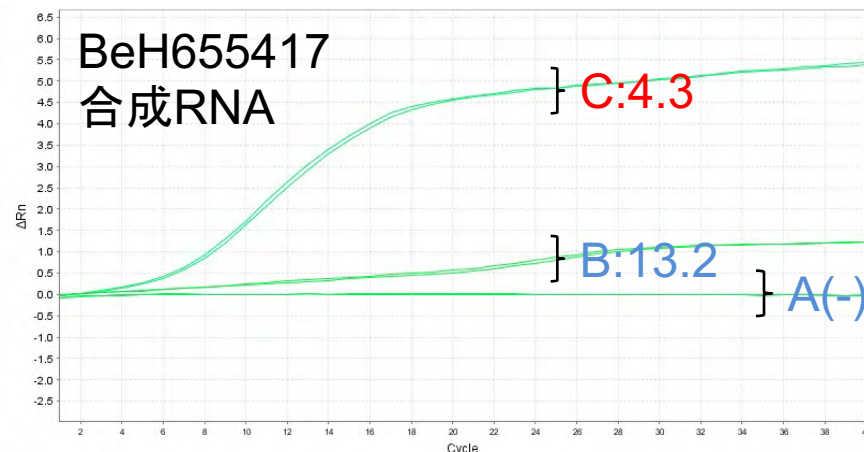
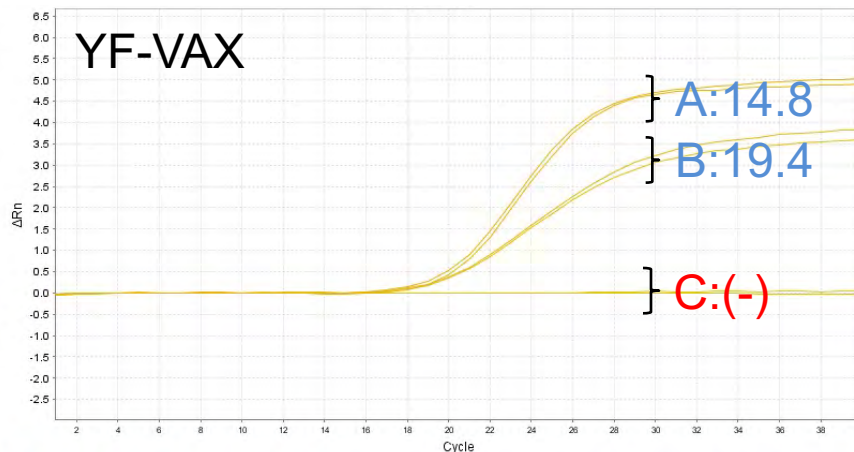
2016年4月22日付けで公表された世界保健機関（WHO）の情報によりますと、中国の国際保健規則(IHR) 国家担当者は、4月4日から4月12日までに、新たに黄熱患者2人をWHOに報告しました。これまでに、合計11人の黄熱確定患者がアンゴラから中国へ感染輸入されたことが報告されています。

黄熱ウイルス検出用TaqManプライマープローブセット

Primer		
	Name	Sequence
Set A (YF17D/W. Africa)	YF-8280F(17D/WAf)	TCCACTCATGAAATGTACTACGTGTCT
	YF-8354C(17D/WAf)	GGAGGCGGGATGTTTGGT
Set B (YF17D/W. Africa)	YF-4769F(17D/WAf)	TTGATTCCATCTTGGGCTTC
	YF-4862C(17D/WAf)	GGACCTCTTCCTCTCCATCC
Set C (S. America)	YF-9393F(SAm)	CAGGTGGGAAAGCTTACATGG
	YF-9453C(SAm)	CACCTGCCCCGGATCCTCT
Probe		
Set A (YF17D/W. Africa)	YF-8308FAM(17D/W.Africa)	AGCCCGCAGCAATGTCACATTTACTGT
Set B (YF17D/W. Africa)	YF-4804FAM(17D/W.Africa)	TGTCGCCTATGGTGGCTCATGGAAG
Set C (S.America)	YF-9415FAM(S.America)	TGTCATAAGCCGGCGGGACCA

中南米株、アフリカ株鑑別黄熱リアルタイムRT-PCRの開発

Primer & Probe		Forward／Probe／Reverse
A	YF 17D/W.Africa	8280／8308FAM／8354c
B	YF 17D/W. Africa	4769／4804FAM／4862c
C	S.America 1&2	9393／9415FAM／9453c



*Toyobo
RNA-direct
Realtime PCR
Master Mix
使用

Ct value	YF-VAX【アフリカ株】	BeH655417【南米株】
A	14.8	Undetermined
B	19.4	13.2
C	Undetermined	4.3

12. ノロウイルス

H28年度 衛生微生物技術協議会 ノロウイルスレファレンス委員会報告

ノロウイルスレファレンス委員会
世話人
国立感染症研究所感染症疫学センター
木村 博一

内 容

1. NoV検査外部精度管理結果について
(H26-27年厚生労働科学研究・佐多班)
2. NoV GIキャプシド遺伝子の分子進化について
3. 過去3シーズンのNoV遺伝子型の推移について
(GII.P17-GII.17の出現と流行)

H26・27年度ウイルス検査精度管理に関する研究内容

H26年度:

- ・リアルタイムPCR法によるNoV遺伝子定量

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順
- 3) 標準検査法
- 4) 精度管理データ記入ファイル

- ・各地研におけるウイルス検査の精度管理の実態把握

- 1) 精度管理アンケート

H27年度

- ・シーケンス・系統樹解析精度管理

- ・NoVPCR産物(300bps程度)

- 1) 材料の塩基配列解析(シーケンス解析)
- 2) 近隣結合法(NJ法)による系統樹解析

調査項目:

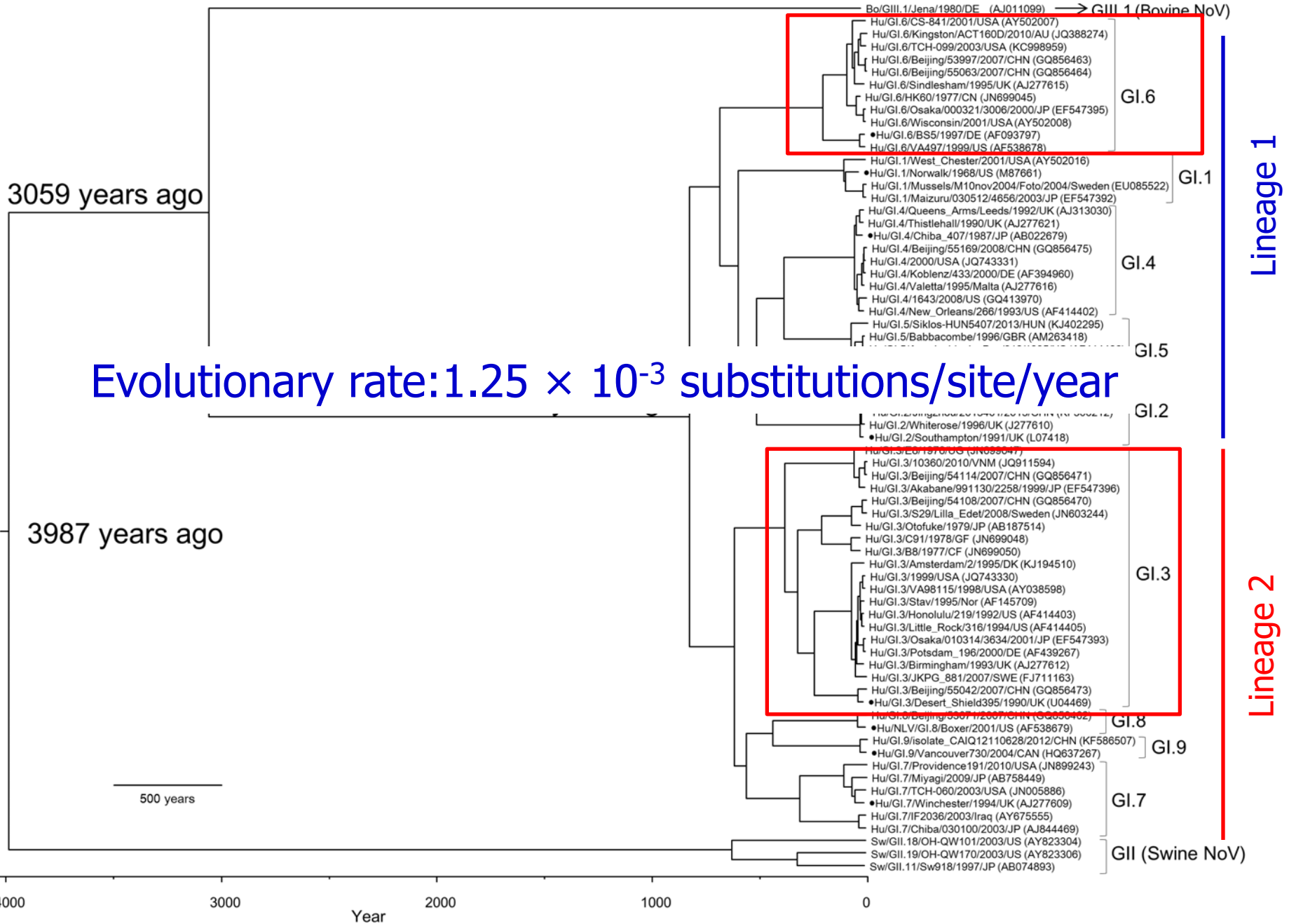
- 1) 塩基配列解析の精密度
 - 2) 塩基配列解析長
 - 3) 解析試料の系統樹上の位置
 - 4) 標準株との塩基配列相同性
- ・H26年度のフォローアップ研修



今後、同じ手法論による実習を短期研修ウイルス研修で実施予定

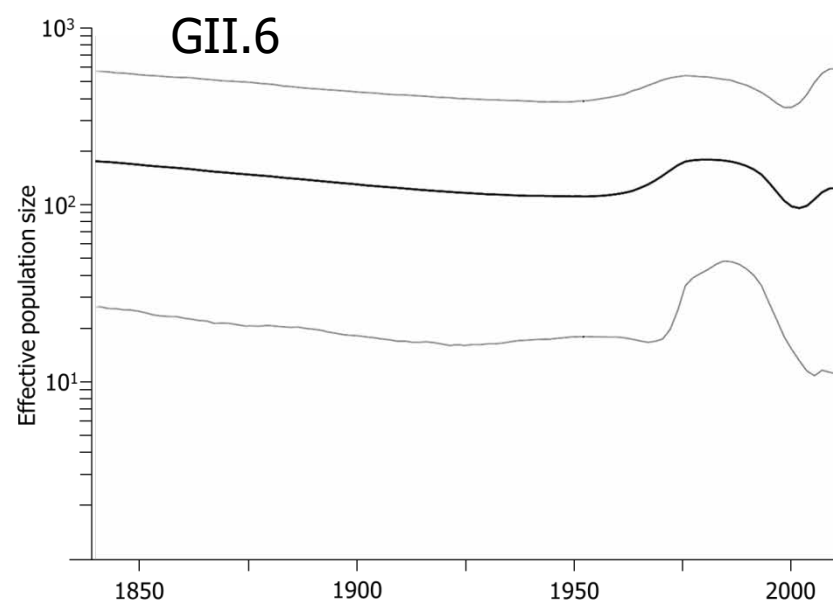
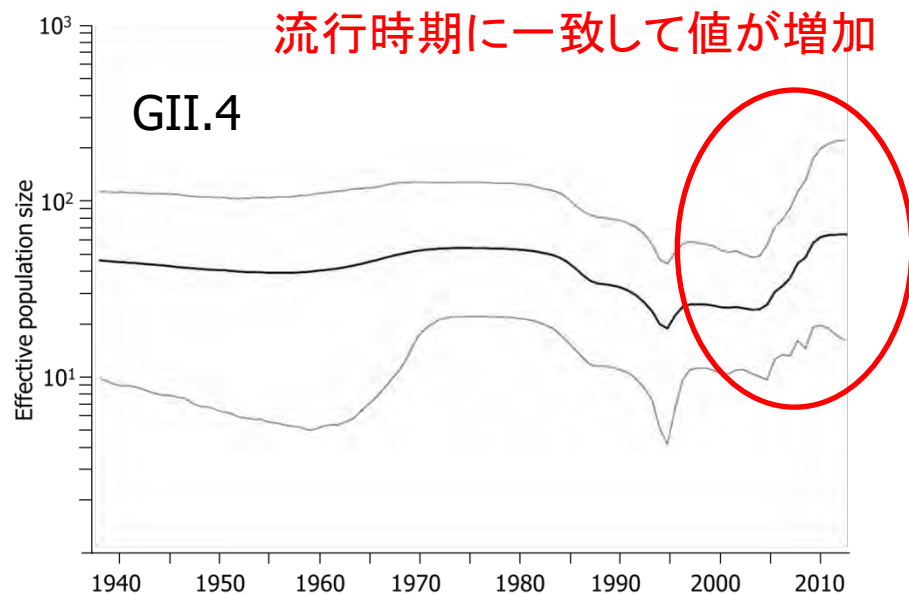
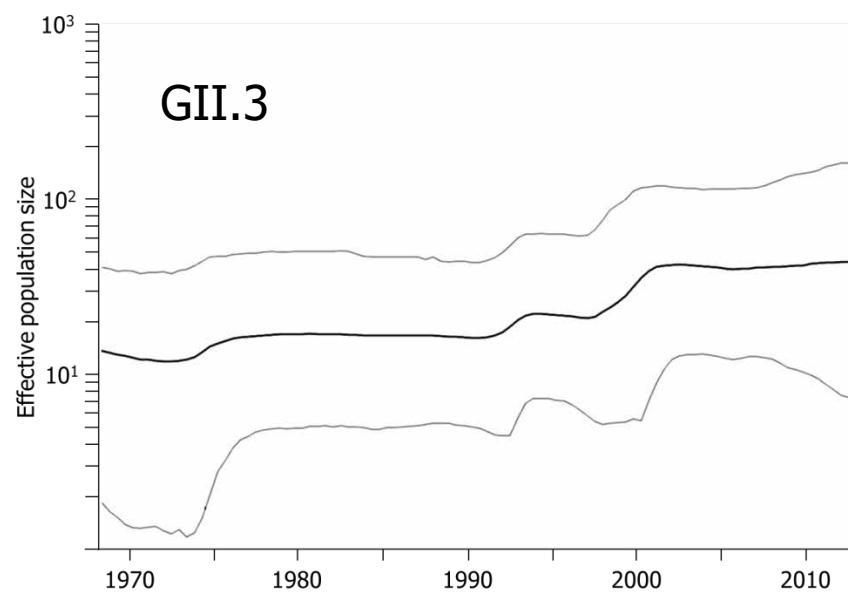
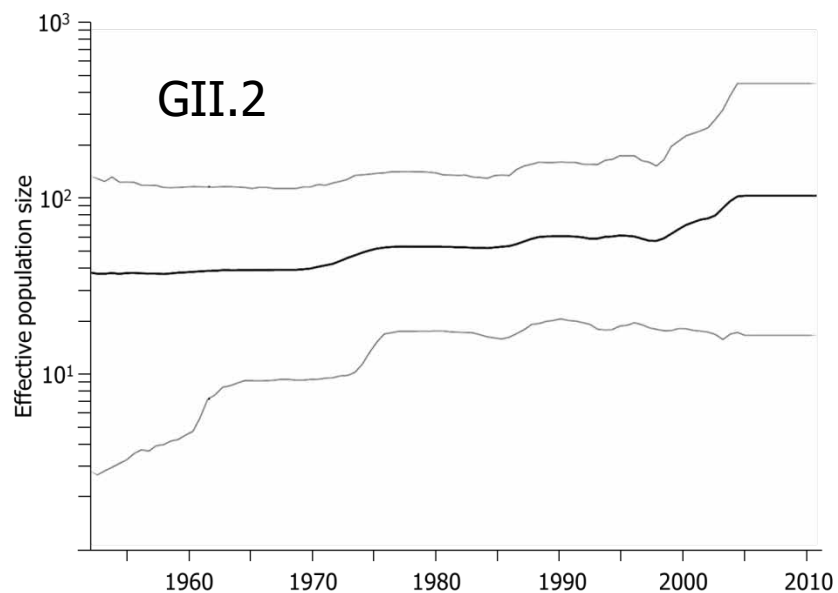
NoV GIキャプシド遺伝子の分子進化

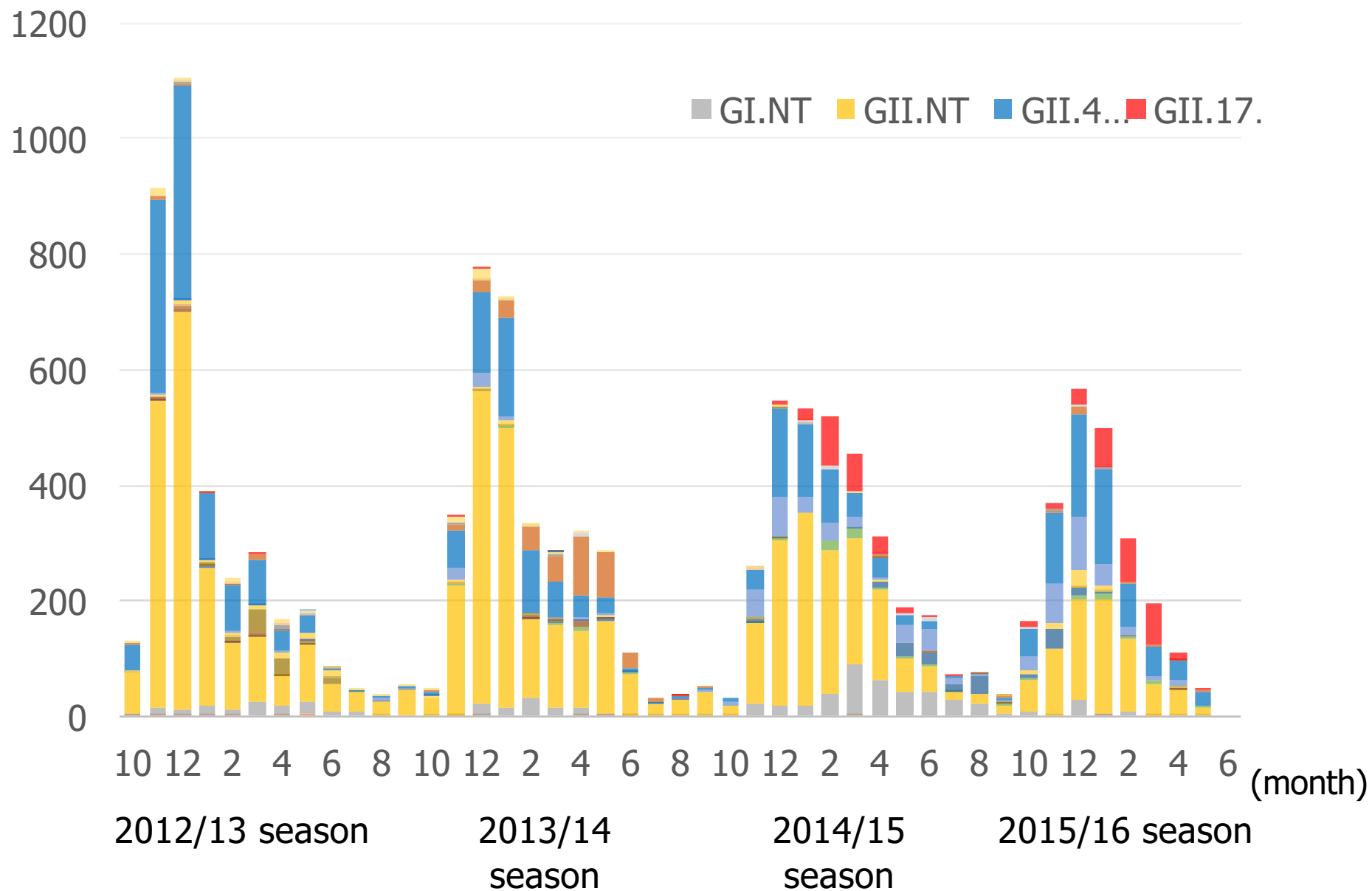
Phylogenetic tree of ORF2 constructed by Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method



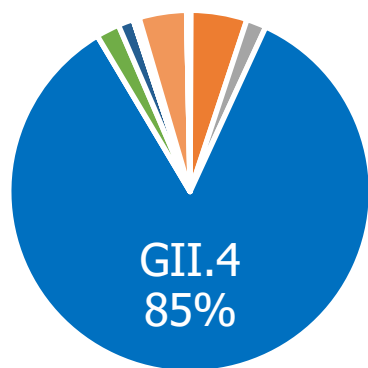
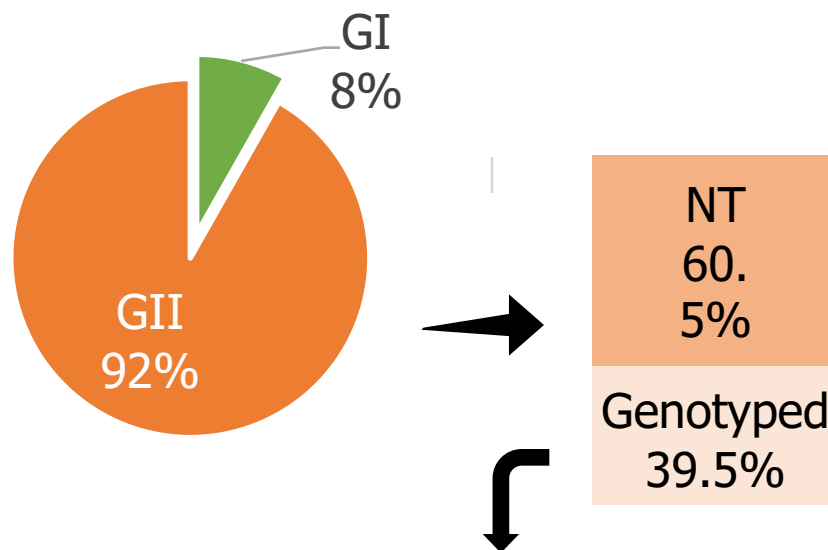
新しいNoV流行予測の方法について Bayesian Skyline Plotの応用

BSP of major genotypes

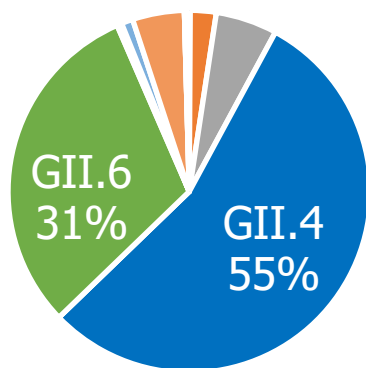




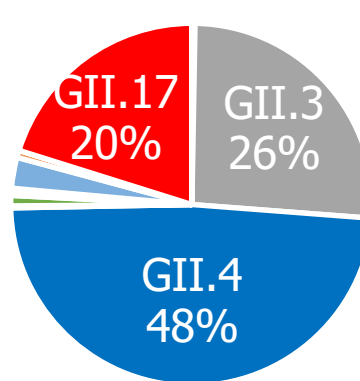
本邦において過去4シーズンに検出されたNoVの遺伝子型



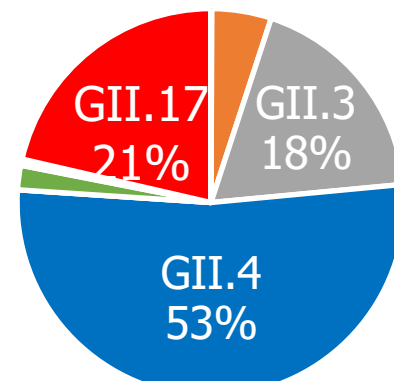
2012/13 season



2013/14 season



2014/15 season



2015/16 season

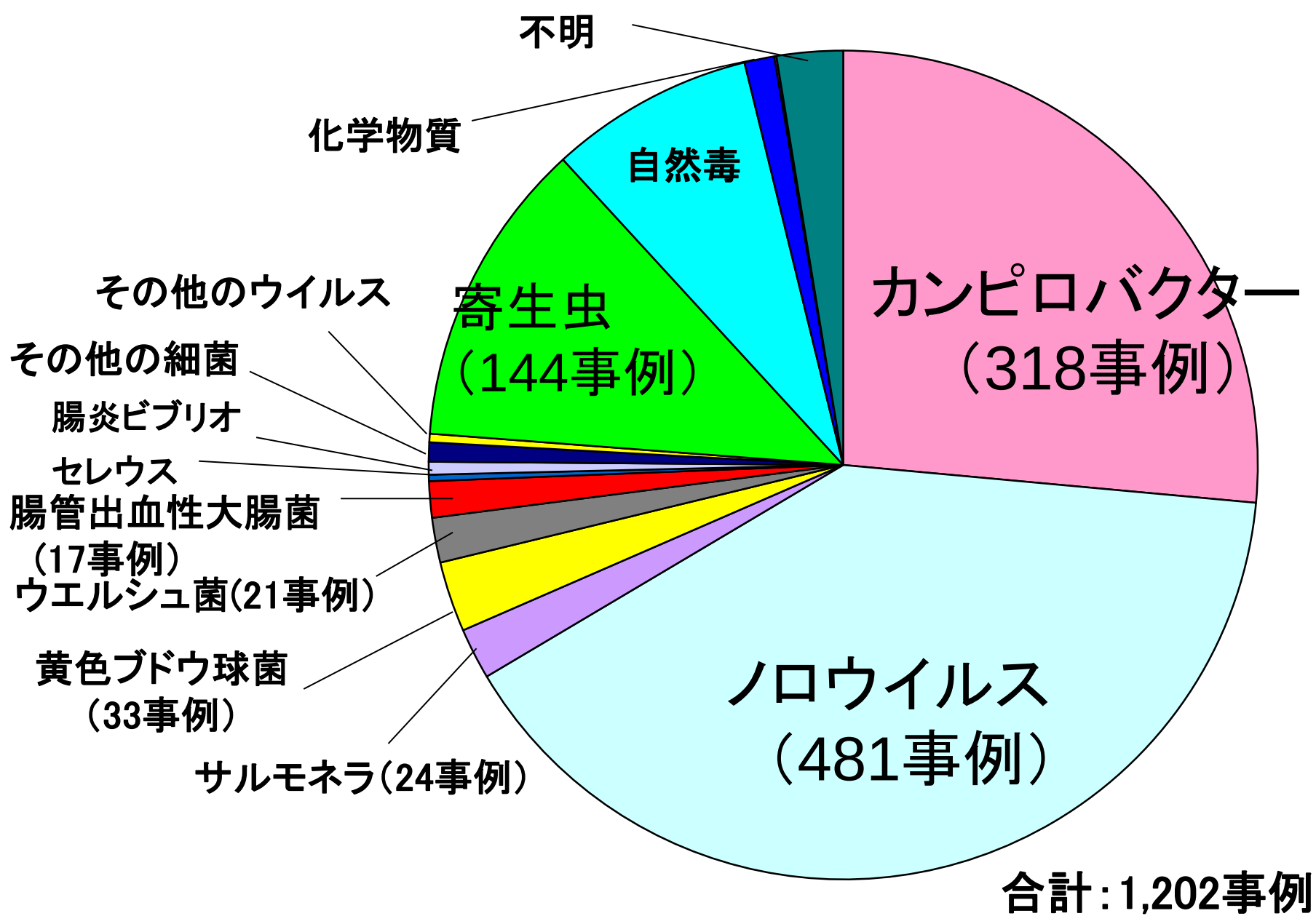
今後のGII.17の検出動向に注意が必要

13. カンピロバクター

2016. 7. 22
広島市南区民
文化センター

衛生微生物技術協議会第37回研究会
レファレンスセンター等関連会議

カンピロバクター



病因物質別食中毒発生状況(2015年, 全国)

カンピロバクター・レファレンス 支部センター

支部 センター	担当地域
秋田県保健環境センター	北海道・東北・新潟地区
東京都健康安全研究センター	関東・甲・信・静地区
愛知県衛生研究所	東海・北陸地区
大阪府立公衆衛生研究所	近畿地区
山口県環境保健センター	中国地区
広島市衛生研究所	四国・広島県地区
熊本県保健環境科学研究所	九州地区

カンピロバクター レファレンス活動内容

- 血清型別用 Lior血清*の作製、配布
- Lior 型別法およびPenner型別法による血清型別状況の比較
- 遺伝子(PCR法)によるPenner型別方法の検討
- *C. jejuni*, *C. coli* のフルオロキノロン剤およびエリスロマイシンに対する耐性菌の出現状況の把握

* 平成28年3月31日でLior 血清の配布を終了

各支部センターにおける型別菌株数(2015年)

支部センター	集団由来 菌株数	(事件数)	散発由来 菌株数	食肉 菌株数	合計
秋田県健康環境センター	11	(5)	8	0	19
東京都健康安全研究センター	93	(34)	116	0	209
愛知県衛生研究所	29	(8)	25	0	54
大阪府立公衆衛生研究所	135	(50)	19	0	154
広島市衛生研究所	11	(4)	91	68	170
山口県環境保健センター	5	(2)	30	1	36
熊本県保健環境科学研究所	57	(15)	1	0	58
合計	341	(118)	290	69	700

散発下痢症由来*C. jejuni* のLior血清型別成績
(全国・2015年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
LIO 4	2	15	5	6	32	8		68	(23.7)
TCK 1		12	1		2			15	(5.2)
LIO 1		5	1	1	6			13	(4.5)
LIO 28		10		1	2			13	(4.5)
LIO 11		5			2	1		8	(2.8)
LIO 2		3	2		1	1		7	(2.4)
LIO 7		6				1		7	(2.4)
その他*	2	10	4	4	13	13		46	(16.0)
小計	4	66	13	12	58	24		177	(66.7)
(%)	(57.1)	(56.9)	(52.0)	(73.7)	(63.7)	(85.7)		(66.7)	
複数血清	2	10	3	2	17	0		34	(11.8)
型別不能	1	40	9	5	16	4	1	76	(26.5)
合計	7	116	25	19	91	28	1	287	

*18種類

散発下痢症由来*C. jejuni* のPenner血清型別成績 (全国・2015年)

血清型	秋田	東京	愛知	大阪	広島	山口	熊本	合計	(%)
B群		5	1		13	7		26	(9.1)
D群		8			6	1		15	(5.2)
Y群		10	1	1	2			14	(4.9)
L群		8	2		1			11	(3.8)
O群		4			2	4		10	(3.5)
F群		2	1	1	3			7	(2.4)
その他*	2	11	3	6	8	5		35	(12.2)
小計	2	48	8	8	35	17	0	118	(41.1)
(%)	(28.6)	(41.4)	(32.0)	(42.1)	(38.5)	(41.1)	(0)	(41.1)	
複数血清	0	0	2	0	1	0	0	3	(1.0)
型別不能	5	68	15	11	55	11	1	166	(57.8)
合計	7	116	25	19	91	28	1	287	

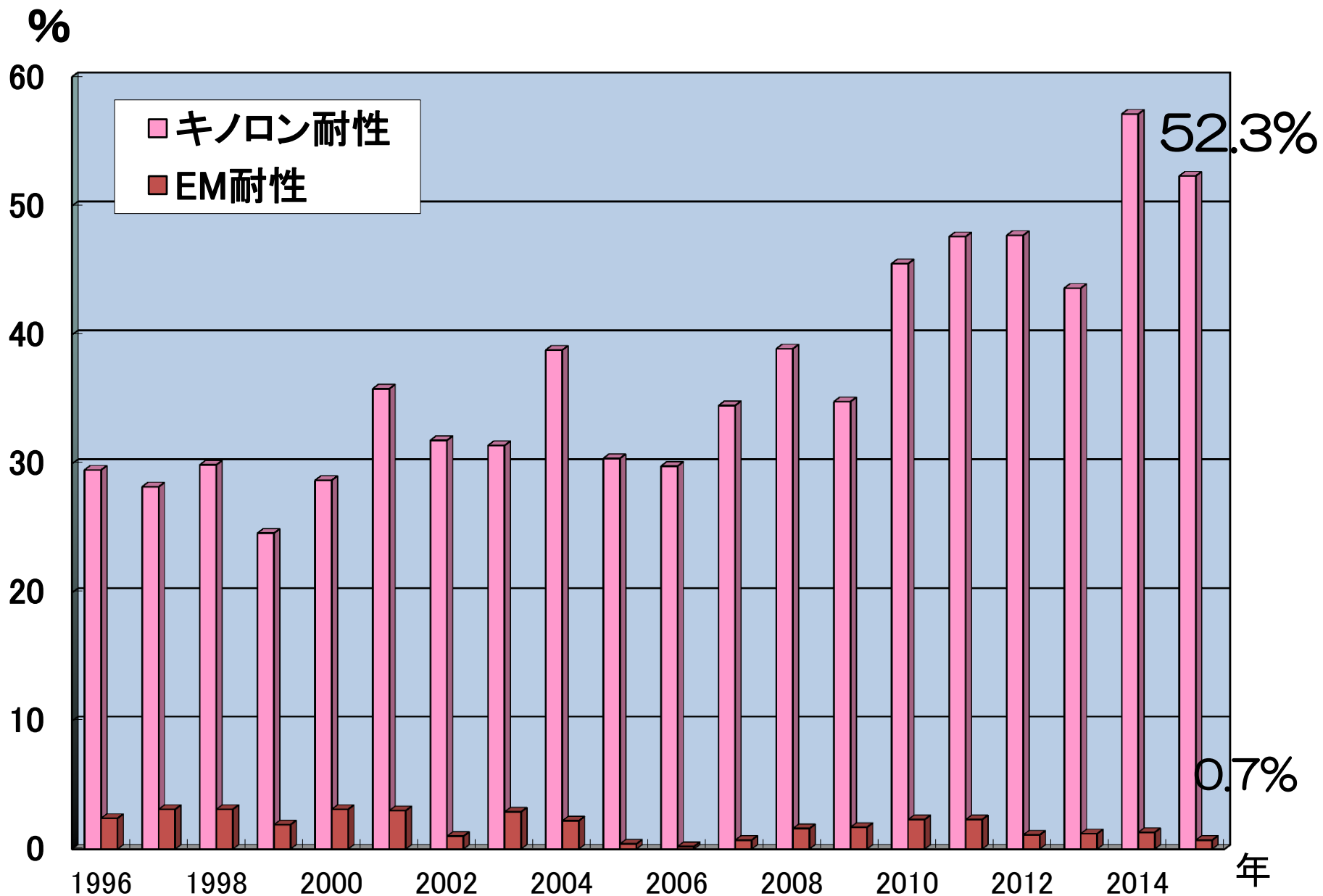
*10種類

カンピロバクター血清型別法のまとめ(2015年)

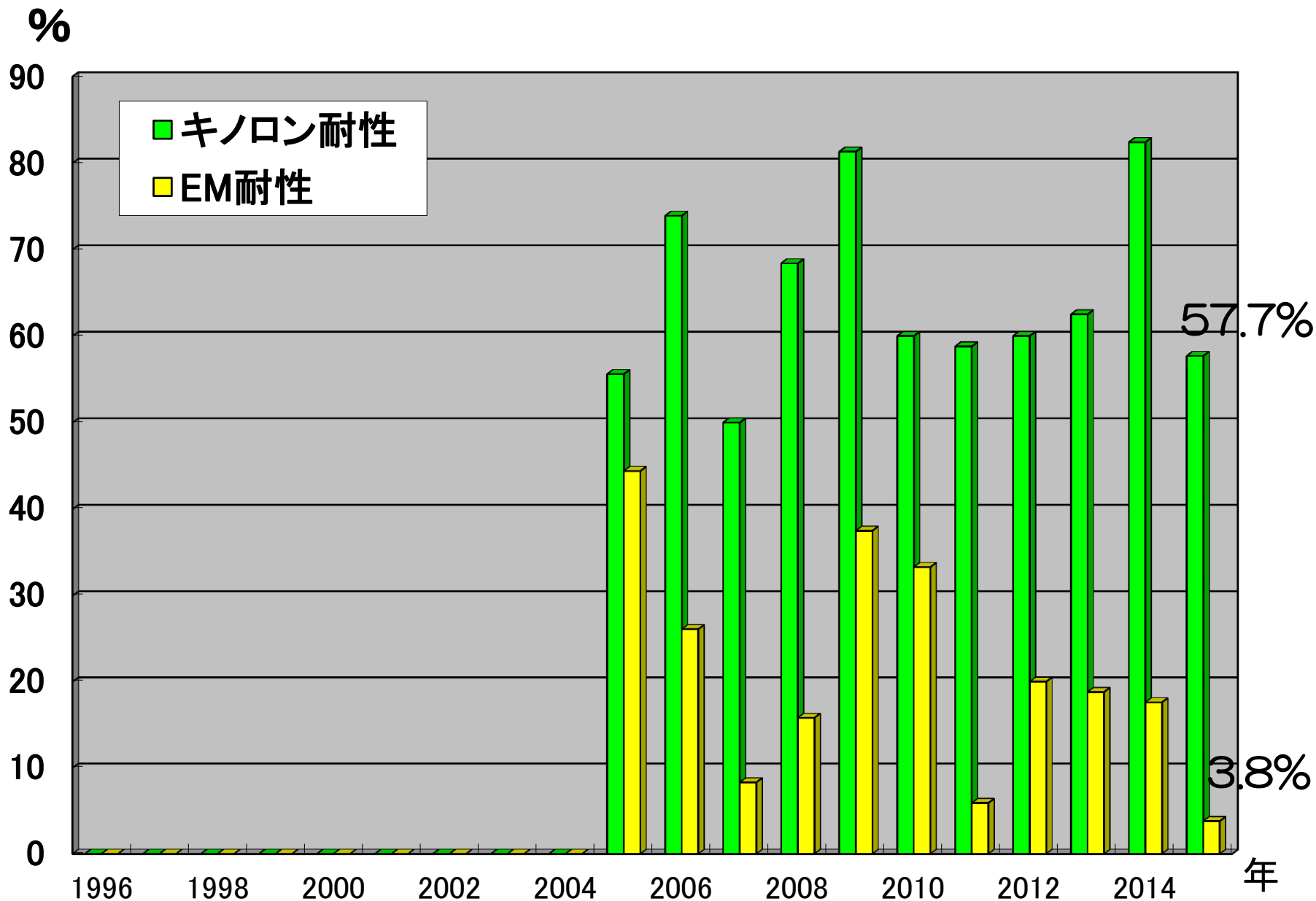
散発下痢症由来 *C. jejuni* 287 株を対象に検討した結果,

- Lior 法では, 25種類の単独血清(61.7%), 複数血清(11.8%)に型別され, 型別率は**73.5%**であった。検出された血清型は, LIO 4, TCK 1, LIO 1, LIO 28 の順に多く, 年次別変化は認められなかった。
- Penner 法では, 16種類の単独血清(41.1%), 複数血清(1.0%)に型別され, 型別率は**42.1%**であった。検出される血清型は, B群, D群, Y群, L群 の順に多く, 年次別変化は認められなかった。

薬剂感受性試験



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



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

検討課題

- ・遺伝子型別法についての検討

Penner 血清群

→市販のPHA法による型別率が低い(42.1%)

莢膜多糖遺伝子を用いて、Penner 遺伝子を決定する。

➡ 血清型別試験等の統一プロトコールの作成

- ・薬剤耐性出現状況の把握

➡ 薬剤感受性試験方法及び判定基準の統一

支部センターへのアンケート結果より

レファレンス活動から見えてきたこと

H28.4.1 感染症法の改正 : 病原体検査の質の確保

■カンピロバクター免疫血清

カンピロバクター・レファレンス: 地研の人員・予算の削減

Lior 血清作製困難 → 市販のPenner 血清型別へ移行

しかし、Penner 血清の型別率が低い

- ・メーカーは、レファレンス株を対照に品質保証を実施
- ・メーカーが菌株等の変異？に気付くのは困難
- ・検査の実情を、どの様に反映させるのか？

14. アデノウイルス

レファレンスセンター等関 連会議： アデノウイルス

世話人： 国立感染症研究所 感染症疫学センター
藤本嗣人, 花岡 希
fujimo-t@nih.go.jp

2016年7月21日(木) 広島県 健康福祉センター3F 大会議室B
11:10～12:10

地区レファレンスセンター 2016

北海道・東北・新潟地区

青森県環境保健センター

新潟県保健環境科学研究所

筒井 理華

広川 智香

関東・甲・信・静地区

東京都健康安全研究センター

川崎市健康安全研究所

長谷川 道弥

松島 勇紀、清水 英明

東海・北陸地区

福井県衛生環境研究センター

平野 映子

近畿地区

大阪府立公衆衛生研究所

廣井 聡

中国・四国地区

広島市衛生研究所

藤井 慶樹

九州地区

宮崎県衛生環境研究所

三浦 美穂

* 敬称略

咽頭結膜熱と検出ウイルス

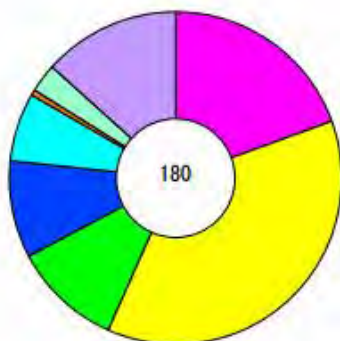
咽頭結膜熱患者から分離・検出されたウイルス、2012～2016年

(病原微生物検出情報：2016年7月15日 作成)

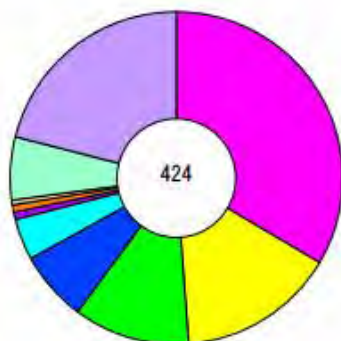
* 各都道府県市の地方衛生研究所からの分離／検出報告を図に示した

IASR

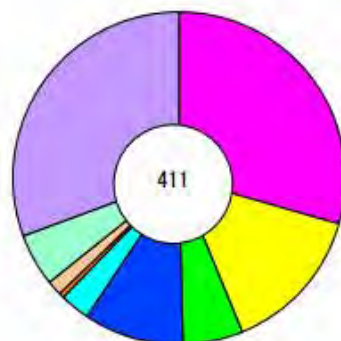
Infectious Agents Surveillance Report



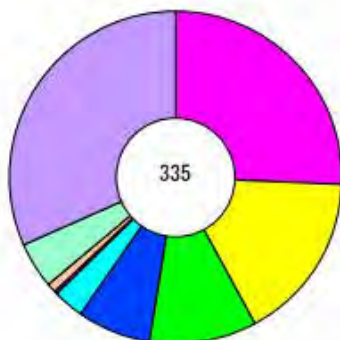
2016年



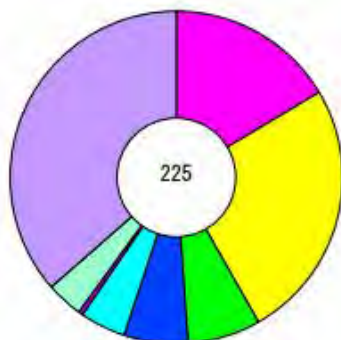
2015年



2014年



2013年



2012年

- Adenovirus 3
- Adenovirus 2
- Adenovirus 4
- Adenovirus 1
- Adenovirus 5
- Adenovirus 37
- Adenovirus 54
- Adenovirus 6
- Other adeno
- その他

流行性角結膜炎：2015年から54型の流行が続いている

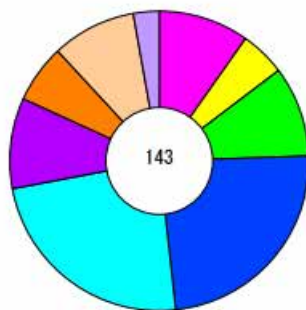
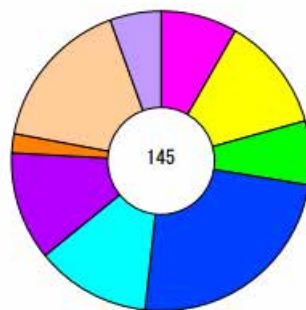
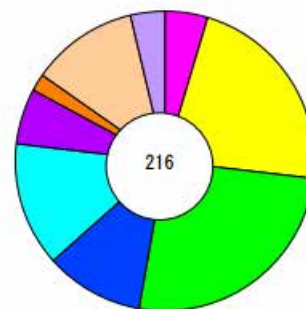
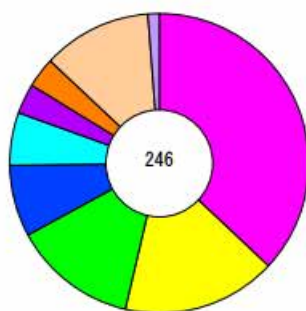
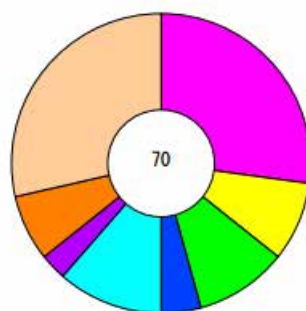
流行性角結膜炎患者から分離・検出されたウイルス、2012～2016年

(病原微生物検出情報：2016年7月15日 作成)

* 各都道府県市の地方衛生研究所からの分離／検出報告を図に示した

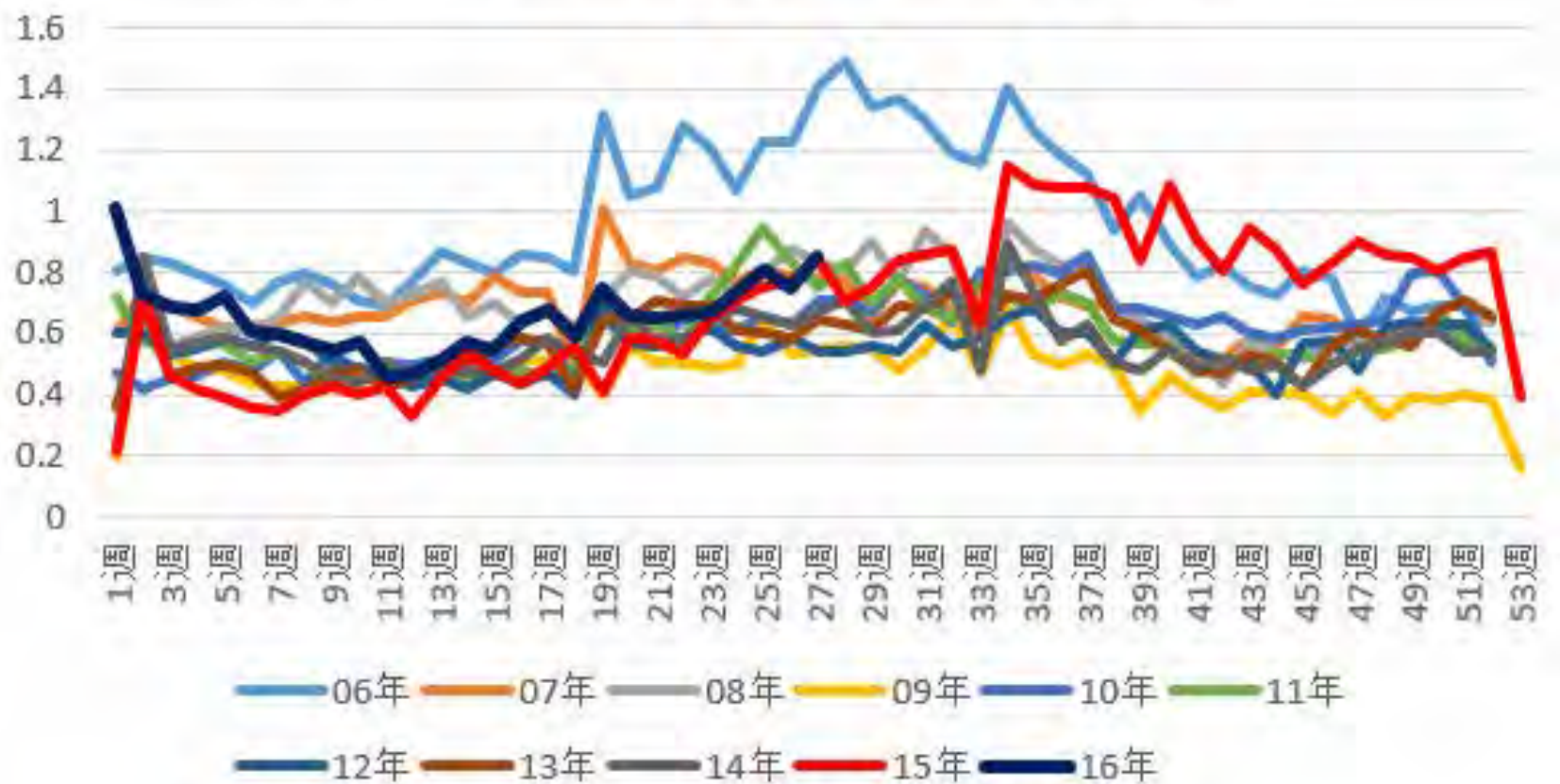
IASR

Infectious Agents Surveillance and Report

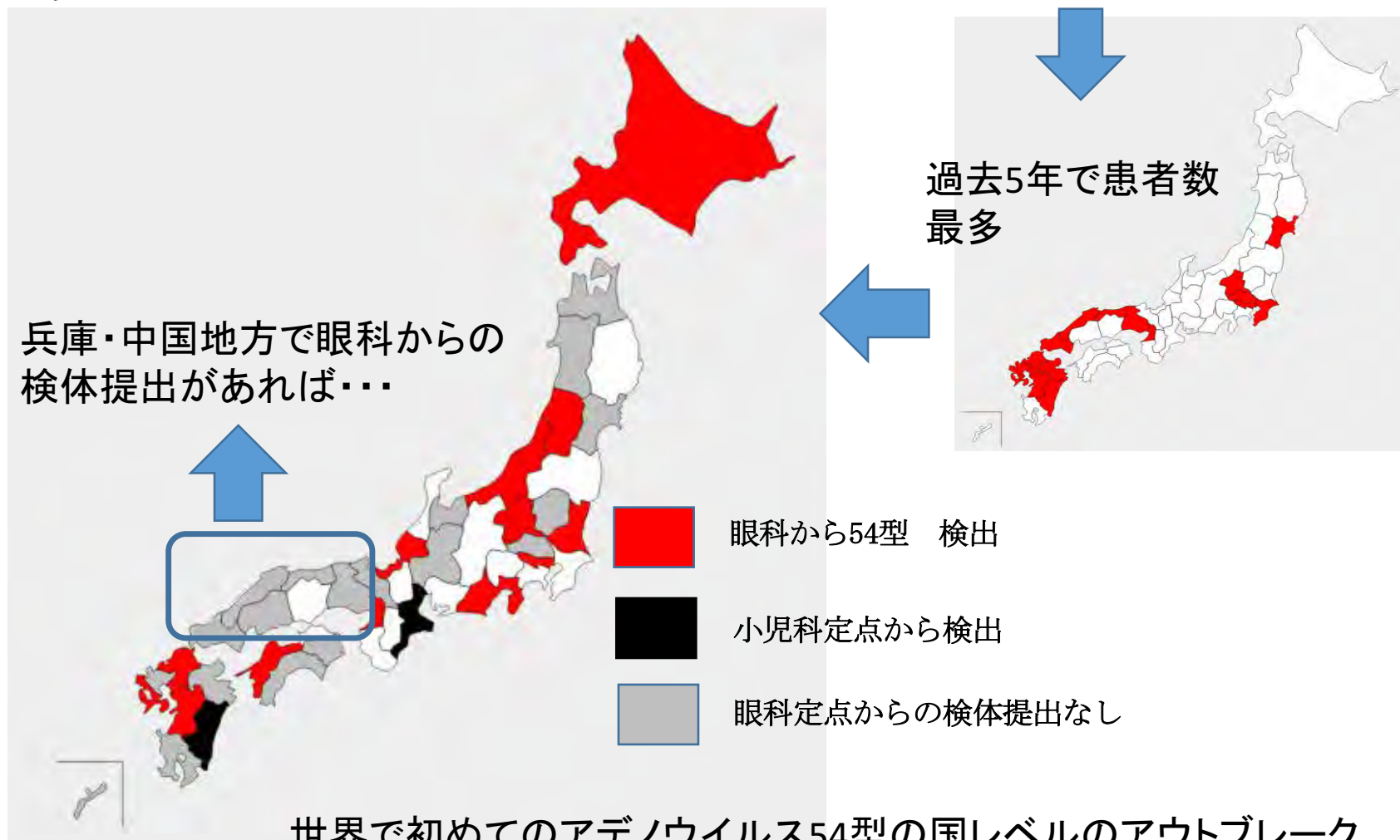


- Adenovirus 54
- Adenovirus 3
- Adenovirus 37
- Adenovirus 4
- Adenovirus 56
- Adenovirus 8
- Adenovirus 53/22
- Other adeno
- Coxsackievirus A24
- その他

流行性角結膜炎定点当たり患者数



昨年度(2015年)に54型による全国規模の流行性角結膜炎の流行



致死症例からのアデノウイルス検出

Emerg Infect Dis. 2016 Apr;22(4):687-90. doi: 10.3201/eid2204.151595.

Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014.

Hai le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N.

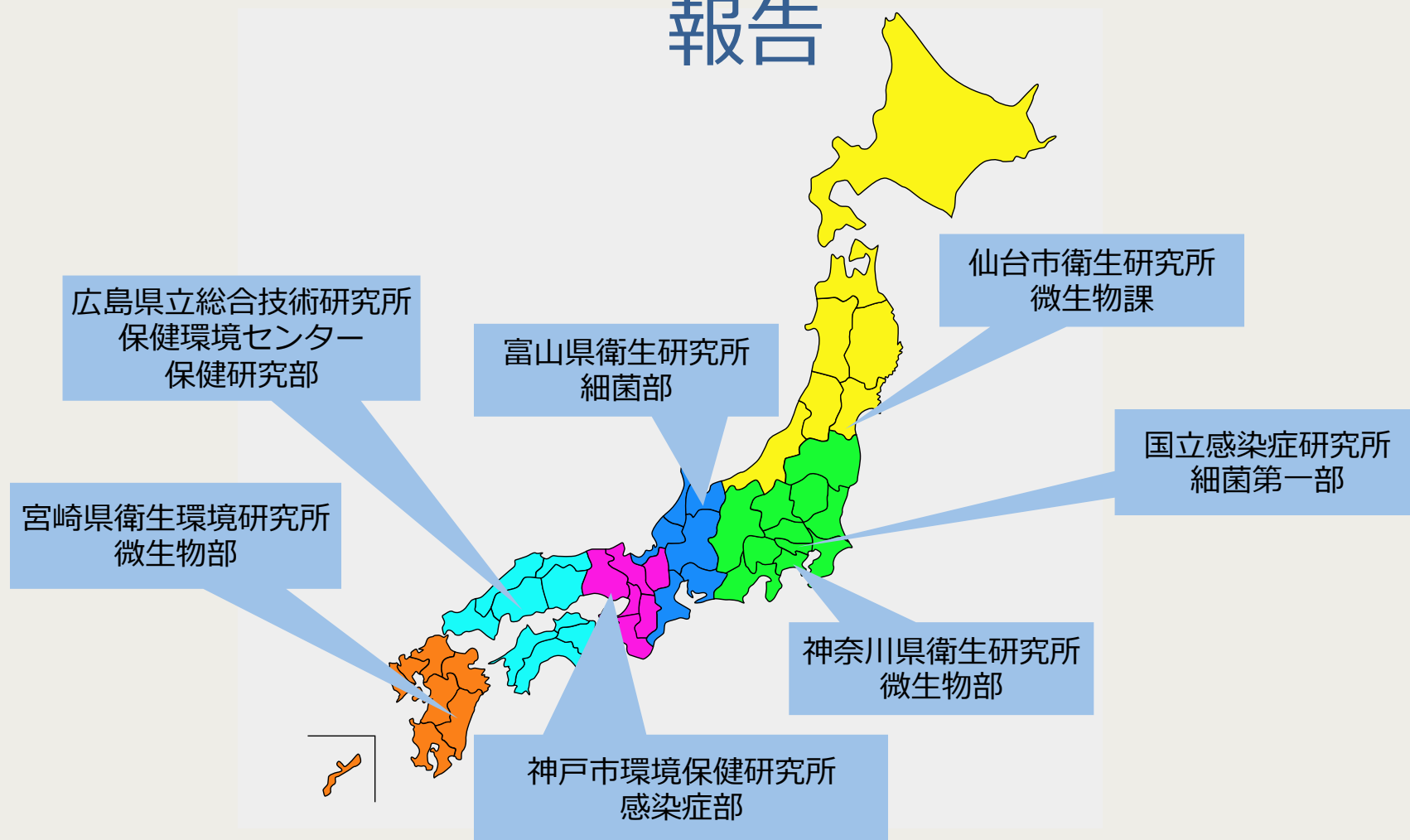
Abstract

During a 2014 measles outbreak in Vietnam, postmortem pathologic examination of hospitalized children who died showed that adenovirus type 7 pneumonia was a contributory cause of death in children with measles-associated immune suppression. Adenovirus type 7 pneumonia should be recognized as a major cause of secondary infection after measles.

近年に日本で流行していないが7型は、小児で致死的感染症を引き起こすことがある。
諸外国で、7型の流行は多く報告されているので日本においても監視の継続が重要。

15. レジオネラ

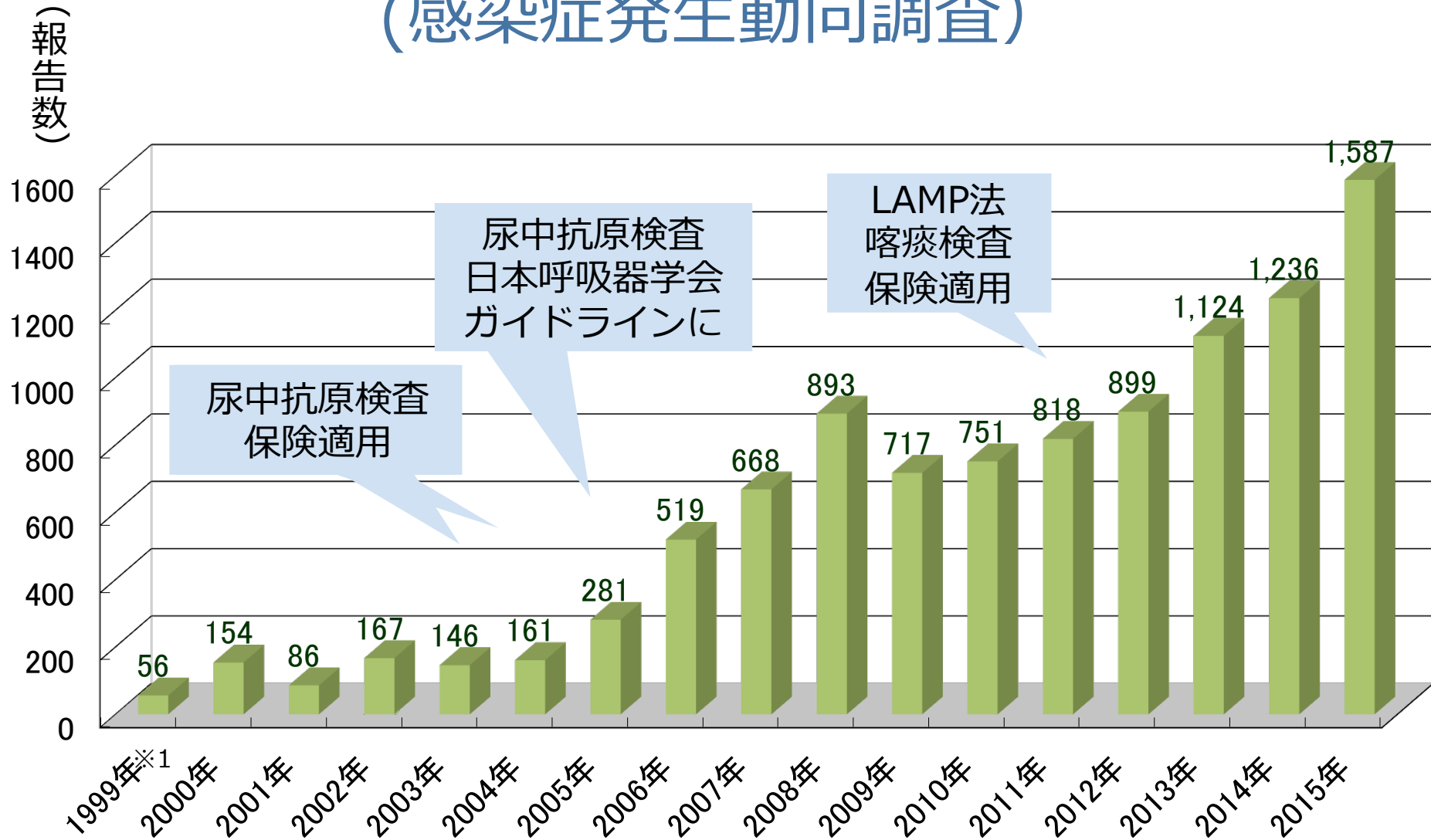
レジオネラ・レファレンスセンター会議 報告



衛生微生物技術協議会第37回研究会
平成28年7月22日 広島

年別レジオネラ症報告数

(感染症発生動向調査)



※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

レジオネラ症増加の背景

- 診断の増加（医師の注目、診断薬の普及）
- リスク因子を持った人の増加（基礎疾患、免疫抑制剤）
- 人口の高齢化
- 配管系の老朽化
- 気候変動

Garrison LEら、MMWR 65(22):576-84, 2016.

収集されたレジオネラ臨床分離株の内訳

菌種別 2007年～

収集臨床分離株の内訳

2016年3月末日現在

L. pneumophila 375株 (97.9%)

L. bozemanai 1株 (0.2%)

SG1 371株 (85.1%)

SG9 5株 (1.1%)

L. dumoffii 1株 (0.2%)

SG2 8株 (1.8%)

SG10 2株 (0.5%)

L. feeleeii 1株 (0.2%)

SG3 14株 (3.2%)

SG12 2株 (0.5%)

L. londiniensis 1株 (0.2%)

SG4 3株 (0.7%)

SG13 2株 (0.5%)

L. longbeachae 5株 (1.1%)

SG5 7株 (1.8%)

SG14 1株 (0.2%)

L. rubrilucens 1株 (0.2%)

SG6 8株 (2.1%)

SG15 1株 (0.2%)

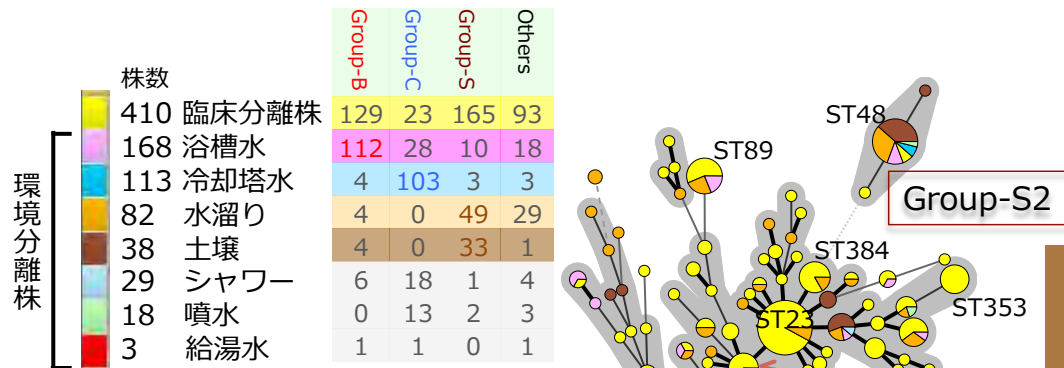
SG8 1株 (0.2%)

UT* 1株 (0.2%)

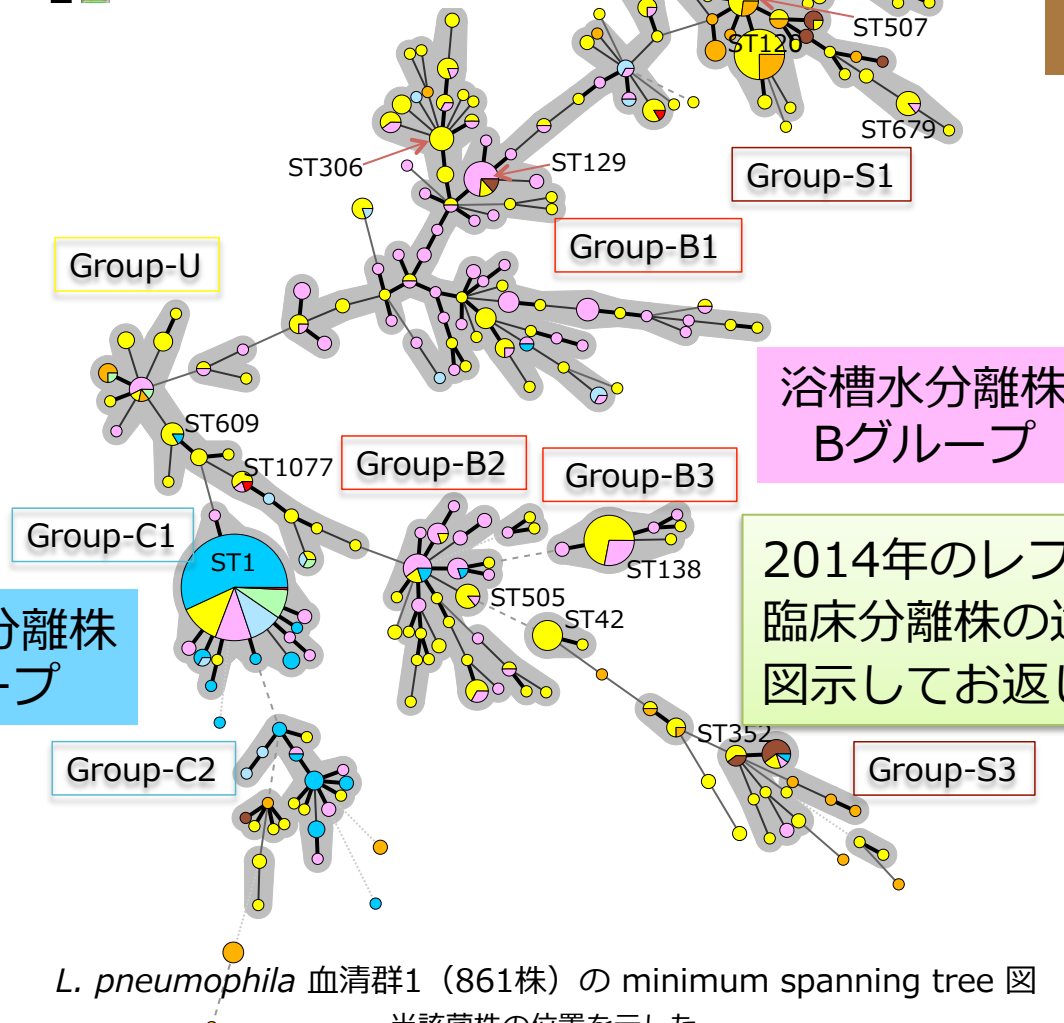
* デンカ生研レジオネラ免疫血清ニューモフィラ1-15群のいずれにも反応しなかった。

計

436株 (100%)



土壌・水溜り
分離株
Sグループ



浴槽水分離株
Bグループ

冷却塔水分離株
Cグループ

2014年のレファレンス会議以降、
臨床分離株の遺伝子型別結果を
図示してお返ししています。

L. pneumophila 血清群1 (861株) の minimum spanning tree 図
当該菌株の位置を示した。

レジオネラ免疫血清の 配布について

市販されていないレジオネラ免疫血清を
デンカ生研に製造委託し、
支部センターを通じて配布

2016年5月配布

セントヘレンシ1群、2群

ジョルダニス

2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

これまで、厚労科研「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」において、レジオネラレファレンスセンターを通して、地研が参加してきた。

2015年度は、日水製薬（株）が実施母体となり、その他の行政機関・民間機関に対象を拡大し、地衛研はレファレンスセンターを通して参加した。

2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

参加施設 189施設

内訳：検査関連施設 96

行政機関 75

68地衛研が参加

財団・協会関係 5

消毒業、コンサルタント業 3

その他13

2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

地方衛研68機関の結果

良好機関の割合

非濃縮：62/68 (91%)

濃縮：ろ過濃縮 38/61 (62%)

遠心濃縮 8/22 (36%)

⇒ 検査研修と内部精度管理が必要

2016年度の予定

- レジオネラ属菌検査精度管理サーベイを実施（昨年度より2か月前倒しの日程）。
- 短期研修 新興再興感染症技術研修でレジオネラ属菌検査を実施（10月）。

16. 結核

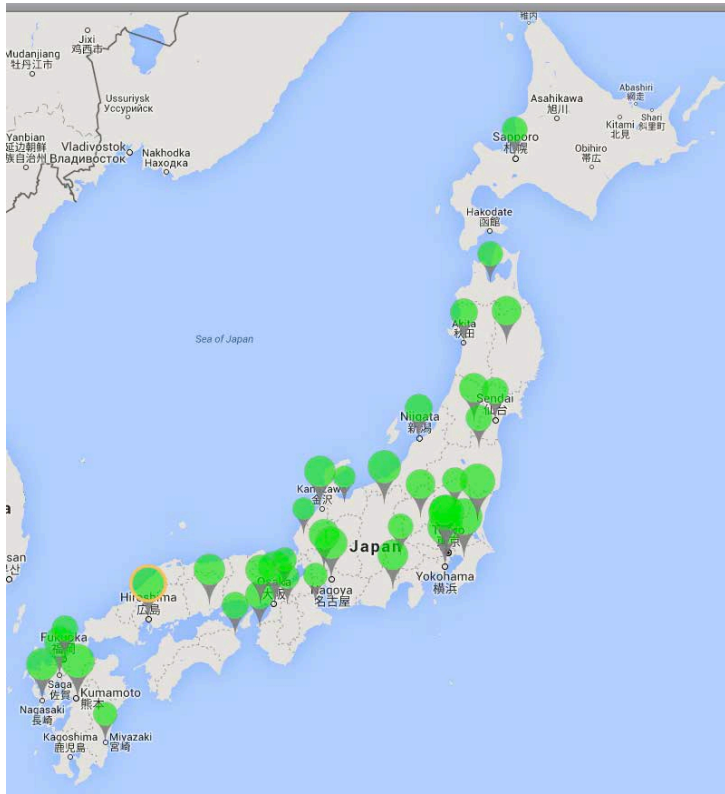
結核

代表世話人：御手洗 聡
(結核予防会結核研究所抗酸菌部)

検討内容

- 結核菌VNTR全国データベースの評価に関する報告
- 結核菌VNTR型別外部精度評価結果報告
- 本年度の活動内容
- 「結核分子疫学調査の手引き」の内容に関する検討

DB構築に用いた情報について



使用菌株の地理的な分布

10県除く(滋賀県、鳥取県、島根県、山口県、香川県、愛媛県、高知県、大分県、鹿児島県、沖縄県)

分析対象菌株

- 民間検査会社において、2010～2011に分離された結核菌982株
- 37都道府県をカバー
- 付随情報:分離地域、分離日、薬剤感受性（個人情報を除く）

分析対象のVNTR loci (24箇所)

JATA(12/15), HV(3232, 3820, 4120), Supply (3690, M40, M04, 2401, M16, ETR C)



国レベルでネットワーク化の在り方を検討するためのモデル

多施設共同評価の概要

- 衛生微生物技術協議会において、DB共同評価の案内、協力自治体を募集
- 2016. 2. 10までに24自治体から4821株のVNTR情報を提供していただく
- 自治体株とデータベースモデルの比較結果を自治体に還元(2016.4.29)
- 広域比較の有用性評価のため、2010-2011年に分離された結核菌株のうち、JATA(15)-VNTR情報が判明している859株について分析を実施

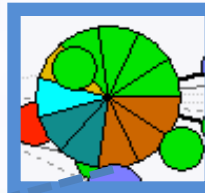
10自治体で登録された結核菌859株の系統関係

広域VNTR-DBモデル
分離頻度上位4VNTR型
(国内蔓延株疑い)



7自治体

山口県、神戸市、大阪市、
埼玉県、さいたま市、川崎
市、福島県、札幌市

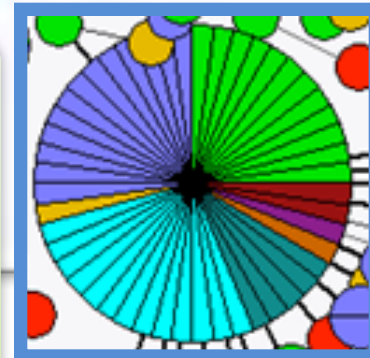


5自治体

神戸市、埼玉県、さいた
ま市、川崎市、福島県



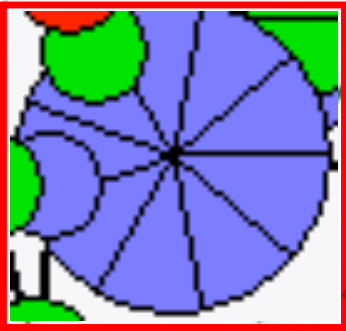
多施設共同評価でも、広域的な
VNTR型の存在が確認



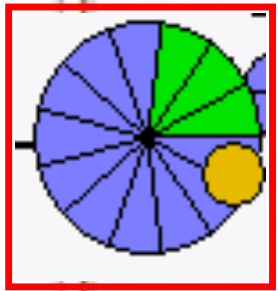
8自治体

神戸市、兵庫県、大阪市、
埼玉県、さいたま市、川崎
市、新潟県、福島県

10自治体で登録された結核菌859株の系統関係

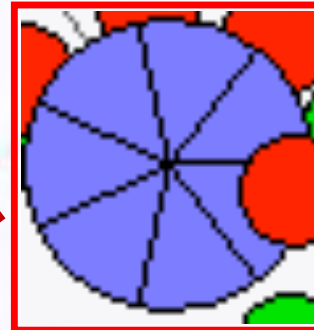


大阪市
(9株)



大阪市、
神戸市
(13株)

地域的な局在が明らかになったクラスタの事例



大阪市
(7株)

地域における感染拡大の可能性

感染経路の究明において優先的な調査が必要？

VNTR分析に関する外部精度評価の方法

- 参加希望のあった衛生研究所を対象
- 未知の結核菌3株DNAを送付
- VNTR分析結果の正答を結核研究所にて解析

外部精度評価で用いたVNTR分析結果報告シートの概要

施設名

PCR産物の測定方法

分析結果シート

分析施設 担当者)
XX研究所 XX)

分析方法
キャピラリー電気泳動 (ロスモアイ)

	JATA No.															HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15									
ID	0424	MIRU 10	1955	2074	2163b	2372	MIRU 26	3155 QUB 15)	MIRU 31	3336	4052 QUB 26)	4156	1982 (QUB 18)	2163a	ETR-A	3232	3820	4120	3690 Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
入力	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション
H37Rvの コピー数	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2						
Strain A(QC-DNA 1	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	11	4	1	11	4	2	2	5	2	3	4
Strain B(QC-DNA 2	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	8	4	7	N	3	6	8	4	3	2	1	4	1	4
Strain C(QC-DNA 3	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	9	3	3	2	4	3	5

JATA(12/15)

HV

Supply(15)

国内で推奨される共通の分析対象

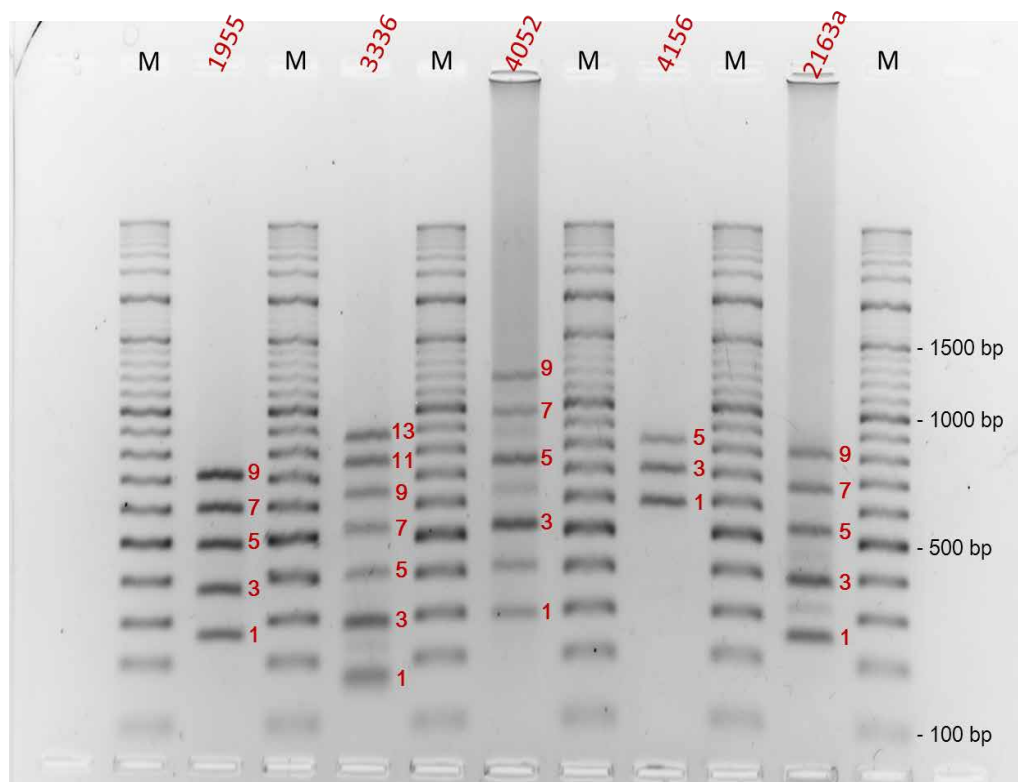
超可変領域、
高識別能
(オプション)

国際比較
(オプション)

参加施設から電子メール等で報告シートを回収し、集計・分析を実施

内部精度管理用サンプルの提供

アガロースゲル用VNTRステップラダーマーカー



- コピー数既知の検体を組み合わせて結核研究所内で調整
- アガロースゲルの分離能、コピー数換算、等の確認に使用
- 45施設に配布(5 loci, 10run分)

2015年度VNTR分析外部精度評価

— 概要 —

- 全国の地方衛生研究所を対象
- 53施設の参加（54施設、2014年度）
- 53施設から分析結果が送付されている
(～2016.3.3)

2015年度の結果(3)

2015年度 外部精度評価の結果

結核菌3株をJATA(12)-VNTR法で分析した場合の正答との一致率

	2014 施設数 (54施設中の割合)	2015 施設数 (53施設中の割合)
全ローサイ完全一致	36施設 <u>66.7%</u> (36/54)	49施設 <u>92.5%</u> (49/53)
1ローカス違い	7施設 13.0%(7/54)	1施設 1.9%(1/53)
2カ所以上違い	11施設 20.3%(11/54)	3施設 5.7%(3/53)



- 2015年度は分析精度の改善が確認された
- 引き続き、分析精度の向上に向けた取り組みが必要

本年度の活動内容

- 昨年度実施した結核菌VNTR遺伝子型別に関する外部精度評価の再実施（10月頃アナウンス予定）
- 既に作成されているVNTR実施手順書の補完資料の作成

結核レファレンス委員会

委員

- 北海道東北新潟:宮城県保健環境センター・畠山 敬
→山形県衛生研究所・瀬戸順次
- 関東甲信静:神奈川県衛生研究所・相川勝弘
- 東海北陸:富山県衛生研究所・磯部順子
- 近畿:大阪市立環境科学研究所・山本香織
- 中国四国:岡山県環境保健センター・大畠律子
→河合央博
- 九州:大分県衛生環境研究センター・一ノ瀬和也

世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡, 瀧井猛将, 村瀬良朗

17. リケツチア

リケッチア症レファレンスセンター会議 報告2016

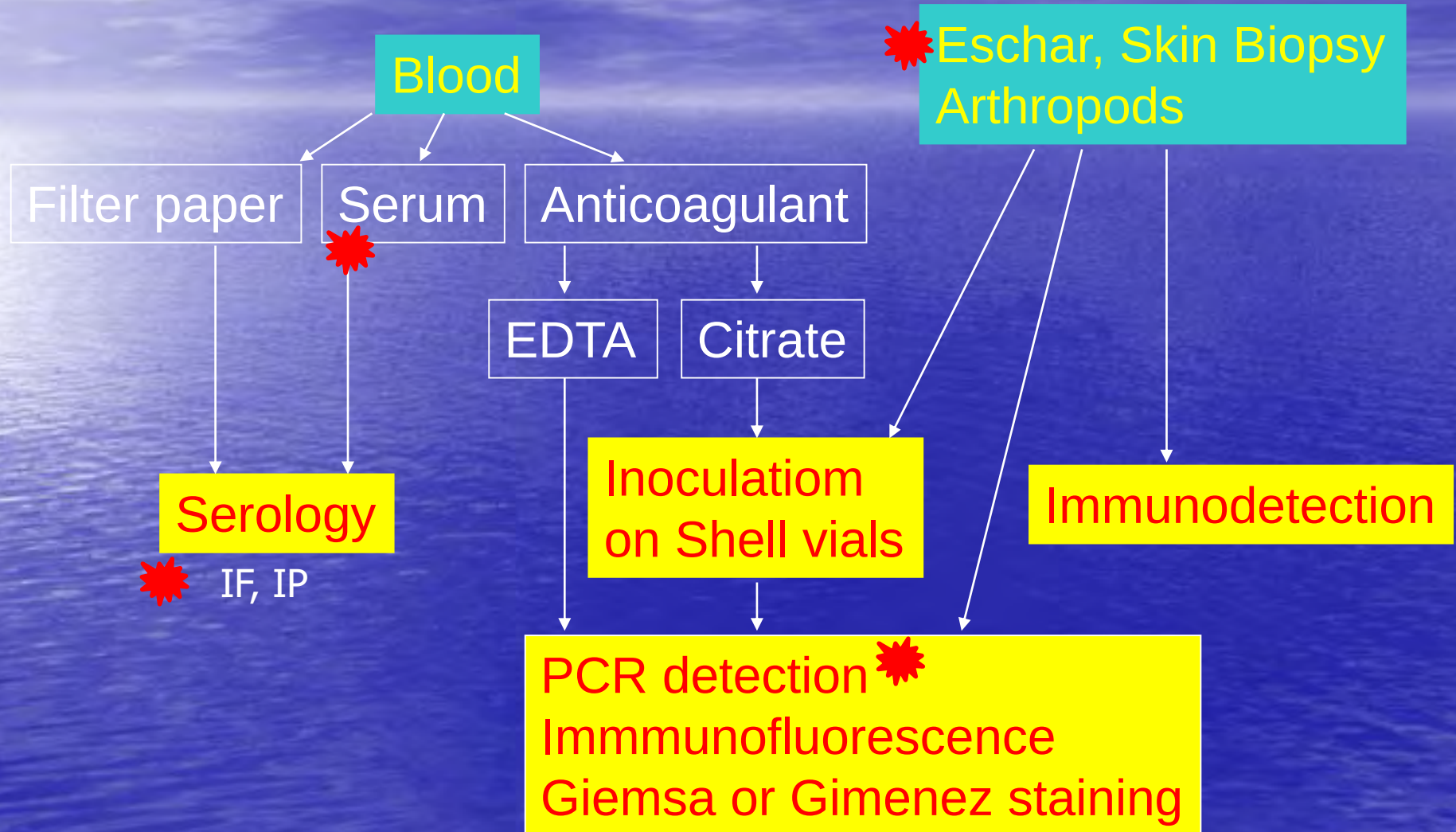
全国衛生微生物技術協議会, 2016年7月22日, 広島

- 北海道東北地区
福島県衛生研究所
青森県環境保健センター
- 東海北陸
三重県保健環境研究所
富山県衛生研究所
- 関東甲信静
東京都健康安全研究センター
埼玉県衛生研究所
- 近畿ブロック
和歌山県環境衛生研究センター
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター
- 中国・四国
岡山県環境保健センター
広島県総合科学研究所環境保健センター
高知県衛生研究所
- 九州
宮崎県衛生環境研究所
鹿児島県環境保健センター

世話人 安藤秀二
国立感染症研究所
ウイルス第一部第五室
shuando@nih.go.jp

- ・ **イントロ（情報共有：発生状況 等）**
- ・ **情報提供（診断系の流れの確認。新規LAMP法）**
- ・ **情報提供（感染細胞抗原を用いたELISA（抗体検出））**
- ・ **情報提供（広島県の取り組み）**
 - ・ **広島県内のダニ類媒介感染症の発生状況と検査対応等について**
 - ・ **ダニ媒介感染症について総合的に対応している実例を紹介，他県での取り組みの参考とする。**
- ・ **意見交換**

Strategy of Laboratory Diagnosis of Rickettsial Infection



リケツチア症に用いる遺伝子検出

国内のリケツチア症の多様性 (*Rickettsia japonica* 以外の紅斑熱群リケツチアによる患者発生, つつが虫病の抗原性状の多様性) から, 特異性は保ちながらも, より広範なリケツチアを検出する系でスクリーニングし, その後 conventional PCR からシーケンス解析で種, 型を決定するのが望ましい。

- Kawamori et al (SFG and Scrub typhus Realtime PCR, H26衛微協)
 - 感染症法で規定され、国内で確実に発生するつつが虫病と日本紅斑熱をスクリーニング可能
- Hanaoka et al (*R. japonica* Realtime PCR, *R. heilongjiangensis*, *Emerg Infect Dis* 15:1994-7, 2009)
 - イスカマダニの生息が現在確認されている地域以外 (宮城県より南) は *R. japonica* としてほぼ間違いない。
- Conventional PCR (*Rickettsia* spp 17KDa, gltA, H20希少感染症研修)
 - シーケンスにより種の確定
- Conventional PCR (*O. tsutsugamushi* type-specific antigen (TSA))
 - Furuya et al: Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31; 1637-40
 - Sato et al: 佐藤寛子、柴田ちひろ、斎藤博之、須藤恒久: 秋田県における Shimokoshi 型つつが虫病の遡及的疫学調査. *Med. Entomol. Zool.*, 2014, 65(4):183-188

リケッチア属検出のためのLAMP法の検討

背景と目的

- 国内の紅斑熱群リケッチア症として、*Rickettsia japonica*による日本紅斑熱は発生地域拡大とともに近年増加傾向にある。
- *R. heilongjiangensis*による極東紅斑熱や*R. helvetica*、*R. tamurae*による患者も報告されている。
- 紅斑熱群リケッチアは世界的にも極めて多種のものが知られ、従来の遺伝子増幅検出系では特異性を重視するあまり、異なる種の検出には不適切である。
- すべてのリケッチア属を検出できる遺伝子検出系の検討が必要。

方法: LAMP 使用機器及び反応組成

使用酵素 LoopampDNA増幅試薬キット [栄研化学]

使用機器 リアルタイム濁度測定装置 RT-160C [栄研化学]
LOOP 反応チューブ [栄研化学]

反応時間

63°C 60分

基本反応組成

使用量

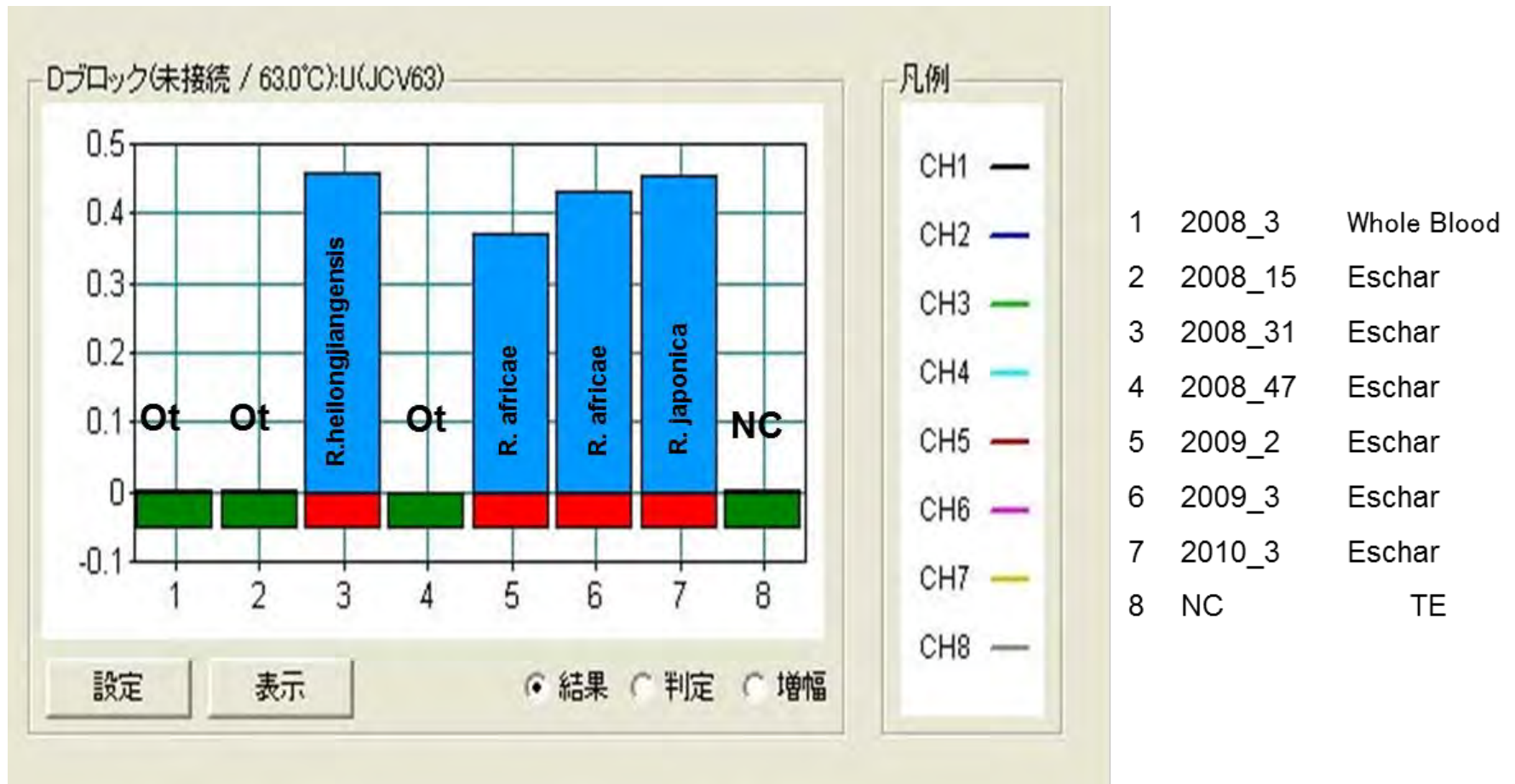
Reaction Mix (2 ×)	12.5 μl
FIP (40 μM)	1 μl
BIP (40 μM)	1 μl
Loop-F (20 μM)	1 μl
Loop-B (20 μM)	1 μl
F3 (5 μM)	1 μl
B3 (5 μM)	1 μl
F3_cana (5 μM)*	1 μl
B3_cana (5 μM)*	1 μl
Bst DNA polymerase	1 μl
template	1 μl
dH2O (滅菌蒸留水)	8.5 μl
Total	25 μl

Set ID	Name	Nucleotide sequence (5'–3')	Purpose
	164_3_F3	GGATCATTACTATGCTAATAGGTT	
	164_3_B3	TCGATTAAATAACCGCAGCT	
	164_3_FIP	TCTTTGTTGCAGGAGGCCAGGGCTTATAGGAATTTT ATGGATAGC	
164_3	164_3_BIP	TACTCACTGGTTTCGCTTCAAAAGAATAGCAAGAGCA CCACCT	LAMP for <i>Rickettsia</i> spp.
	164_3_F3_cana	GGATCATTACTATTCTAATAGGCT	
	164_3_B3_cana	TCGACACCAATAAATTAACCT	
	164_LF	CCCATAGATTGAAACCAGTTACTG	
	164_LB	TGGGCTATGGGTGCAACTTCTAATC	

*反応性向上のために配列の若干異なるF3_cana,B3_canaを加えた。

*JJID Advance Publication, Hanaoka N et al

臨床検体



Each samples were amplified by Rickettsia spp. or Orientia-specific nested PCR, and identified by sequence analysis.