

衛生微生物技術協議会第40回研究会（熊本） レファレンスセンター等報告

日時：令和元年7月10-11日

場所：熊本県熊本市 市民会館シアーズホーム夢ホール（熊本市民会館）：熊本市国際交流会館

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

1. 麻疹・風疹

令和元年7月10日~11日

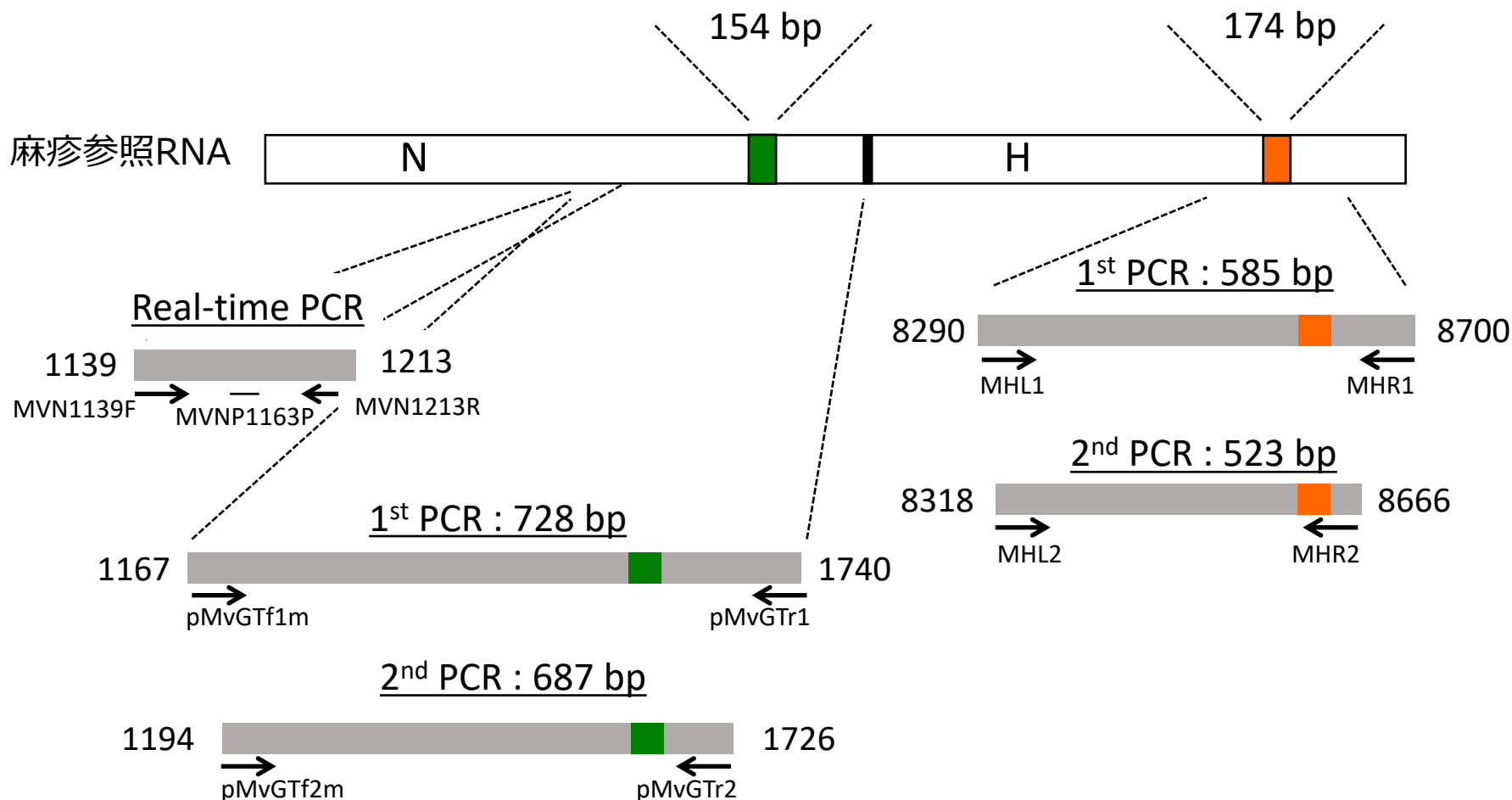
衛生微生物技術協議会第40回研究会 熊本市民会館

麻疹・風疹 レファレンスセンター報告

国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室 森 嘉生（風疹）
第一室 大槻 紀之（麻疹）

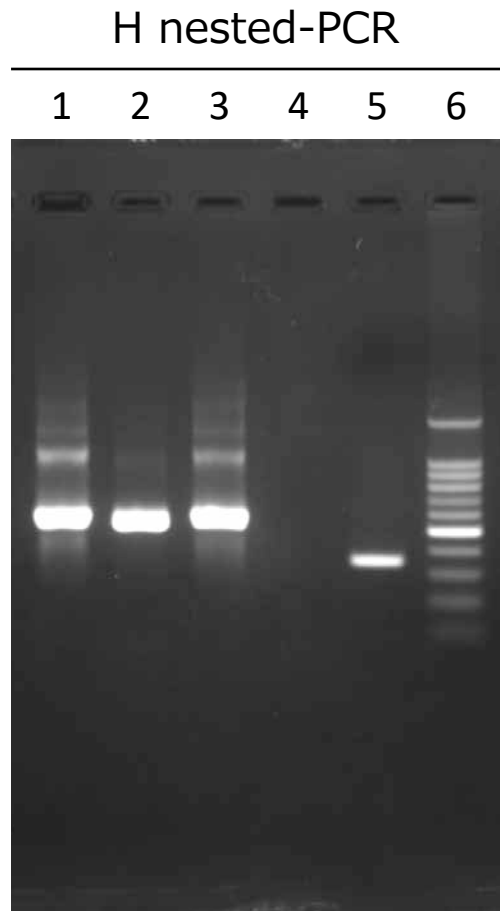
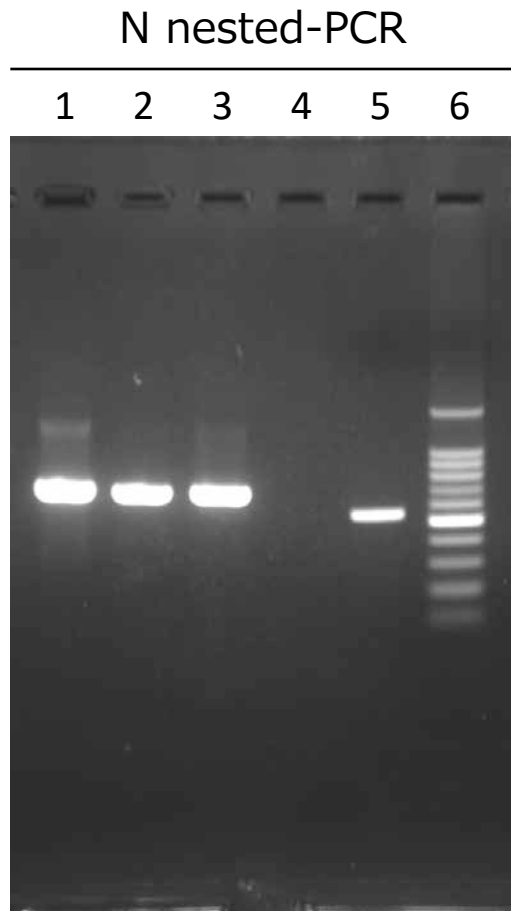
1. ウイルス遺伝子検査に用いる参照RNAの更新について
麻疹
風疹
2. 病原体検出マニュアルの改定について
風疹
3. 麻疹ウイルス遺伝子解析に関して
4. 今年度の予定

新規麻疹参照RNA（陽性コントロール）



新規参照RNAはReal-time RT-PCRとconventional RT-PCRの両方の陽性コントロールとして使用可

新規麻疹参照RNA（陽性コントロール） - conventional PCR

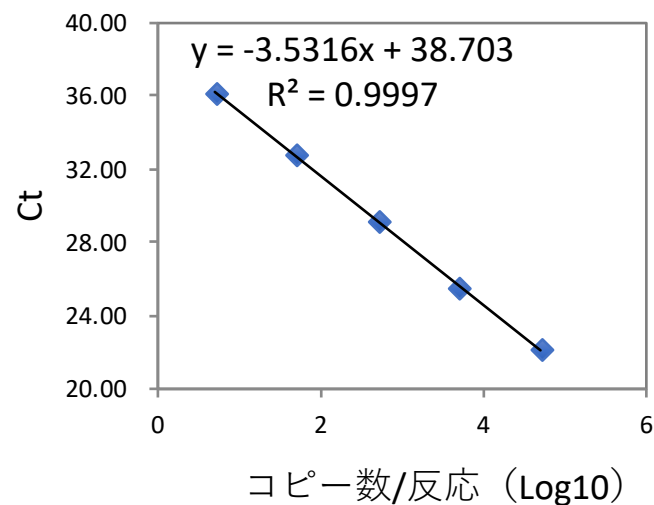


1. 新規参照RNA (10^2 コピー/ μ l)
2. 新規参照RNA (10^1 コピー/ μ l)
3. 現陽性RNA
4. 陰性対照
5. サイズマーカー
6. 100bp ラダー

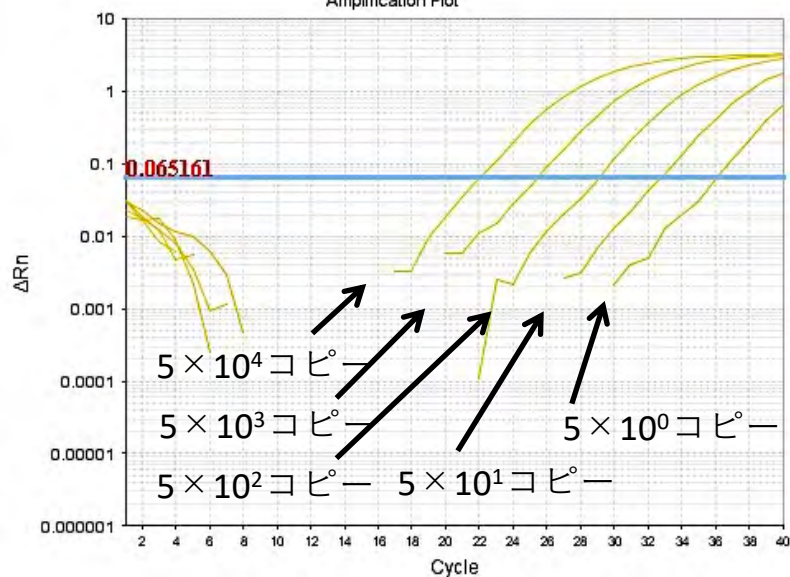
687bp	523bp	参照RNA検出バンド
533bp	349bp	麻疹ウイルス検出バンド

新規麻疹参照RNA（陽性コントロール） - real-time PCR

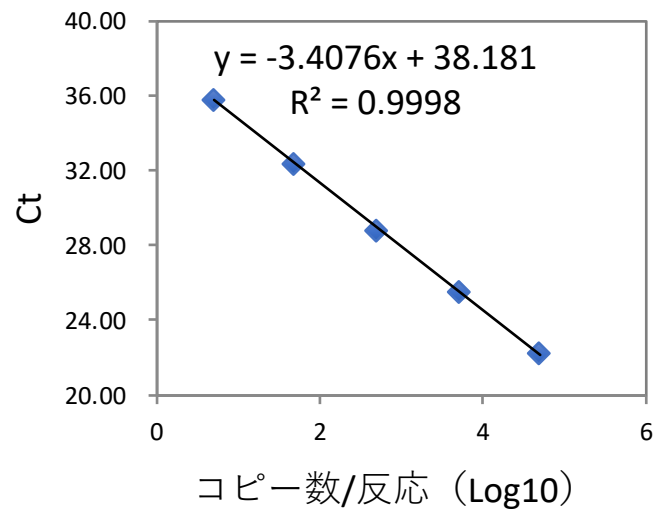
新規麻疹参照RNA



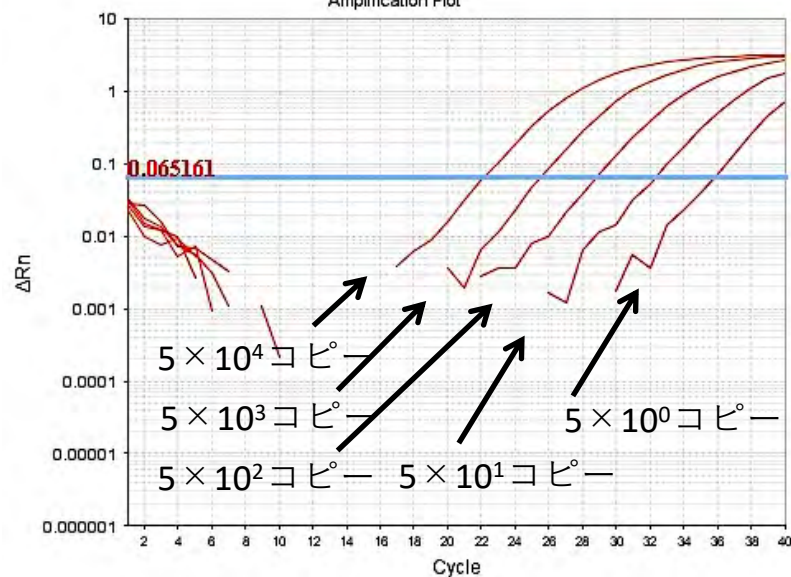
Amplification Plot



現在のスタンダードRNA

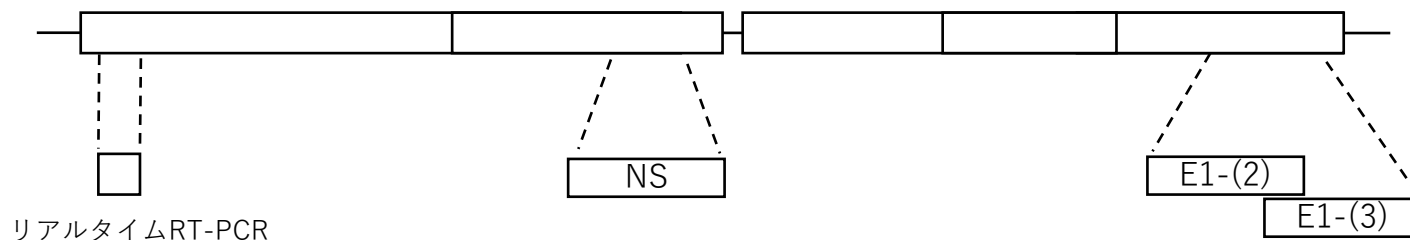


Amplification Plot

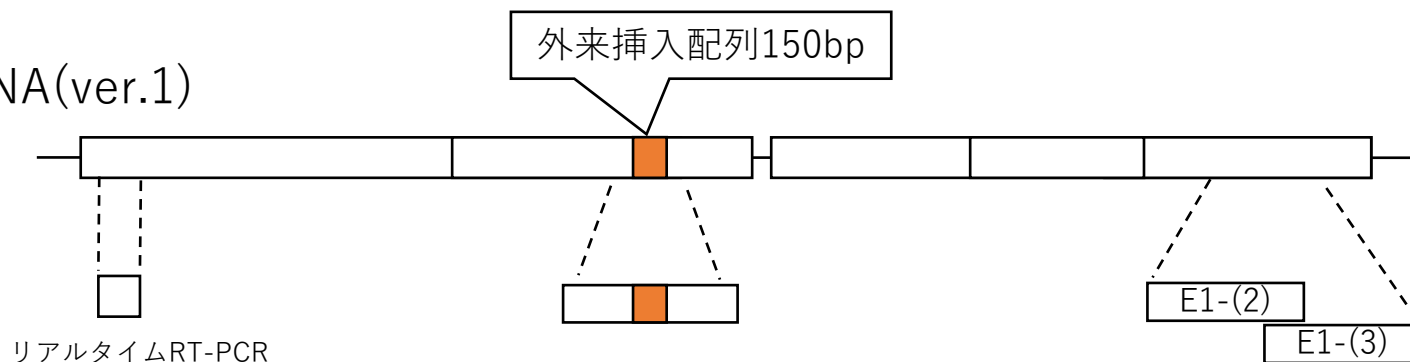


新規風疹参照RNA(ver.2)における外来配列の挿入部位の模式図

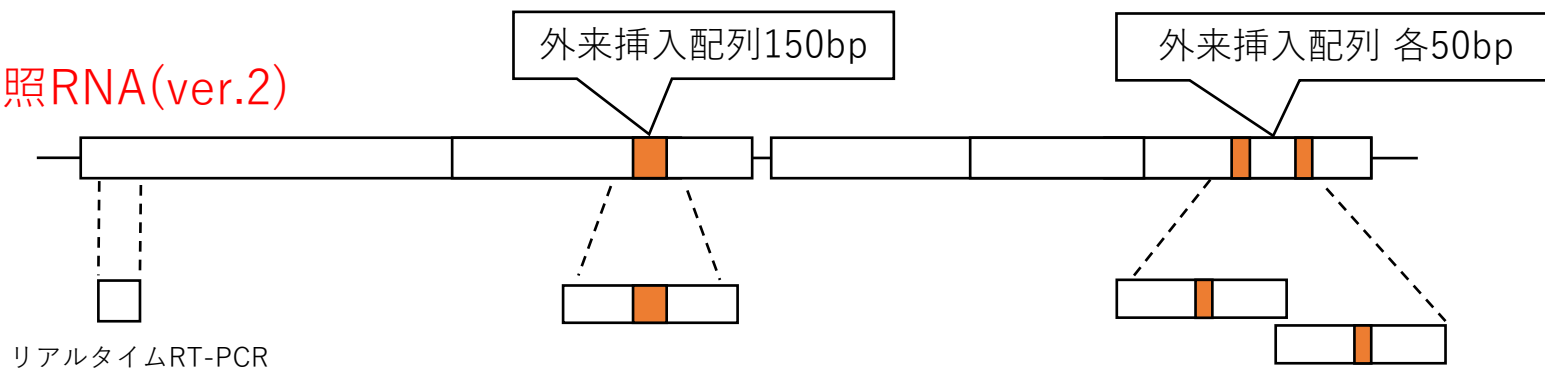
風疹ウイルス野外株ゲノムRNA



参照RNA(ver.1)



新規参照RNA(ver.2)

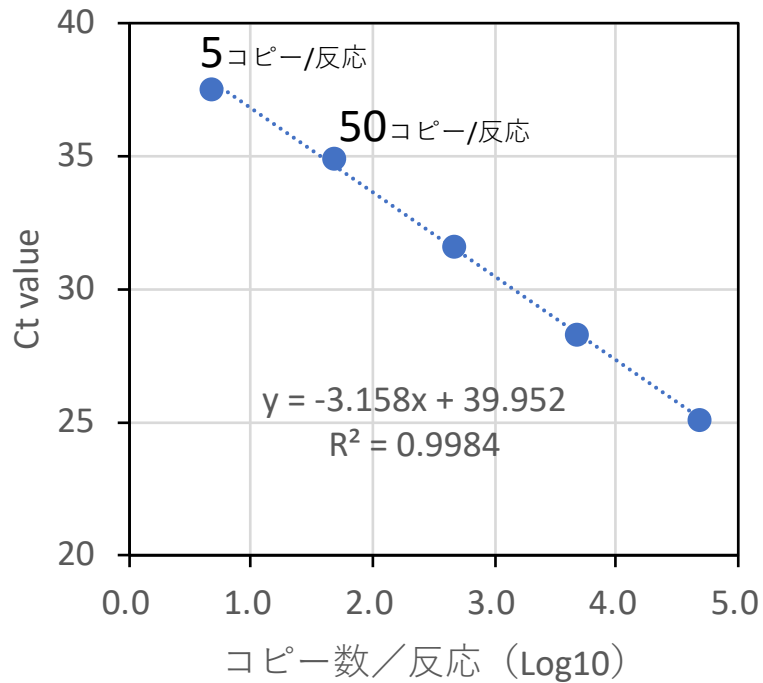


風疹コンベンショナルRT-PCRによる増幅産物のサイズ

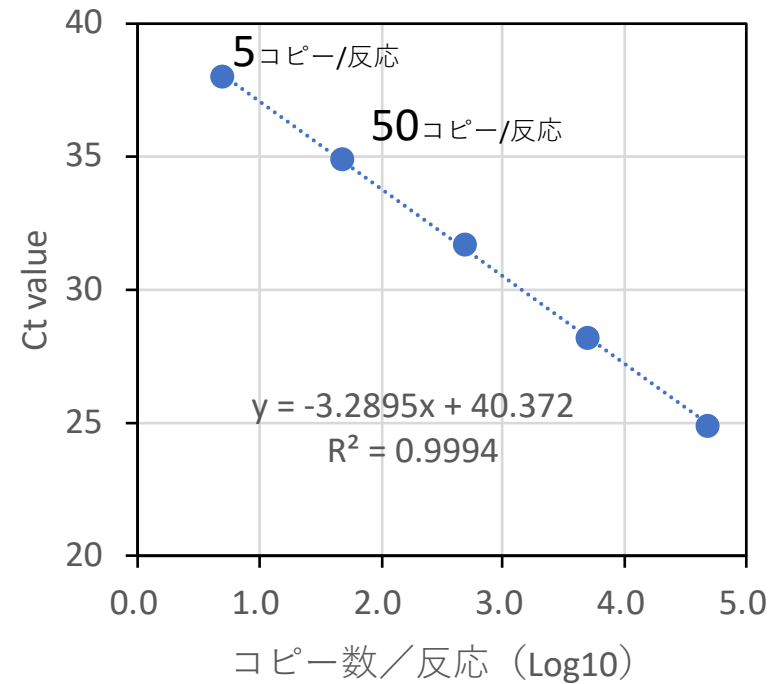
	期待されるバンドサイズ(bp)		
	NS領域RT-PCR	E1-(2)領域RT-PCR	E1-(3)領域RT-PCR
野外株	1st PCR: 256 nested PCR: 157	1st PCR: 506 nested PCR: 466	1st PCR: 550 nested PCR: 423
	+150		
参照RNA (Ver.1)	1st PCR: 406 nested PCR: 307	1st PCR: 506 nested PCR: 466	1st PCR: 550 nested PCR: 423
		+50	+50
新規参照RNA (Ver.2)	1st PCR: 406 nested PCR: 307	1st PCR: 556 nested PCR: 516	1st PCR: 600 nested PCR: 473

新規風疹参照RNA(ver.2)のリアルタイムRT-PCR増幅

参照RNA (ver.1)



参照RNA (ver.2)



病原体検出マニュアル 風疹 第4版について
(2019.7月4日改定)

変更点

1. コンベンショナルRT-PCR（NS遺伝子、E1遺伝子）の実施例変更
PCR酵素：Perfectshot Ex-Taq → Tks Gflex DNA polymerase
2. シーケンス用プライマーの追加、シーケンス反応精製方法の記載変更
3. 参照RNA ver.2について
4. 検体の処理法、輸送、保管についての補足
5. その他 細かな修正

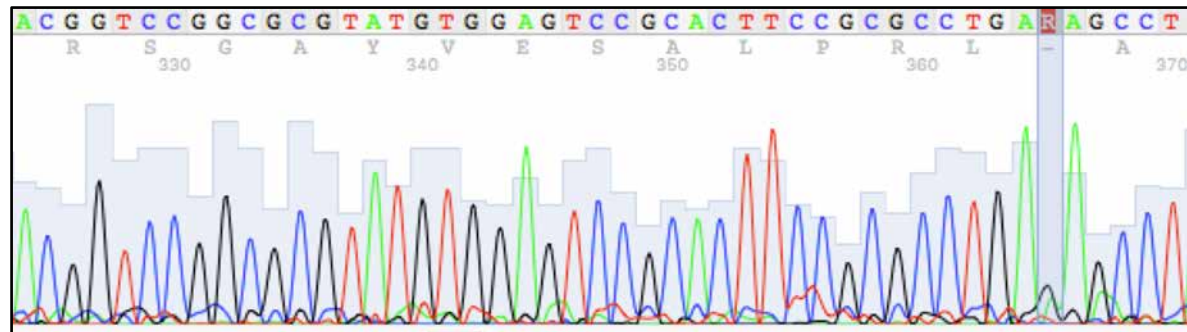
シーケンスプライマーの改良

E1-3R ACCCGCGCGCTC**GCG**CGATC

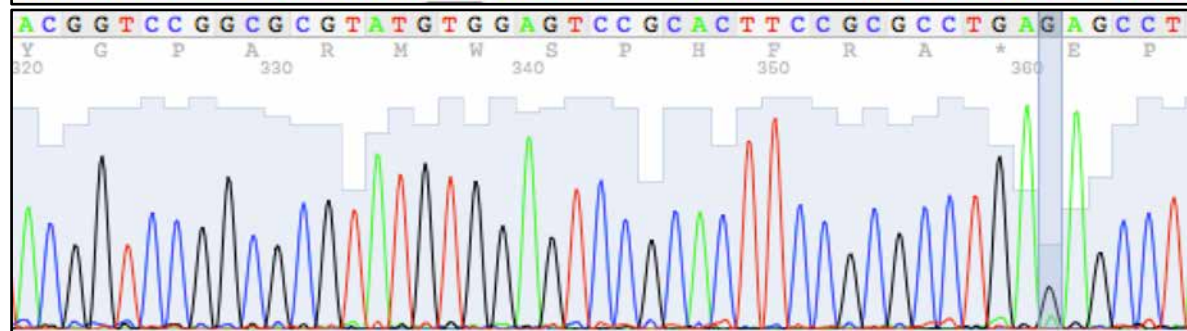
E1-3R'seq ACCCGCGCGCTC**ACA**CGATC

プライマーダイマーの解消。シーケンス反応時のみ使用

E1-3R



E1-3R'seq



シーケンス反応精製方法の記載変更

E1-3R (E1-3R'seq) は精製方法の影響を非常に受けやすい

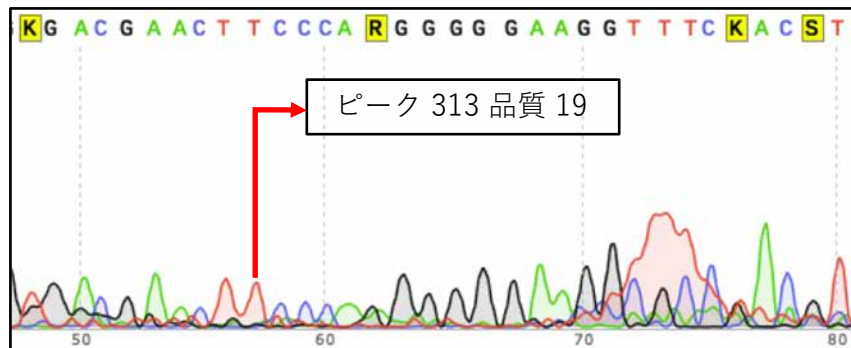
第3.2版

AutoSeq G-50 (GEヘルスケア) 等を用い、未反応ダイターミネーターを除去する。

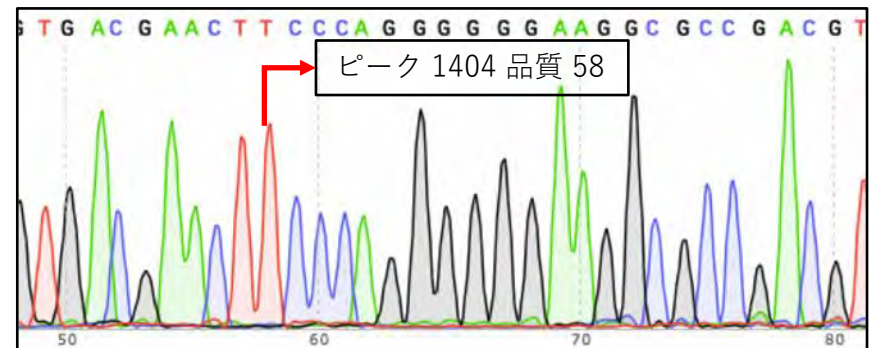
第4.0版

スピンカラム法やエタノール沈殿法等を用いて、未反応ダイターミネーターを除去する。
<中略> 感染研では**Centri-Sepスピンカラム** (Thermo Fisher Scientific) を用いた方法もしくはエタノール沈殿で精製を行ない、良好な結果を得ている。

AutoSeq G-50



Centri-Sep



検体の処理、輸送、保管についての補足

- 1) 咽頭ぬぐい液または鼻腔拭い液（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：合成樹脂素材のスワブ採取スティック（例：Sterile Swab Applicators, Copan社製）で咽頭あるいは鼻腔粘膜をぬぐい、ウイルス保存輸送液（1～3mL）に浸漬する。ウイルス保存輸送液は市販品（例：BDユニバーサルトランスポート検体輸送用培地、BD社製）のほか、自家調整液*が使用できる**。＜中略＞

* * 上記を使用することが望ましいが、難しい場合には滅菌綿棒と少量の滅菌生理食塩水で代用することができる。細菌培養用のキャリー・ブレア培地等は望ましくない。

- 3) 尿（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

10から50mLの尿を採取する。1,000～1,500rpm、10分間遠心した沈渣細胞を2～3mLのウイルス輸送保存液に再浮遊させたものを用いる。上記の処理を行うことが望ましいが、尿そのものでもウイルス遺伝子を検出可能である。上記の処理を行っても沈渣細胞が得られない場合があるが、その場合には尿検体をそのまま使用する。ウイルス分離に未処理尿検体を使用する場合、そのままだと細胞障害が起きることがあるため2～10倍に希釈して使用する。

検体の処理、輸送、保管についての補足

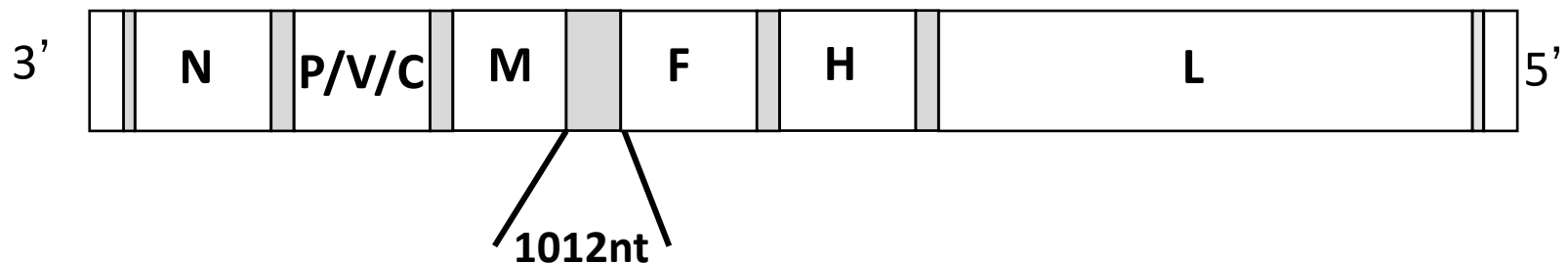
2-4. 検査材料の輸送と保管

検体を採取したら4℃に保管し、速やかに検査実施施設へ冷蔵状態で輸送する。ウイルス遺伝子検出法あるいはウイルス分離法の実施は、採取後48時間以内に開始することが望ましいが、困難な場合にはそのまま冷蔵保存を行うか（採取後7日ぐらいまで）、-80℃でいったん冷凍保存する。全血からの血清・血漿・PBMC分離および尿の遠心分離は冷凍前に実施する。検体の長期保存は必ず-80℃での冷凍で行うこと。血清学的検査に用いる血清は-20℃で保存可能である。

麻疹N遺伝子450bpの配列によるウイルスの型別について

世界的に麻疹の発生が減少している状況に於いて現在のN遺伝子450bpの塩基配列による型別だけでは分子疫学的に十分に仕分け出来ない状況になりつつある。

WHOではより詳細な分子疫学を実施するために M/F-NCR（M/F遺伝子間のnon-coding region）の塩基配列による型別を検討している



麻疹ウイルスM/F-NCRの塩基配列に関して

今後、疫学リンクがはっきりせずN450の配列により分子疫学的にも十分な解析が出来なかった場合、M/F-NCRの塩基配列の解析が必要となる可能性

現在は以下の様に考えています

- ✓ M/F-NCRの配列を解析することにより、国内の発生状況の調査に有用であると考えられるウイルス株での配列解析
- ✓ 配列の決定は、感染研ウイルス3部で実施あるいは各施設で実施どちらでも可能とする
- ✓ 感染研で実施した場合でも、その配列の利用は国内の流行の調査及びWHOへの報告にのみデータを利用する
- ✓ 後日、M/F-NCR配列が必要となる場合も考えられるので、可能な限り抽出RNAやcDNAの保存が必要

今年度の予定

- ・ 配布希望施設へ参照RNA ver2の送付
- ・ 麻疹 病原体検出マニュアル 小改定
(参照RNAに関する記載変更)
- ・ 厚労省外部精度管理事業 麻疹・風疹
ウイルス遺伝子配列解析
8月上旬受付開始、9月上旬~10月上旬実施
- ・ AMED研究班（岡本分担班） 実地研修
風疹ウイルス遺伝子配列解析
2月ごろ

2. HIV関連

第40回衛生微生物協議会レファレンスセンター関連会議 HIV関連（2019.7.10 熊本市国際交流会館）

議題

- ・ 新規HIV検査試薬（Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Assay）に関する
情報提供
神奈川県衛生研究所 佐野貴子先生
- ・ 病原体検出マニュアルの改定案 – Geeniusの導入を想定した案
東京都健康安全研究センター 長島真美先生
- ・ H30年度実施のHIV遺伝子検査精度管理調査に関する報告
国立感染症研究所エイズ研究センター 草川茂先生

昨年度の活動報告

病原体検出マニュアルを全面的に改訂(2018年10月)

- ・ 遺伝子診断、およびHIV-2との鑑別診断の項目を重点的に改訂

定量法(In-house); 既存の方法を改訂し、簡略化
定性法(In-house); 新たにマニュアルに追加



・ HIV検査講習会の実施(10月)
東京都健康安全研究センター

・ 遺伝子検査導入の支援
および精度管理調査の実施

HIV-1 NAT精度管調査の実施（H30年度）

背景

in-house HIV-1 NAT検査法の
精度管理は？

適切な標準物質が無く、
統一的な評価は行われていない

該当する外部精度調査の
プロジェクトがない



NAT検査評価用標準物質の作製

標準物質を含むHIV-1陽性・陰性
検体を配布し、測定結果の評価

感染研

- 参加施設の募集
- 標準物質を含む4サンプルを配布



参加施設

- 各施設で準備したStandardを使用
- 各施設で定めた測定方法でVLを決定
- 結果を報告

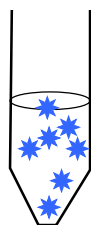
HIV-1 NAT検査用標準物質の作製と値付け

標準物質候補検体の作製



HIV-1の培養

↓ (上清を60℃1時間処理し不活化)



HIV陰性血漿にスパイク、
分注し-80℃で保管

標準物質候補検体の値付け

献血血液スクリーニング用国内標準品
JIV-(B) No.JP-1 (国立感染症研究所
血液・安全性研究部より譲渡[#])と
候補検体の段階希釈列を異なる
3種類の方法で3回測定



平行線定量法によって候補検体の力価を
国内標準品に対する相対力価として算出、
6.71 Log₁₀IU/mL (5.17×10^6 IU/mL,
 3.81×10^6 copies/mL)と決定した

[#]日本輸血細胞治療学雑誌 (2018) 第64巻 第3号 502-509

HIV-1 NAT精度管理調査結果の概要

※参加施設には個別に報告書を郵送

※ 定量法10施設、定性法3施設の独立した3測定の結果を評価した。

HIV-1定量NAT検査

2施設

増幅効率90-100%を示すSlope値の検量線が得られ、HIV-1 RNA定量診断薬と比較してばらつきのない標準物質18-00定量値が得られた。

他施設(8施設)では、陽性・陰性の判定には問題がなかったが、検量線、測定間の測定値のばらつきなどの問題があり、引き続き検討が必要と考えられた。

HIV-1定性NAT検査

3施設

陽性・陰性の判定結果に問題はなかった。

1施設

標準物質18-00希釈列の複数回測定で同じ結果が得られ、最小検出感度が**38.1cp/mL**であることが示された。

- 定期的な精度管理調査が必要であることが示唆された
- 系の立ち上げ、支援の一助になったと考えている

今後の見込み

； Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Assayに関する情報提供

2019年秋以降に発売開始見込

原理 ； イムノクロマト（IC）法を基本とし金コロイド
標識プロテインAを検出

操作性； 簡便

検出感度； 組換えタンパク・ペプチドを用いてIgGを検出

用途； 現行の確認検査、および鑑別検査法（WB法）
の後継品

Geenius HIV 1/2 キットについて

- 抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体が1つのデバイスで判定可能
- 検体は血清、血漿および全血で測定可能
- **短時間（30分）で結果判定が可能**
- Geenius専用リーダーおよびソフトウェアにより自動読み取り解析,結果のデジタルデータの保管が可能

※スクリーニング検査での陽性検体の確認検査としてのみ使用可能



HIV-1陽性検体166件(慢性期146件、急性期20件)を用いた検討

Table 1. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for established and acute HIV-1 infection samples.

	WB		Geenius						Total
			HIV-1 positive	HIV-1 indeterminate	HIV-2 positive	HIV-2 indeterminate	HIV positive untypable	HIV negative	
Established HIV-1 Infection ^a (n = 146)	NLB 1	Positive	143	0	0	0	1	0	144
		Indeterminate	1 ^c	1 ^c	0	0	0	0	2
		Negative	0	0	0	0	0	0	0
		Total	144	1	0	0	1	0	146
	NLB 2	Positive	18	0	0	0	0	0	18
		Indeterminate	122	1	0	0	1	0	124
		Negative	4	0	0	0	0	0	4
		Total	144	1	0	0	1	0	146
Acute HIV-1 infection ^b (n = 20)	NLB 1	Positive	0	0	0	0	0	0	0
		Indeterminate	7	6	0	0	0	3	16
		Negative	0	0	0	0	0	4	4
		Total	7	6	0	0	0	7	20
	NLB 2	Positive	0	0	0	0	0	0	0
		Indeterminate	5	3	0	0	0	0	8
		Negative	2	3	0	0	0	7	12
		Total	7	6	0	0	0	7	20

・Geeniusの感度は99.3% (145/146) [95%CI, 96.2-100.0]、HIV-2バンドの交差反応性は0%

・NLB 1の感度は98.6% (144/146) [95%CI, 95.1-99.8] 2件の判定保留例は治療中の検体

・NLB 2では4件しか陰性にならず、交差反応性は12.3%(18/146)となった

・急性期検体では、NLB 1で判定保留となった16件中7件は、Geeniusでは陽性となった。

HIV検査体制の維持・向上に向けた取り組み 2019年度の計画

- Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Assayの導入を見込んだ病原体検出マニュアルを更新

レファレンスセンター関連会議で討論した内容を反映させ、最終版とします。

- HIV検査講習会の実施（秋以降）

問合せ先；東京都健康安全研究センター（貞升先生）

- HIV-NAT精度管理調査の実施（秋以降）

系の立ち上げに関する相談は感染研エイズセンターにて随時受付ております。

3. 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

衛生微生物技術協議会 第40回研究会
令和元年7月10-11日 熊本県熊本市

インフルエンザレファレンスセンター

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

大阪健康安全基盤研究所

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

石川県保健環境センター

堺市衛生研究所

沖縄県衛生環境研究所

H30年度のレファレンス活動報告

- ✓ インフルエンザ株サーベイランスの実施
HI試験用サーベイランスキットの配布
- ✓ 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)
- ✓ 薬剤耐性株検出系(TaqMan PCR)の動作確認
43地衛研に実施
- ✓ ウイルス分離培養技術の実態調査
関東・甲・信・静地区および東海・北陸地区を中心に
37地衛研に実施
- ✓ インフルエンザ診断マニュアルの更新
第4版に更新

R元年度のレファレンス活動報告

- ✓ インフルエンザ株サーベイランスの実施
サーベイランスキットを10月に配送予定(希望地衛研)
- ✓ 薬剤耐性株サーベイランスの実施
実施要綱を8月に配布予定
- ✓ 薬剤耐性株検出系(TaqMan PCR)の動作確認
未実施地衛研を中心に実施予定
- ✓ ウイルス分離培養技術の実態調査
中国・四国および九州地区を中心とした希望地衛研
に実施予定

4. 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

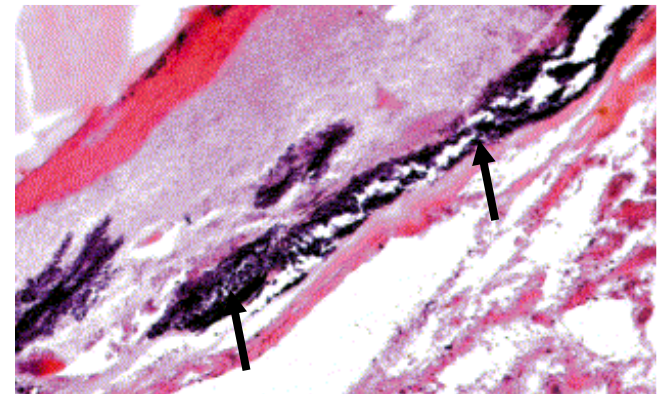
○A群溶血性レンサ球菌咽頭炎（小児科定点報告疾患）
A群レンサ球菌による上気道感染症

○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** ← 簡便
- M血清型別
- *emm*遺伝子型別など

B群

- 血清型別など

C,G群

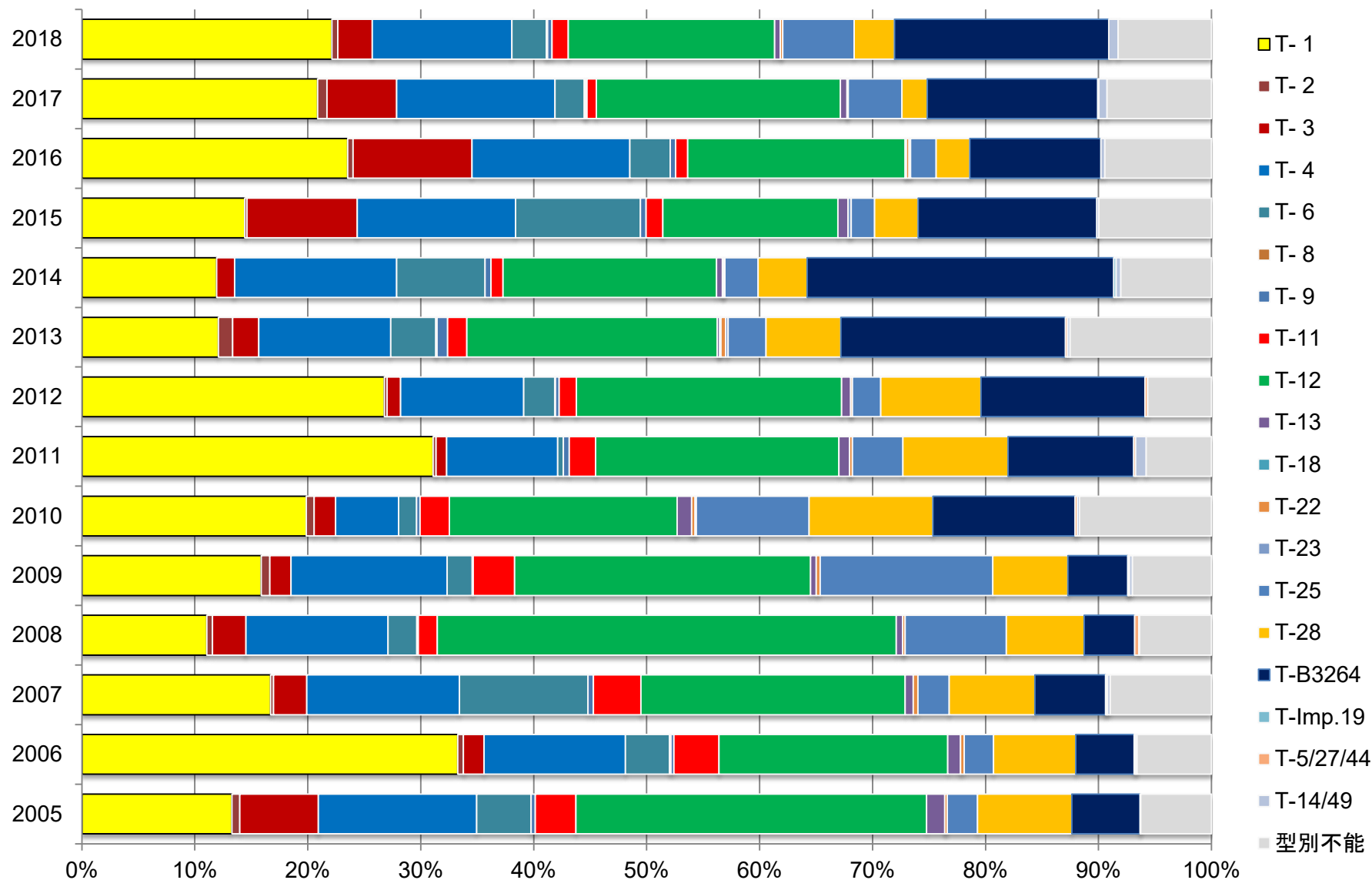
- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

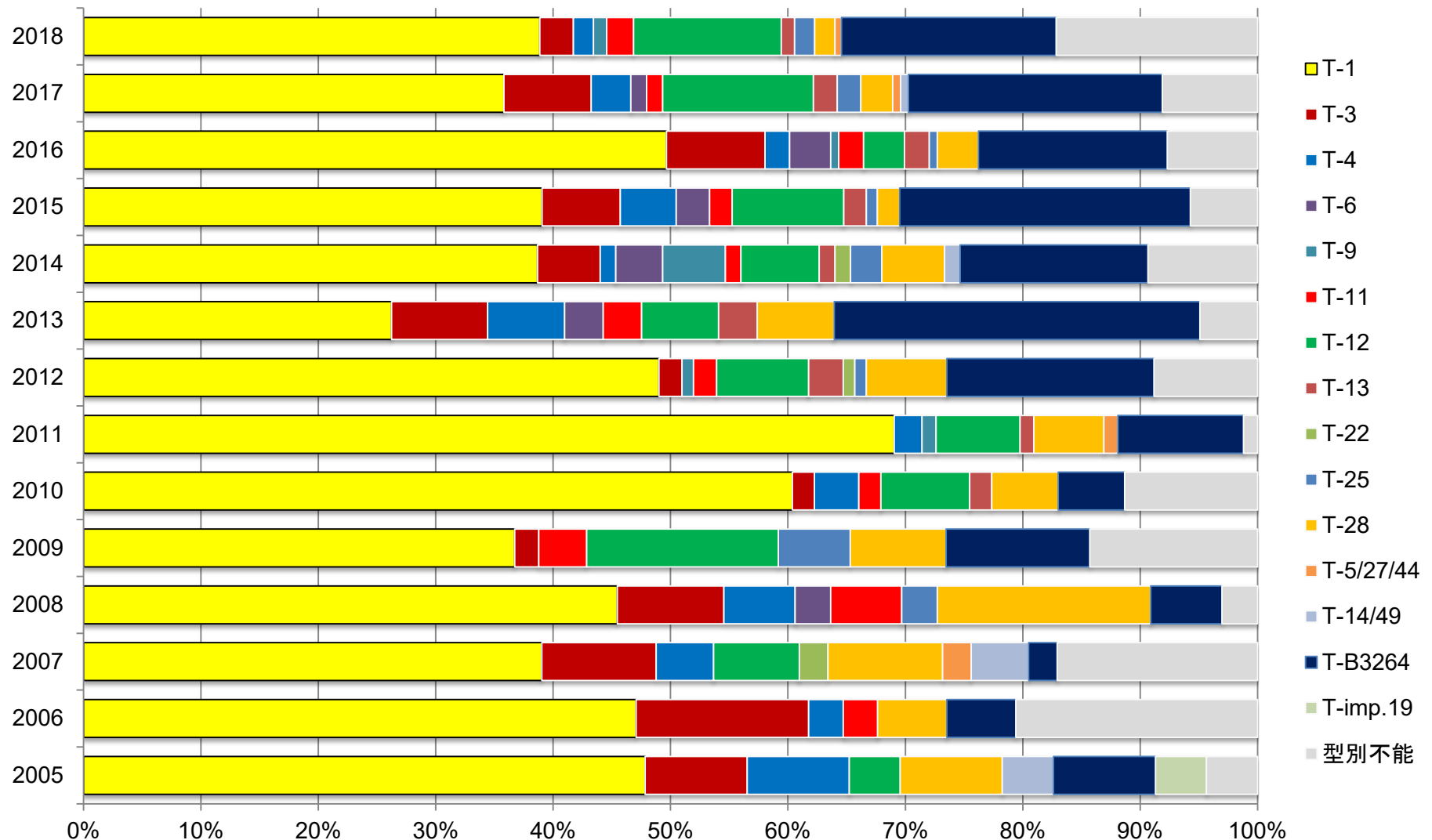
- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

咽頭炎由来株（A群レンサ球菌）のT型別（2005-2018）



劇症型溶レン菌感染症患者由来株（A群レンサ球菌）の T型別（2005-2018）



5. カンピロバクター

衛生微生物技術協議会・第40回研究会
リファレンスセンター会議

カンピロバクター

議 事

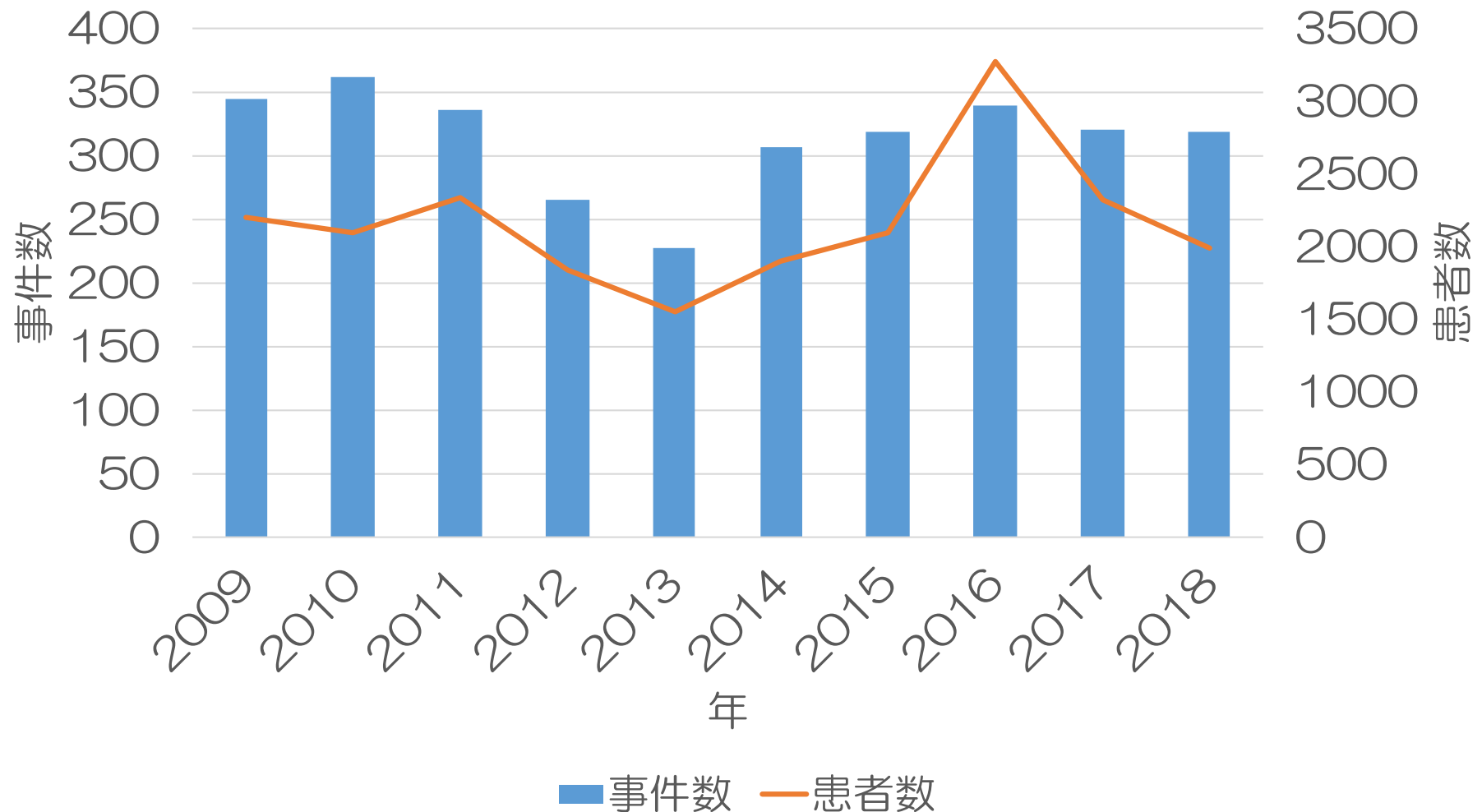
- 食中毒発生状況及び関連情報の紹介
- 前年度の検討内容報告
- リファレンスセンターからの報告（紹介）
 - 食中毒事例（秋田県）
 - 選択分離培地の検討（愛知県）
 - 定量試験法等の紹介（東京都）
- 本年度の検討計画（案）

令和元年度 カンピロバクター・リファレンス名簿

担当	担当者	所属（機関、部署）	
代表世話人	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
副世話人	山本 章治	国立感染症研究所	細菌第一部
北海道・東北	今野 貴之	秋田県健康環境センター	保健衛生部
関東・甲信越	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター	微生物部
東海・北陸	山田 和弘	愛知県衛生研究所	生物学部
近畿	坂田 淳子	大阪健康安全基盤研究所	微生物部
中国・四国	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター	保健科学部
九州・沖縄	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部

カンピロバクター食中毒の発生動向

- 平成30年（2018年）の発生状況：事件数 319件（全体の24.0%）
患者数 1,995名（全体の11.5%）
- 近年は下げ止まりの傾向が続いている。



加熱用表示について



News Release

令和元年6月25日

食品表示の適正化に向けた取組について

消費者庁は、食品衛生の監視指導の強化が求められる夏期において、食品の表示・広告の適正化を図るため、都道府県等と連携し、食品表示法、景品表示法及び健康増進法の規定に基づき下記の取組を実施することとしましたので、お知らせいたします。

1 基本方針

不適切な食品の表示に対しては、消費者庁が横断的に取締りを行いつつ、地方出先機関を有し、監視業務についてのノウハウを有する農林水産省及び財務省並びに都道府県・保健所等が相互に連携し、食品表示の関係法令の規定に基づき効果的・効率的な取締りの執行体制を確保しているところです。

このような体制の下、食品衛生の監視指導の強化が求められる夏期においては、次のとおり、食品表示の重点事項について、取締り等を行うこととしました。

2 夏期一斉取締りの実施について

国及び都道府県等においては、食品衛生の監視指導の強化が求められる夏期において、食中毒などの健康被害の発生を防止するため、従来から食品衛生の監視指導を強化してきたところですが、例年どおり、この時期に合わせ、食品等の表示の信頼性を確保する観点から、食品表示の衛生・保健事項に係る取締りの強化を全国一斉に実施します（別紙）。

（1）実施時期：令和元年7月1日から同月31日まで

（2）主な監視指導事項

- ア アレルゲン、期限表示等の衛生・保健事項に関する表示
- イ 保健機能食品を含めた健康食品に関する表示
- ウ 生食用食肉、遺伝子組換え食品等に関する表示
- エ 道の駅や産地直売所、業務用加工食品に関する表示
- オ 食品表示基準に基づく表示方法の普及・啓発

3 表示の適正化等に向けた重点的な取組について

国及び都道府県等においては、食品表示の適正化を図るため、従来から食品

鶏肉によるカンピロバクター食中毒を発生させないために ～「加熱用」表示をしっかりと確認～

別添1



平成30年、263件の飲食店がカンピロバクター食中毒で営業禁止等の処分を受けています。

鶏肉を扱う飲食店

の皆さまへ



- 加熱用や用途不明の鶏肉・鶏内臓を生食用として提供してはいけません。
- 鶏肉・鶏内臓を調理する際は、「加熱用」などの表示に従い、十分に加熱。



中心部を75℃で1分間以上

食鳥処理業者、卸売業者

の皆さまへ



- 通知に基づき、「加熱用」、「中心部まで十分に加熱してお召し上がりください」、「生食用にはしないでください」の表示等で、情報伝達を確実に実施。
- 「新鮮だから大丈夫」は根拠のない誤った発言ですので、やめてください。



加熱用 等と
しっかりと表示

詳しい情報を知りたい方へ

食中毒予防の詳しい情報は、以下のウェブサイトに掲載されていますので、ご活用ください。

厚生労働省・消費者庁 国産食肉安全委員会のリスト 日食協の「知ろう！防ごう！食中毒」へのリンク



カンピロバクターとは？



鶏肉、牛、豚、豚、鶏肉などの動物の腸管内に生息します。少ない量（数個）でもヒトに感染しますが、影響は軽く、十分な加熱調理で死滅します。



【問合せ】消費者庁 電話 03-3507-8800（代）
表示対策課食品表示対策室・食品表示企画課

公益社団法人日本食品衛生協会

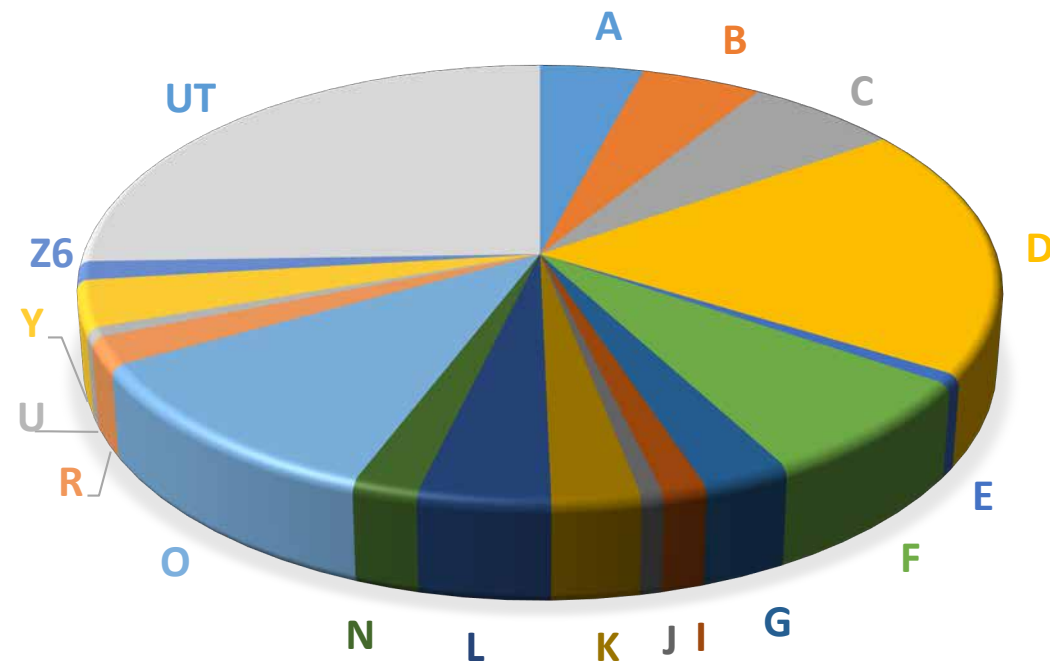
ウェブサイト <http://www.n-shokuei.jp>

平成30年度の活動報告

① Penner血清型別

➤平成30年度 *C. jejuni* 散発事例由来株を中心に検討

型	菌株数	割合(%)
A	6	4.1
B	7	4.8
C	9	6.2
D	27	18.6
E	1	0.7
F	11	7.6
G	4	2.8
I	2	1.4
J	1	0.7
K	4	2.8
L	6	4.1
N	3	2.1
O	16	11.0
R	3	2.1
U	1	0.7
Y	5	3.4
Z6	2	1.4
UT	37	25.5



② 薬剤感受性試験

➤ **CPFX、TC、EM**を対象として、**EUCAST法**に基づき試行的に実施。

薬剤	ディスク濃度 (μg)	MICブレイク ポイント (mg/L)		阻止円直径 ブレイクポイント (mm)	
		S $\leq$	R $>$	S $\geq$	R $<$
CPFX	5	0.5	0.5	26	26
EM, <i>C. jejuni</i>	15	4	4	20	20
EM, <i>C. coli</i>	15	8	8	24	24
TC	30	2	2	30	30

- ISO 20776-1に基づくMIC判定基準/方法を採用
- 培地：MH broth + 5% 馬脱線血 + 20 mg/L β -NAD
- 培養条件：微好気， $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，48時間
- 接種菌数: 5×10^5 CFU/mL

EUCAST法に関する主な意見

項目	利点	欠点
接種菌の調整	菌数を明確に調整可能	一定の習熟が必要
培養・MIC判定	一部の菌株では良好な発育/ 明瞭な阻止円を認めた	定義される培地の市販品 がなく、自家調整が必要 (労力・費用面)
その他	TC判定はCLSIと一部で差異が認めた (利点・欠点の別は不明)	

- 6センターの全体成績(EUCAST法)

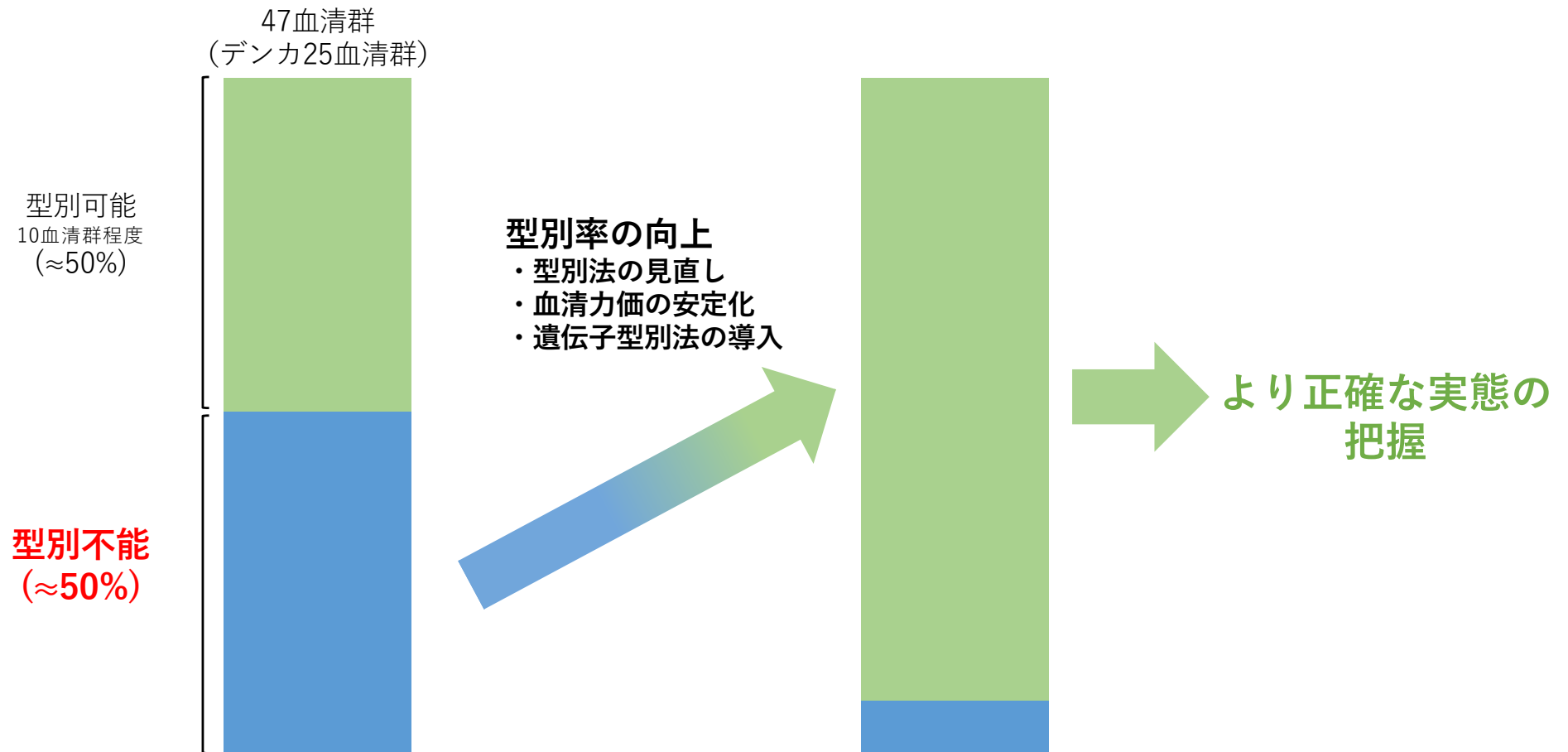
EM	TC	CPFX	菌株数	割合(%)
S	S	S	62	41.1
S	S	R	45	29.8
S	R	R	28	18.5
R	R	R	5	3.3
R	S	R	0	0
S	R	S	11	7.3

- うち3センターの成績 (EUCAST法/CLSI法の平行試験)

EM	TC	CPFX	CLSI	EUCAST
S	S	S	16	15
S	S	R	16	12
S	R	R	8	12
R	R	R	2	3
R	S	R	1	0
S	R	S	0	1

→不一致はTC判定で見られ易い？

Penner血清型別法の問題点と改善案

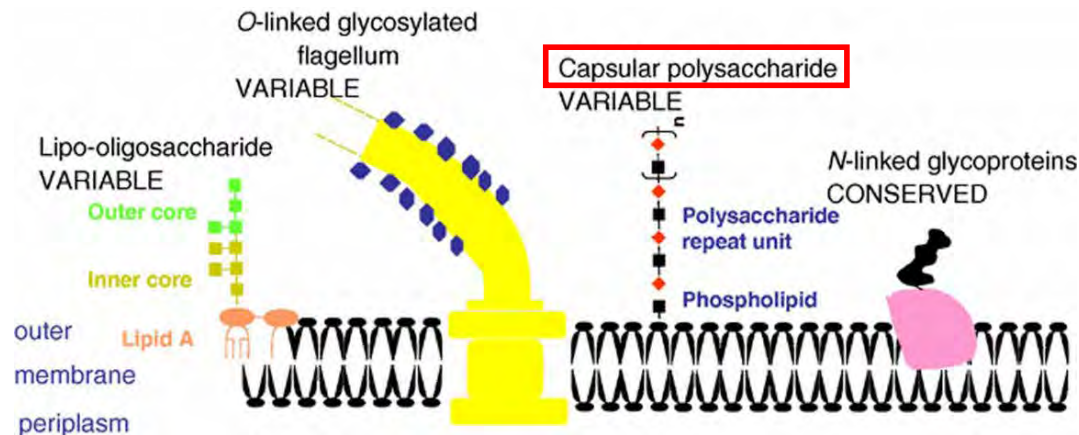


Penner血清型の遺伝子型別法の検討

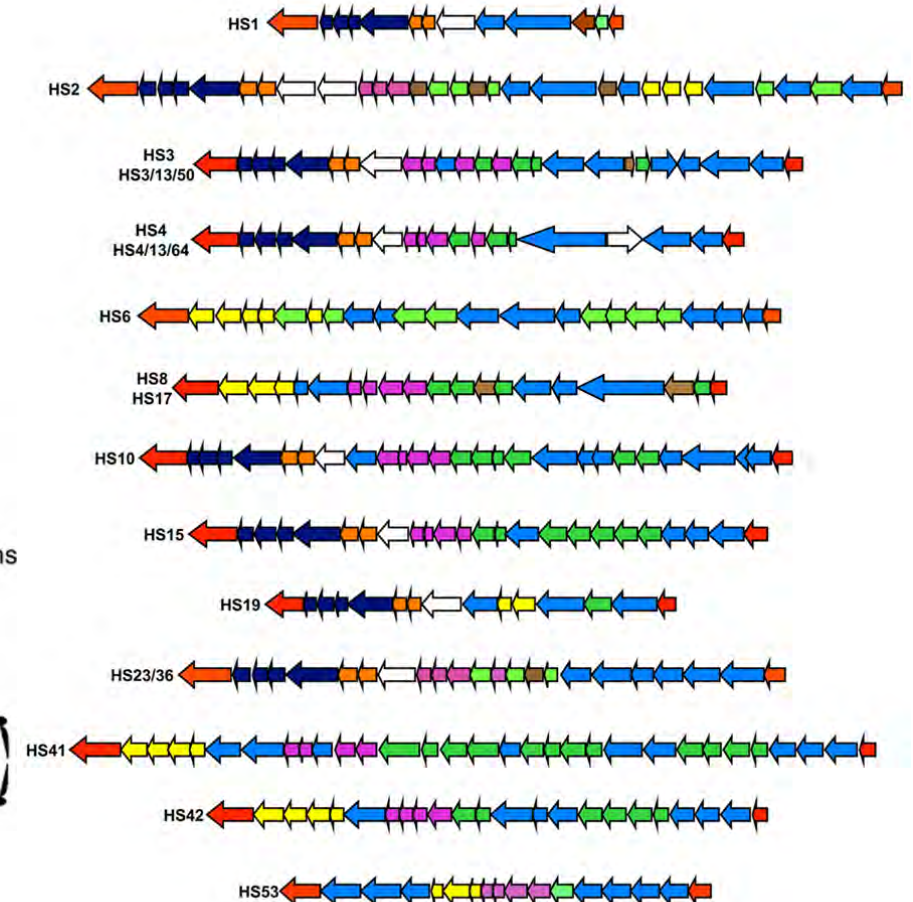
カンピロバクターの莢膜多糖（CPS）=Penner血清型の決定因子



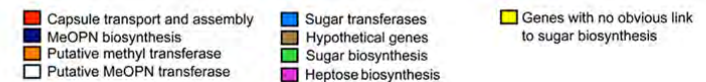
CPS合成遺伝子クラスターの多様性を基にした遺伝子型別法の導入



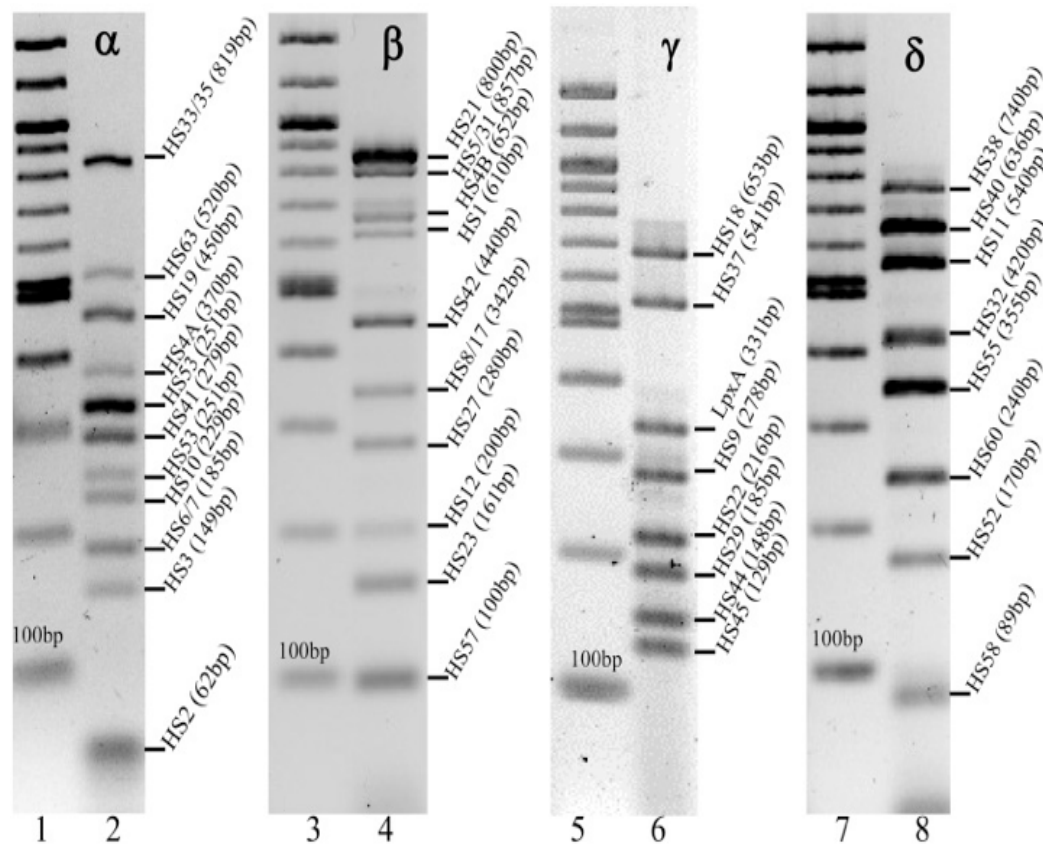
FEMS Microbiology Reviews, Volume 29, Issue 2, 01 April 2005, Pages 377–390



Front. Cell. Infect. Microbiol., 15 February 2012



マルチプレックスPCRによる遺伝子型別法：各血清群のCPS合成遺伝子クラスター内で特異的な遺伝子を検出



Poly *et al.*, *PLoS ONE* (2015)

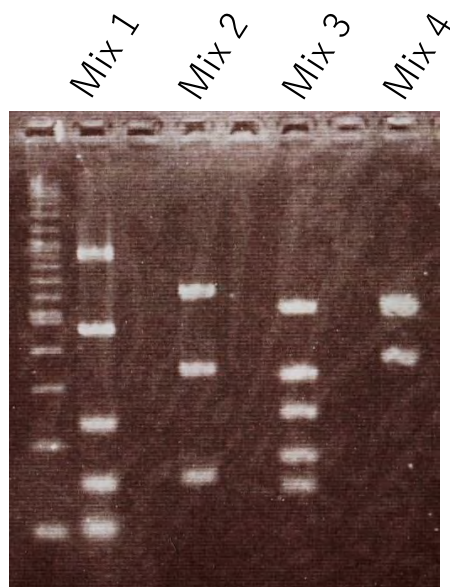
1. 長所

- ・ 44血清群を型別可能である。
- ・ 血清型別法に比べて簡便・安価である。
- ・ 型別率が高い (>90%)。

2. 短所

- ・ 判定しづらいバンドがいくつかある。
- ・ いくつか交差反応が見られる。
- ・ 検出対象の遺伝子が血清型を決定しているかどうかは不明なため、誤判定の可能性がある。

秋田式簡便法：市販血清型別試薬でカバーされる25血清群を型別可能



<i>Mix 1</i>	<i>Mix 2</i>	<i>Mix 3</i>	<i>Mix 4</i>
<u>E/U (HS5/31): 857 bp</u>	<u>A (HS1): 607 bp</u>	Z (HS38): 741 bp	P (HS21): 801 bp
N (HS18): 653 bp	<u>G (HS8/17): 342 bp</u>	<u>Y (HS37): 541 bp</u>	D (HS4B): 652 bp
<u>O (HS19): 450 bp</u>	S (HS27): 280 bp	V (HS32): 420 bp	<u>J (HS11): 540 bp</u>
Z6 (HS55): 341 bp	K (HS12): 201 bp	<u>L(HS15), U(HS31), HS58: 325 bp</u>	<u>D (HS4A): 370 bp</u>
<u>I (HS10): 229 bp</u>	<u>R (HS23/36): 161 bp</u>	<u>R (HS53): 251 bp</u>	Z2 (HS41): 279 bp
<u>C (HS3): 149 bp</u>	Z7 (HS57): 100 bp	<u>F (HS6/7): 185 bp</u>	Z5 (HS52): 170 bp
<u>B (HS2): 102 bp</u>		<u>A (HS44): 148 bp</u>	E (HS5), V (HS32), Z4 (HS45), HS60: 128 bp

下線部：含まれる陽性コントロール（15種類）

太字：検出対象の血清型（14種類）

Mix 3のL(HS15), U(HS31)およびHS58は血清学的に関連性がないにもかかわらず同一プライマーで検出されます。今年度はカウントしないで下さい。

③ Penner-PCR型別法の検討

➤ Penner血清型別との整合性を詳細に検討するため、

- 1) 既に血清型別された菌株を対象に、遺伝子型別を実施。
- 2) 陽性コントロール用の標準株を整備（本年度活動用に調整を終えたところ）。

地衛研	検定株数	一致株数	不一致株数	一致率（％）
A	30	30	0	100
B	35	32	3	91
C	27	24	3	89
D	12	12	0	100
E	30	30	0	100
F	8	8	0	100
全体	142	136	6	96

Penner-PCR型別法の検討～血清型別の一一致率（平成30年度）

血清群	検定菌株数	一致菌株数	不一致菌株数	一致率（％）
A群	7	6	1	86
B群	13	13	0	100
C群	14	14	0	100
D群	30	28	2	93
E群	1	1	0	100
F群	12	11	1	92
G群	5	5	0	100
I群	4	2	2	50
J群	2	2	0	100
K群	6	6	0	100
L群	4	4	0	100
N群	4	4	0	100
O群	22	22	0	100
P群	2	2	0	100
R群	6	6	0	100
U群	1	1	0	100
Y群	7	7	0	100
Z6群	2	2	0	100
全体	142	136	6	96

今後の計画（案）

1. Pennerの25血清群全てを対象にした試験を実施する。
2. 判定し難いバンドをピックアップし、プライマーを改良する。
3. その他の問題点も共有し、可能な限り改善する。
4. 秋田式手法をベースに、リファレンス用のプロトコールを作成する。

本年度の全体計画(案)

- 薬剤耐性試験：*C. jejuni*散発事例由来株等
- Penner血清型別試験：同上
- Penner-PCR試験：陽性対照を用いた検討
- 検査法の平準化に関する検討(アンケート含)

6. 結核

レファレンスセンター報告

結核

討議事項

- 2018年度に実施した結核菌VNTR型別法の外部精度評価結果に関する協議（結核研究所・村瀬）
- 結核菌分子疫学調査におけるゲノム解析の利用に関するアンケート調査報告（山形衛研・瀬戸）
- 本年度の活動内容

VNTR分析に関する外部精度評価の方法

- レファレンス委員を介して、EQA実施プロトコールの配布・参加募集
- 参加希望のあった衛生研究所を対象
- 結果既知の結核菌3株のDNAを送付
- 内部精度管理用結核菌DNAの配布
- 各施設でのVNTR分析結果を結核研究所にて標準結果と比較解析

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 (ロスマアイ)

	JATA No.															HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				3690 Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
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)

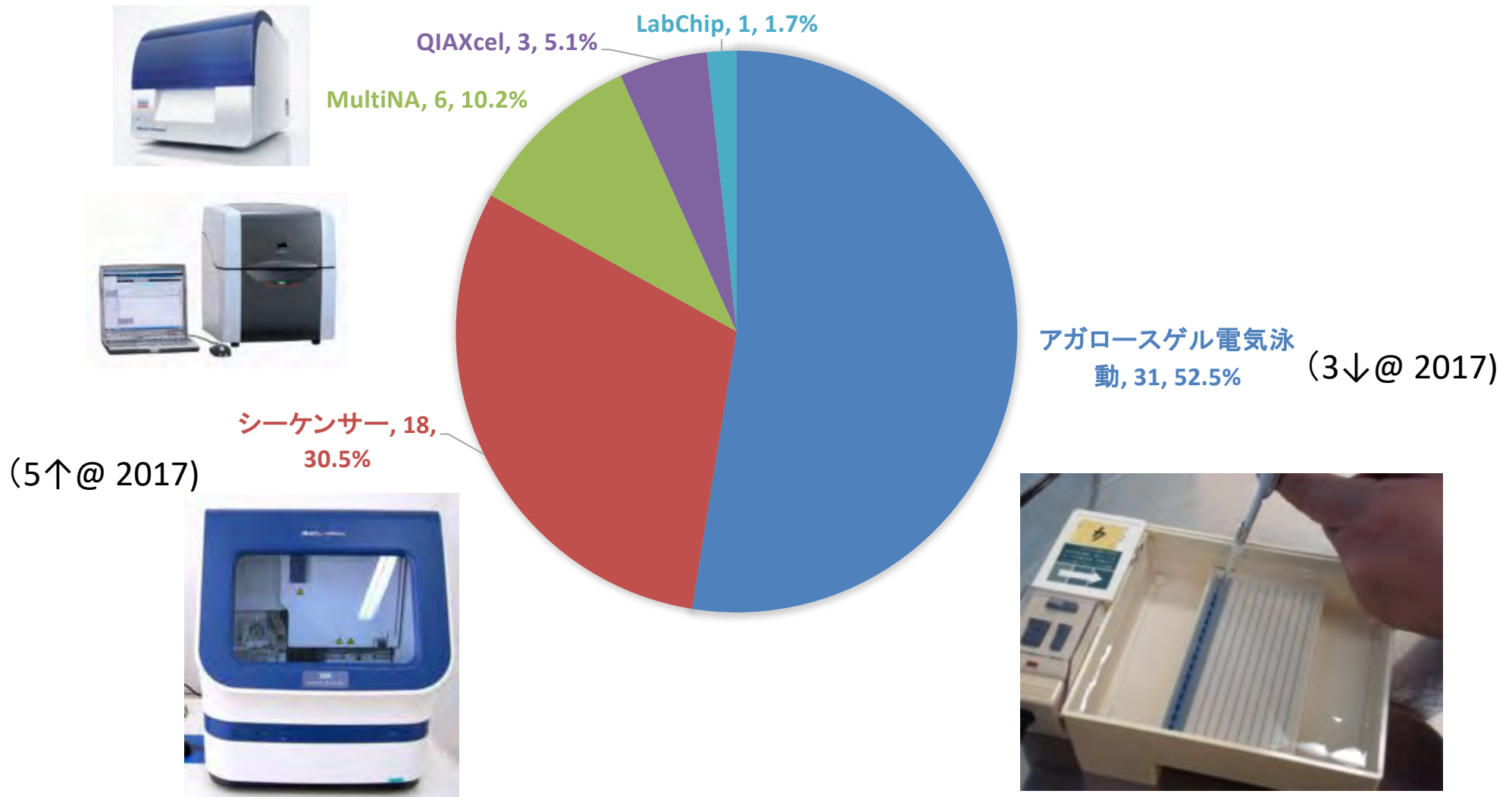
国際比較
(オプション)

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

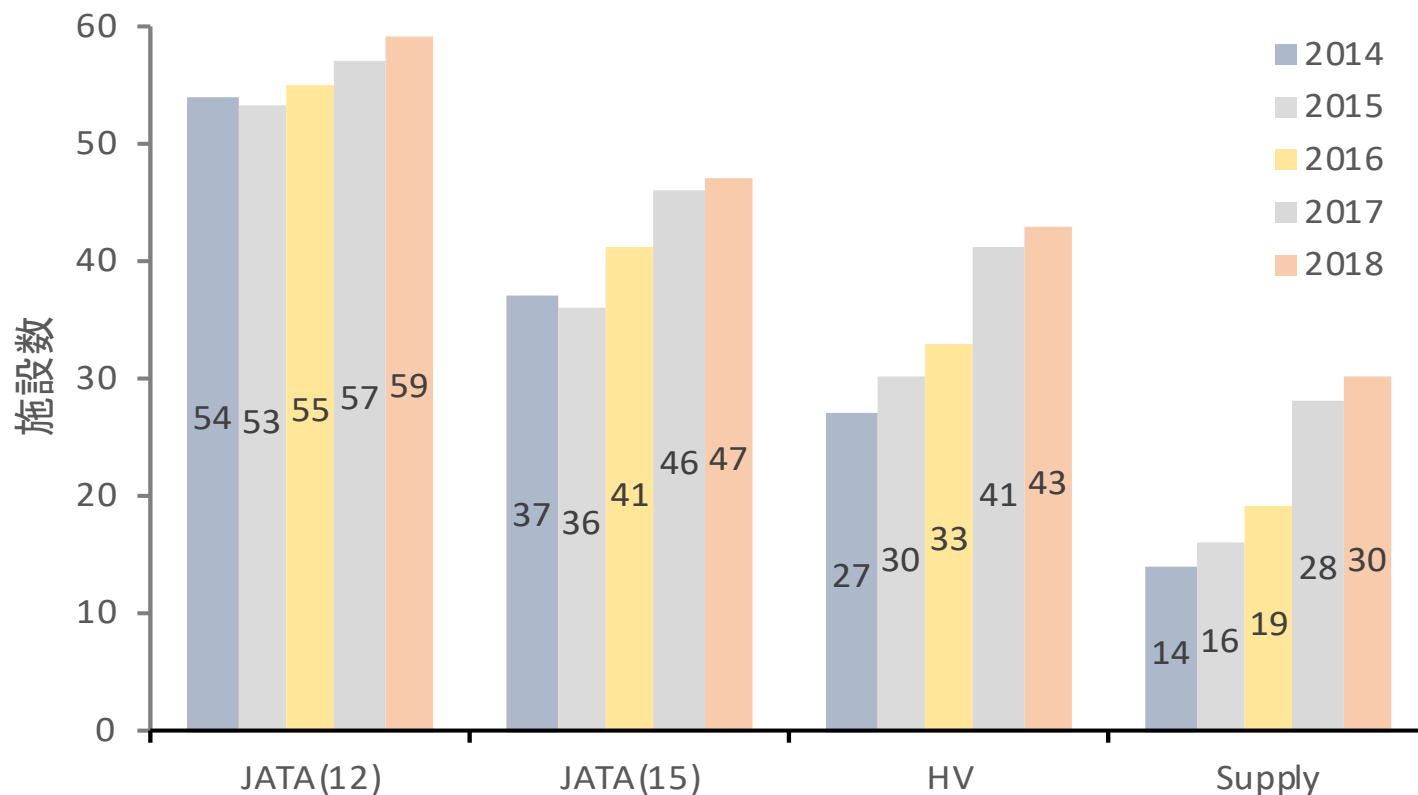
2018年度VNTR分析外部精度評価

- 59施設の参加（2017年度 [n=57]）
- 内部精度管理用検体、外部精度評価用検体の発送
（2018.11.19）
- 59施設より分析結果を報告
（～2019.1.12）

各施設で用いられているDNA分子量の測定法 (2018年度, 59施設)



参加施設で採用されているVNTR分析システム



JATA-12は基本的に全施設実施。識別能を上げるためにJATA-15、HV、Supplyを追加分析する施設数が年々増加

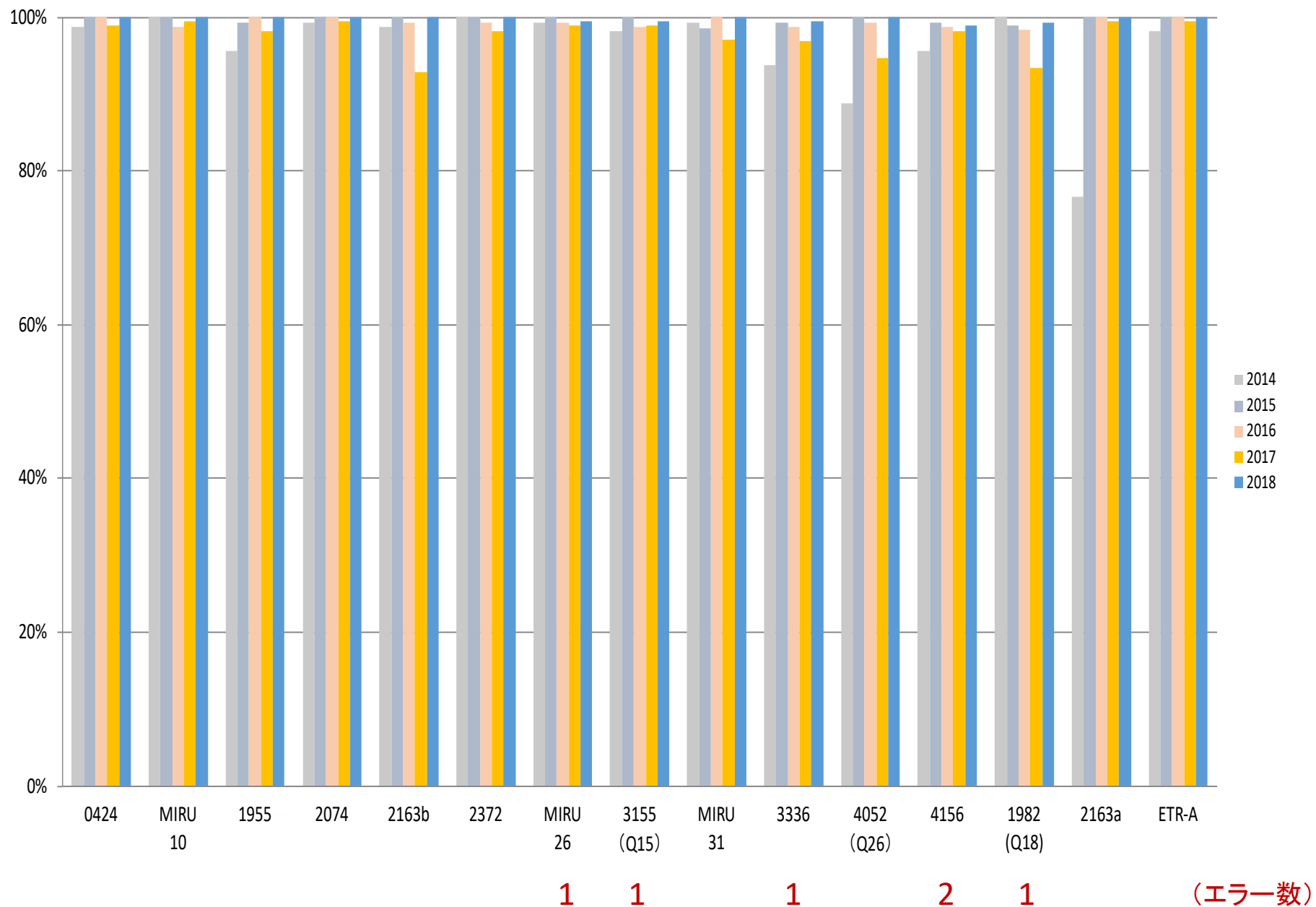
2018年度 外部精度評価の結果

結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答施設数

	2014 (54施設)	2015 (53施設)	2016 (55施設)	2017 (57施設)	2018 (59施設)
完全一致 (n, [%])	36 (67%)	49 (92%)	48 (87%)	40 (70%)	55 (93%)
1 locus違い (n, [%])	7 (13%)	1 (2%)	5 (9%)	12 (21%)	3 (5%)
2 loci以上の違い (n, [%])	11 (20%)	3 (6%)	2 (4%)	5 (9%)	1 (2%)

- 完全一致施設の割合 これまでで最も高い
 - 2 loci以上の違いがあった施設の割合 これまでで最も少ない
- } これまでで最も正答率が高い

各locusにおける正答率(%)



各分析法におけるローカセットの正答率

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

	JATA-12		JATA-15		HV		Supply	
	n	正当%	n	正当%	n	正当%	n	正当%
Agarose	31	99.7	24	100	21	96.3	10	100
Sequencer	18	99.8	18	100	18	100	18	99.7
Multina	6	100	4	100	3	92.6	1	100
QIAxcel	3	99.1	1	88.9	1	77.8	-	-
Labchip	1	100	-	-	-	-	1	100
	59		47		43		30	

外部精度評価まとめ

- 2018年度は59施設に対して外部精度評価を実施(5回目)
- 2018年度の結果では、3株のEQA用検体をJATA 12で分析した場合の正答施設が55施設(93%)
- 自動化と分析精度に優れるシーケンサーの採用施設が増加傾向(13→18施設)
 - 研修、マニュアル、Bin setの配布等で支援する必要
- 今後も外部精度評価や研修を通じて、分析精度の維持と向上を図る必要がある。
- プライマー設定の共通化を図る。

VNTR研修の実施

- 2019年5月30-31日に本年度1回目の研修を実施
- 研修精度を考慮し、一回当たり5名程度まで
- 一般的な結核菌の取扱からフラグメント解析によるVNTRの実習まで実施
- 来年度も実施するため、9月中にアナウンスする。

結核菌ゲノム解析に関するアンケート調査結果概要

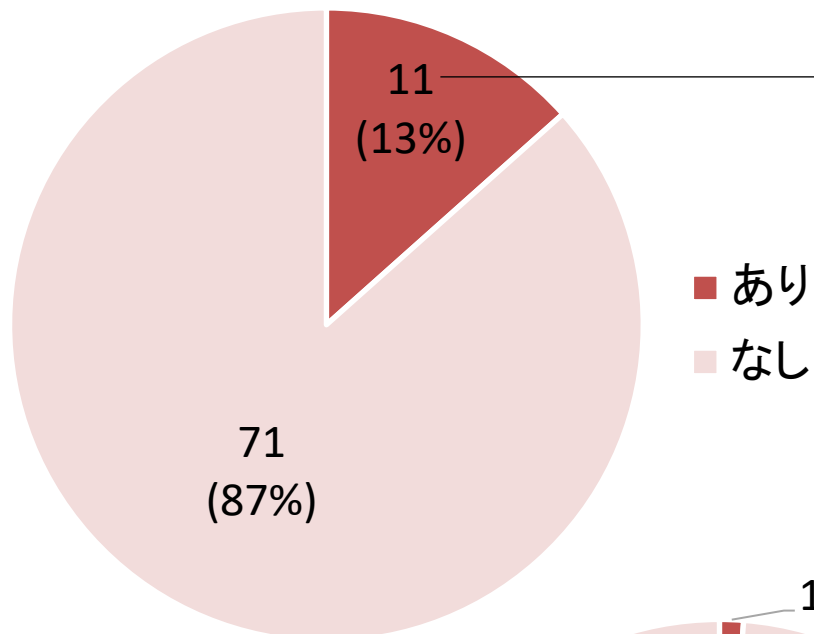
目的

- 第94回日本結核病学会総会シンポジウムにおける 地衛研の現状紹介（2019.6.8 済）
- AMED結核研究所研究班において、現場に即した結核菌ゲノム解析のあり方を考えるための基礎データとすること

調査の概要

アンケート実施期間	平成31年2月15日～3月6日
回答施設数	82施設
回答率	100%
回答条件	機器設置・解析実施状況は、平成30年12月31日現在の状況を回答

2(1)NGS据え置き機の設置



2(2)設置機種

MiSeq 1台: 10施設

iSeq 2台: 1施設

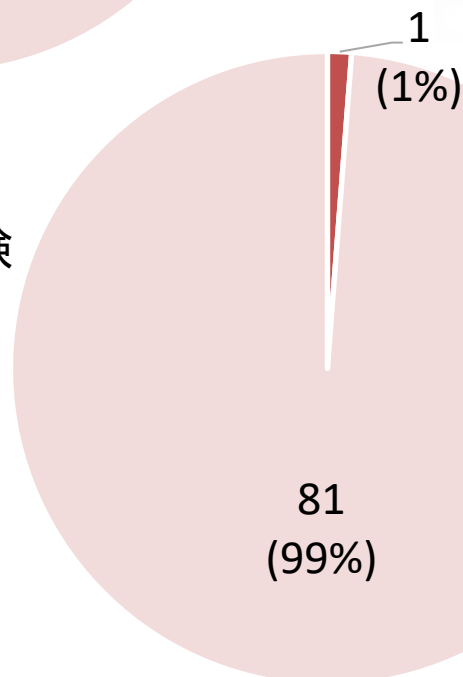


MiSeq, 1700万
Mtb 40株/run



iSeq 100, 400万
Mtb 4株/run

2(3)モバイル型NGS使い捨て機を用いた病原体ゲノム解析の経験



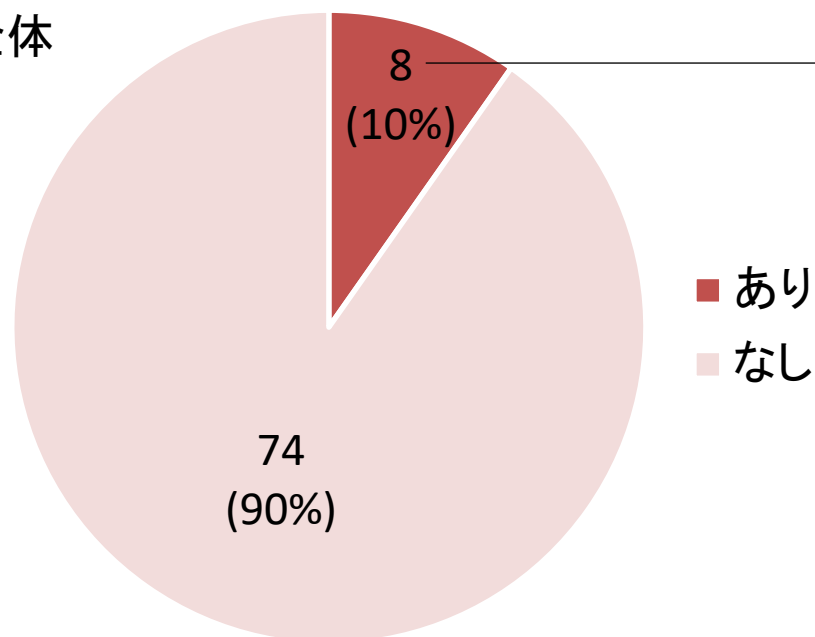
あり
なし



MinION

3(3) 結核菌ゲノム解析の実施、もしくは結核菌ゲノムデータの取得の経験

全体



4 データ取得詳細(複数回答)

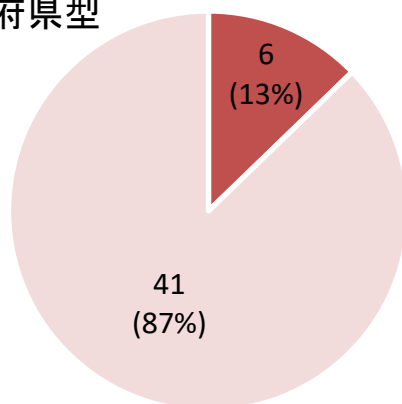
自施設NGS: 3施設

モバイル型NGS: 0施設

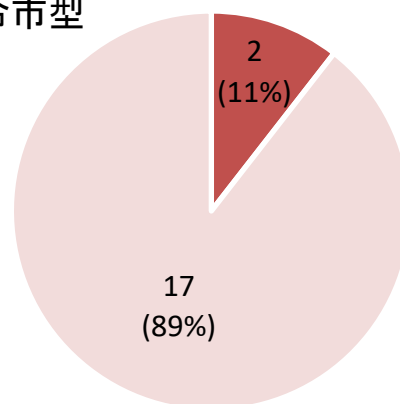
民間機関外注: 2施設

共同研究: 6施設

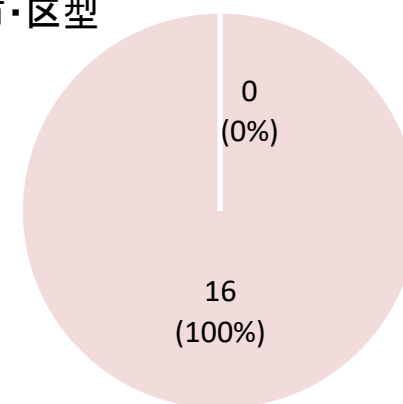
都道府県型



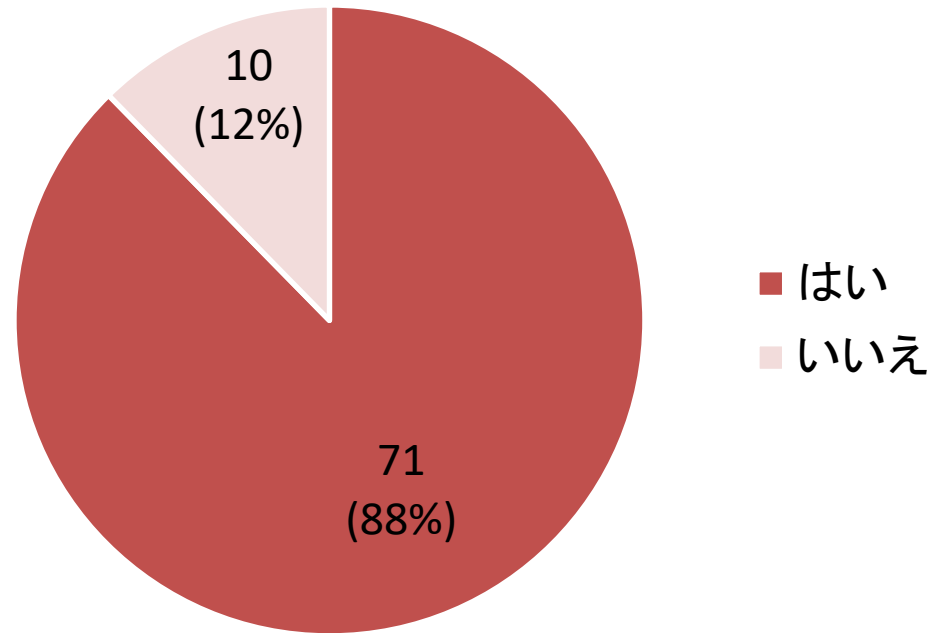
政令市型



中核市・区型

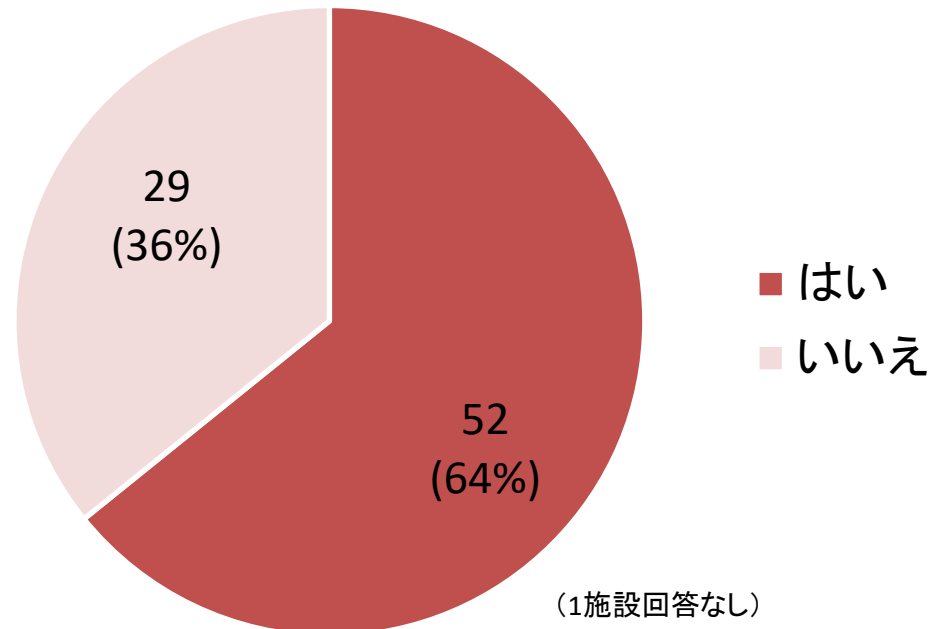


5(1)地衛研の業務遂行のために、
NGSを用いた**病原体**ゲノム解析情報
は有用か？



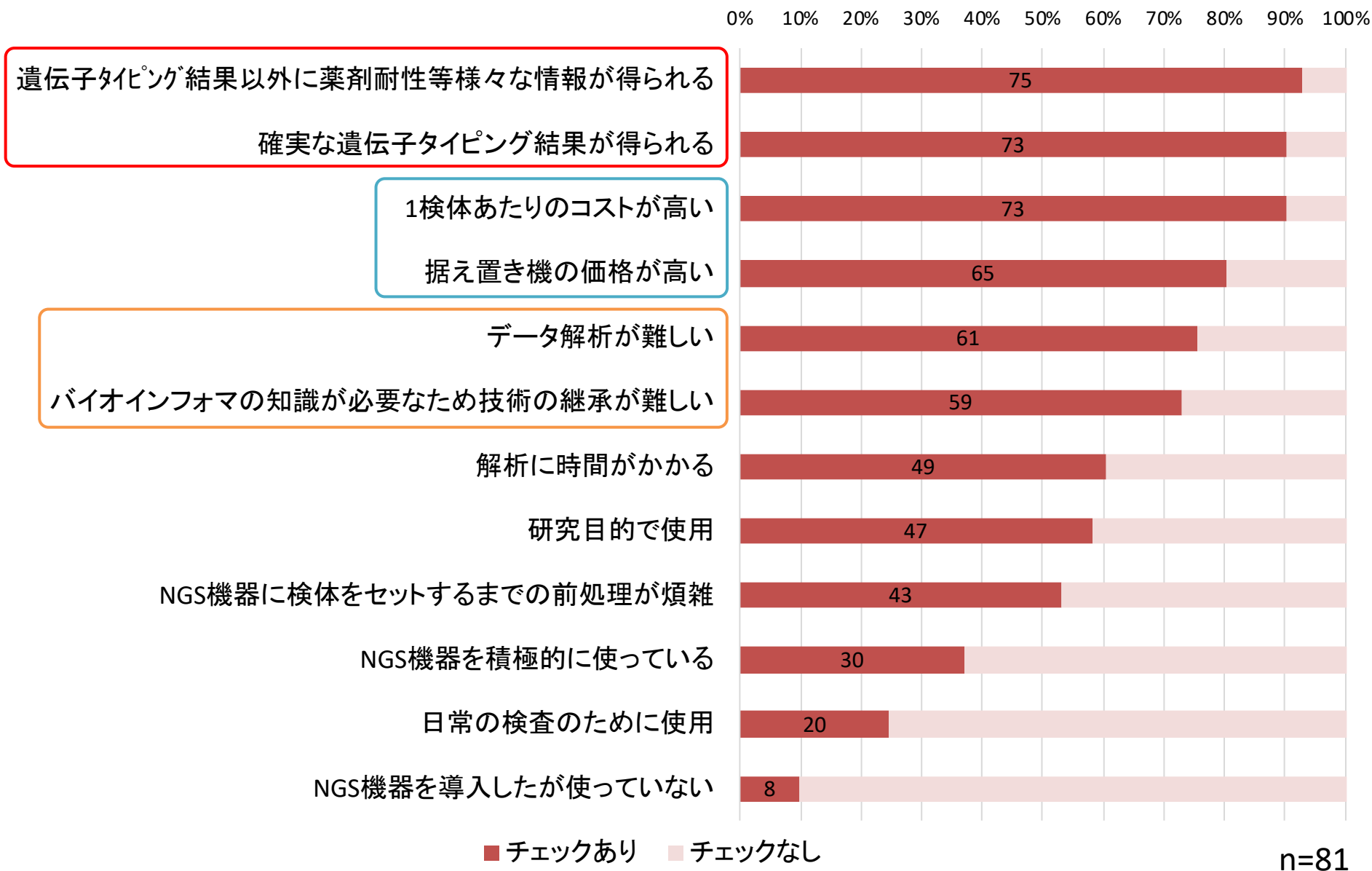
(1施設回答なし)

5(2)地衛研の業務遂行の
ために、NGSを用いた**病原体**
ゲノム解析情報は必要か？

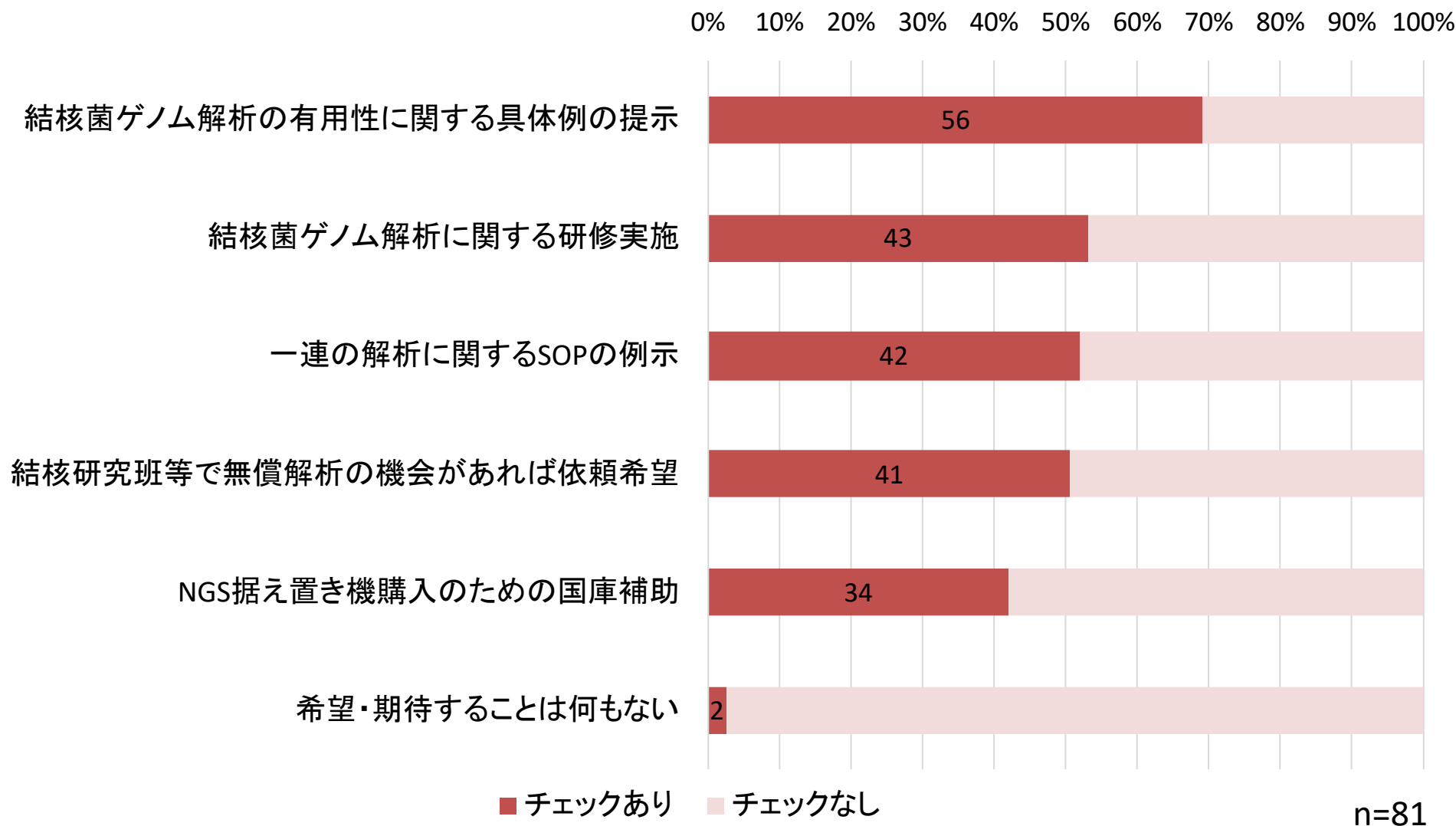


(1施設回答なし)

5(3) 病原体ゲノム解析に対する実感(NGS未実施の施設はイメージを回答)



6 結核菌ゲノム解析普及のために希望・期待すること



2019年度の予定

1. 本年度の精度保証実施について
 1. 継続してVNTR外部精度評価を実施する。
2. 外部精度評価実施後のフィードバック(follow-up)
 1. 問題点の洗い出しと改善効果の評価のための調査を今年度から実施する。
 2. 今年度及び来年度結核菌の取扱とVNTRに関する研修を二回ずつ実施する(5月及び10月)。
3. 必要に応じてフラグメント解析の標準手順書をアップデートする。
4. ゲノム解析パイプライン解説書の試作

結核レファレンス委員会

委員

- 北海道東北新潟：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・大屋日登美
- 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・河合央博
- 九州：大分県衛生環境研究センター・神田由子

世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡，村瀬良朗

7. アルボウイルス

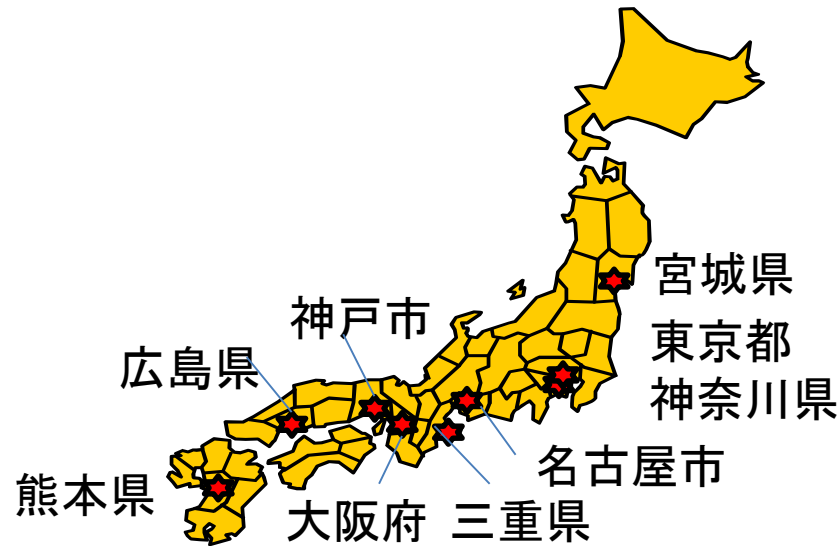
衛生微生物技術協議会第40回研究会 アルボウイルスレファレンスセンター会議 報告

2019年7月11日(木)

国立感染症研究所 ウイルス第1部

イム チャンガン
林 昌 宏

アルボウイルス感染症レファレンスセンター



レファレンスセンター

担当部・課

宮城県保健環境センター

微生物部

東京都健康安全研究センター

微生物部

神奈川県衛生研究所

名古屋市衛生研究所

微生物部

三重県保健環境研究所

微生物研究課

大阪健康安全基盤研究所

微生物部

神戸市環境保健研究所

感染症部

広島県保健環境センター

保健研究部

熊本県保健環境科学研究所

微生物科学部

国立感染症研究所

ウイルス第1部第2室

当室におけるリアルタイムRT-PCR法によるアルボウイルス遺伝子検出法

患者検体（血液、血清、血漿、尿、唾液等）



RNA抽出
(Roche社 High Pure Viral RNA kit)



ワンステップ
リアルタイム
RT-PCR

48℃ (RT reaction)	5 min	1 cycle
95℃	20 sec	1 cycle
95℃	3 sec	40 cycles
57℃	30 sec	

Thermo Fisher社
・StepOnePlus
・Quantistudio5
を使用

必要に応じて通常のRT-PCR法によりウイルス遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し、遺伝子解析を行っている

当室で使用しているジカウイルス用リアルタイムPCRプライマー プローブセット

	Name	Sequence
Primer	ZIKV 1086f:	CCG CTG CCC AAC ACA AG
	ZIKV 1162c:	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT
Probe	ZIKV 1107p	FAM-AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A-TAMRA

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

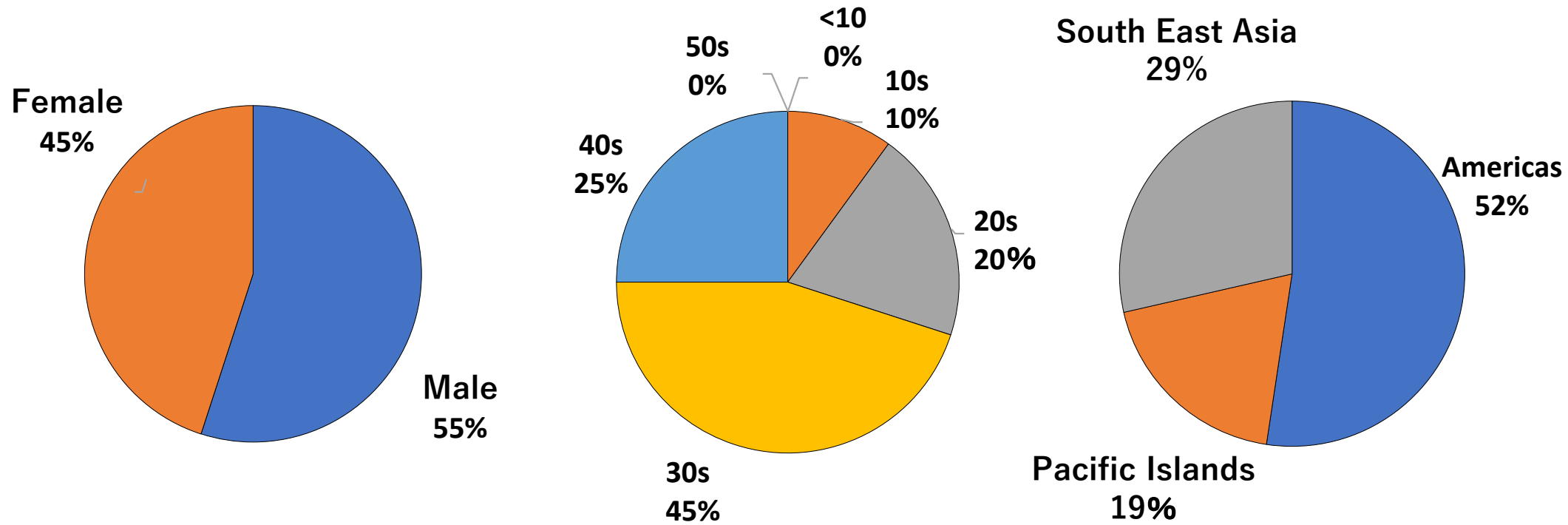
ブラジルにおける小頭症の増加(2015-2016)

✓ 小頭症と以下の症状が関連する:

- 発作
- 発達障害
- 発育障害
- 動作障害、平衡感覚の欠如
- 嚥下障害
- 聴覚障害
- 視覚障害



Imported Zika cases in Japan until 2017



タイにおけるジカウイルス感染症(2016年～2018年)

年	感染者数		小計
	顕性感染者数	不顕性感染者数	
2016	606	4	610
2017	564	13	577
2018	882	239	1,121
合計	2,052	256	2,308

蚊媒介感染症の診療ガイドライン(第5版)

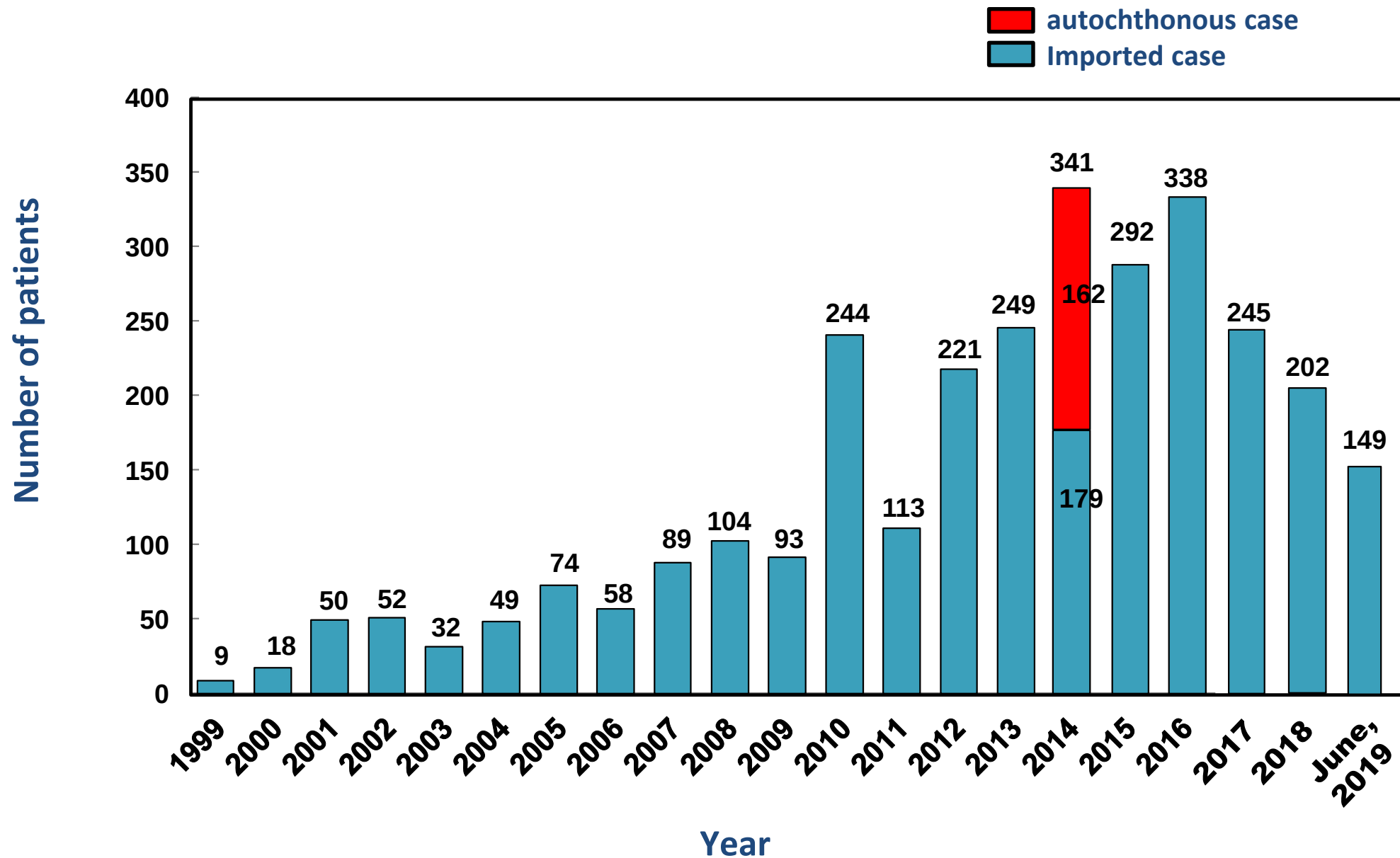
平成31年2月7日
国立感染症研究所

蚊媒介感染症の診療ガイドライン(第5版) 改訂のポイント

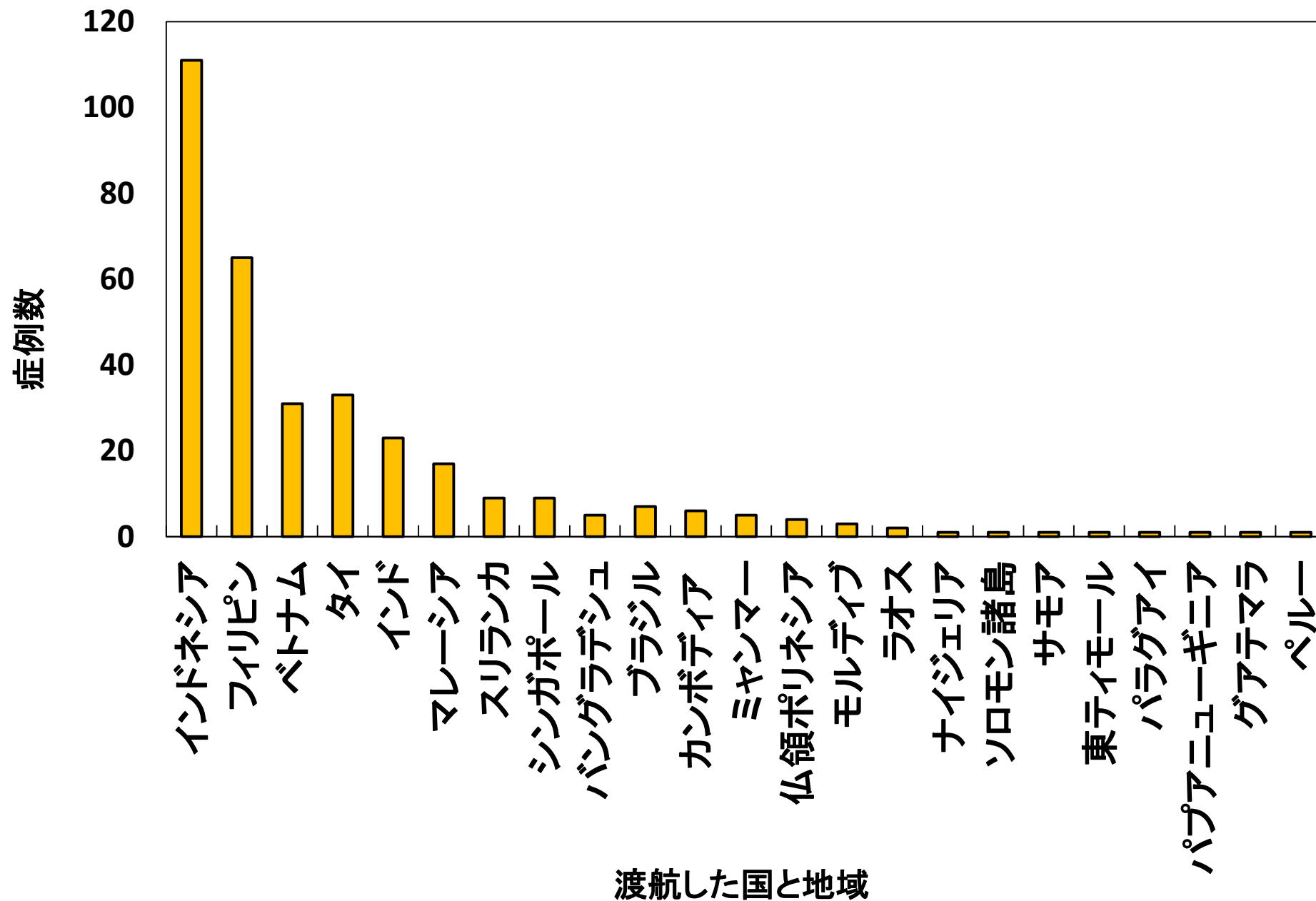
本ガイドラインは、蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針(平成27年厚生労働省告示第二百六十号)に基づき、医師がデング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症などの蚊媒介感染症を診断し、確定した症例について直ちに届出を行うことができるよう、疫学、病態、診断から届出、治療、予防に至る一連の手順などを示したものである。

本ガイドライン第5版の改訂のポイントは、近年国内外で進められているジカウイルスの新たな診断法開発の成果をもとに記載を更新し、国内発生時の対応を含め、診療対応の考え方、手順の整理を行った点である。特に国内ではジカウイルスの遺伝子検出法としてLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を応用した蛍光RT-LAMP法による検査試薬が開発され、平成30年6月18日に製造販売承認された。本試薬を用いることにより全血、血清、尿からジカウイルス遺伝子を迅速かつ特異的に検出することが可能である。ヒトが蚊の吸血によりジカウイルスに感染すると発症前から発症時にかけて高いウイルス血症を呈することが報告されており、発症時の間便で迅速なウイルス遺伝子検査の導入は防疫体制の強化に寄与することが期待される。

国内の1999-2019年6月におけるデング熱症例の推移



2016年における渡航先別デング熱輸入症例数

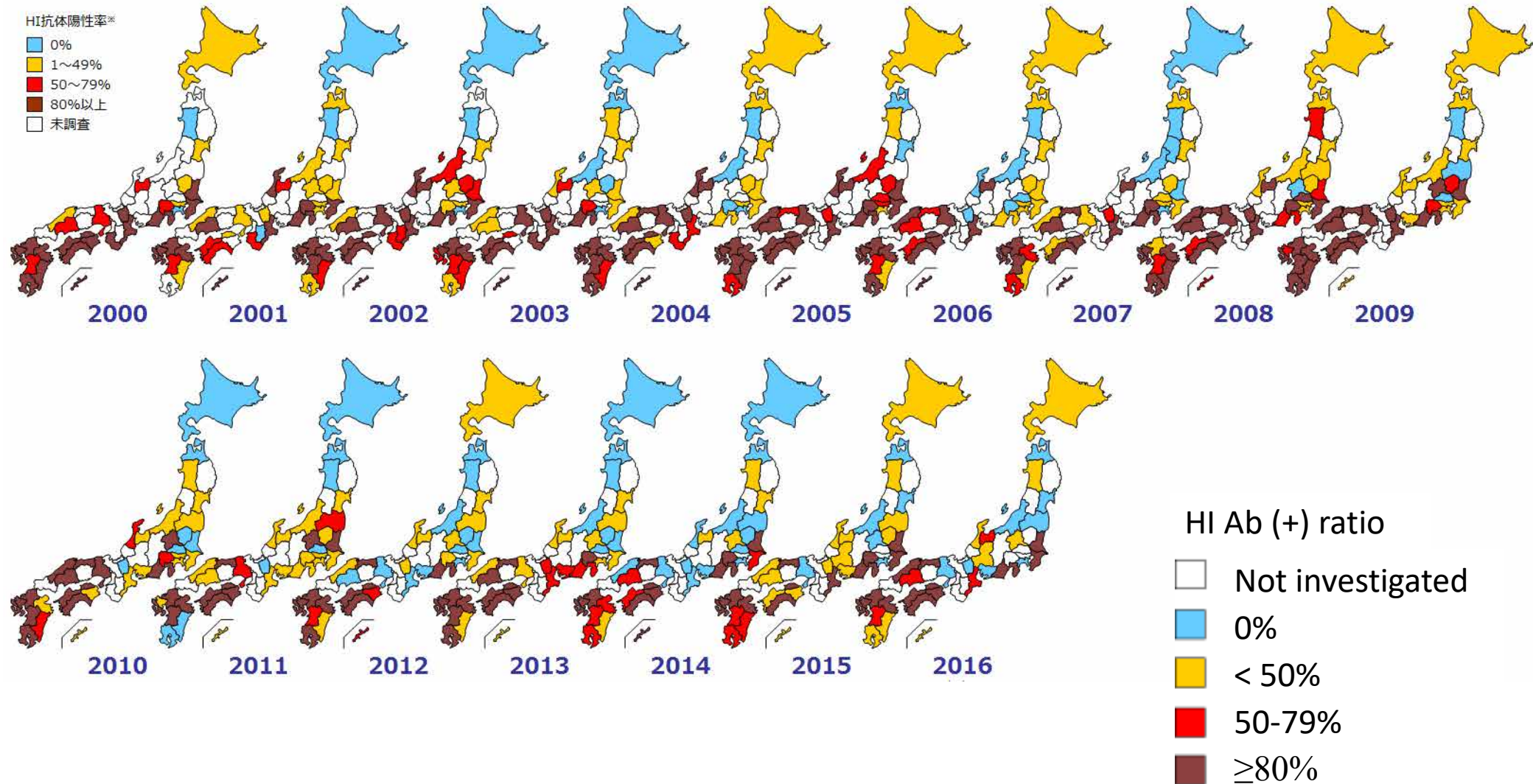


国内における日本脳炎患者数の推移(1991年～2018年)

year	total	under 14	under 7
1991	14	1	0
1992	4	0	0
1993	8	0	0
1994	4	0	0
1995	2	1	1
1996	4	0	0
1997	4	0	0
1998	2	0	0
1999	5	0	0
2000	7	0	0
2001	5	1	0
2002	8	0	0
2003	2	1	0
2004	4	0	0

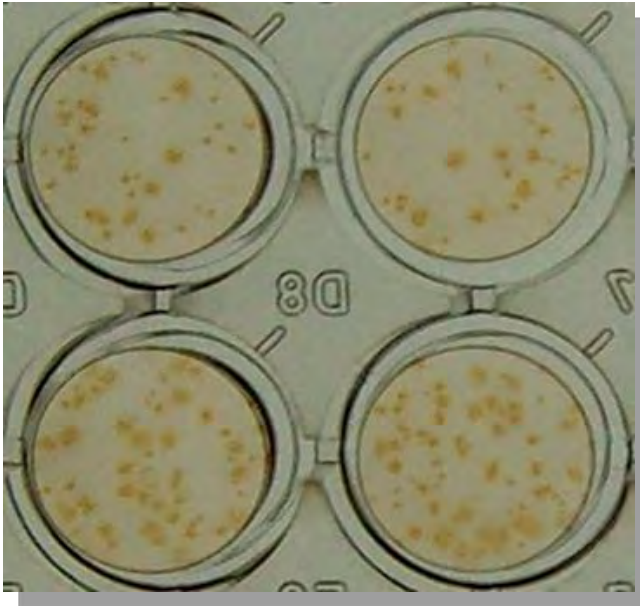
year	total	under 14	under 7
2005	7	0	0
2006	8	1	1
2007	9	0	0
2008	3	0	0
2009	3	2	2
2010	4	1	1
2011	9	2	1
2012	2	0	0
2013	9	0	0
2014	2	1	1
2015	2	1	1
2016	11	0	0
2017	3	0	0
2018	0	0	0

2000-2016年におけるブタの日本脳炎ウイルス感染状況の年別推移

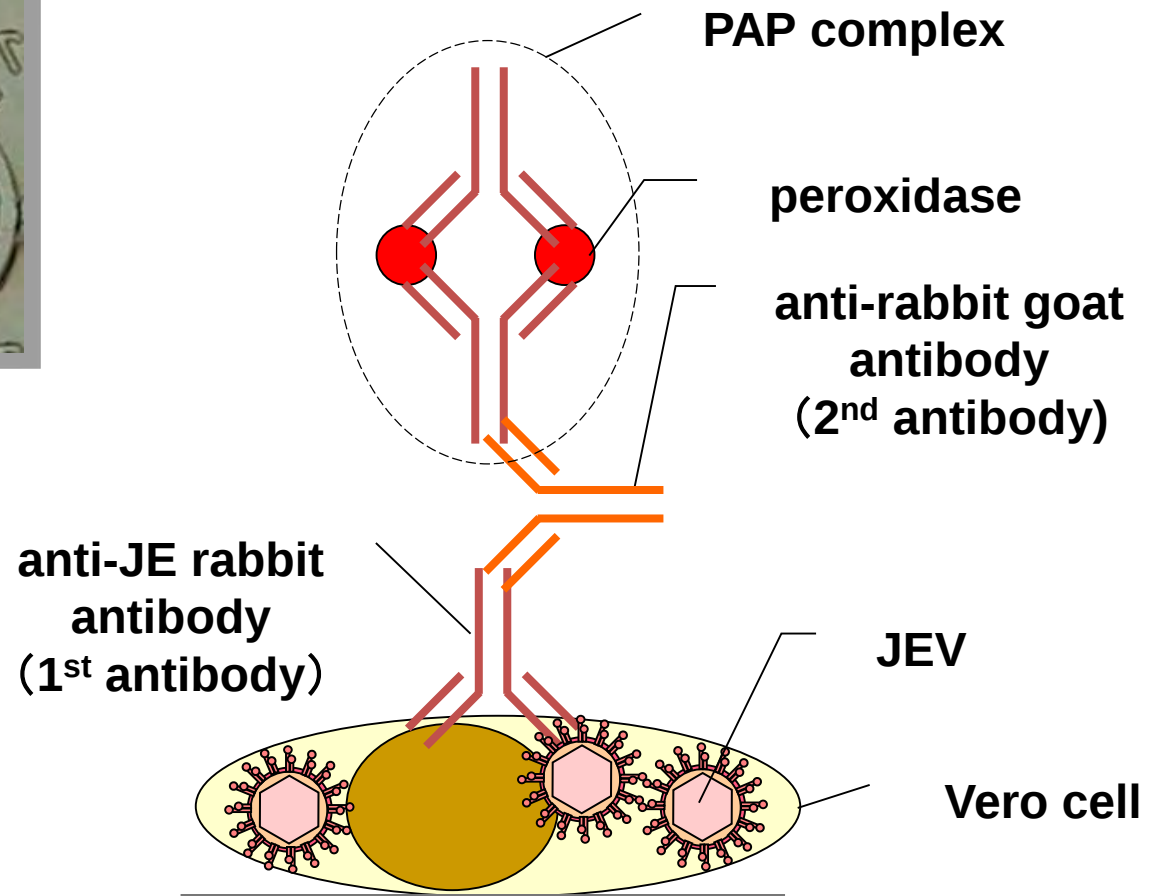


各年調査期間(5-10月)におけるHI抗体価1:10以上の抗体陽性率の最高値

FRNT: PAP (peroxidase anti-peroxidase) method



Focus formation by JEV



Number of JE reported by WHO JE monitoring system

Country and Region	Surveillance program	Number of reported cases						(year)
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Australia	National	1	4	1	3	0	1	
Cambodia	sentinel (6)	55	41	60	48	10	5	
China	sentinel (27)	1763	2178	858	624	1130	1147	
Japan	National	2	9	2	2	11	3	
Lao	sentinel (3)	23	9	4	13	19	9	
Malaysia	National	22	12	47	36	59	20	
Papua New Guinea	sentinel (1)	0	0	1	4	0	1	
The Philippines	sentinel (9)	24	25	69	115	312	361	
Korea R.	National	20	14	26	40	28	9	
Singapore	National	0	0	0	0	0	0	
Viet Num	sentinel (9)	183	224	421	368	357	200	

WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system

国内におけるダニ脳炎症例

年代	性別	発症日	TBE中和抗体価	症状	推定感染地域
30's	女性	1993年10月	6病日：640倍, 43病日：2560倍	発熱、吐気、頭痛、髄膜刺激症 状、痙攣発作、意識障害	道南圏域
40's	男性	2016年7月中旬	3病日：<25倍, 10病日：3200倍	発熱、筋肉痛、関節痛、麻痺、 意識障害、痙攣、髄膜炎、 脳炎、 死亡	道内
70's	男性	2017年6月中旬	急性期血清（6/20）： 50倍, ペア血清（7/3）： 800倍	発熱、頭痛、意識障害、 脳炎、 死亡	道南圏域
70's	男性	2017年7月中旬	急性期血清（7/18）： 800倍, ペア血清（7/31）： 12800倍	発熱、頭痛、意識障害、脳炎	道央圏域
40's	女性	2018年5月下旬	-	発熱、意識障害、髄膜炎、脳炎	道北圏域

まとめ

- 神奈川県衛生研究所の加入によりアルボウイルスレファレンスセンターのいっそうの強化が期待される
- 今後も適宜、遺伝子検査用陽性対照の配布および中和検査用ウイルスの分与を実施する
- アルボウイルス実験診断法の講習会開催について検討する
- マスギャザリングに備え、ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルスの流行状況に留意する
- 日本脳炎、ダニ媒介脳炎の流行状況に留意する

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)
大阪健康安全基盤研究所	(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)

国立感染症研究所 ウイルス第二部

今年度の議題

1. 各ブロックからのエンテロウイルス検出情報
2. 感染性ポリオウイルスを含む可能性のある材料を取扱う施設を対象としたWHOガイダンス(PIMガイダンス)とPIM保有施設調査
3. AFP検査に関するアンケート結果報告
4. 急性弛緩性麻痺(AFP)病原体検査マニュアル作成の進捗状況
5. 質疑応答

抗血清、細胞の配布（H30年度実績）

抗血清分与	延べ6衛研(25種類)
細胞分与	延べ10衛研(RD-A:10衛研、L20B:10衛研)

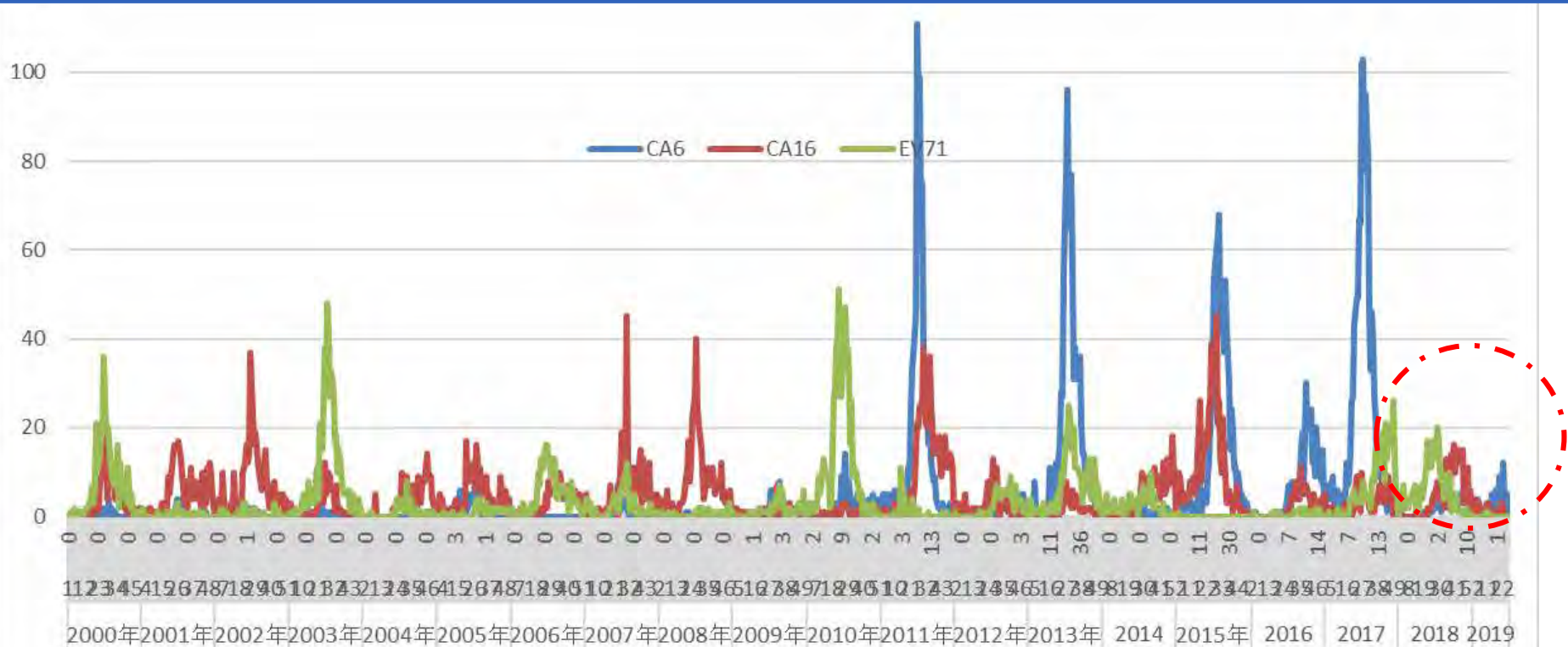
エンテロウイルス抗血清EP95*は各ブロックへ依頼ください。
その他の単味抗血清はウイルス二部へ照会ください。

RD-A細胞、L20B細胞は分与可能です。

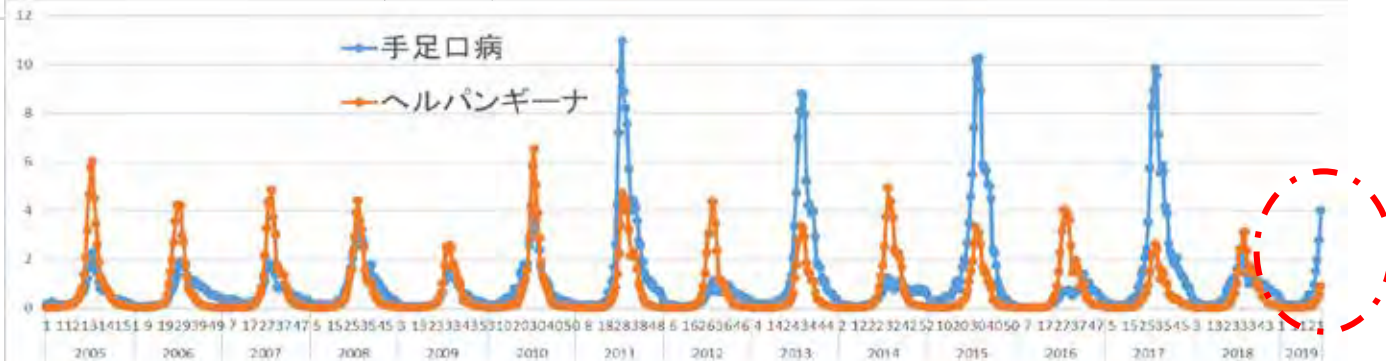
*EP95とは、1995年にエンテロウイルスレファレンス支部と共同で作成したプール抗血清。国内で流行した代表的な血清型を含む。

「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

手足口病患者から検出されたCA6,CA16,EV71の動向



出典 NESIDデータを加工: 2019.06.28アクセス



出典 IDWRデータを加工 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data.html> 2019.06.28アクセス

まとめ

2019年のエンテロウイルス検出について(2019年7月1日現在)

- 2019年シーズンのエンテロウイルスは手足口病患者からの検出が中心。
- 検出されたウイルスはCA6が多く、次いでCA16 (昨年シーズンはEV71とCA16がメイン)。
- CA6による手足口病は、ほぼ2年周期の流行を示すこと、またCA16の検出報告もあることから今後の動向に注視。

急性弛緩性麻痺 (AFP) 検査マニュアルについて

- 2018年度実施したAFP検査体制に対するアンケート結果について情報提供(愛媛県立衛生環境研究所長四宮(豊嶋)先生より)
- AFP検査マニュアルは感染研と地方衛生研究所の執筆担当者とともに、基本的な検査の方向性について検討中
- 地衛研で対応可能なウイルス分離用細胞、PCR検査の位置づけ、について今後とも検討が必要
- マニュアル案はエンテロウイルスレファレンスセンター6支部でも検討し、支部内の地衛研の意見を反映していく予定。

9. ノロウイルス

衛生微生物技術協議会
第40回研究会
ノロウイルスレファレンスセンター報告

染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

someya@niid.go.jp

2019年7月11日



世話人交代のお知らせ（再掲）

2018年4月付で、ノロウイルスレファレンスセンターが
国立感染症研究所 感染症疫学センター 第六室 より
同 ウイルス第二部 第一室 に移りました。

これに伴い、本会議の世話人を
前任の 木村 博一 先生（現 群馬パース大学）に代わって
染谷 雄一 が担当しています。

標準プラスミドの請求先

- ノロウイルス

- ➡ 感染症疫学センター 第六室 岡本貴世子 k-okmt@niid.go.jp

- ロタウイルス、サポウイルス

- ➡ ウイルス第二部 第一室 染谷雄一 someya@niid.go.jp

にお願いします。

病原体検出マニュアルの作成

- ノロウイルス検出マニュアル 第1版 公開（2019年6月）
- ロタウイルス検出マニュアル 第2版 公開（2019年6月更新）
- サポウイルス検出マニュアル 作成中（2020年度公開を目指す）

「病原体検出マニュアル」 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>)

ノロウイルス検出マニュアル 第1版

目次

1. 概説
2. 検査の準備
3. 検査の進め方
4. 10%ふん便懸濁液の作成
5. RNA 抽出 (QIAamp Viral RNA Mini キットを用いる時)
6. cDNA 合成
7. Capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法
8. RdRp 領域の一部と capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法 (dual typing 法)
9. 塩基配列の解析
10. 遺伝子型の判定
11. NoV の命名法
12. Real-time PCR 法
13. 参考 (マルチプレックス PCR 法)
14. 参考文献



3種のPCR法について説明

ノロウイルス検出マニュアル（第1版）の発行

- 令和元年（2019年）6月

執筆者一覧

群馬パース大学

北里大学

北海道大学

群馬県衛生環境研究所

川崎市衛生研究所

大阪健康安全基盤研究所

愛媛県立衛生環境研究所

山口県環境保健センター

福岡県保健環境研究所

国立感染症研究所

木村博一

片山和彦

大森亮介

高橋裕、塚越博之、猿木信裕

松島勇紀、清水英明、岡部信彦

左近直美、本村和嗣

豊嶋千俊、四宮博人

岡本玲子、村田祥子、戸田昌一、調恒明

吉富秀亮、中村麻子、小林孝行

染谷雄一、村上耕介、岡本貴世子

【謝辞】 本マニュアルは、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（18fk0108033）の補助金を受けて作成された。

PCRによる増幅領域

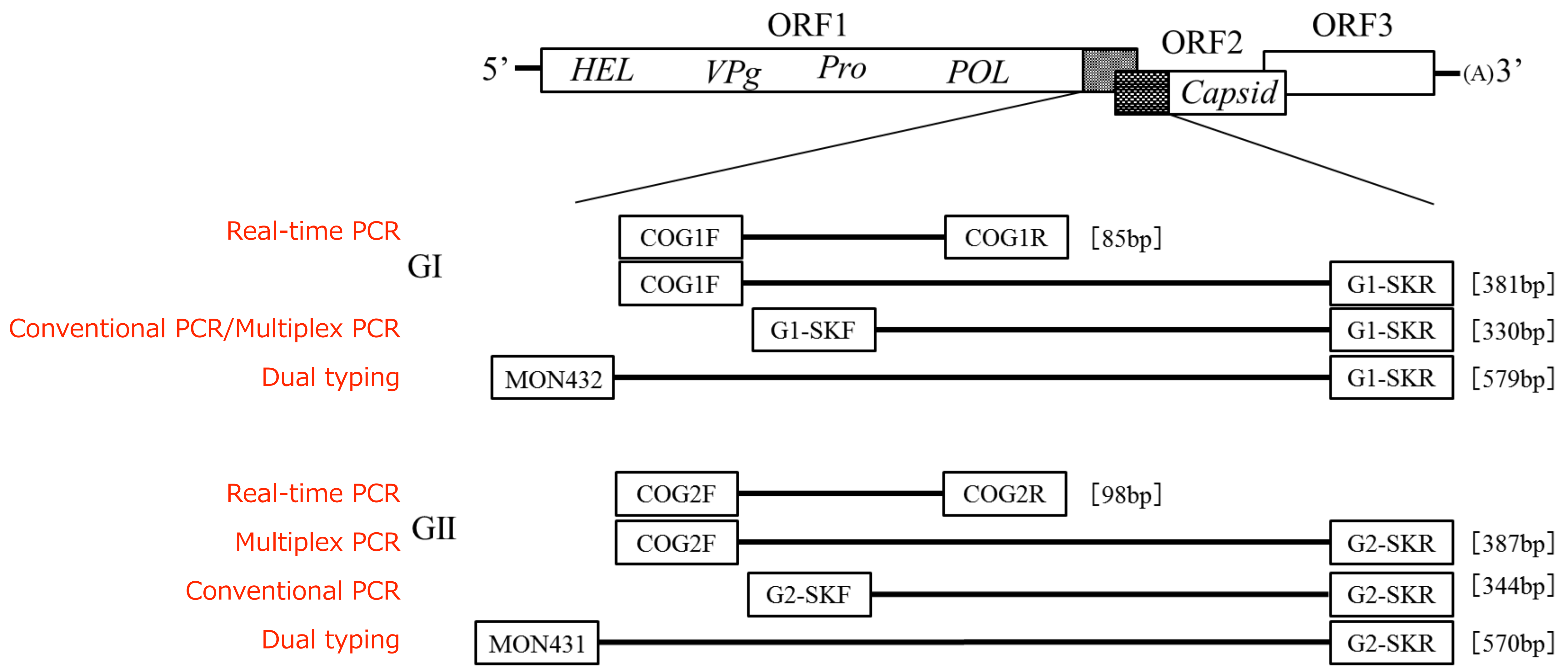


図 2. NoV 検査に使用するプライマーとプローブの位置

PCRに用いるプライマーの塩基配列

表 6. NoV 検査に使用するプライマーとプローブ

Primer	Sequence (5'→3')	Polarity	Position
G1-SKF	CTGCCCCGAATTYGTAAATGA	+	5342-5361
G1-SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	-	5653-5671
G2-SKF	CNTGGGAGGGGCGATCGCAA	+	5046-5067
G2-SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-	5367-5389
G2AL-SKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT	-	5367-5389
MON432	TGGACICGYGGICCYAAYCA	+	5093-5112
MON431	TGGACIAGRGGICCYAAYCA	+	4820-4839
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	+	5291-5310
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	-	5354-5375
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	5003-5028
ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	+	5003-5028
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	5080-5100

Probe	Sequence (5'→3')*	Polarity	
RING1-TP(a)	AGATYGCGATCYCCTGTCCA	+	5321-5340
RING1-TP(b)	AGATCGCGGTCTCCTGTCCA	+	5321-5340
RING2AL-TP	TGGGAGGGSGATCGCRATCT	+	5048-5067

*5'-FAM あるいは VIC, 3'-TAMRA あるいは MGB、BHQ

Real-time PCR法の判定について

<判定基準>

判定においては、Ct値、増幅曲線、検量線の直線性、反応効率などを総合的に判断することが前提である。

1) 試験成立条件

検査材料の代わりにDDWを入れた陰性対照が陰性（蛍光強度の増大が認められないあるいはCt値40以上）であり、100コピー/反応の標準物質がCt値35以内となった場合に試験が成立する。上記条件が満たされないときは再試験を行う。

2) 判定

100コピー/反応よりも低い濃度の標準物質を使用した場合に、Ct値が35以上（40以内）で蛍光強度の増大が見られた場合には、該当する濃度を判定基準とすることも可能である。

測定不具合の報告、判定に関する質問が寄せられる

➡ Q & A / Troubleshooting を Appendix として公開することを検討

Real-time PCR法の判定について

＜質問1＞ 試験成立条件の「100コピー/反応でCt値35以内」を満たさない場合はどうすればよいか？

＜回答＞ 平成27年3月27日付「ノロウイルス定量リアルタイムPCR標準物質の更新について」で配布された標準物質を使用した場合、「 10^3 copies/ウエルの標準物質を添加した実験系のCt値は、ほぼ30サイクル」になる。

試験成立条件を満たさない場合、波形を確認し、必要に応じ補正を行い、標準物質1000コピー/反応のCt値が30（ ± 1 ）となっていることを確認する。

それでも「100コピー/反応でCt値35以内」にならない場合、プローブ等の試薬や標準物質の劣化、希釈系列作成の不備、機械の不調等が考えられる。検査系の見直しが必要と思われる。

Real-time PCR法の判定について

＜質問2＞ 判定（「100コピー/反応よりも低い濃度の標準物質を使用した場合に、Ct値が35以上（40以内）で蛍光強度の増大が見られた場合には、該当する濃度を判定基準とすることも可能である。」）に関して、

「100コピー/反応でCt値35以上」かつ「100コピー未満/反応でCt値が35～40」の場合、試験は成立しないのか？

＜回答＞ 質問1と同様、検査系の見直しが必要と考えられる。ただし、検査検体のCt値が標準物質100コピーのCt値よりも小さい場合は陽性と判断して問題はない。

ロタウイルス検出マニュアル（第2版）の更新

- 第1版 平成26年（2014年）12月
- 第2版 令和元年（2019年）6月

Ⅲ．検査方法

Ⅲ-1．イムノクロマト法

Ⅲ-2．ELISA 法

Ⅲ-3．RNA 抽出

Ⅲ-4．PAGE によるウイルス RNA の検出

Ⅲ-5．リアルタイム PCR

Ⅲ-6．マルチプレックス PCR（VP7 の遺伝子型決定法）

Ⅲ-7．RT-PCR

Ⅲ-8．シーケンス解析

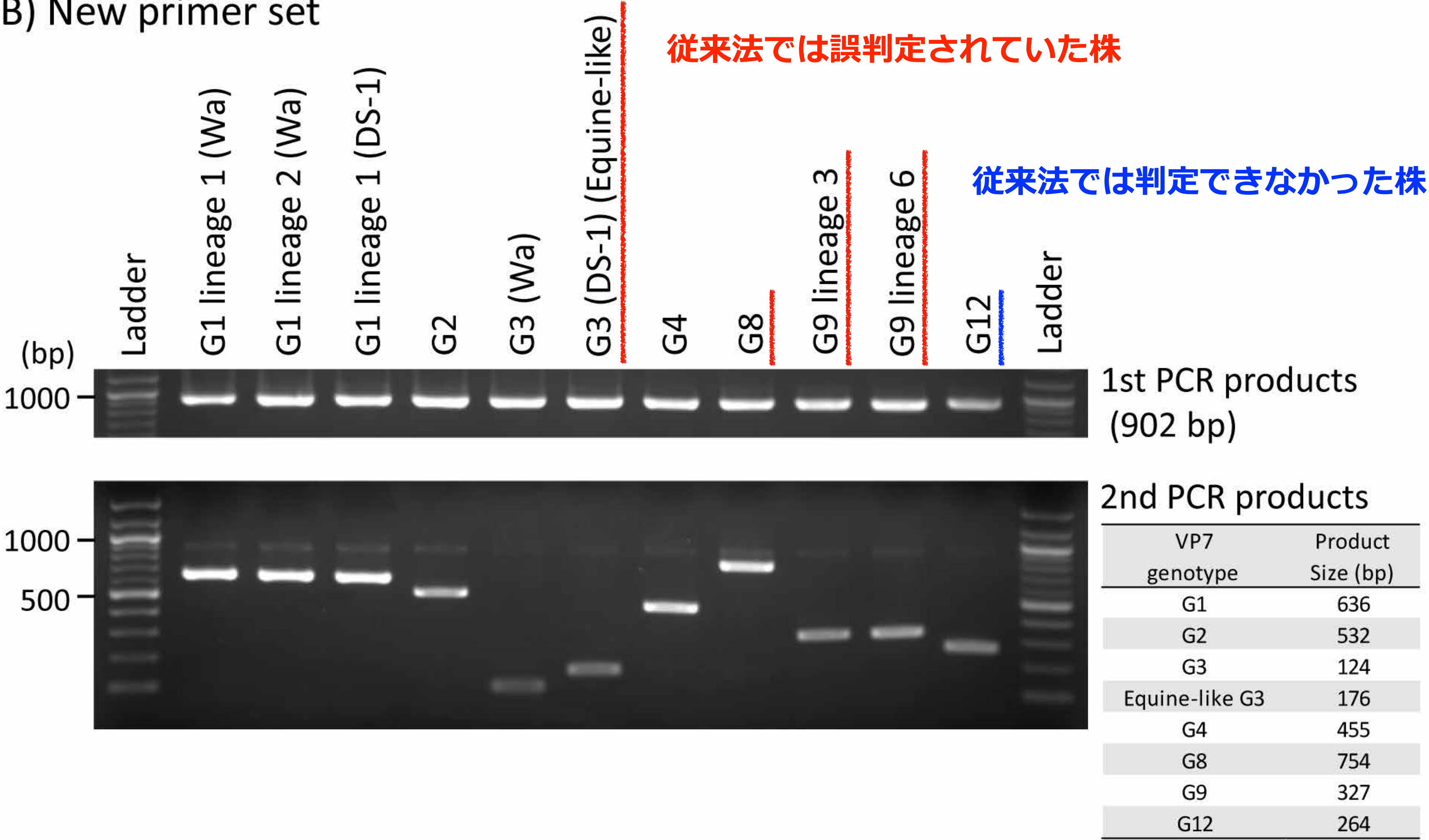
※ワクチン株との鑑別について



第1版より追加・変更

VP7 genotyping法を改良（new primer setを設計）

B) New primer set



8種類の型（G1, G2, human G3, equine-like G3, G4, G8, G9, G12）を正しく判別可能

ワクチン株との鑑別について

➤ ワクチン株のアクセッション番号

ロタリックス											
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Reference	HG917354	JN849113	HG917356	JX943609	JX943610	JX943611	KC580607	HQ392411	HQ392420	HG917357	KC580611

ロタテック											
Strain	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
WI79-9 (G1)	GU565057	GU565055	GU565056	GU565052	GU565053	GU565054	GU565058	GU565059	GU565060	GU565061	GU565062
SC2-9 (G2)	GU565068	GU565066	GU565067	GU565063	GU565064	GU565065	GU565069	GU565070	GU565071	GU565072	GU565073
WI78-8 (G3)	GU565079	GU565077	GU565078	GU565074	GU565075	GU565076	GU565080	GU565081	GU565082	GU565083	GU565084
BrB-9 (G4)	GU565090	GU565088	GU565089	GU565085	GU565086	GU565087	GU565091	GU565092	GU565093	GU565094	GU565095
WI79-4 (P[8])	GU565046	GU565044	GU565045	GU565041	GU565042	GU565043	GU565047	GU565048	GU565049	GU565050	GU565051

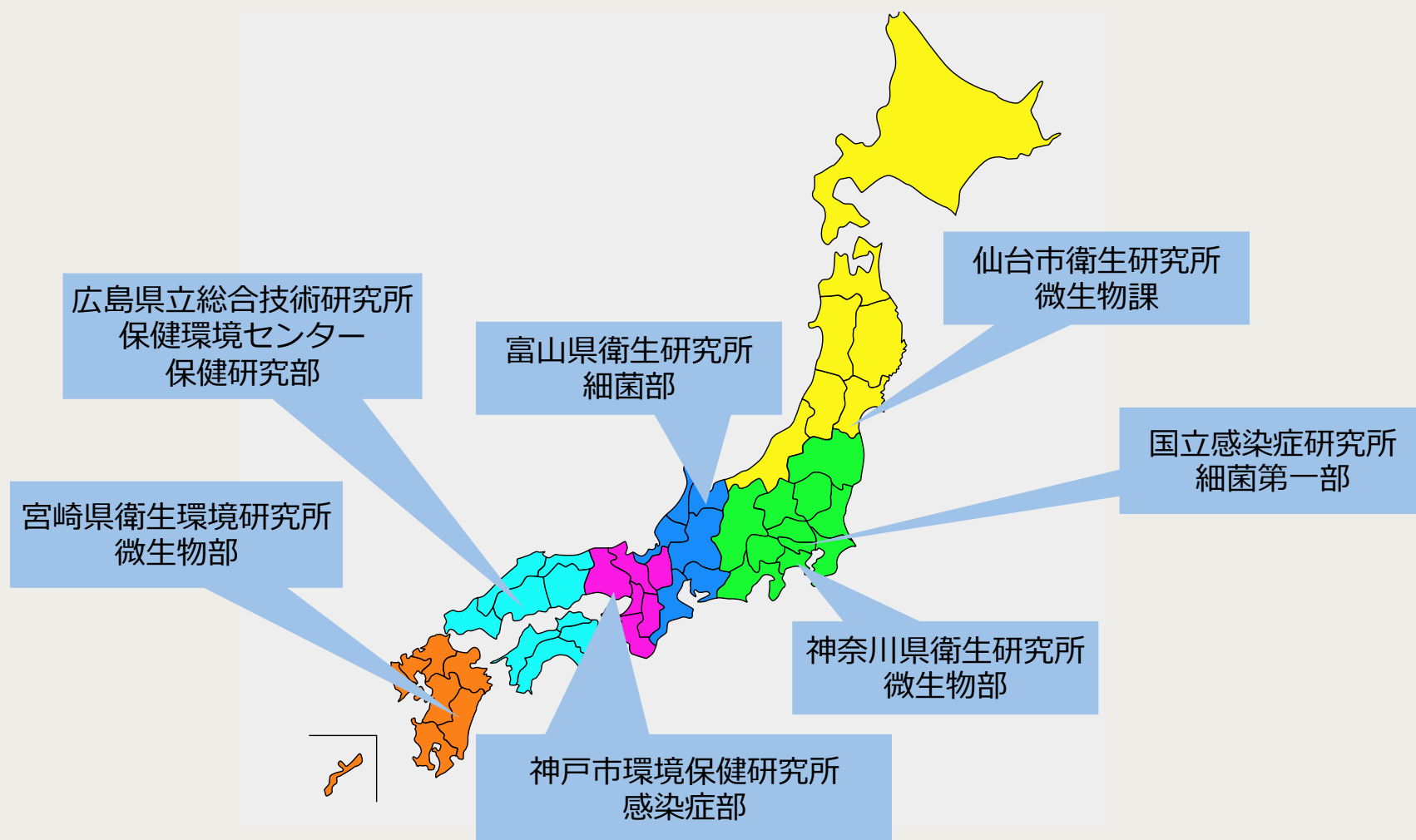
- ロタテックの場合、VP7、VP4、VP3は複数の遺伝子型が
ワクチンに混在しているため、シークエンス解析が困難。
- シークエンスは他の遺伝子（VP6やNSP4等）をターゲットに解析する。

検討すべき課題

- ノロウイルス検出マニュアル第1版記載の「参考 マルチプレックスPCR法」の位置付け
 - ノロウイルスGI, GII、サポウイルス、アストロウイルス
 - A群, B群, C群ロタウイルス、アデノウイルス
 - アストロウイルス検出法
 - アデノウイルス検出法
- 検出法改善の必要性を検証
標準プラスミドは？
マニュアルの必要性は？

10. レジオネラ

レジオネラ・レファレンスセンター会議



衛生微生物技術協議会第40回研究会
令和元年7月10日 熊本市民会館

今日の議題

- 感染研センター報告

レジオネラ症発生動向

臨床分離株の収集と遺伝子型別

検査についての情報

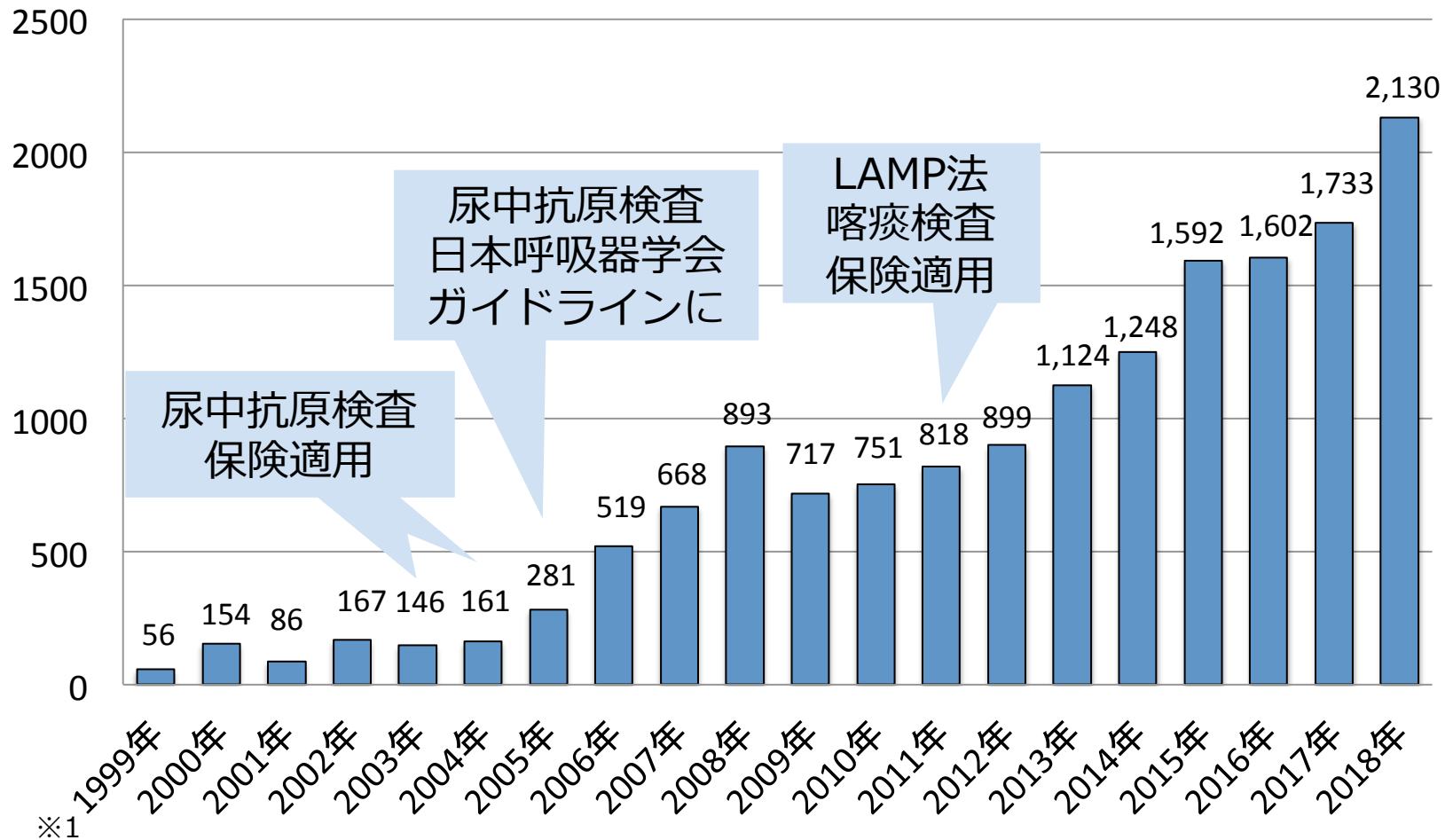
- 外部精度管理

- 支部センター報告

年別レジオネラ症報告数

(感染症発生動向調査)

(報告数)



※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

日本におけるレジオネラ症集団感染事例の感染源 1980年-2018年3月

	市中感染	福祉施設感染	院内感染	合計
入浴設備	22	1	0	23 (70)
冷却塔	2	0	1	3 (9)
給水/給湯系	0	0	2	2 (6)
加湿器	0	1	0	1 (3)
高圧洗浄装置	1	0	0	1 (3)
不明	0	3	0	3 (9)
合計	25 (76)	5 (15)	3 (9)	33 (100)

福祉施設：高齢者福祉施設、乳児院

院内感染の給水/給湯系2例では、加湿器も使用されていた。

()内は%

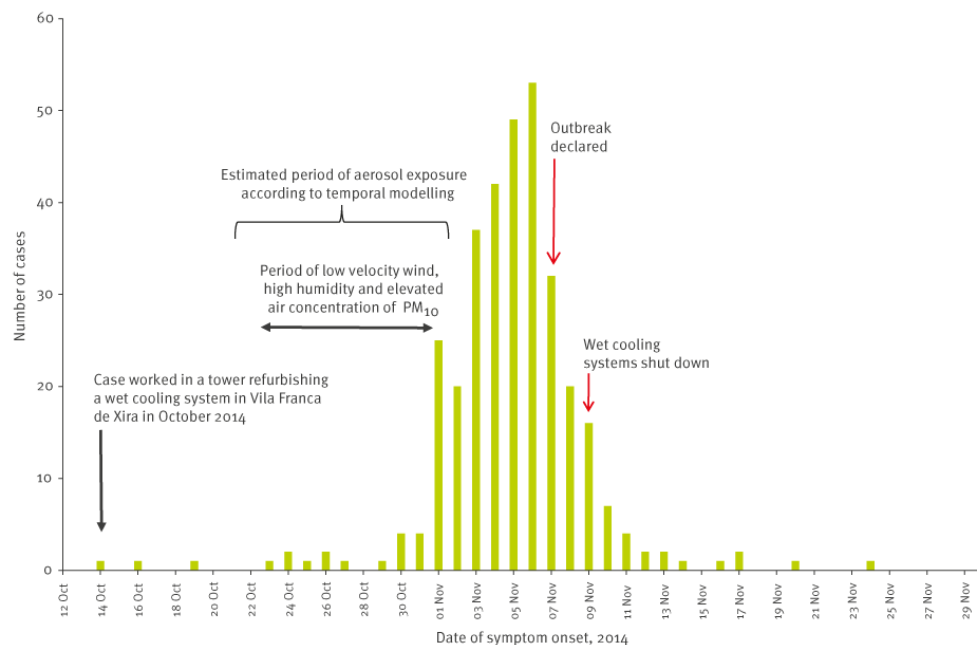
最近の海外レジオネラ症大規模集団感染事例

約50名以上の患者事例のみ

	年	国名	施設	感染源	患者数	確定症例数	死亡者数	
30	2005	ノルウェー	リグニン製造工場	空気洗浄のための冷却施設		55	10	LpSG1
31	2005	米国	長期療養施設	冷却塔		82	23	LpSG1
32	2006	スペイン	市センター	冷却塔		146	0	LpSG1
33	2006	英国	レジャー施設	渦流浴（循環式）	118	5	0	LpSG1
34	2007	ロシア	町の給水設備 醸造排水処理プラント	給水設備	130	74	5	LpSG1
35	2009-2010	ドイツ		冷却塔		65	5	LpSG1
36	2012	英国	蒸溜所？	冷却塔？	101	53	3	LpSG1
37	2012	カナダ	事務所用ビル	冷却塔		182	13	LpSG1
38	2012	米国	ホテル	噴水、シャワー	114	11	3	LpSG1
39	2013	ドイツ	工場、下水処理場	冷却塔他	159	78	1	LpSG1
40	2014	ポルトガル	肥料工場？	冷却塔	403	377	13	LpSG1
41	2015	米国	ホテル	冷却塔		127	12	LpSG1
42	2015	米国	福祉施設	給湯/給水系		54	13	
43	2015	スペイン	バス乗り場	噴水		238	2	

Pontiac fever、少数の肺炎も

FIGURE 1
Confirmed cases of Legionnaires' disease by date of symptom onset, Vila Franca de Xira, Portugal, 14 October – 24 November 2014 (n = 334)

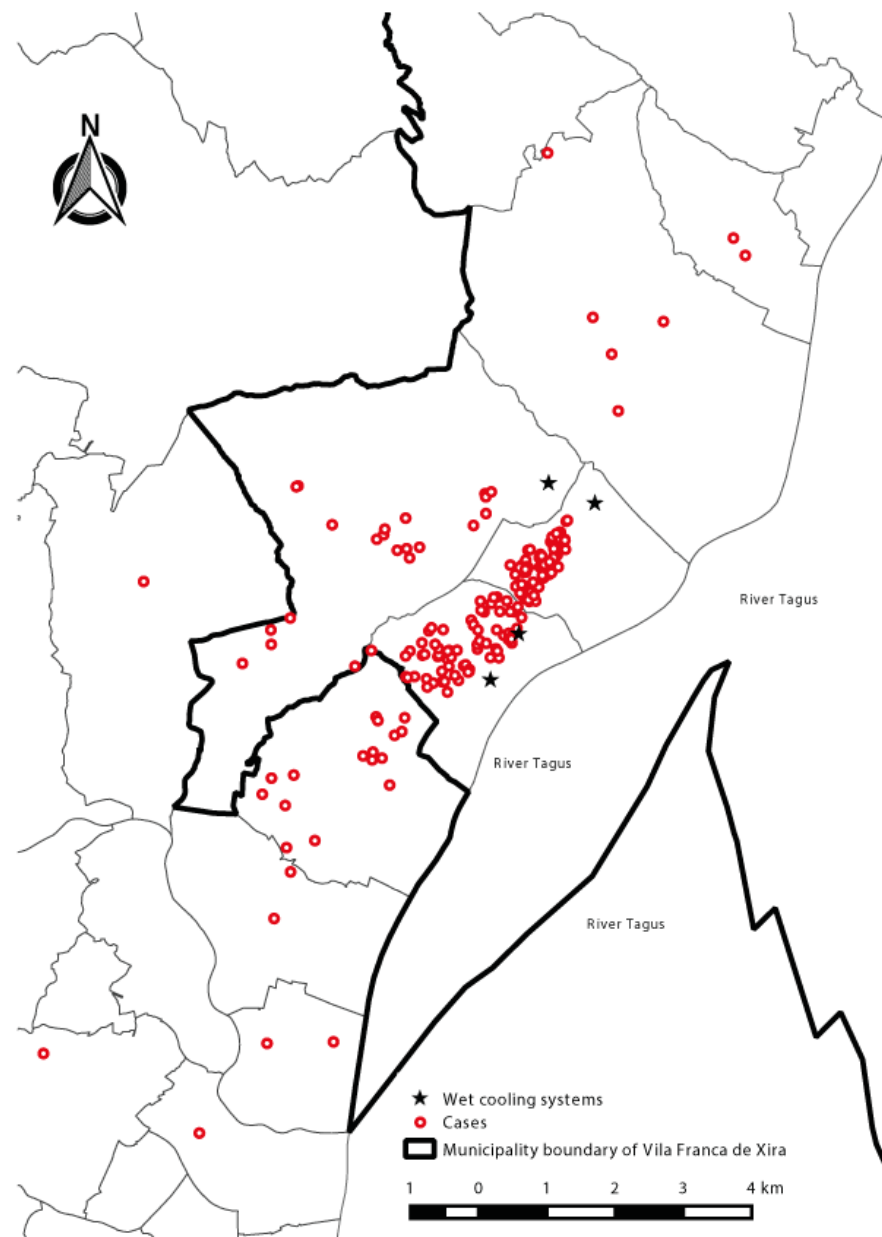


確定334例、67%が男性、
年齢中央値58歳（25-92歳）
少なくとも10人死亡
すべて尿中抗原陽性。
起因菌ST1905（C2グループ）

Shivaji T et al., Eurosurveillance 19 (50), 2014

FIGURE 2

Mapping of cases of Legionnaires' disease by place of residence, Vila Franca de Xira, Portugal, notified by 14 November 2014 (n = 250)



レジオネラ症患者臨床検体および分離株分与のお願い

国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、レジオネラ症に対する積極的疫学調査を行っています。

感染症法に基づく発生動向調査によると、

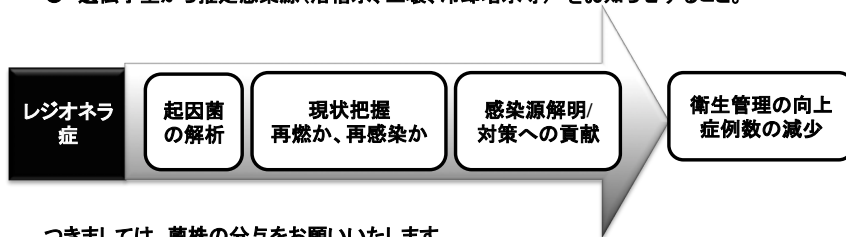
● レジオネラ症患者は2018年には2,130例(暫定数)で、本年は更にそれを上回ると予想されます。

● 届出例中、尿中抗原検出による確定診断は95%で、届出時点での培養陽性は2.9%となっています¹⁾。しかし、菌株を分離しないと感染源が確定できず対策が困難となります。

レジオネラ・レファレンスセンターでは、感染症法に基づいた積極的疫学調査として以下の活動を行っています。

● 臨床分離株の菌種、血清群や遺伝子型などを決定することで、どのような株が感染しているか調査し、その結果を感染研感染症疫学センターのホームページや学術誌等で還元すること^{2),3)}。

● 遺伝子型から推定感染源(浴槽水、土壌、冷却塔水等)⁴⁾をお知らせすること。



つきましては、菌株の分与をお願いいたします。

それが困難な場合には喀痰等の呼吸器検体の確保・分与をお願いします。

患者様を特定する情報は削除し、匿名化していただけると幸いです。

本レファレンス事業にご理解いただけますようお願い申し上げます。

個々の解析結果については、随時報告致します。

ご協力の程、どうぞ宜しくお願い致します。
今後とも宜しくお願い申し上げます。

2019年7月

- 分与いただいた菌株はレジオネラレファレンス活動の参照株として用いることがあります。
- 菌株の目的外の使用および許可なしに第三者への分与は行いません。

参考文献

1) 我が国のレジオネラ症の発生動向調査における概要 2007.1.1～2016.12.31
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/1674-disease-based/ra/legionella/idsc/idwr-sokuhou/7638-legionella-20171030.html>

2) *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008-2016. Appl Environ Microbiol, 2018, 84, pii:e00721-18.

3) レジオネラ臨床分離株の型別 -レファレンスセンター活動報告として IASR, 2013, 6:161-3. <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2252/400/3599-dj4004.html>

4) Distribution of Monoclonal Antibody Subgroups and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates Derived from Cooling Tower Water, Bathwater, and Soil in Japan. Appl Environ Microbiol, 2012, 78:4263-70.

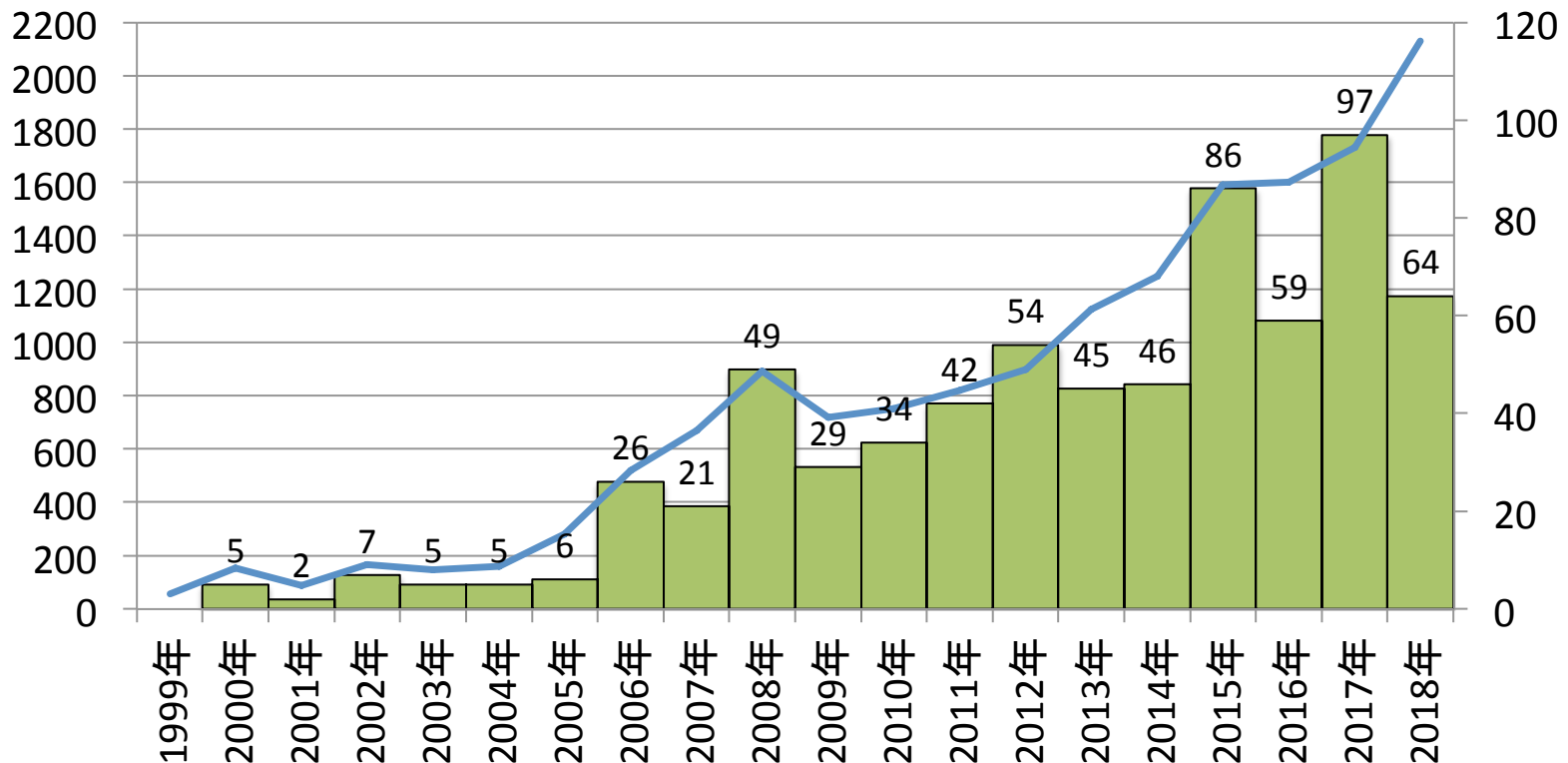
連絡先
国立感染症研究所
前川純子(細菌第一部担当者)
大西 真(細菌第一部 部長)
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1
TEL: 03-5285-1111
E-mail: jmaekawa@nih.go.jp

分離年別 収集レジオネラ臨床分離株

(2019年6月現在、2018年分まで)

報告数

株数



レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行っている。

収集臨床分離株の内訳

2019年3月末日現在

L. pneumophila 679株 (98.1%)

L. anisa 1株 (0.1%)

SG1 603株 (87.1%)

SG9 9株 (1.3%)

L. bozemanae 1株 (0.1%)

SG2 13株 (1.9%)

SG10 3株 (0.4%)

L. dumoffii 1株 (0.1%)

SG3 17株 (2.5%)

SG12 2株 (0.3%)

L. feeleeii 2株 (0.3%)

SG4 4株 (0.6%)

SG13 2株 (0.3%)

L. londiniensis 1株 (0.1%)

SG5 11株 (1.6%)

SG14 1株 (0.1%)

L. longbeachae 6株 (0.9%)

SG6 10株 (1.4%)

SG15 1株 (0.1%)

L. rubrilucens 1株 (0.1%)

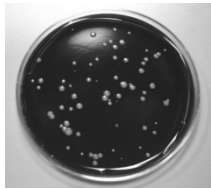
SG8 2株 (0.3%)

UT* 1株 (0.1%)

* 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 692株 (100%)

Sequence-based typing (SBT)法



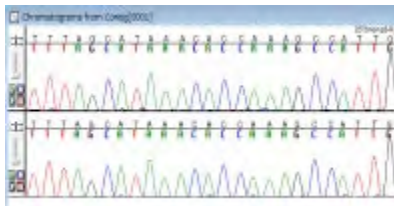
L. pneumophila のコロニーから
DNAを取り出す。



特定（7カ所）のDNA断片を
PCR法で増幅する。



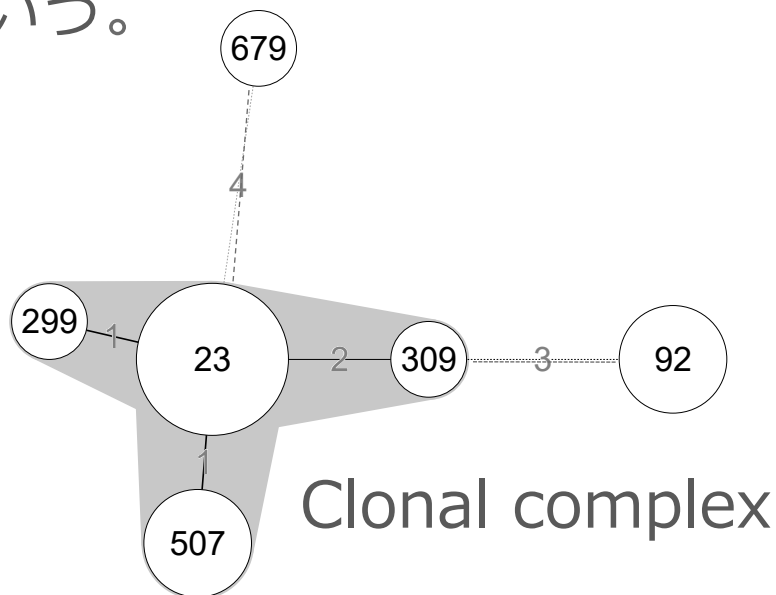
DNA断片の塩基配列を読み取り、
配列の違いに応じて番号をつける。



例) (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)
=(2,3,9,10,2,1,6) ST23

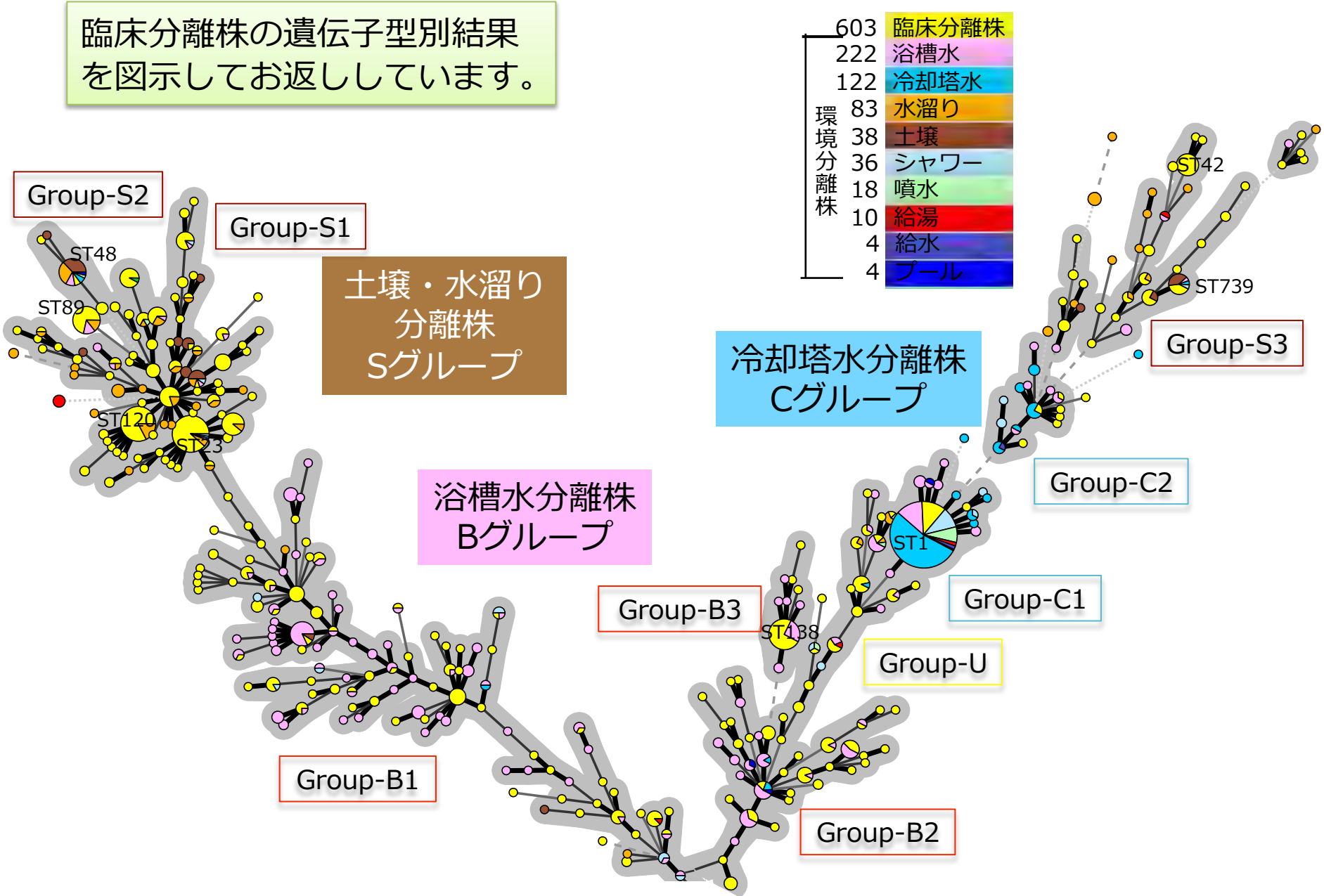
遺伝子型(ST)間の類縁関係を解析する。 —minimum spanning tree法—

- 似ているST同士を各遺伝子の差異数に比例した長さの“枝”で結び、枝の長さの総長が細小になるようにする。
- 数字はST型を示し、円の大きさは、株数に比例する。
- 隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下のSTの集団をclonal complexという。



国内で分離された*L. pneumophila* 血清群1（1142株）の minimum spanning tree 図

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。



2018年8月



Applied and Environmental
Microbiology®

PUBLIC AND ENVIRONMENTAL
HEALTH MICROBIOLOGY



***Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016**

Junko Amemura-Maekawa,^a Fumiaki Kura,^{a*} Kyoko Chida,^b Hitomi Ohya,^c Jun-ichi Kanatani,^d Junko Isobe,^d Shinobu Tanaka,^e Hiroshi Nakajima,^f Takahiro Hiratsuka,^g Shuji Yoshino,^h Miho Sakata,ⁱ Miyo Murai,ⁱ Makoto Ohnishi,^a
Working Group for *Legionella* in Japan

^aDepartment of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^bSendai City Institute of Public Health, Miyagi, Japan

^cKanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa, Japan

^dToyama Institute of Health, Toyama, Japan

^eKobe Institute of Health, Hyogo, Japan

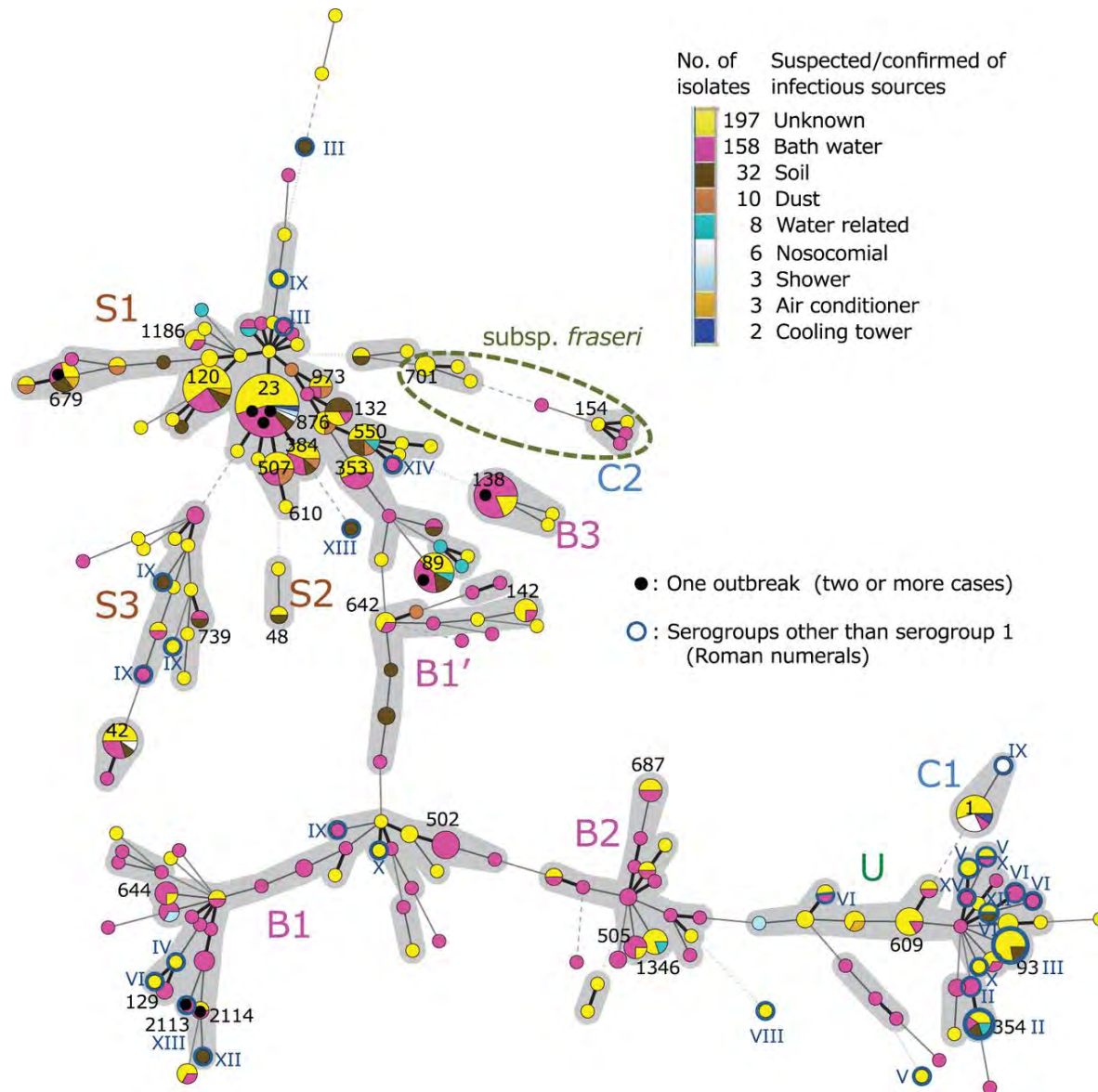
^fOkayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, Okayama, Japan

^gHiroshima Prefectural Technology Research Institute, Public Health and Environment Center, Hiroshima, Japan

^hMiyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki, Japan

ⁱDepartment of Health Sciences, Saitama Prefectural University, Saitama, Japan

MST analysis of 419 *L. pneumophila* isolates collected in Japan between 2008 and 2016.



Junko Amemura-Maekawa et al. Appl. Environ. Microbiol. 2018; doi:10.1128/AEM.00721-18

検査法について

- ◆ 2019年7月？ 公衆浴場における衛生等管理要領の改正
- ◆ 同時期 レジオネラ属菌検出のための検査方法

通常時の入浴施設等の衛生管理状態を確認するにあたり、浴槽水等のレジオネラ属菌検出のための基本となる検査方法について技術的助言として提示

- ◆ 病原体検出マニュアル「レジオネラ症」今年度改訂

1 1. 薬剤耐性菌

薬剤耐性菌レファレンスセンター報告

国立感染症研究所薬剤耐性研究センター
鈴木里和、松井真理、菅井基行

カルバペナム耐性腸内細菌科細菌（CRE）病原体サーベイランス

2017年3月 健康局結核感染症課長通知に基づき、病原体検出情報システムを通じて検査結果報告

- ・ 報告する検査項目は13項目、うち6項目（遺伝子検査4項目、表現型検査2項目）は通知で原則実施することとされている

集計結果等はIASRで還元

- ・ 2017年検体採取分 集計結果
IASR Vo.39, p162-163（2018年9月号）

- ・ CRE病原体サーベイランス報告状況
IASR Vol.40, p19-20（2019年2月号）

- ・ 2018年検体採取分 集計結果
IASR報告準備中

- 2018検体採取分報告概要
- 海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の増加

IASR

カルバペナム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE）病原体サーベイランス, 2017年

(IASR Vol. 39 p162-163: 2018年9月号)

感染症法5類全数把握対象疾患であるカルバペナム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE）感染症は、2017年3月に発出された通知（健感発0328第4号）により、症例の届出があった際には医療機関に対し病原体の提出を求め、地方衛生研究所等で試験検査を実施し、結果を病原体検出情報システムに報告することとなっている。今回、通知で原則実施とされている、PCR法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子（IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型）の検出結果の概要を示す。

IASR

カルバペナム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス報告状況

(IASR Vol. 40 p19-20: 2019年2月号)

2017年3月に発出された通知（健感発0328第4号）により、カルバペナム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症の届出があった際には、地方衛生研究所等で当該患者より分離された病原体の試験検査を実施し、結果を病原体検出情報システムに報告することとされた。本稿では、病原体検出情報システムへの検査結果報告状況を示す。集計対象は、病原体検出情報システムに報告された、検体採取日が2017年1月1日～12月31日の865株¹⁾ および2018年1月1日～6月30日（以下、2018年上半期）の575株（2019年1月15日現在）とした。

CRE病原体サーベイランス

原則実施検査項目 各検査実施数と陽性数

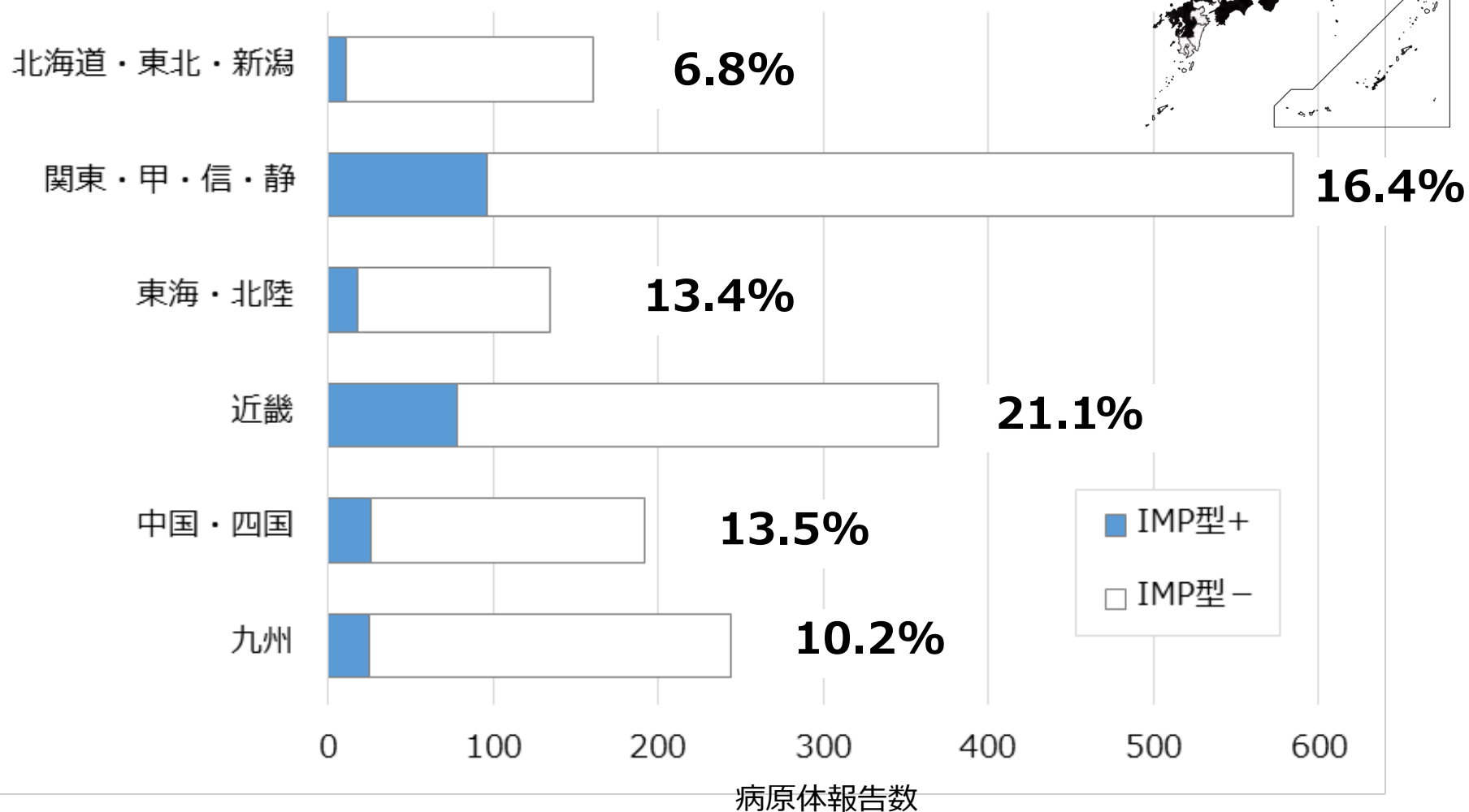
		検体採取期間		2017年1～12月（n=865）				2018年1～12月（n=1,684）			
		検査項目		検査実施株数（％）		陽性数（％＊）		検査実施株数（％）		陽性数（％＊）	
原則実施	遺伝子検査	IMP型		865	（100.0）	227	（26.2）	1,684	（100.0）	254	（15.1）
		NDM型		865	（100.0）	8	（0.9）	1,684	（100.0）	31	（1.8）
		KPC型		865	（100.0）	3	（0.3）	1,684	（100.0）	10	（0.6）
		OXA-48型		865	（100.0）	2	（0.2）	1,684	（100.0）	3	（0.2）
	表現型検査	メタロ-β-ラクタマーゼ試験		813	（94.0）	218	（26.8）	1,665	（98.9）	279	（16.8）
		ボロン酸試験		798	（92.3）	292	（36.6）	1,653	（98.2）	663	（40.1）
少なくとも1つのカルバペネマーゼ遺伝子検出				865		239	（27.6）	1,684		297	（17.6）

* 検査実施株数に対する陽性%

CRE病原体サーベイランス（2018年検体採取分） ブロック別IMP型検出率

IMP型検出株 32都府県 254株（全体の15.1%）

IMP型検出報告のある
都府県の分布

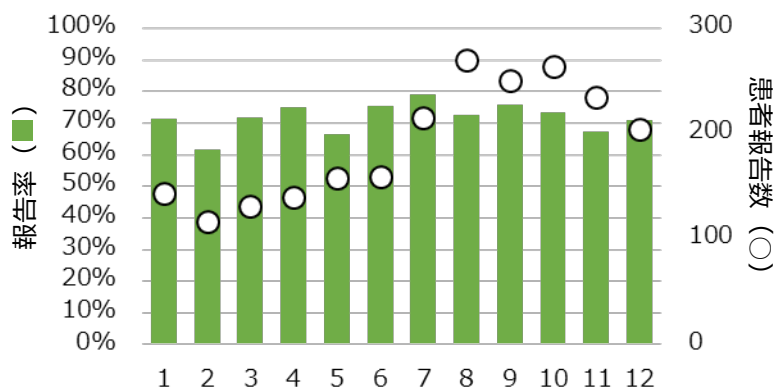


CRE病原体サーベイランス報告状況（2018年検体採取分）

- 発生動向調査（患者報告） 2,289例（2019年5月31日現在）
- 病原体サーベイランス（病原体報告） 1,653株*（2019年6月28日現在）

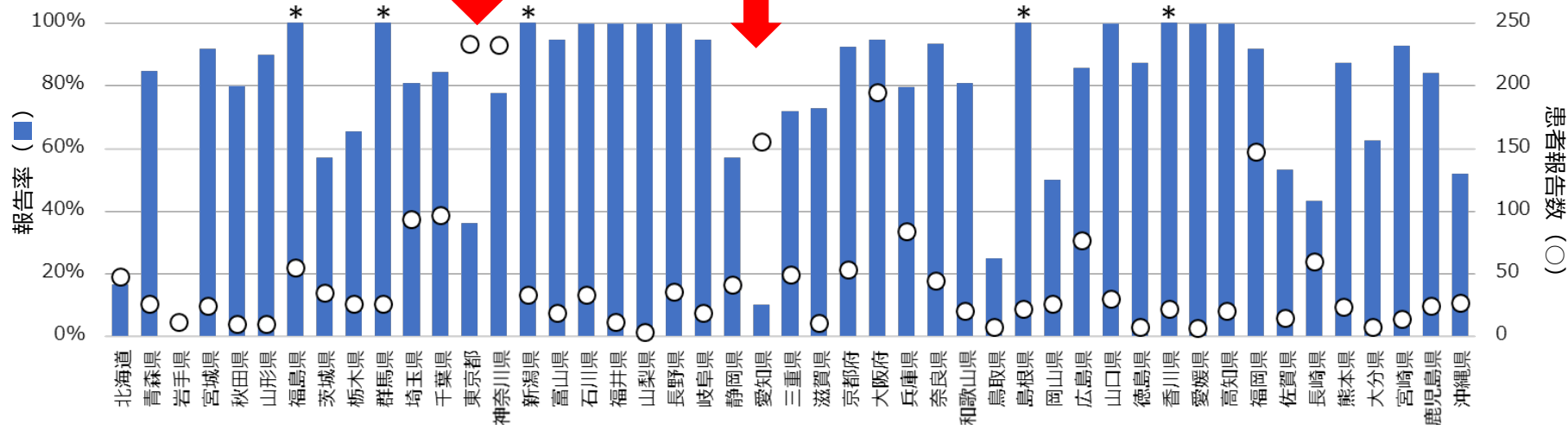
*通知で原則実施とされた検査項目が全て報告された株（CRE病原体報告数の98%）

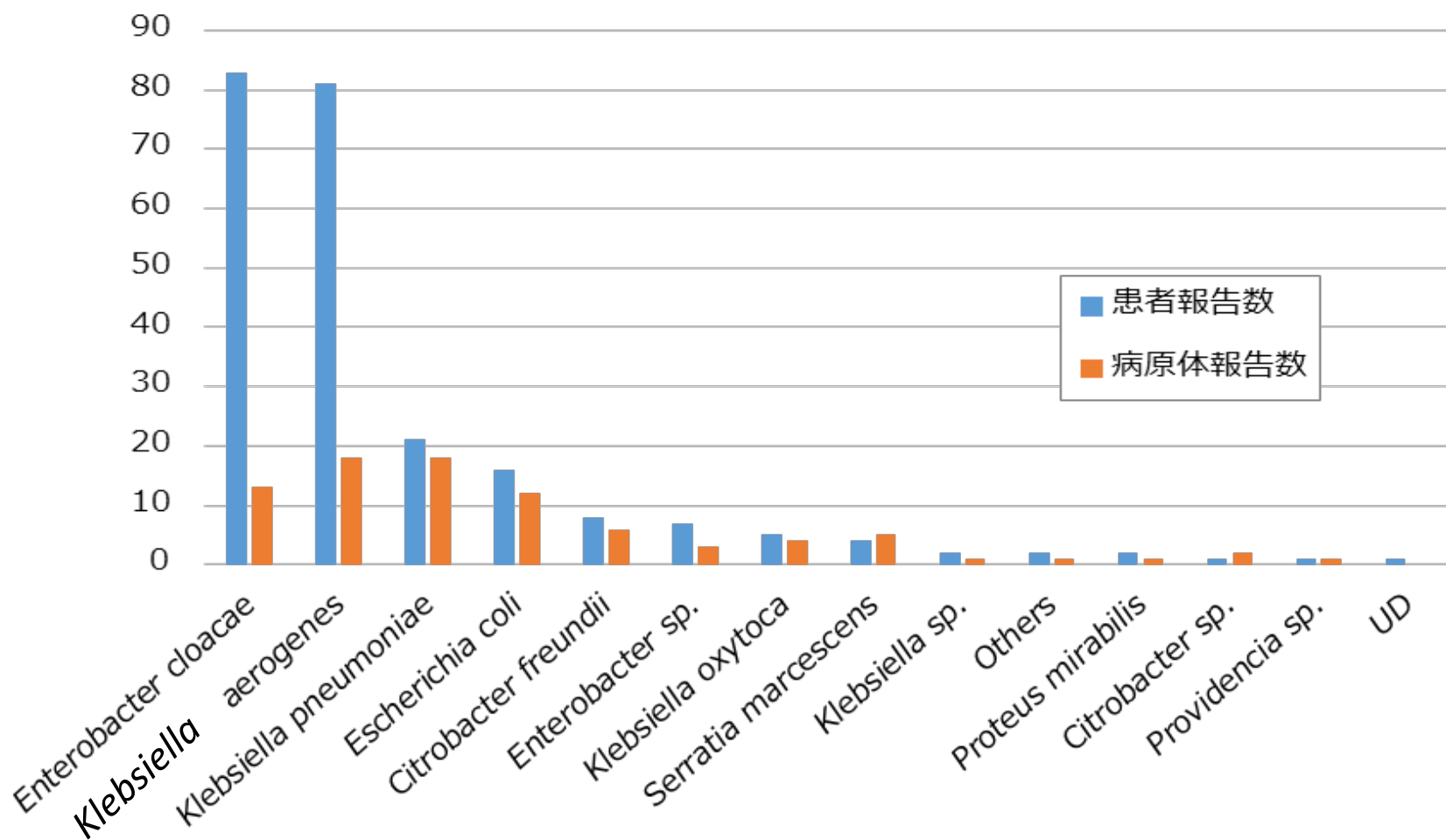
月別（範囲 61-79%, 中央値72%）



報告率 (%)
= 病原体報告数/患者報告数*×100

都道府県別（範囲 0-100%, 中央値86%）





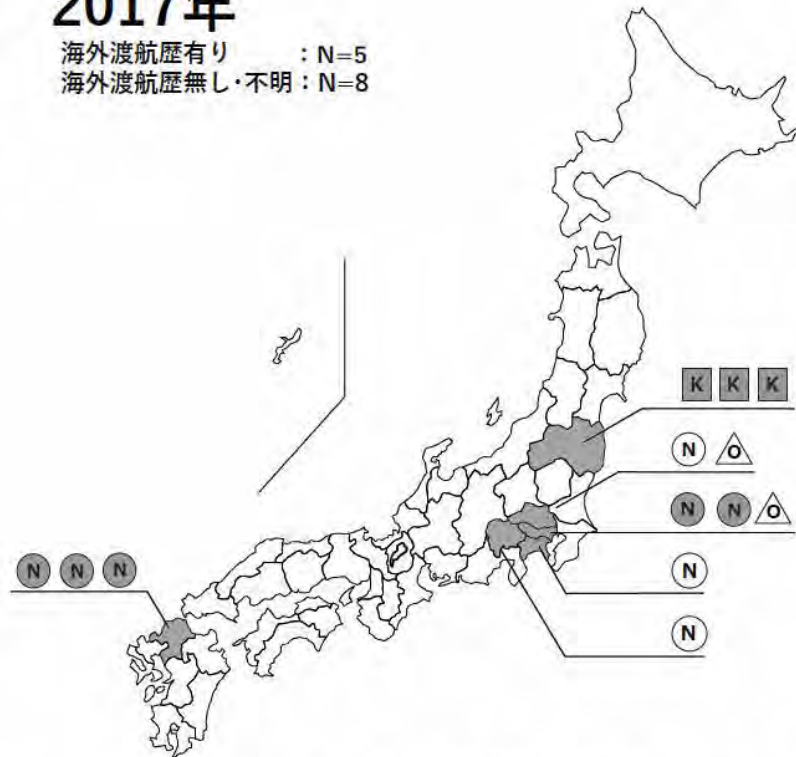
海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の増加

特に、海外渡航歴無し・不明症例からのNDM型検出が増加！

（海外渡航歴無し・不明症例からの検出時には結果確定のため、シーケンスをお願いします）

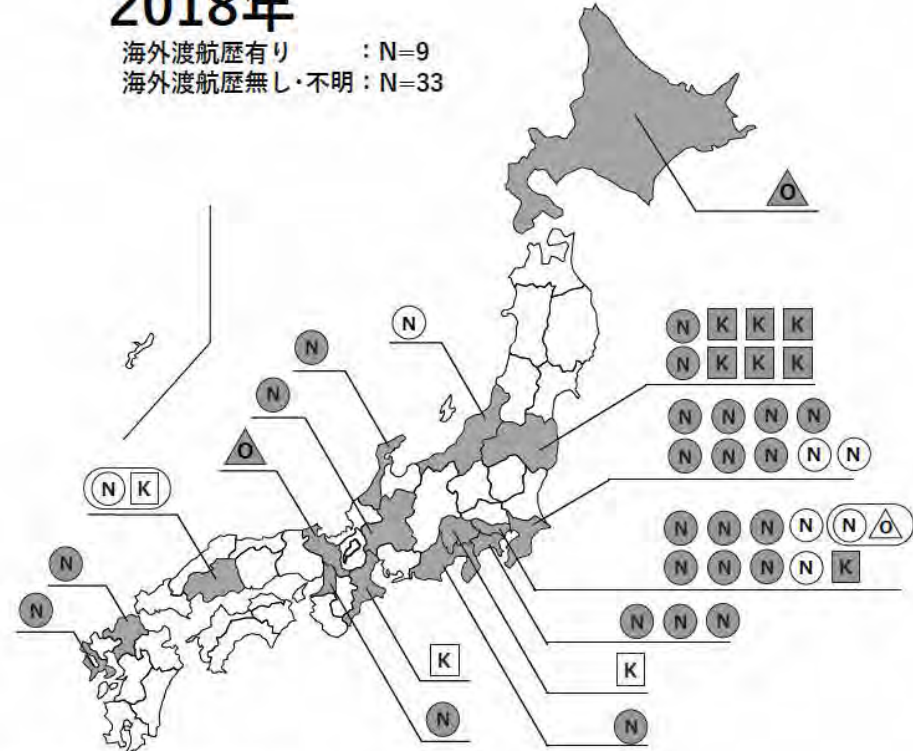
2017年

海外渡航歴有り : N=5
海外渡航歴無し・不明 : N=8



2018年

海外渡航歴有り : N=9
海外渡航歴無し・不明 : N=33



- | | |
|----------------------|-------------------|
| ● NDM型 海外渡航歴無し・不明 | ○ NDM型 海外渡航歴有り |
| ■ KPC型 海外渡航歴無し・不明 | □ KPC型 海外渡航歴有り |
| ▲ OXA-48型 海外渡航歴無し・不明 | △ OXA-48型 海外渡航歴有り |

○ 同一菌株が複数のカルバペネマーゼ遺伝子保有

病原体サーベイランス結果の活用

病原体サーベイランス 薬剤耐性研究センター（ハンセン庁舎）



電話会議
(週に1度)

発生動向調査（患者報告） 感染症疫学センター（戸山庁舎）



カテゴリー	報告日	報告者	自治体	施設名	患者	課題	原因の推測	発症の詳細	対応(DRC)	対応までの期間(日)	対応(AMRC)	対応(AMRC)の状況	対応(AMRC)の状況	その他の対応など(追記)
1120	2019	2019	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学
1204	2019	2019	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学
1204	2019	2019	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学
1204	2019	2019	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学
1204	2019	2019	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学	●●大学

- それぞれのサーベイランスで集積が疑われる事例を双方で確認
- 必要に応じて各センターから自治体へ問い合わせ、結果をフィードバック
- 自治体等からの個別問い合わせで把握した事例について情報共有、サーベイランスデータ確認

自治体

地方衛生研究所 検査担当

保健所
地方衛生研究所 感染症情報センター

その他、今年度の予定

- 薬剤耐性菌研修、陽性コントロールDNA配布
- 病原体検出マニュアル
⇒ 今年度内に改訂予定
- NESID病原体サーベイランス
バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）
薬剤耐性アシネトバクター
⇒ 検査結果入力形式の整備を予定
- 精度管理事業
課題1 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌
6月17日 参加施設宛に検体送付（8検体）
7月26日（金） 17:00 結果登録締め切り

12. 寄生虫

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人：永宗喜三郎(感染研・寄生動物)

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

話題の提供と情報交換（演者・所属：敬称略）.

A.アニサキス食中毒の最近の傾向

1.概説

（杉山 広・感染研）

2.カツオの生食を原因とするアニサキス食中毒の発生原因に関して

（鈴木 淳・東京都健康安全研究センター）

3.アニサキス形態同定に関する手順 ～福島県における取り組み～

（菅野奈美、塚田敬子・福島県衛生研究所、門馬直太・福島県庁）

B.サルコシスティス食中毒のこれまでとこれから

4.熊本馬肉サルコシスティス問題を振り返る

（原田誠也・熊本県保健環境科学研究所）

5.ジビエ関連サルコシスティス

（八木田健司・感染研）

アニサキス食中毒の最近の傾向

1.概説(杉山 広・感染研寄生動物)

- (1) アニサキスは海産の哺乳動物(クジラなど)に成虫が寄生し、海産魚介類の喫食を通じて、幼虫が人体感染する寄生性線虫である。
- (2) 食中毒統計を紐解くと、2006年のアニサキス食中毒の事件数はわずか6件であったが、2016年には123件となり、その後は年間にほぼ倍増して、2017年は230件、2018年は467件に至った。
- (3) その結果、アニサキス食中毒の事件数は、ノロウイルスやカンピロバクターによるものを抜いて、全食中毒の中で第1位となった。
- (4) 原因となる魚介類としては、患者の食歴から、サバ(マサバとゴマサバの総称)が最も重要とされてきた。一方、2018年にはカツオ生食による事件数が、サバを原因とするものを抜いた。
- (5) しかし2018年の秋以降、カツオ生食のアニサキス食中毒事件数は、大幅に減少している。販売店ではカツオの冷凍(解凍)を自主的に実施しており、これが事件数減少の要因の一つと考える。

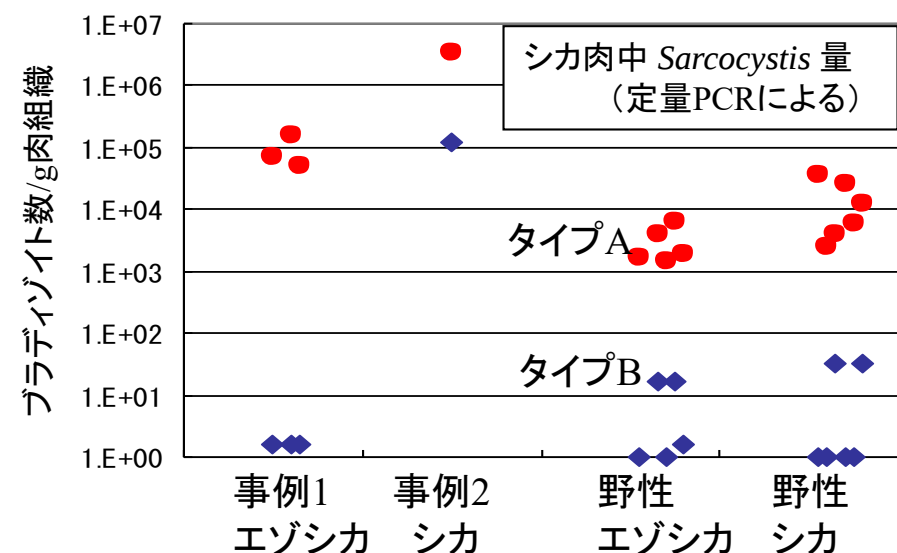
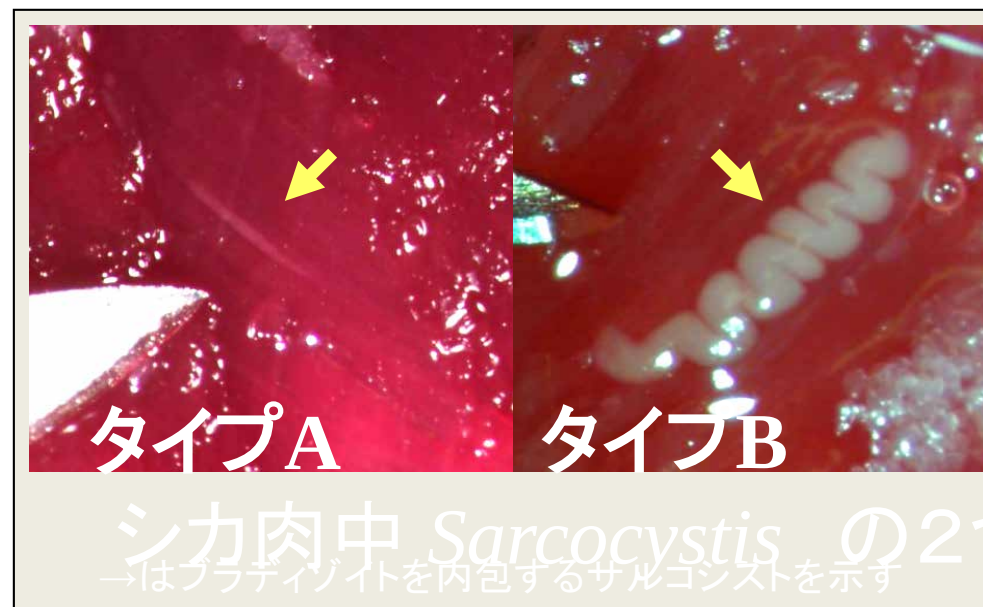
・馬30頭(純国産馬6頭、外国産馬24頭)、1頭当たり21部位について、*S. fayeri*の定量検査を実施したところ、**純国産馬はいずれも不検出**であったが、外国産馬は全頭寄生が確認された。高寄生部位はヒレ、カクマク、フタエゴ、外モモ、及びヒレ下がりであり、**内臓はすべて不検出**であった。また、LAMP法による*S. fayeri*の簡易検査法を開発した。

国通知：平成23年6月17日付け食安発0617第3号(暫定法)
平成28年4月27日付け生食監発0427第4号

ジビエ関連サルコシステイス *Sarcocystis*

国立感染研寄生動物部
八木田健司

- 近年シカ肉等ジビエ利用の動きが全国的に高まっている。
- 2011年以降、シカ肉の生食、あるいは加熱不十分な調理による下痢・腹痛等を示す**有症事例が4件発生**。
- 原因は**シカ寄生の *Sarcocystis* 属**と考えられ、ウマ寄生の *S. fayeri* とは異なる。
- シカの *Sarcocystis* 寄生率は高い** (>80%)。イノシシも同様 (~50%)。
- シカ肉有症事例の肉組織のブラディゾイト(仔虫)量は、**馬肉の食中毒事例の場合とほぼ同等**。その高い寄生率は野性シカにも見られる。
- 個体の感染率と寄生量の高さから、シカ肉に関しては、*Sarcocystis* による健康被害を防ぐために**十分な加熱処理**が必要。



レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人：永宗喜三郎(感染研・寄生動物)

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。

13. リケツチア

リケッチア・レファレンスセンター会議報告2019

全国衛生微生物技術協議会, 2019年7月11日, 熊本市

- 北海道東北
福島県衛生研究所
青森県環境保健センター
- 関東甲信静
東京都健康安全研究センター
千葉県衛生研究所
- 東海北陸
三重県保健環境研究所
富山県衛生研究所
- 近畿
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

リケッチア・レファレンスセンターの目的

必要性

- 国内のリケッチア症(つづが虫病と日本紅斑熱)は、決して少なくない患者数が報告され、日本紅斑熱は増加している。
- 有効な抗菌薬がありながら、死亡例、重症化例もいまだ報告される。
- 地域によって発生時期が異なり、**地域状況に即した**症例対応が必要となる。
- 国内のリケッチア症の多様性ととも、様々な輸入症例が確認される。
- 報告に必須とされる実験室的診断技術の大部分がイン・ハウスの検査法である。
- リケッチア症は、患者発生地域に固有のベクターの消長に関する情報の把握や感染推定地域における感染源(ベクター、動物)の調査が重要であり、その調査技術の伝承・伝達や維持の課題。
- **関係機関が密に協議・連携し、情報共有、技術の標準化に必要な情報分析、相互支援。**

目的・役割

- 標準株、分離株の維持(リスク分散)。
*課題: 特定病原体、BLS3
- 診断用抗原並びにPCR陽性コントロールの分担作製と供給。
- 実験室診断技術の相互評価(技術の維持)
- 新規診断法等の相互評価。
- 疫学情報、診断情報の収集・分析と共有。
- 緊急時のバックアップ体制
- 検査マニュアルの作成、改訂
- 検査技術の研修
- その他

発生状況1

感染症法

- ・日本紅斑熱 (*R. japonica*, 3種)
- ・つつが虫病 (*O. tsutsugamushi*)
- ・ロッキー山紅斑熱 (*R. rickettsii*, 3種)
- ・発疹チフス (*R. prowazekii*, 3種)

その他

- ・発疹熱 (*R. typhi*)
- ・極東紅斑熱 (*R. heilongjiangensis*)
- ・地中海紅斑熱 (*R. conorii*)
- ・*R. helvetica*
- ・African tick bite fever (*R. africae*)
- ・Flinder tick bite fever (*R. honei*)
- ・*R. sibirica*

ほか多種



過去10年で日本が経験したリケッチア症

- ・つつが虫病*
 - ・日本紅斑熱
 - ・極東紅斑熱
 - ・地中海紅斑熱*
 - ・African tick bite fever *
 - ・Queensland tick fever (*R. australis*) *
 - ・*R. tamurae*
 - ・*R. helvetica*
 - ・Ca *R. indica* *
 - ・発疹熱*
- *輸入症例
- *国内感染と輸入症例



発生状況2

紅斑熱 (カラー)

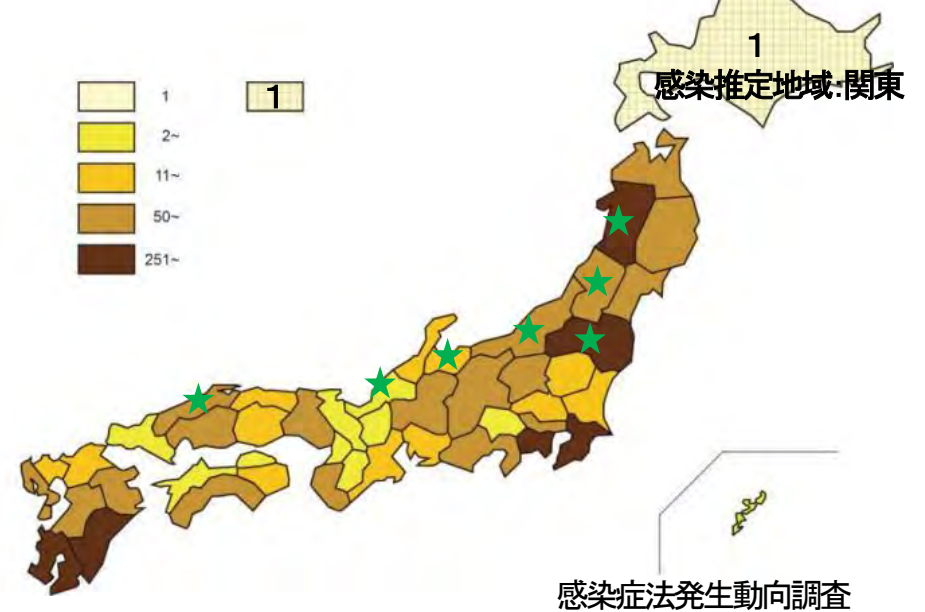
日本紅斑熱患者報告地(1999～2011)



★ 日本紅斑熱の新規発生

つつが虫病 (カラー)

つつが虫病患者報告地(1999～2011)



★ Shimokoshi型の発生

感染症法発生動向調査

リケッチア感染症 診断マニュアル

令和 元年 6 月版

目次

疾患の概要

つづが虫病

日本紅斑熱と紅斑熱群リケッチア症(ロッキーマウンテン紅斑熱を含む)

検体

検査の流れ

病原体検出

遺伝子検出

検体の前処理

リアルタイム PCR

コンベンショナル PCR

血清診断法

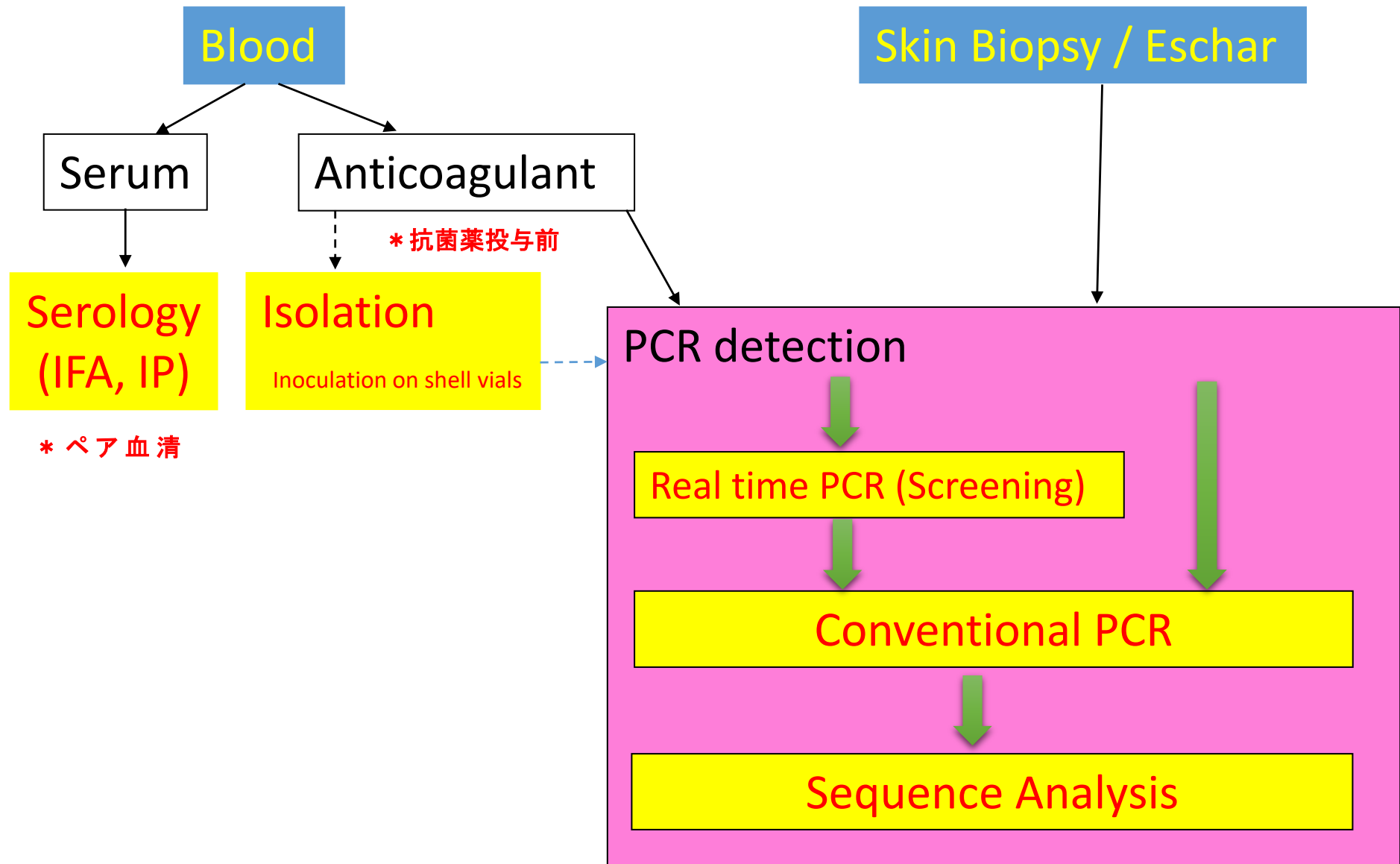
間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF 法)

間接免疫ペルオキシダーゼ法 Indirect immunoperoxidase assay (IP 法)

著者 一覧

全国衛生研究所衛生微生物協議会 リケッチア・レファレンスセンター 一覧

リケッチア感染症実験室診断の流れ



Specificity of Ot-Rj-duplex real-time PCR in Rickettsiales bacteria

Species	Strain (serotype)	Source	Ot-Rj-duplex real-time PCR		Hanaoka Rj-FAM ¹⁾
			Ot-FAM	Rj-VIC	
(Orientia)					
<i>O. tsutsugamushi</i>	Gilliam	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Karp	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Kato	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Irie/Kawasaki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Hirano/Kuroki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Shimokoshi	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JP-2: Sato Gilliam)	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JG: Kasei (Karp)	Apodemus speciosus	Ot-FAM positive	Negative	Negative
(Rickettsia)					
<i>R. japonica</i>	YH	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
	FT	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. heilongjiangensis</i>	CH8-1	Haemaphysalis concinna	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. asiatica</i>	IO-1	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IO-46	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. conorii</i>	Malindi	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. helvetica</i>	IC-1	Ixodes persulcatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IC-1	Ixodes columnae	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. honei</i>	TT-118	Ixodes sp.	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. rickettsii</i>	Sheila Smith	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. sibirica</i>	246	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. tamurae</i>	AT-1	Amblyomma testudinarium	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	HM-1	Haemaphysalis megaspinosa	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. australis</i>			Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Rickettsia</i> sp. LON	LON-2	Haemaphysalis longicornis	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. monacensis</i> (formaly In-56)	IN-1	Ixodes nipponensis	Negative	Rj-VIC positive	Negative
			Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. prowazekii</i>	brein1	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. typhi</i>	Wilmington	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. canadensis</i>	FLA-2	Haemaphysalis flava	Negative	Rj-VIC positive	Negative
			Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HZ	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	Arkansas	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>E. muris</i>	AS145 ^T	Eothenomys kageus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Ehrlichia</i> sp. HF (<i>E. ovatus</i>)	HF565	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative

*R. africae*未検出可能

Jpn. J. Infect. Dis., 71, 267–273, 2018

Original Article

Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan

Fumihiko Kawamori^{1,9}, Yukie Shimazu², Hiroko Sato³, Naota Monma⁴, Asaka Ikegaya¹, Seigo Yamamoto⁵, Hiromi Fujita⁴, Hiroshi Morita⁷, Yukiko Tamaki⁸, Naoya Takamoto⁹, Hongru Su⁹, Masahiko Shimada⁹, Yuko Shimamura⁹, Shuichi Masuda⁹, Shuji Ando¹⁰, and Norio Ohashi^{9*}

¹Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka 420-8637; ²Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Public Health and Environment Center, Hiroshima 734-0007; ³Akita Research Center for Public Health and Environment, Akita 010-0874; ⁴Fukushima Institute for Public Health, Fukushima 960-8670; ⁵Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki 889-2155; ⁶Mahara Institute of Medical Acarology, Tokushima 779-1510; ⁷Myojin Clinic, Wakayama 649-4223; ⁸Tamaki Hospital, Wakayama 646-0033; ⁹Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Integrated Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526; and ¹⁰Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

SUMMARY: Tsutsugamushi disease and Japanese spotted fever are representative rickettsioses in Japan, and are caused by infection with *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia japonica*, respectively. For molecular-based diagnosis, conventional PCR assays, which independently amplify respective rickettsial DNA, are usually used; however, this approach is time-consuming. Here, we describe a new duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *O. tsutsugamushi* and spotted fever group rickettsiae, and its evaluation using several PCR conditions in 6 public health laboratories. The detection limit of the assay was estimated to be 10² copies and the sensitivity was almost identical to that of 3 conventional PCR methods. A total of 317 febrile patients were selected as clinically suspected or confirmed cases of rickettsioses. The detection efficiency of this assay for *O. tsutsugamushi* from blood or skin (eschar) specimens appeared to be almost the same as that of the conventional PCR method, even when performed in different laboratories, whereas the efficiency for spotted fever group rickettsiae tended to be higher than that of the 2 traditional double PCR assays. Our duplex real-time PCR is thus a powerful tool for the rapid diagnosis of rickettsioses, especially at the acute stage of infection.

R. africae 未検出可能

Jpn. J. Infect. Dis., 71, 267–273, 2018

Original Article

Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan

Fumihiko Kawamori^{1,9}, Yukie Shimazu², Hiroko Sato³, Naota Momma⁴, Asaka Ikegaya¹, Seigo Yamamoto⁵, Hiromi Fujita⁶, Hiroshi Morita⁷, Yukiko Tamaki⁸, Naoya Takamoto⁹, Hongru Su⁹, Masahiko Shimada⁹, Yuko Shimamura⁹, Shuichi Masuda⁹, Shuji Ando¹⁰, and Norio Ohashi^{9*}

¹Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka 420-8637; ²Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Public Health and Environment Center, Hiroshima 734-0007; ³Akita Research Center for Public Health and Environment, Akita 010-0874; ⁴Fukushima Institute for Public Health, Fukushima 960-8670; ⁵Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki 889-2155; ⁶Mahara Institute of Medical Acarology, Tokushima 779-1510; ⁷Myojin Clinic, Wakayama 649-4223; ⁸Tamaki Hospital, Wakayama 646-0033; ⁹Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Integrated Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526; and ¹⁰Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

SUMMARY: Tsutsugamushi disease and Japanese spotted fever are representative rickettsioses in Japan, and are caused by infection with *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia japonica*, respectively. For molecular-based diagnosis, conventional PCR assays, which independently amplify respective rickettsial DNA, are usually used; however, this approach is time-consuming. Here, we describe a new duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *O. tsutsugamushi* and spotted fever group rickettsiae, and its evaluation using several PCR conditions in 6 public health laboratories. The detection limit of the assay was estimated to be 10² copies and the sensitivity was almost identical to that of 3 conventional PCR methods. A total of 317 febrile patients were selected as clinically suspected or confirmed cases of rickettsioses. The detection efficiency of this assay for *O. tsutsugamushi* from blood or skin (eschar) specimens appeared to be almost the same as that of the conventional PCR method, even when performed in different laboratories, whereas the efficiency for spotted fever group rickettsiae tended to be higher than that of the 2 traditional double PCR assays. Our duplex real-time PCR is thus a powerful tool for the rapid diagnosis of rickettsioses, especially at the acute stage of infection.

課題(活動予定)

- 感染研HP(感染症の話等)のupdate
 - 検査施設情報 ~アンケート調査による情報の更新
- 課題の洗い出し
 - マニュアル内容の追加・更新
 - 検査系のトラブルシューティング
- 症例解析

14. アデノウイルス

衛生微生物技術協議会・第40回研究会
2019年7月10日（水） 11:10～12:10
国際第二会議室

アデノウイルスレファレンスセンター会議： アデノウイルス型別法の20年



国立感染症研究所
感染症疫学センター 第4室長
藤本 嗣人

地区レファレンスセンター

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

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

東海・北陸地区

福井県衛生環境研究センター

近畿地区

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

中国・四国地区

広島市衛生研究所

九州地区

宮崎県衛生環境研究所 ⇒ 熊本県保健環境科学研究所？



咽頭
結膜熱：
PCF



流行性角結膜炎：EKC



感染性胃腸炎

- 炎症反応が主体。
- アデノウイルスの種・型
標的器官が異なる。

その他 肺炎、出血性膀胱炎、尿道炎 等

種別の重要性： 種と疾患が一致

アデノウイルスは7種

A～G

A種

F種：**消化器**

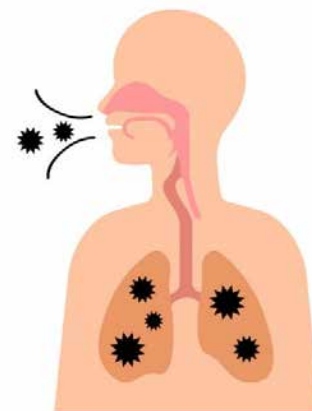
G種



B種：

C種：**呼吸器**

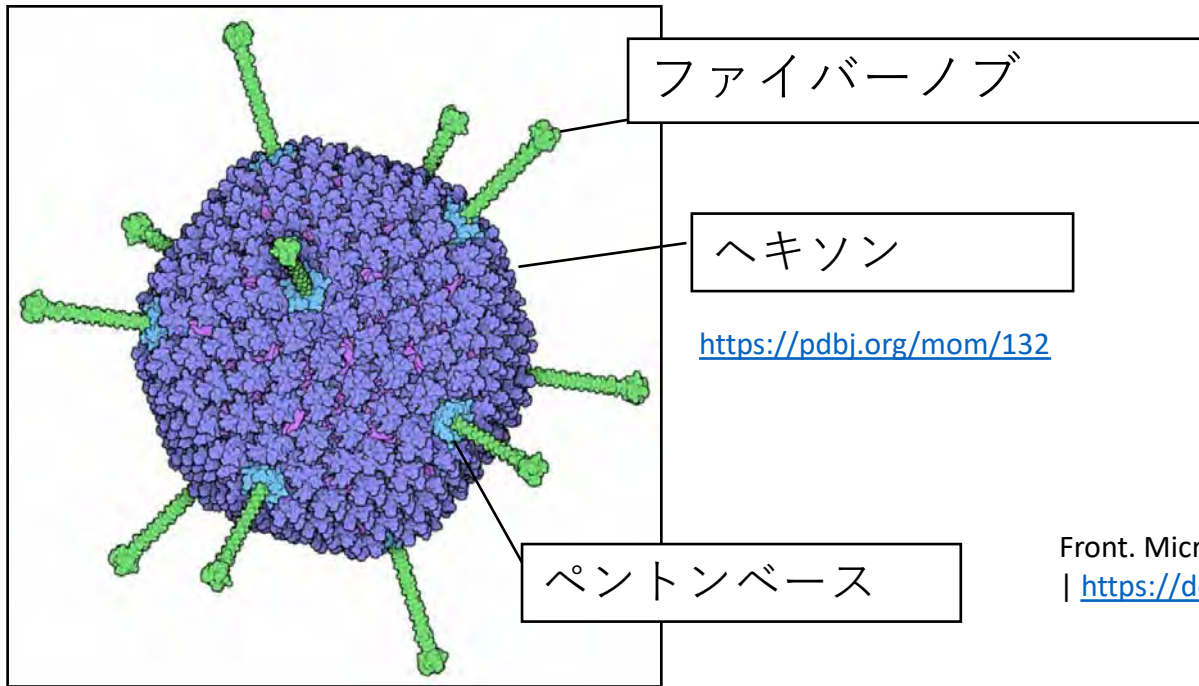
E種：



D種：眼

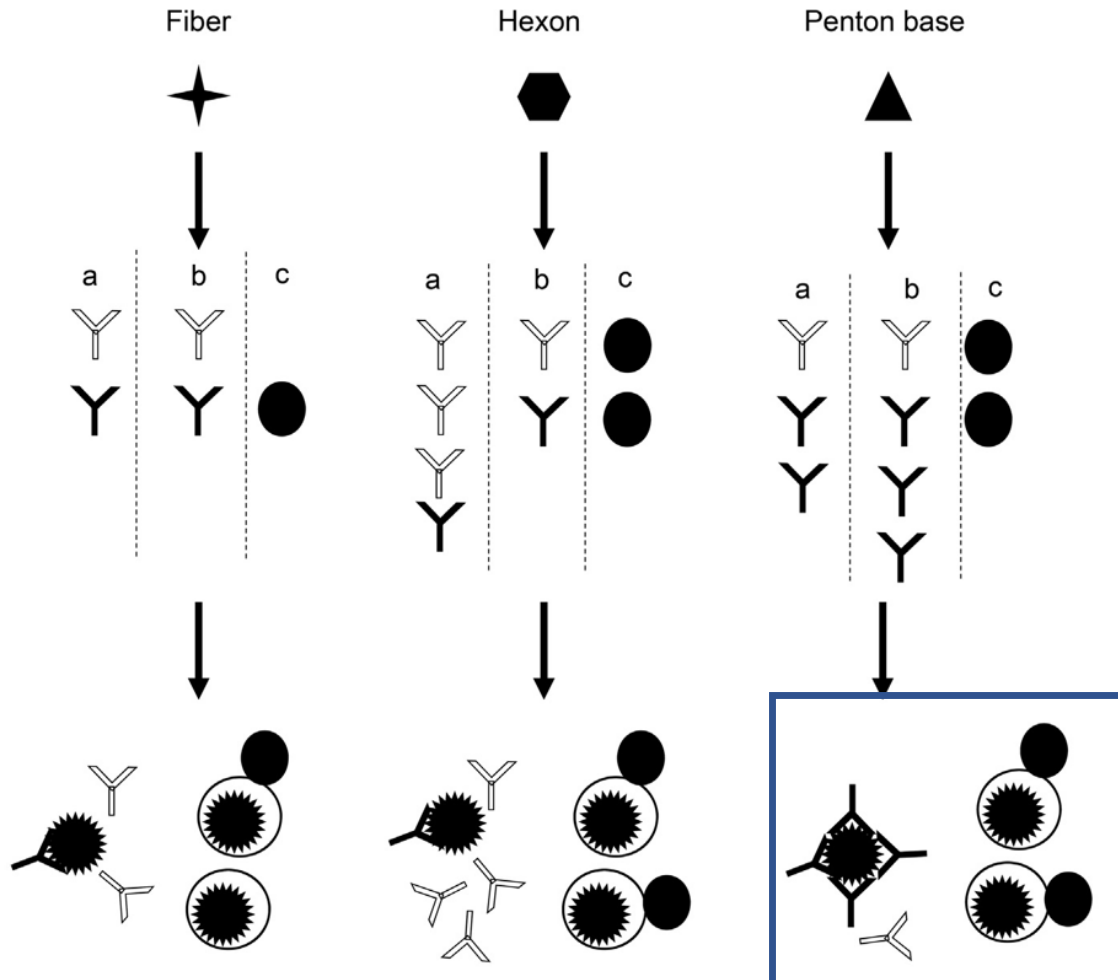
(B種、C種、E種)

アデノウイルスの表面構造とゲノム



Front. Microbiol., 11 September 2018
| <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02178>

中和に関与する領域がヘキソンだけでなく、ペントンベースやファイバーにも 存在することが示されつつある。



ペントンベース
による免疫

ペントンベースは、血清および粘膜部位の両方において
高レベルの中和抗体応答を誘導

2019年現在

・アデノウイルス検査を

ペントン、ヘキソン、ファイバー領域を含めて実施することが必要な状況になっている。



複数領域の検査手法はマニュアルに掲載している



最新の参照配列を2019年7月に地区レファレンスセンターに配布

54型：EKCアウトブレイク



8型や54型（D種）はEKCの症状重く、院内感染

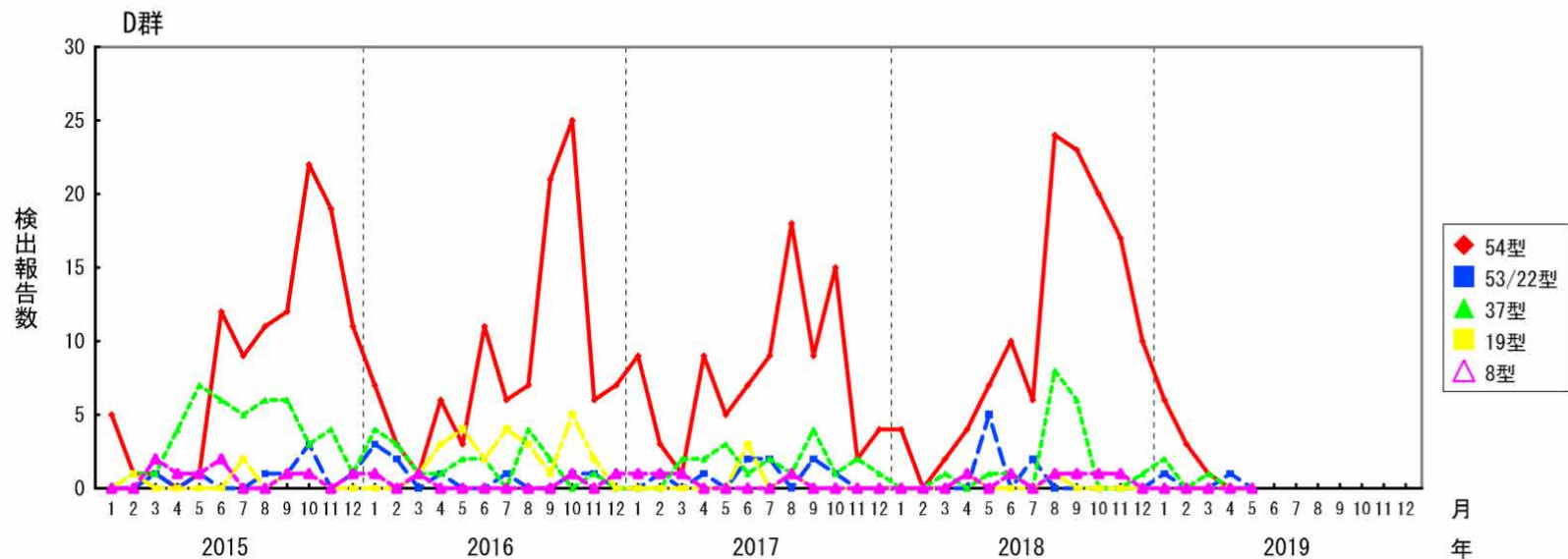
アデノウイルス月別分離・検出報告数の推移、過去4年間との比較、2015～2019年

（病原微生物検出情報：2019年5月31日 作成）

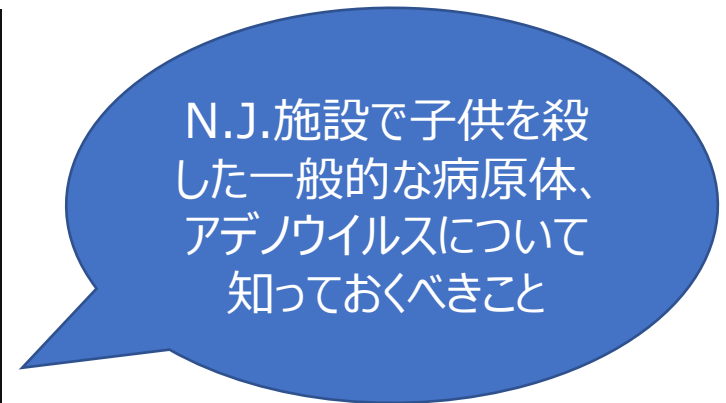
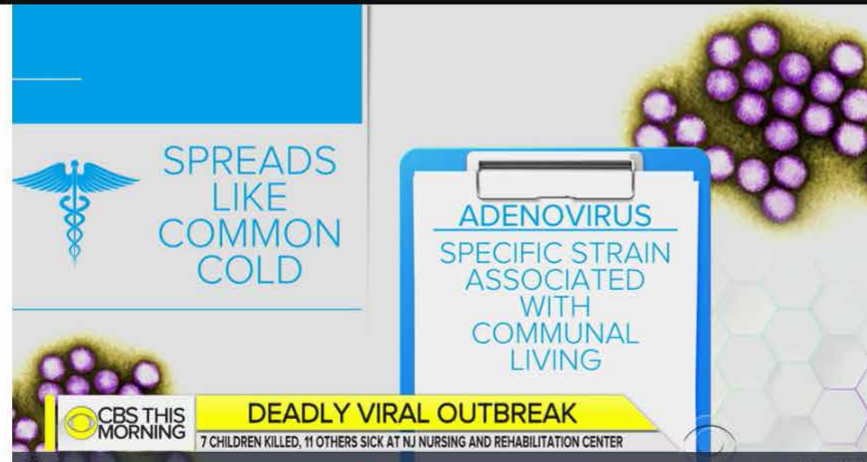
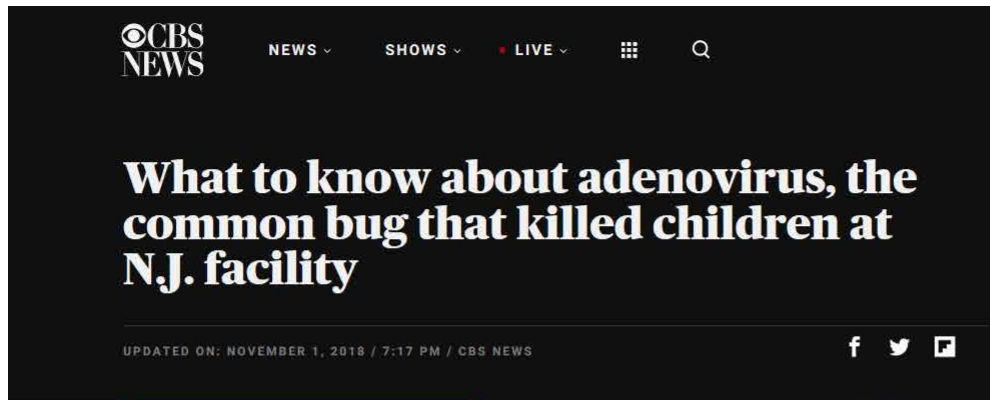
* 各都道府県市の地方衛生研究所等からの分離／検出報告を図に示した

IASR

Infectious Agents Surveillance Report

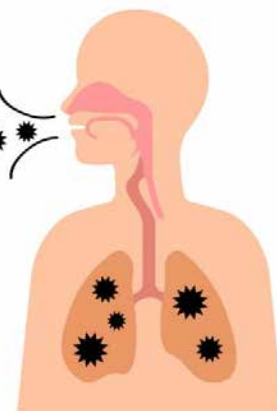
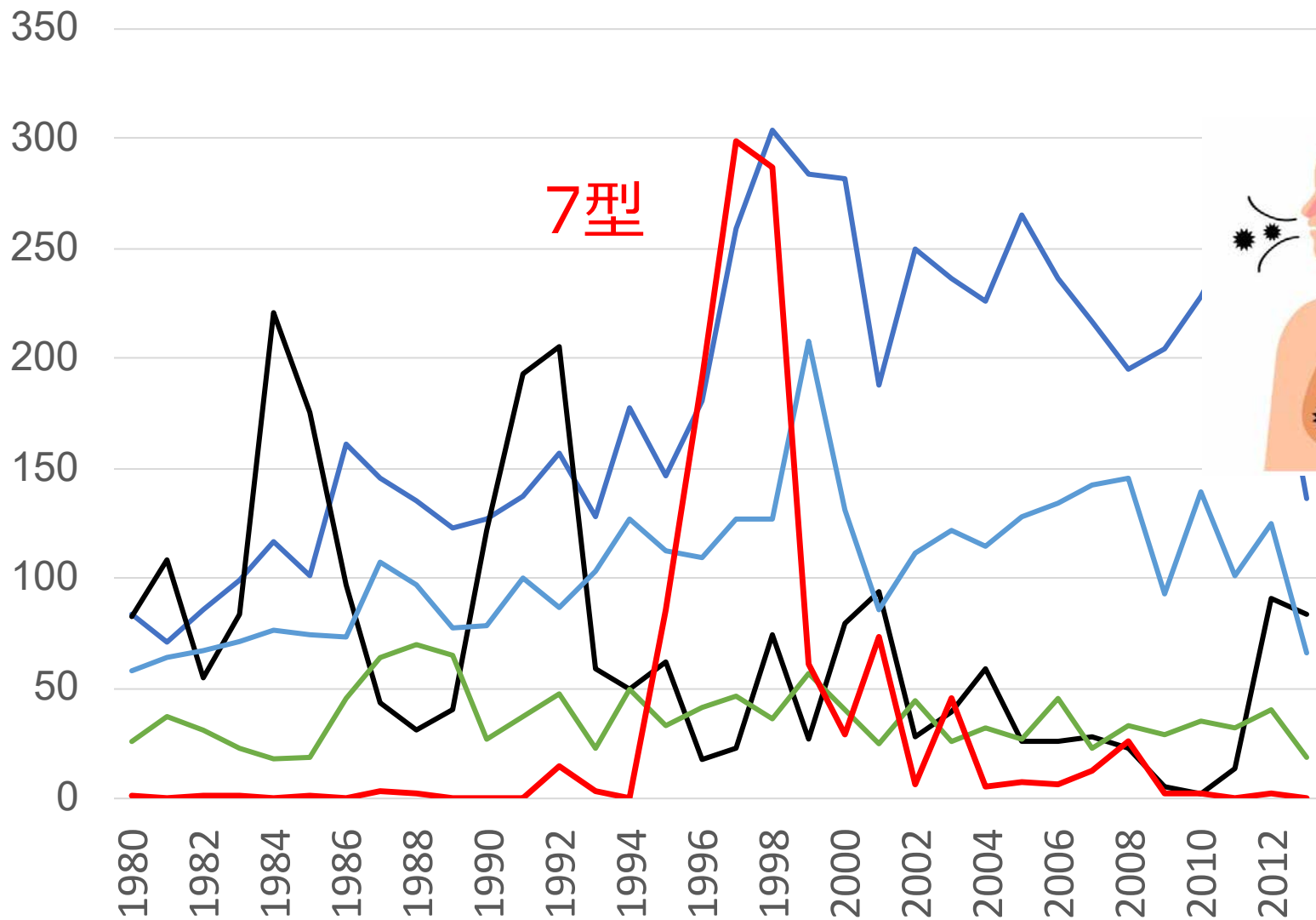


2018年、**7型が米国で流行し死亡例も出て大きな問題**
日本でも2018年に呼吸器の重症感染症例等から7型を検出。



CBSニュース 2018/11/1

1995～1999年：7型日本で流行



まとめ

- アデノウイルスは種と型により病原性が異なる
- 型別に複数領域の塩基配列決定は必須
- 2015～2018年に54型によるEKC多発。
- 7型の流行で米国等で致死的な呼吸器感染症が2018年に日本でも見られた。



ご清聴ありがとうございました。

15. 大腸菌

衛生微生物技術協議会第40回研究会・熊本
レファレンスセンター等関連会議
「大腸菌」

演者1

井口 純（宮崎大学・農学部）

「大腸菌のOg-/Hg-typing PCR法について」

演者2

泉谷 秀昌（感染研・細菌Ⅰ）

「EHEC MLVAについて」

衛生微生物技術協議会・第40回研究会
レファレンスセンター等関連会議・大腸菌
(熊本市国際交流会館：7月10日 11:10-12:10)

Og- and Hg-typing PCR

大腸菌の血清型をPCRで判定できる手法

宮崎大学 農学部 畜産草地科学科

井口 純

iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp

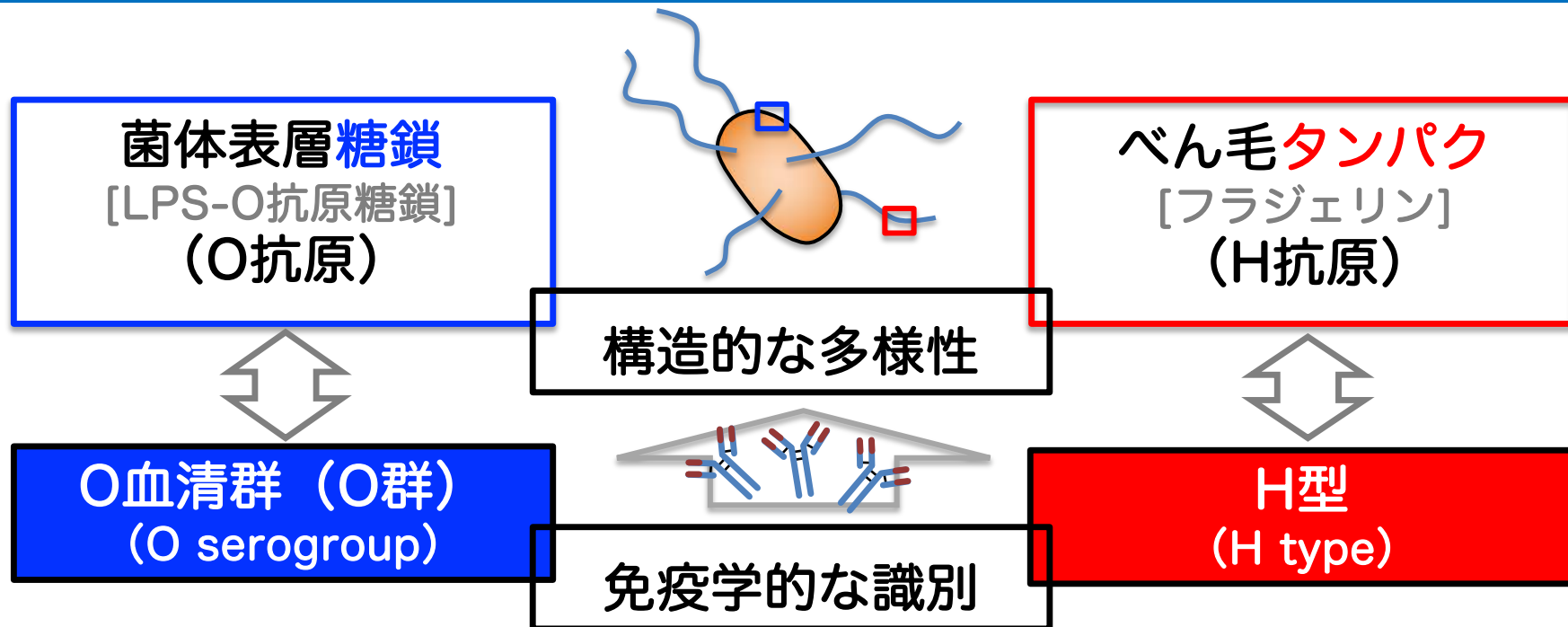


宮崎大学
University of Miyazaki

本日のテーマ

1. 大腸菌血清型の概要
2. Og-typing PCRについて
3. Hg-typing PCRについて
4. 参考情報
5. まとめ

大腸菌の血清型 (serotype) 「O:H型」



国際大腸菌血清型別レファレンスセンター
デンマーク国立血清学研究所 (SSI : Statens Serum Institut)

O群	血清型	H型
01-0188 (欠番 : 31, 47, 67, 72, 94, 122) (亜型 : 18ab/ac, 28ab/ac, 112ab/ac)	タイプ	H1-H56 (欠番 : 13, 22, 50)
185種類	種類	53種類

血清型別の特徴

- ・ 適度な分解能： $185 \times 53 = \underline{9805}$ (≒MLST：multi-locus sequence typing)
 - ・ 血清型が同じ：系統的にごく近縁な菌株
 - ・ 集団事例や流行株の調査
(集団感染事例の探知、汚染源や汚染経路の予測)
 - ・ 保有する病原性遺伝子セットが同じ可能性・高
(病原型やヒトに対するリスクの予測)
- MLVAやPFGEなどの分子疫学解析を行う時は、
血清型（特にO群）による事前の分類が前提
- ・ 豊富な情報 : 国際的に確立された手法
病原型、リスク、流行、疫学、ゲノムなどにリンク

抗血清試薬

メーカー	血清型	O群	H型
SSI Diagnostica (2016～) 国内代理店 ベリタス 完全タイピング	対応範囲 (single)	全・ 185種類	全・ 53種類
	混合血清 (pool)	23種類 (AA-XX)	6種類 (A-F)
	初期コスト (single+pool)	約470万円 (19,000x185+52,000x23)	約300万円 (52,000x59)
	作業時間 *増菌時間 (o/n) を含む	2-3日	3-4日
デンカ生研	対応範囲 (single)	50種類	22種類
	混合血清 (pool)	9種類 (1-9)	なし
	初期コスト (single+pool)	約16万円	約12万円
	作業時間 *増菌時間 (o/n) を含む	2日	3日

EHEC O104:H4 (*stx2+aggR*)によるアウトブレイク

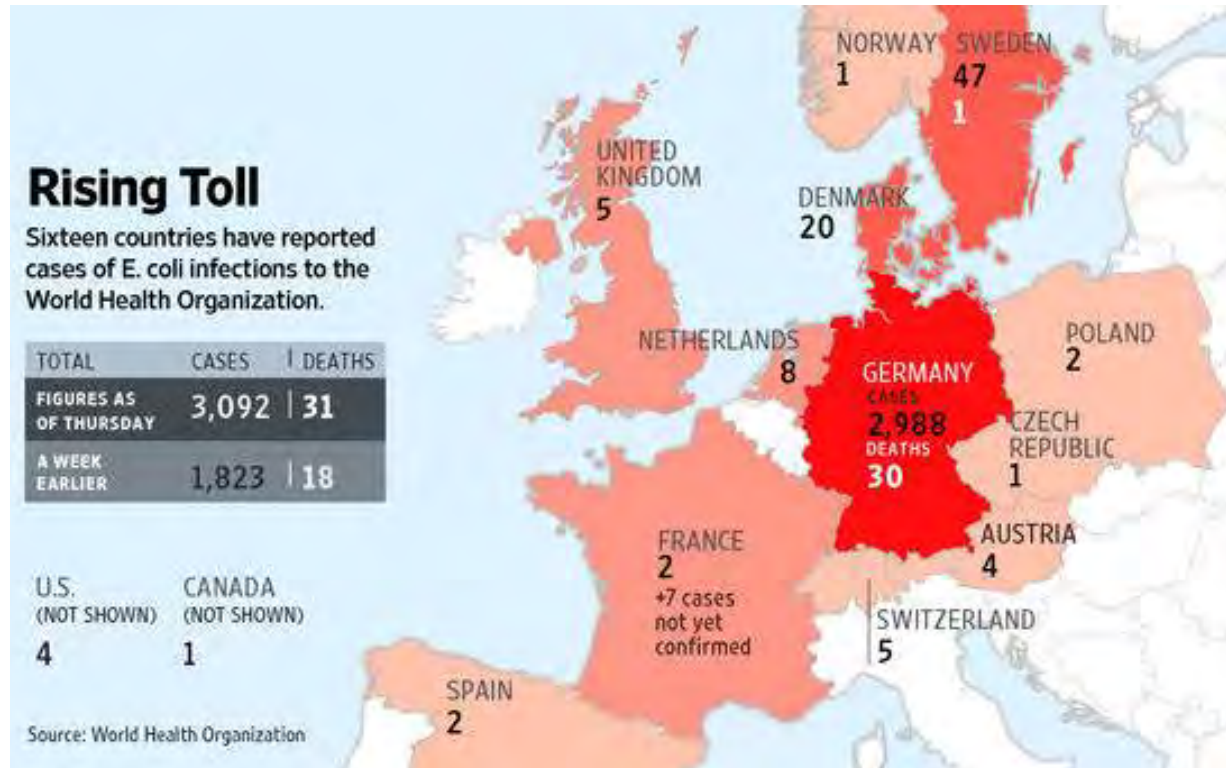
- ・感染者数：4,075名
- ・死亡者：50名
- ・16カ国で感染者
(2011. 7. 22 WHO report)

原因食品：発芽野菜



<https://www.barfblog.com/tags/o104/>

2011年5月 ドイツを中心に発生
(5月8日～7月4日)



<https://www.nap.edu/read/13423/chapter/2>

我が国への侵入にも警戒が必要だったが、、、

Og- and Hg-typing PCR

目標：既存のO群・H型分類に対応した
広域な遺伝学的分類手法の開発・評価

技術：PCR法（汎用性が高い・コストが低い・改良が容易）

Og-typing PCR

(*E. coli* O-genotyping PCR : ECOG-PCR)

20種類のmultiplex-PCRキット
(162種類のプライマーペアを含む)

Iguchi et al. J Clin Microbiol. 53: 2427-32 (2015)

Hg-typing PCR

(*E. coli* H-genotyping PCR)

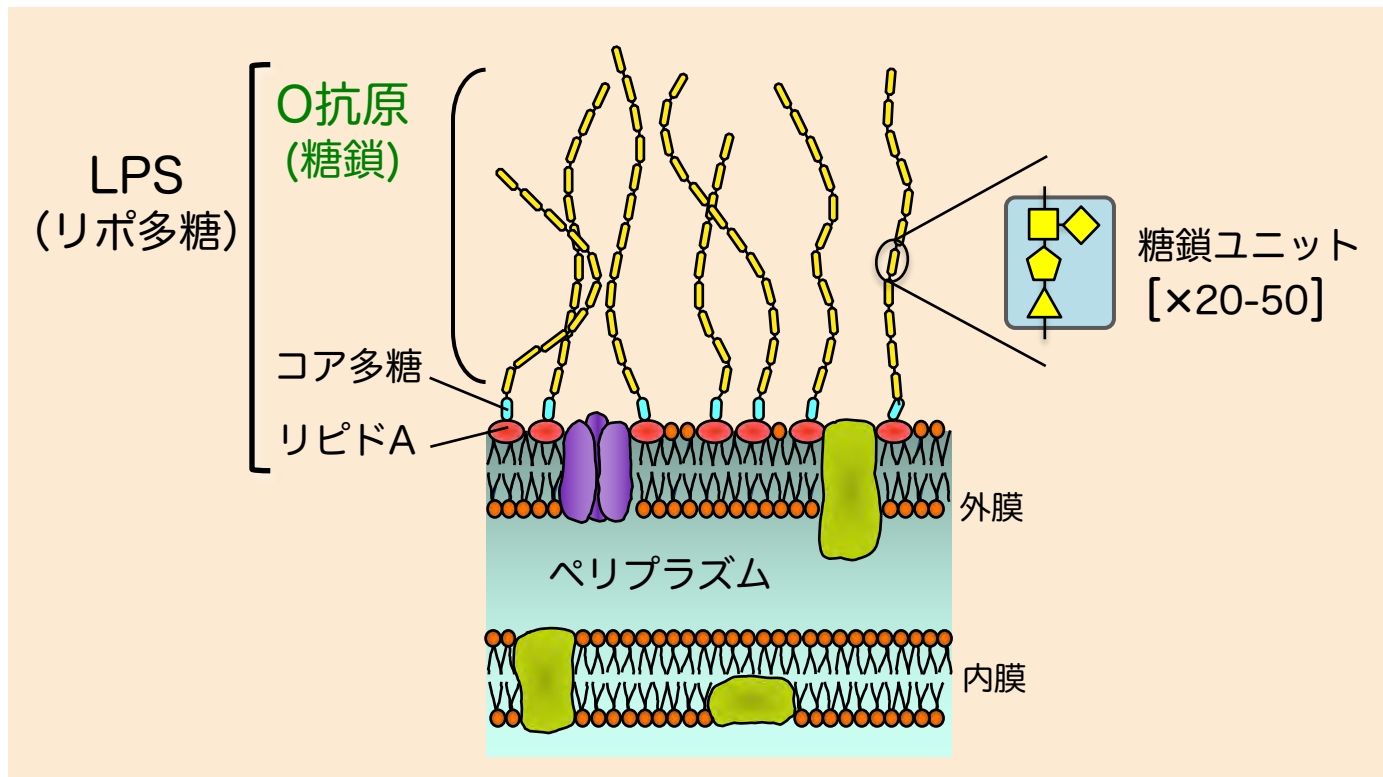
10種類のmultiplex-PCRキット
(51種類のプライマーペアを含む)

Banjo et al. J Clin Microbiol. 56: e00190-18 (2018)

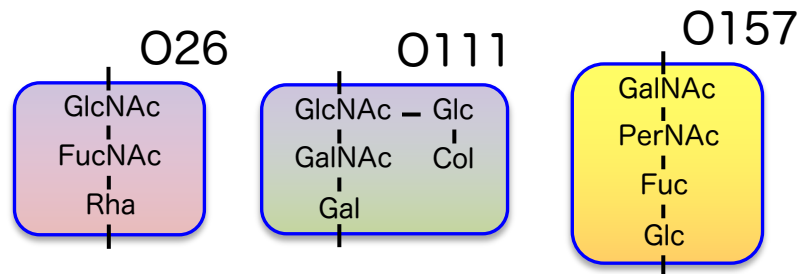
Og-typing PCR

O抗原

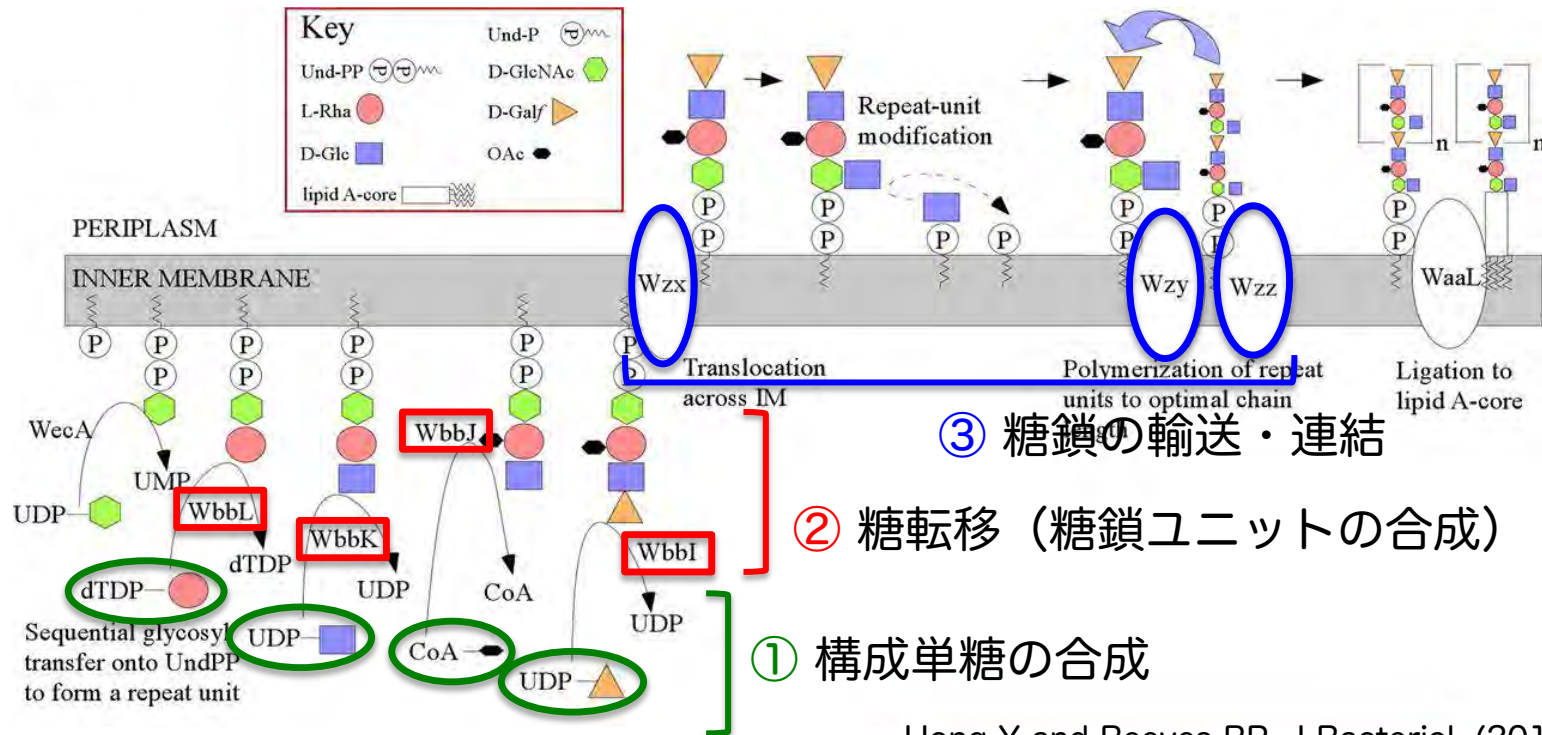
グラム陰性菌の菌体表層



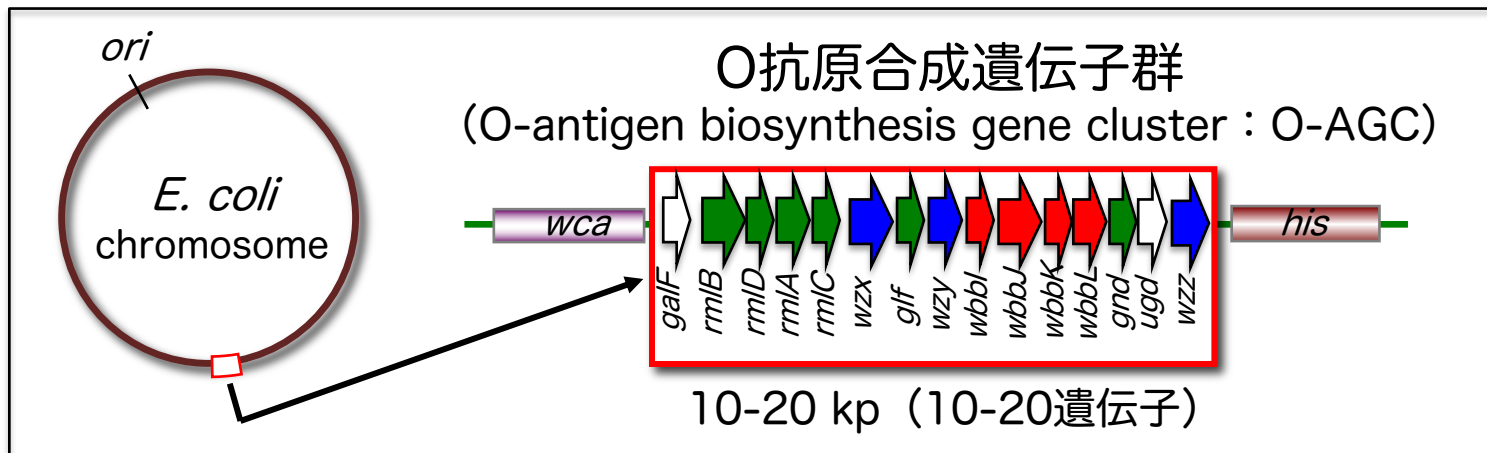
主なO群の
糖鎖ユニットの構造



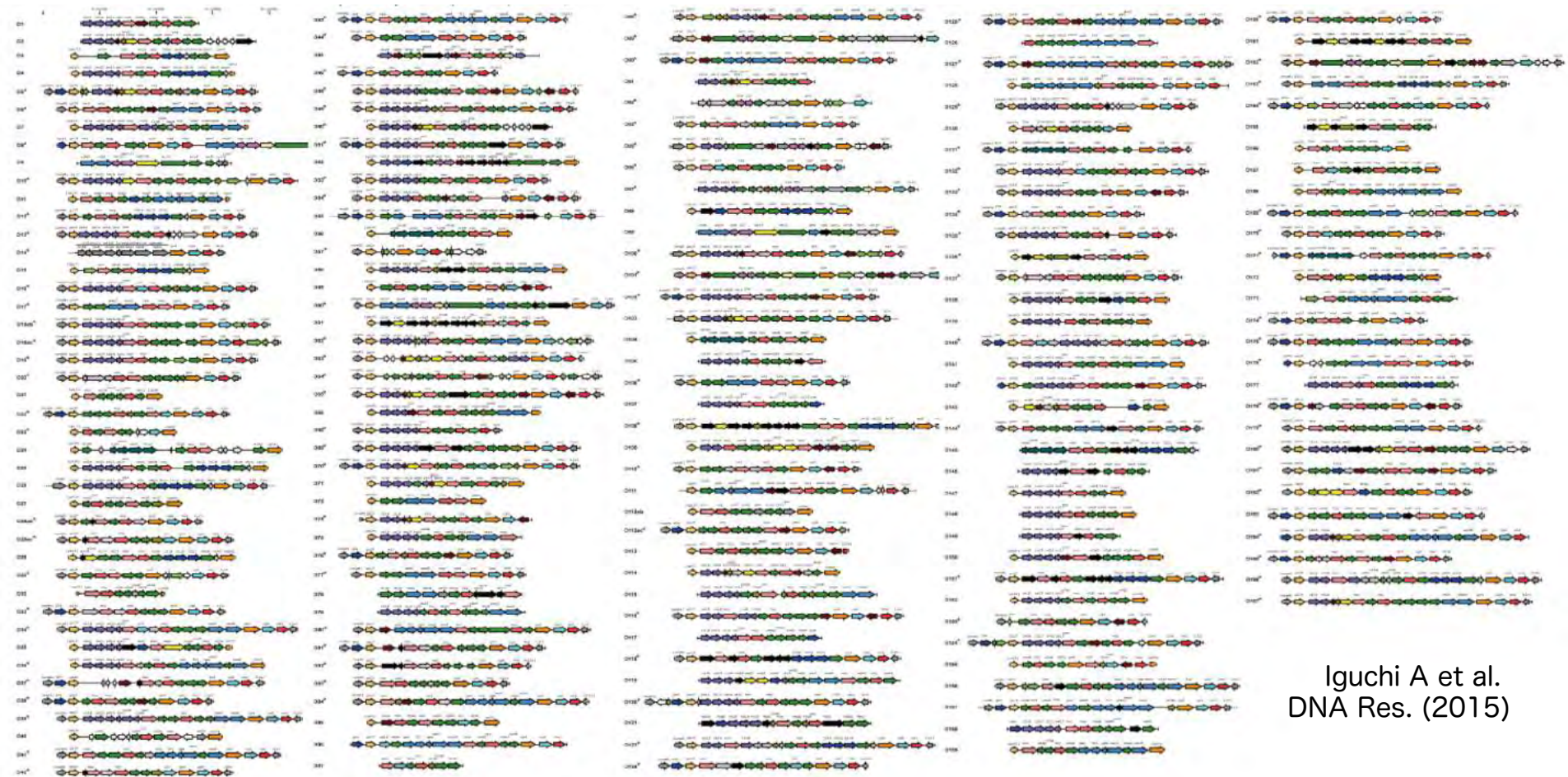
O抗原の合成に関わる遺伝子（群）



Hong Y and Reeves RP. J Bacteriol. (2014)より改変



O抗原合成遺伝子群の全体像



Iguchi A et al.
DNA Res. (2015)

184種類のO群 (O1~O187)

*O188は2015年に追加

O抗原合成遺伝子群の全体像

- すべてのO抗原合成遺伝子領域がいずれかのペア遺伝子を保有

③ 糖鎖の輸送・連結

wzx / *wzy* (O-unit flippase/polymerase)

または

wzm / *wzt* (ABC transporter)

- 異なるO群では各遺伝子の塩基配列の相同性が70%以下

→ O群を判定するマーカー遺伝子として有効

ただし、

35種類のO群では、*wzx/wzy*または*wzm/wzt*の相同性が高い ($\geq 97\%$)

15グループ (Gp) にグループ化

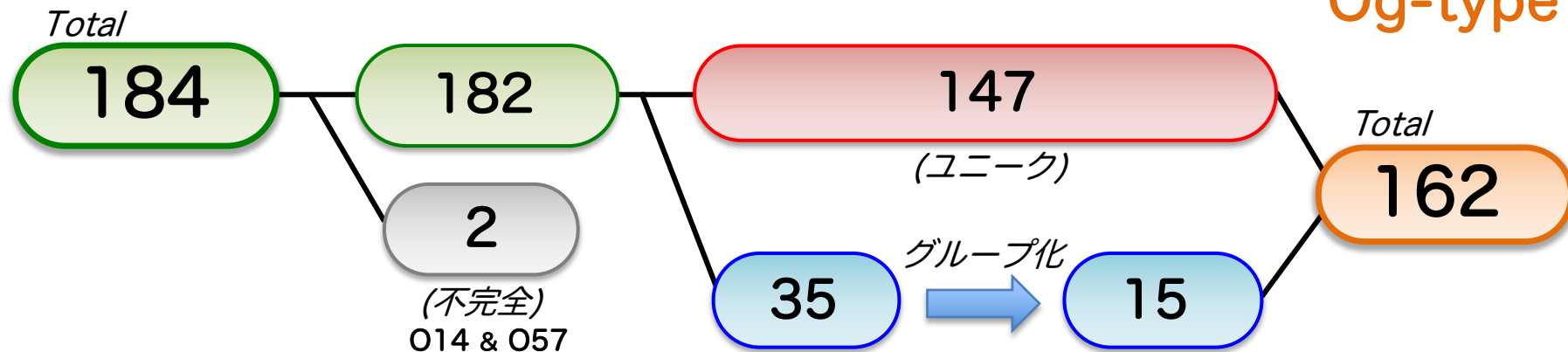
Gp	O群	Gp	O群	Gp	O群
Gp1	O20、O137	Gp6	O46、O134	Gp11	O153、O178
Gp2	O28ac、O42	Gp7	O2、O50	Gp12	O18ab、O18ac
Gp3	O118、O151	Gp8	O107、O117	Gp13	O124、O164
Gp4	O90、O127	Gp9	O17、O44、O73、O77、O106	Gp14	O62、O68
Gp5	O123、O186	Gp10	O13、O129、O135	Gp15	O89、O101、O162

O抗原合成遺伝子群 (Og-type) の整理

O群

O抗原合成遺伝子群の比較・整理

遺伝子型
Og-type



O20, O137	: Gp1
O28ac, O42	: Gp2
O118, O151	: Gp3
O90, O127	: Gp4
O123, O186	: Gp5
O46, O134	: Gp6
O2, O50	: Gp7
O107, O117	: Gp8
O17, O44, O73, O77, O106	: Gp9
O13, O129, O135	: Gp10
O153, O178	: Gp11
O18ab, O18ac	: Gp12
O124, O164	: Gp13
O62, O68	: Gp14
O89, O101, O162	: Gp15

O群

Og-type

PCRプライマーのデザインと評価

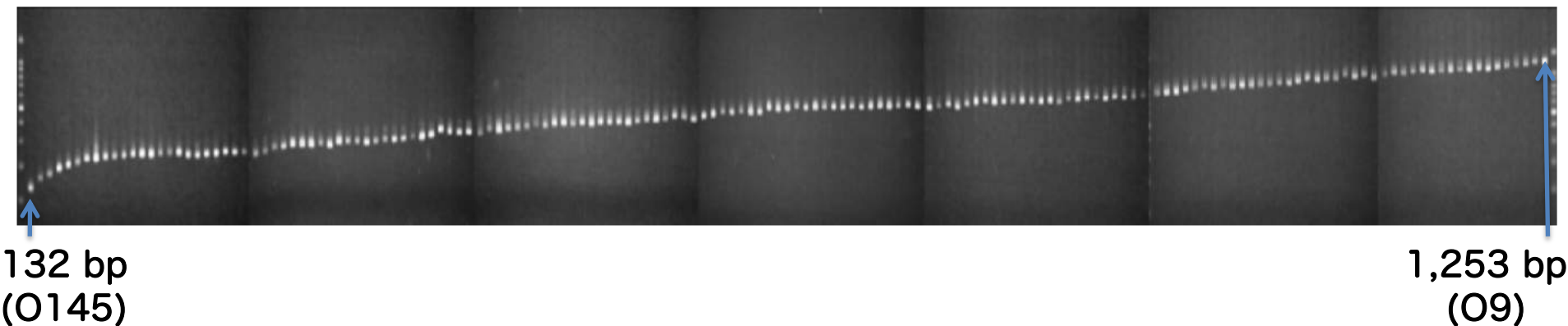
それぞれのOg-typeを検出する
プライマーをデザイン



全O群参考株
(184株) を用いて
特異性を確認

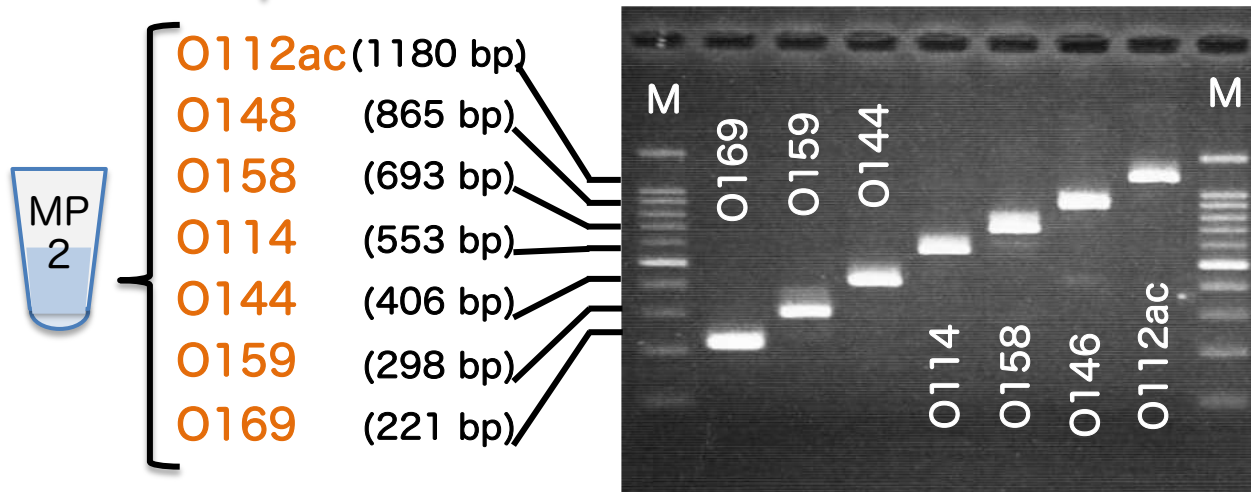
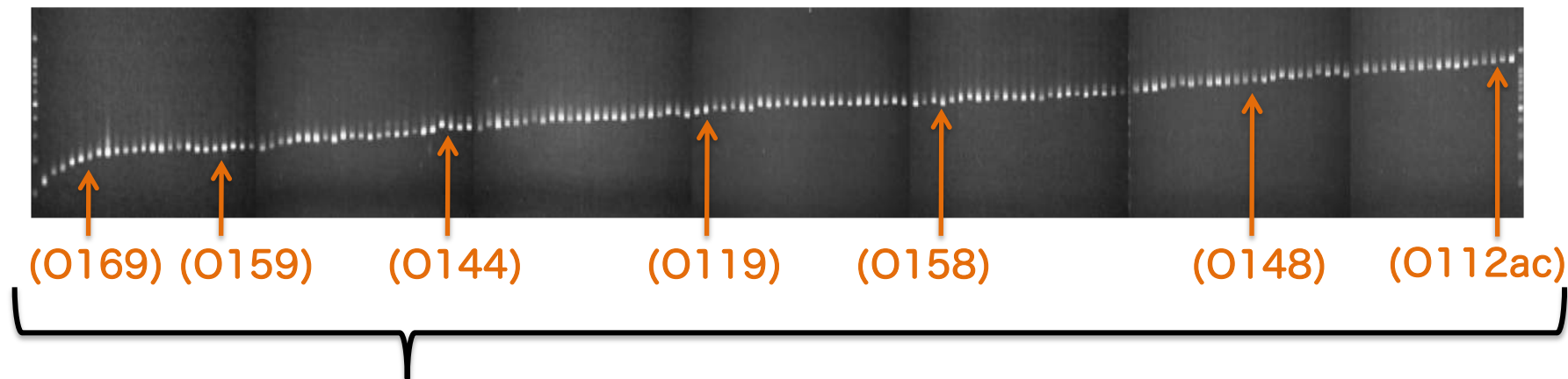
×
162種類

162種類のプライマーペアにより得られたPCR産物



Multiplex-PCRキットの構築

162種類の特異的PCRにより得られたPCR産物



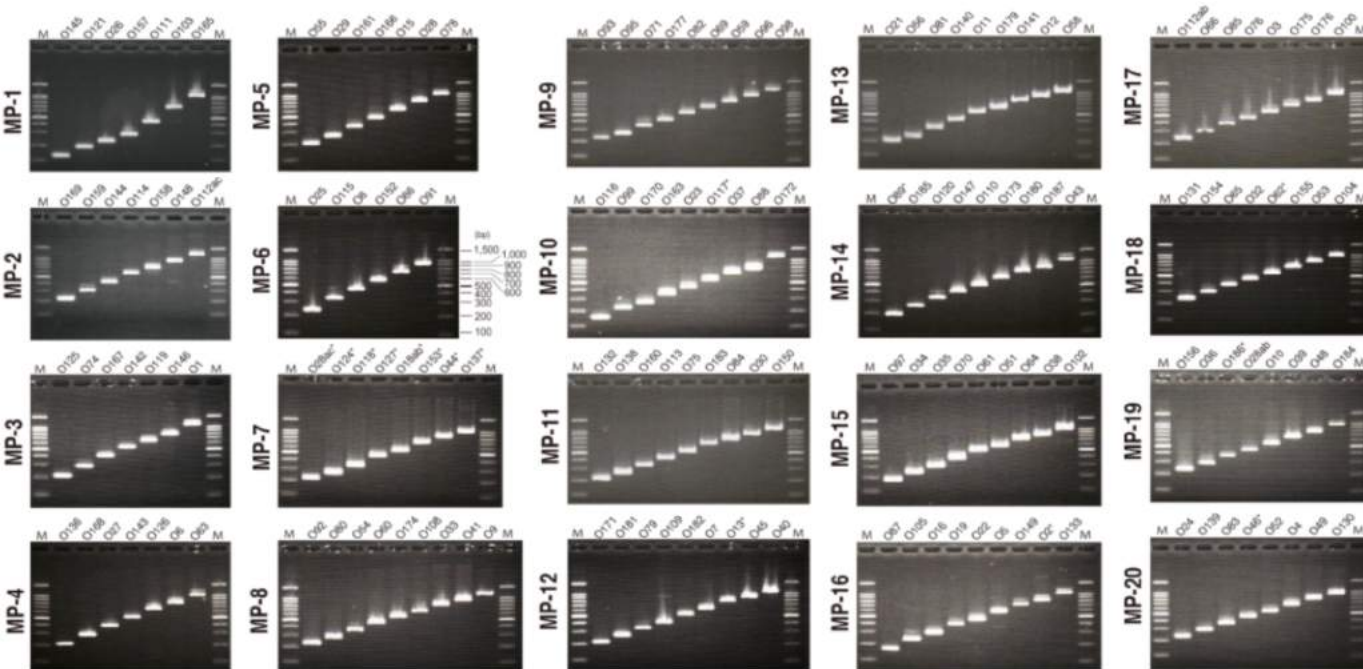
チューブ1本のPCR反応で7種類のOg-typeを検出

Multiplex-PCRキットの構築

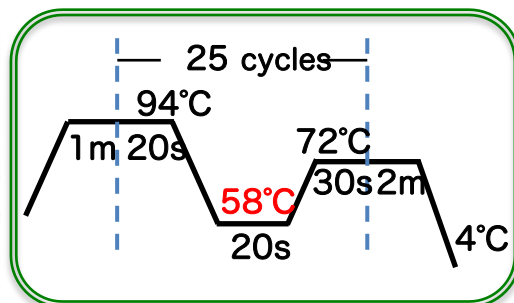
Og-typing PCR

MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	MP 7	MP 8	MP 9	MP 10	MP 11	MP 12	MP 13	MP 14	MP 15	MP 16	MP 17	MP 18	MP 19	MP 20
Og165 Og103 Og111 Og157 Og26 Og121 Og145	Og112ac Og148 Og158 Og114 Og144 Og159 Og169	Og1 Og146 O119 Og142 Og167 Og74 Og125	Og63 Og6 Og126 Og143 Og27 Og168 Og136	Og78 Og128 Og15 Og166 Og161 Og29 Og55	Og91 Og86 Og152 Og8 Og115 Og25	OgGp1 OgGp9 OgGp11 OgGp12 OgGp4 OgGp3 OgGp13 OgGp2	Og9 Og41 Og33 Og108 Og174 Og60 Og54 Og80 Og92	Og98 Og96 Og59 Og69 Og82 Og177 Og71 Og95 Og93	Og172 Og88 Og37 OgGp8 Og23 Og163 Og170 Og99 Og116	Og150 Og30 Og84 Og183 Og75 Og113 Og160 Og138 Og132	Og40 Og45 OgGp10 Og7 Og182 Og109 Og79 Og181 Og171	Og58 Og12 Og141 Og179 Og11 Og140 Og81 Og56 Og21	Og43 Og187 Og180 Og173 Og110 Og147 Og120 Og185 OgGp15	Og102 Og38 Og64 Og51 Og61 Og70 Og35 Og34 Og97	Og133 OgGp7 Og149 Og5 Og22 Og19 Og16 Og105 Og87	Og100 Og176 Og175 Og5 Og76 Og85 Og66 Og112ab	Og104 Og53 Og155 OgGp14 Og32 Og65 Og154 Og131	Og184 Og48 Og39 Og10 Og28ab OgGp5 Og36 Og156	Og130 Og49 Og4 Og52 OgGp6 Og83 Og139 Og24

↑ 主要EHECに関連する7種類のO群

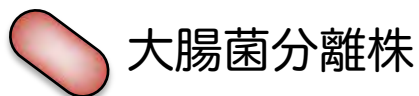


単一のPCR反応条件



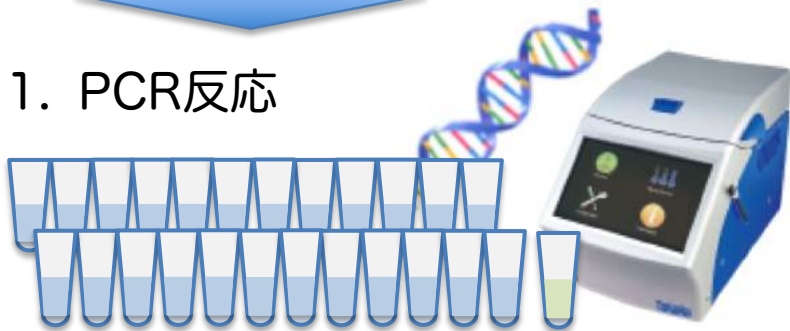
反応時間：約60分間

Og-typing PCR



DNA

1. PCR反応



+

2. 電気泳動によるPCR産物の確認

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 P



MP-18 (993 bp) ➡ Og104

完全タイピングの場合

	抗血清	PCR
網羅検査に必要な試薬類の総額(初期コスト)	470万円	20万円
1検体のコスト	2万円	1000円以下
検査に係る時間	2日	3時間

✓広範囲 ✓低コスト ✓短時間

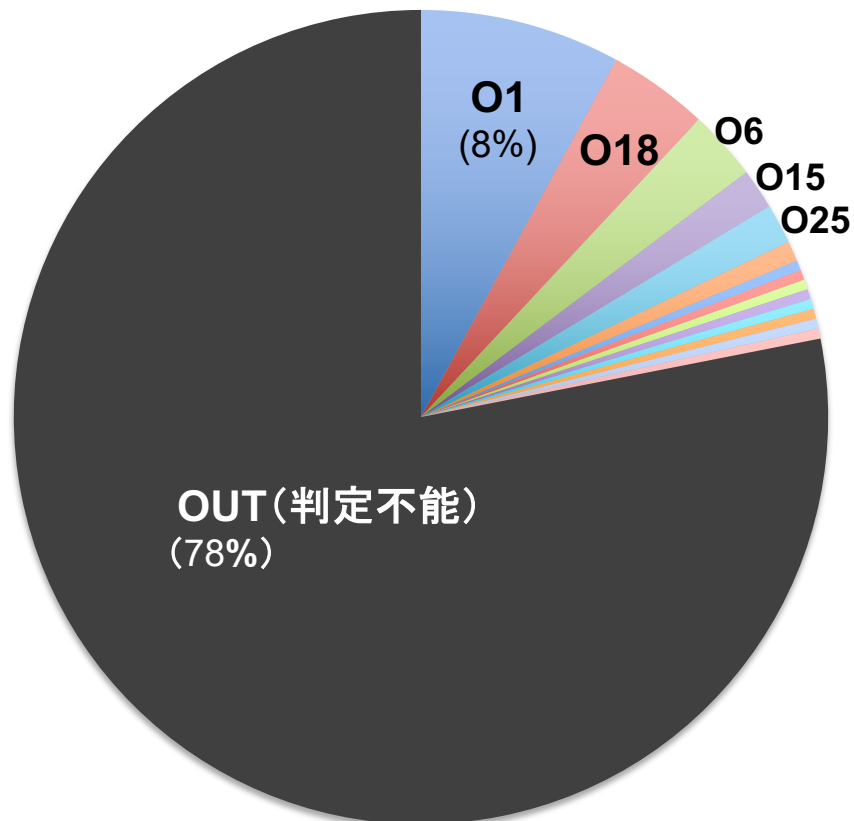
Og-type vs O群

全参考株：完全一致
試験株：ほぼ一致

健康人由来大腸菌のOg-typing PCR

デンカ生研・免疫血清

(14種類を確認)

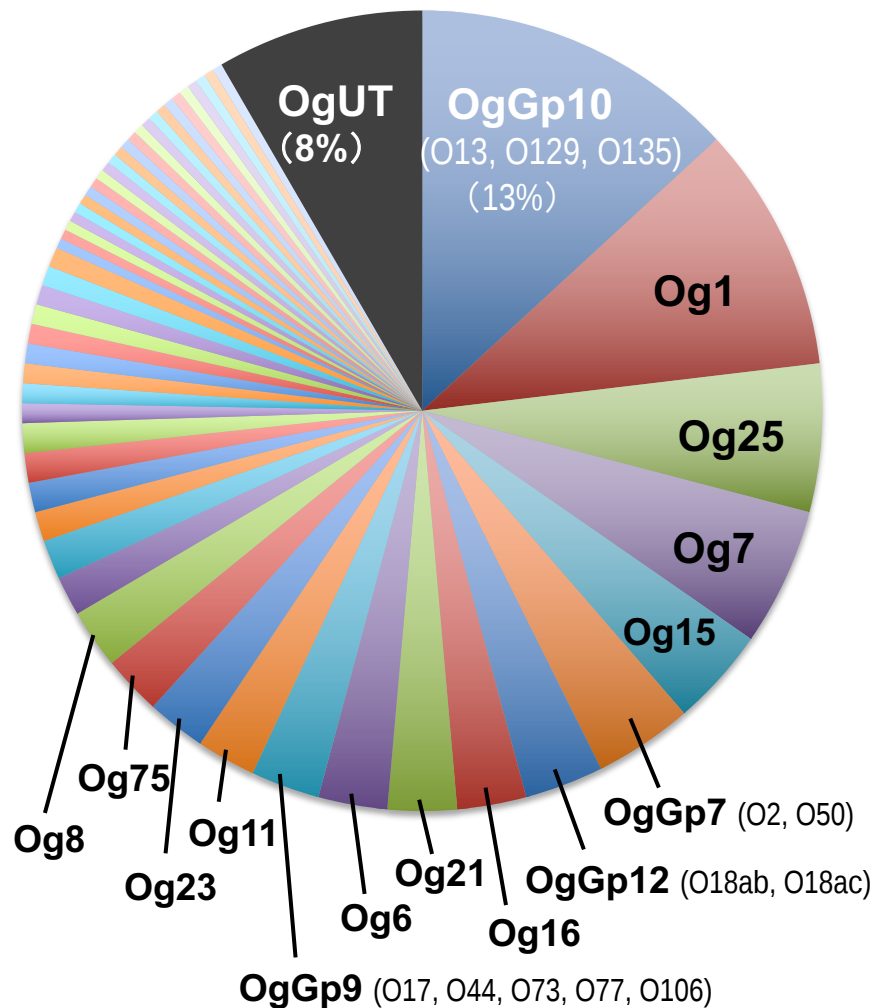


O18 : **OgGp12(O18ab/O18ac)**
OgGp10(O13, O129, O135), Og4, Og23

O15 : **Og15**, Og7

Og-typing PCR

(51種類を確認)



Og-typing PCRの注意点

- ・ Og-typeが判定できない (OgUT) 菌株あり (10%)

→既定型以外のOg-type (新規) の可能性

*重要度の高いものについてはゲノム配列情報を基に

新規Og-type (OgN) 検出PCRプライマーを開発済み

(OgN1, OgN8, OgN9, OgN10, OgN12, OgN31, OgN3, OgN5, OSB16)

- ・ Og-typeとO群が一致しない菌株あり (1%)

→Og-typeに対応するO抗原が発現していない

→抗血清による非特異的凝集

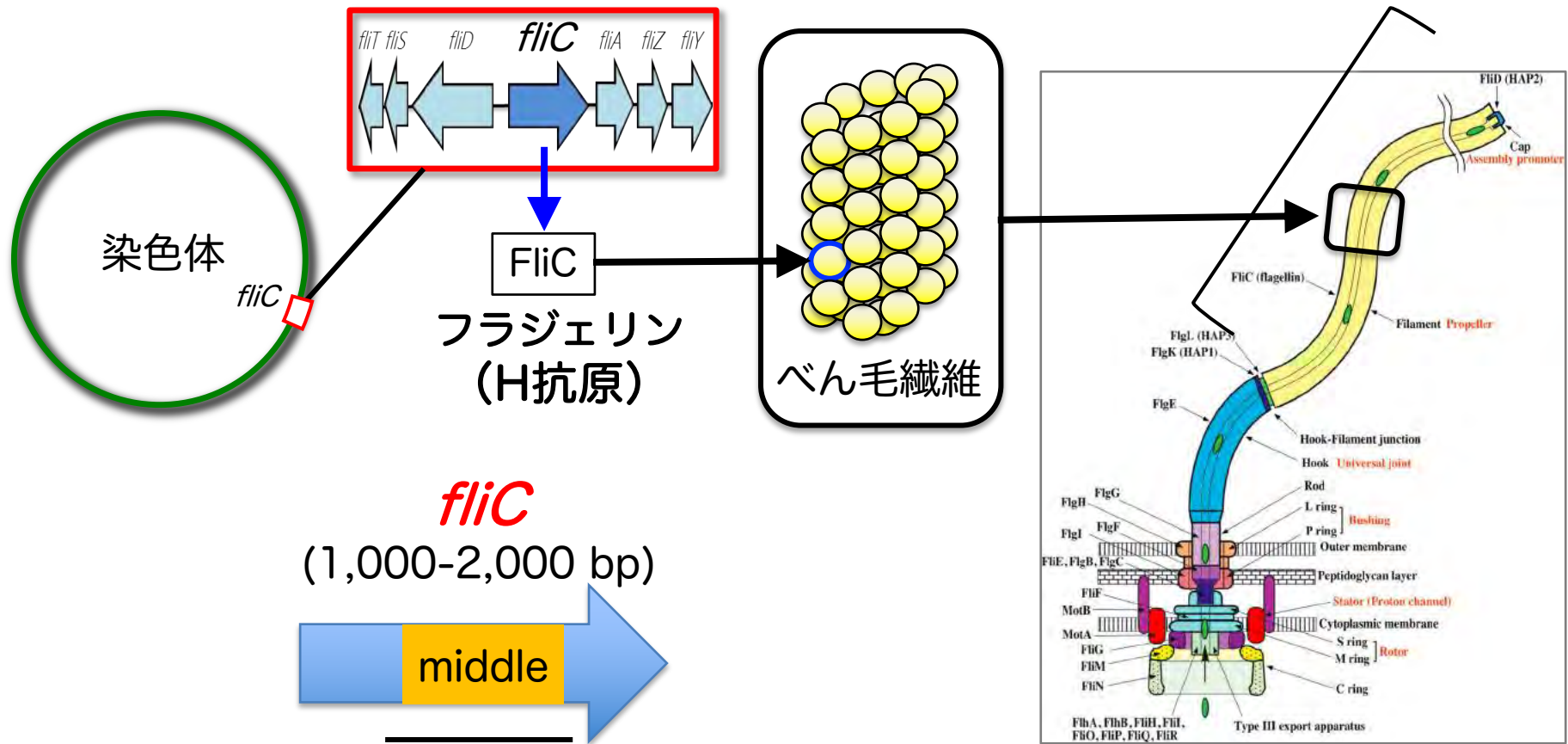
2種類のOg-typeが検出される菌株あり (1-2%)

→莢膜合成遺伝子群がOg-typeマーカー遺伝子と

相同な遺伝子を含む

Hg-typing PCR

H抗原=フラジェリンをコードする *fliC*



塩基配列の多様性が高い領域
(およそ90%以下)

→ H型を判定するマーカー配列として有効

SPRING-8 Information/Vol.6 No.5

ただし、
H1とH12の相同性は高い
(98%)

PCRプライマーのデザインと評価

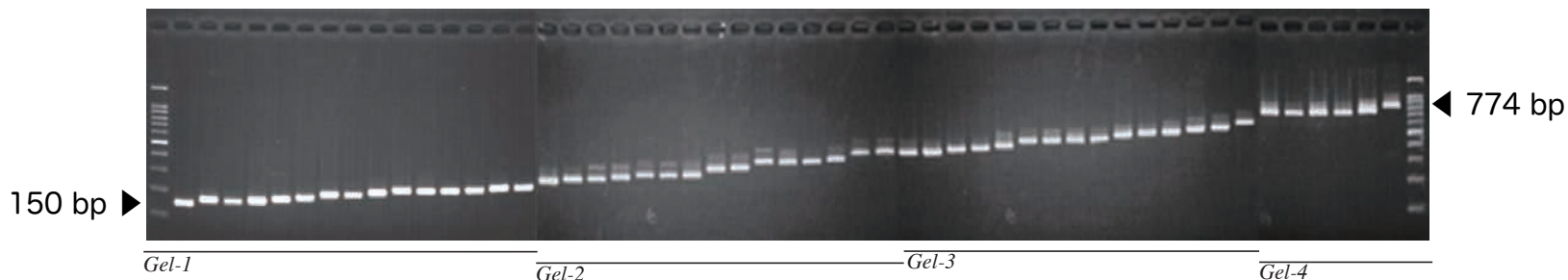
それぞれのHg-typeを検出する
プライマーをデザイン



全H型参考株
(53株) を用いて
特異性を確認

×
51種類

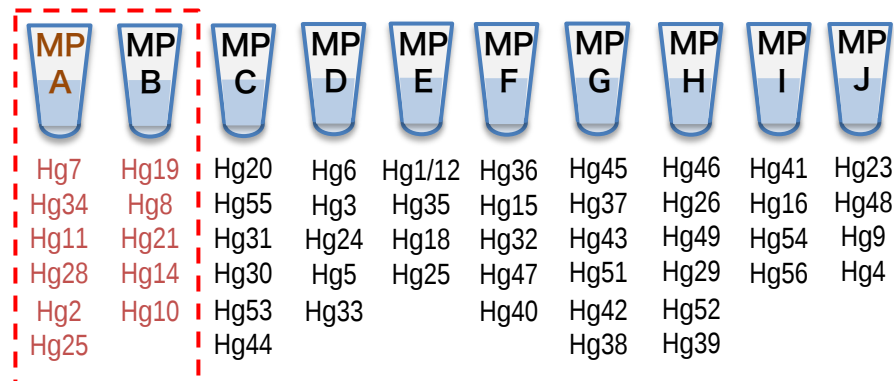
51種類のプライマーペアにより得られたPCR産物



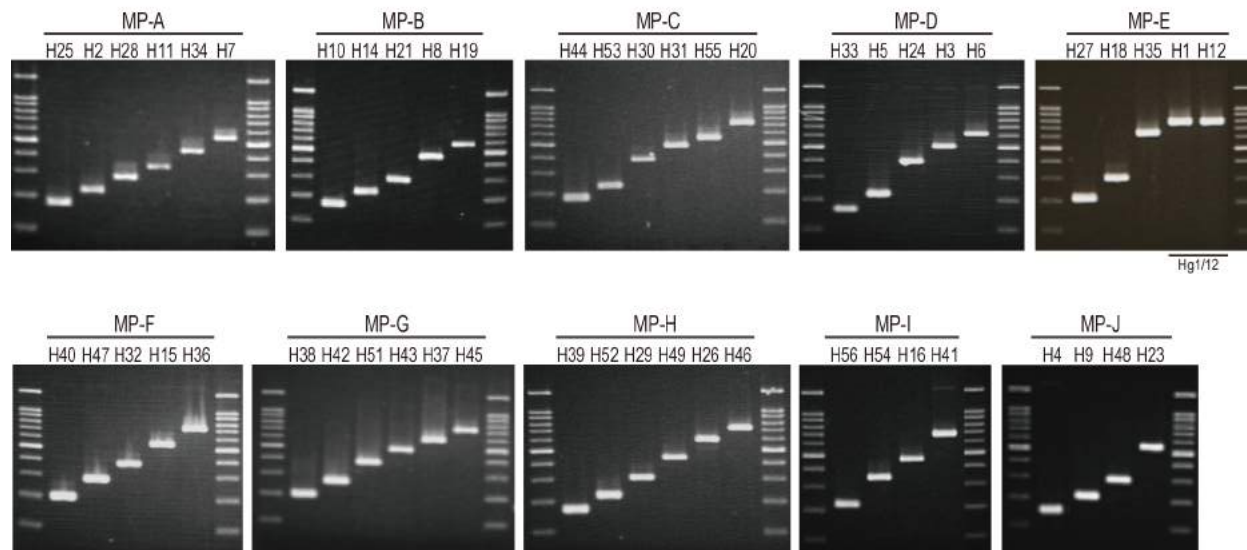
Multiplex-PCRキットの構築

Hg-typing PCR

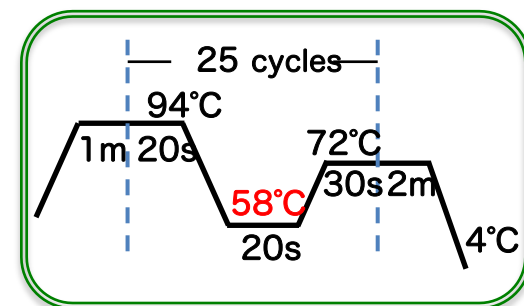
O群	主要H	その他H	
O157	H7		
O26	H11		
O111	H8	H11	H21
O103	H2	H11	H25
O121	H19		
O145	H28	H25	H34
O165	H25		
O91	H14	H10	H21
O45	H2		
O6	H10		
O178	H19		



主要EHECに関連する
11種類のH型

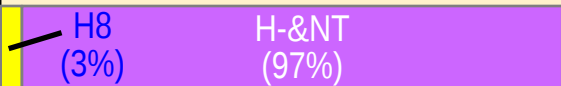
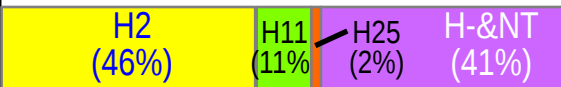
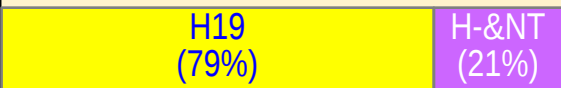
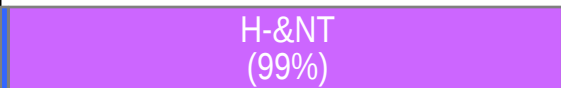
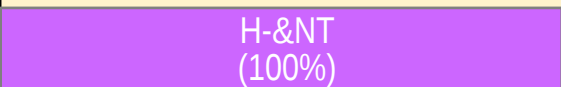


単一のPCR反応条件



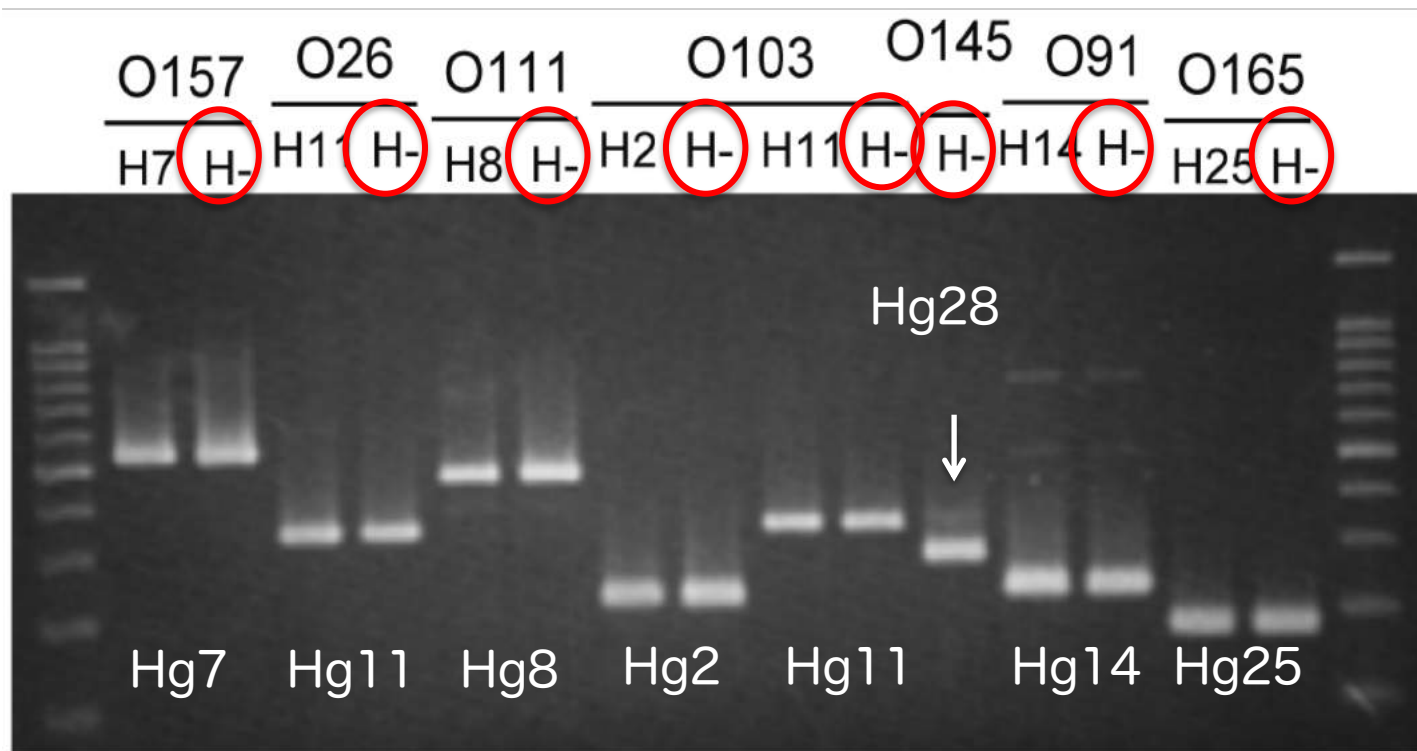
反応時間：約60分間

国内で分離される主要O群-EHECのH型

O血清群	報告数* (2,289)	H型の分布	主要な H型	その他の H型		参考文献
O157	1,355		H7			
O26	502		H11			
O111	78		H8	H11	H21	Ju W et al. Foodborne Pathog Dis 2014 Dallman T et al. JCM. 2012
O103	93		H2	H11	H25	Iguchi A et al. JCM. 2012
O121	67		H19			
O145	94		H28	H25	H34	Beutin L et al. PLoS one 2015 Prager R et al. Int J Med Microbiol 2014 Murakami K et al. PLoS one. 2014
O165	6		H25			
O91	15		H14	H21	H28	Madic J et al. Lett Appl Microbiol 2009 Rey J et al. Int J Food Microbiol 2006

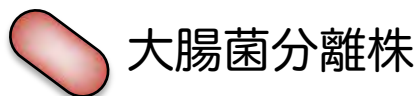
*IASR 36:119- (2015) 腸管出血性大腸菌検出例の血清型別臨床症状 2014年

非運動性株（H-）のHg-typing PCRの結果



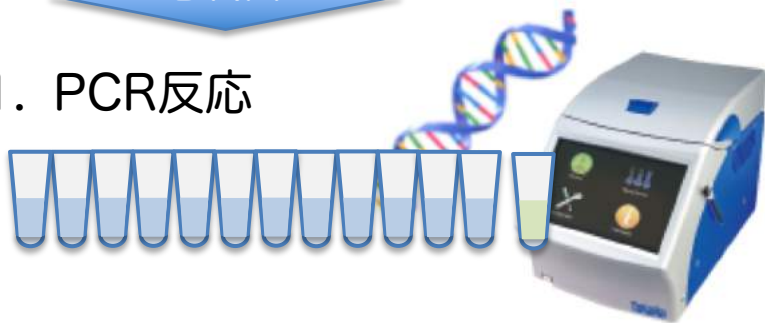
血清学的手法では判定できない**非運動性株（HNMまたはH-）**であっても、マーカー遺伝子（配列）は完全に保存されている場合が多く、**Hg-typing PCR**であれば判定可能

Hg-typing PCR



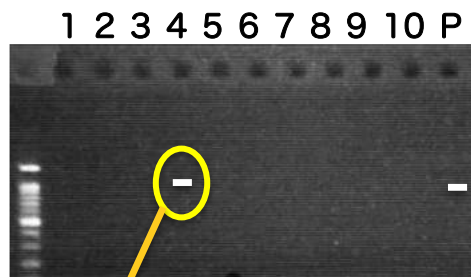
DNA

1. PCR反応



+

2. 電気泳動によるPCR産物の確認



MP-D (399 bp)  Hg24

完全タイピングの場合

	抗血清	PCR
網羅検査に必要な試薬類の総額(初期コスト)	300万円	10万円
1検体のコスト	2万円	700円以下
検査に係る時間	3日	3時間

✓広範囲 ✓低コスト ✓短時間

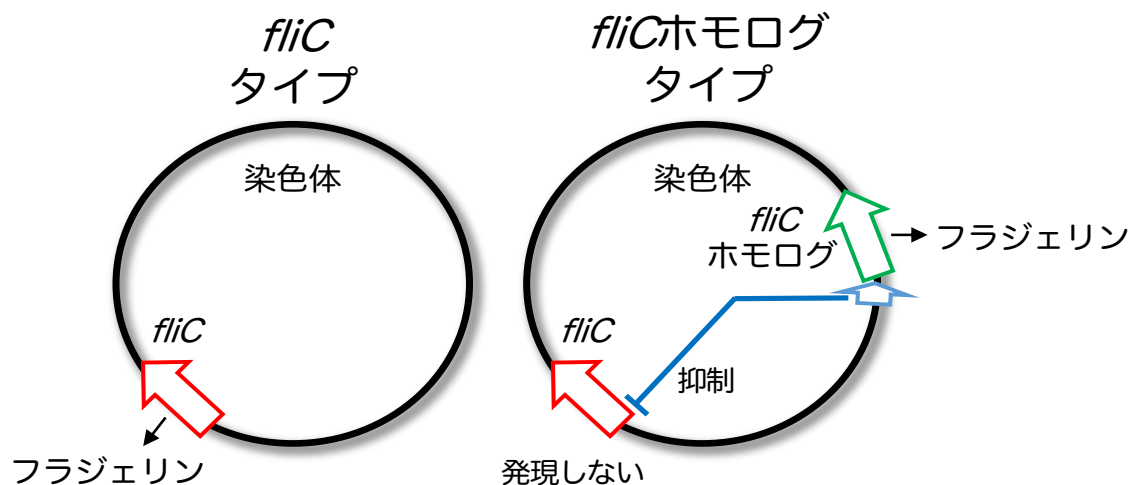
✓非運動性株でも判定可

Hg-type vs H型

全参考株：完全一致
試験株：ほぼ一致

Hg-typing PCRの注意点

- Hg-typeが判定できない（HgUT）菌株あり（1%未満）
 - *fliC*を含むゲノム領域の欠失
 - 既定型以外のHg-type（新規）の可能性
- 2種類のHg-typeが検出される菌株あり（1-2%）
 - 外来性領域上に *fliC*ホモログ（類似遺伝子）



*fliC*ホモログタイプのH型：

H3, H17, H35, H36, H44, H47, H53, H54, H55

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic E. coli Working Group in Japan.

Escherichia coli **O-genotyping PCR**; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping.

Journal of Clinical Microbiology 53(8):2427-32 (2015)

Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic E. coli Working Group in Japan.

Escherichia coli **H-genotyping PCR**; a complete and practical platform for molecular H-typing.

Journal of Clinical Microbiology pii: JCM.00190-18 (2018)

宮崎大学・井口研究室HPからダウンロード可

- ・ Og-, Hg-typing PCRの全プライマー配列（エクセルファイル）
- ・ 日本語版プロトコール（PDF）

問い合わせ先：Iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp

まとめ

- ・ Og-, Hg-typing PCRによって
広域、低コスト、短時間な判定が可能
- ・ PCR法によって得られる結果（遺伝子型、Og-, Hg-type）と、
抗血清を用いた凝集試験による結果（表現型、O群、H型）は
ほぼ一致（稀に一致しないこともある）
- ・ ベン毛を発現していない非運動性株（H-）でも
Hg-typeの判定は可能

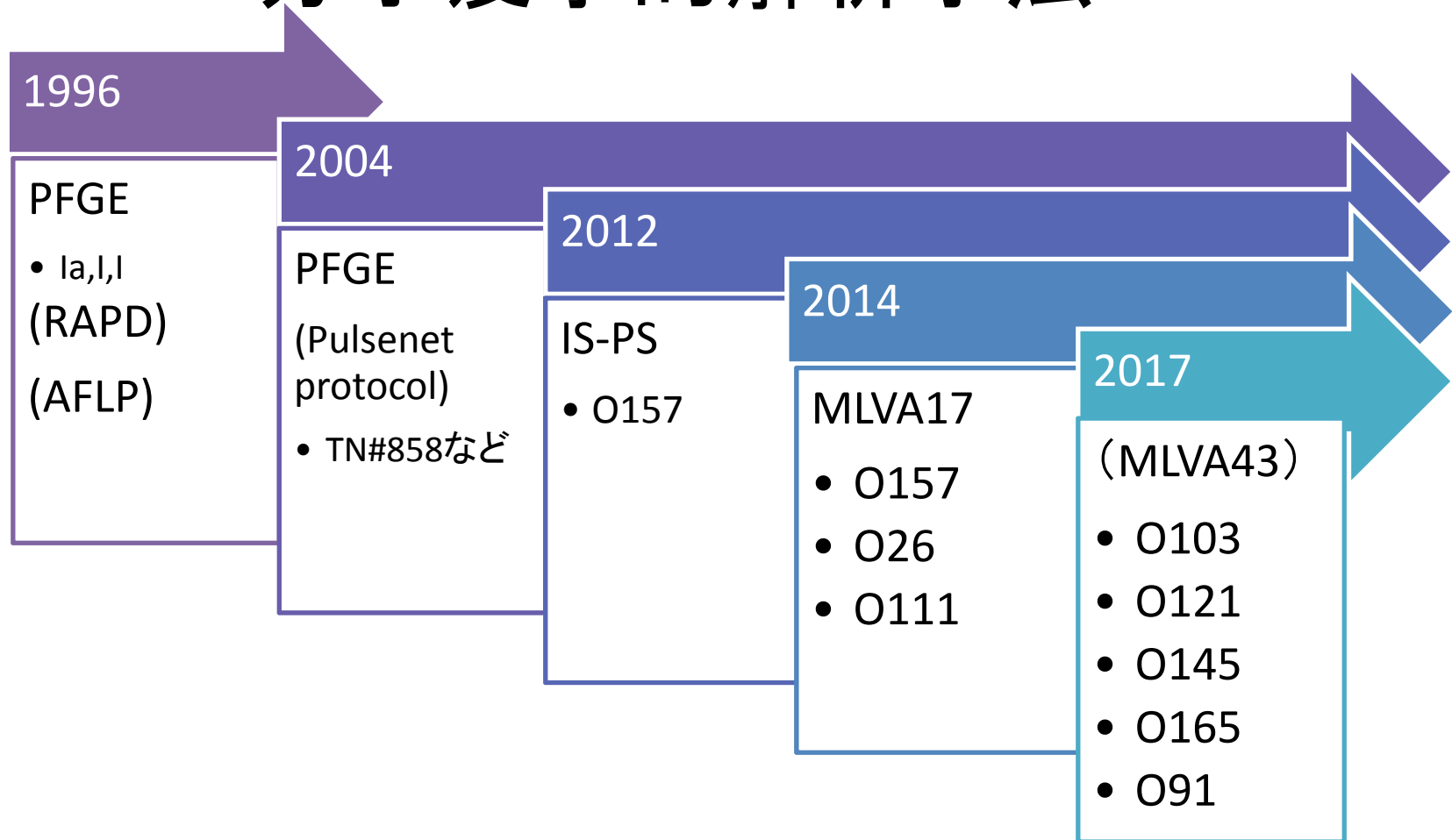
お願い

菌株に関する正しい情報を共有するために、**表現型と遺伝子型の結果は区別**し、PCR法によって得られた結果を報告書や論文に記載する場合は、「**Og**（例えばOg104）」または「**Hg**（例えばHg10）」として表記する。

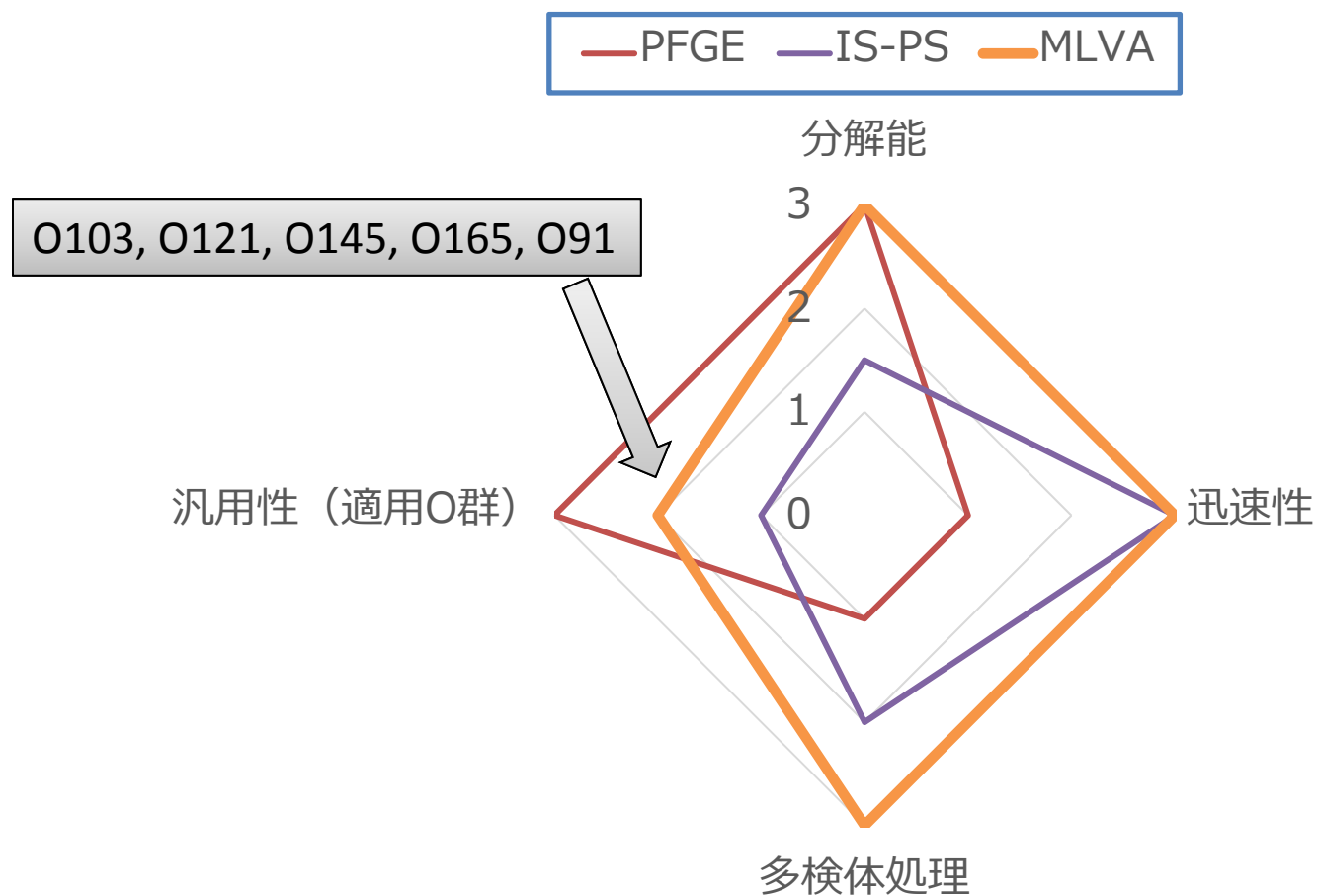
EHEC MLVAについて

衛生微生物技術協議会第40回研究会
—大腸菌リファレンス会議
国立感染症研究所細菌第一部
泉谷秀昌、伊豫田 淳

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学的解析手法



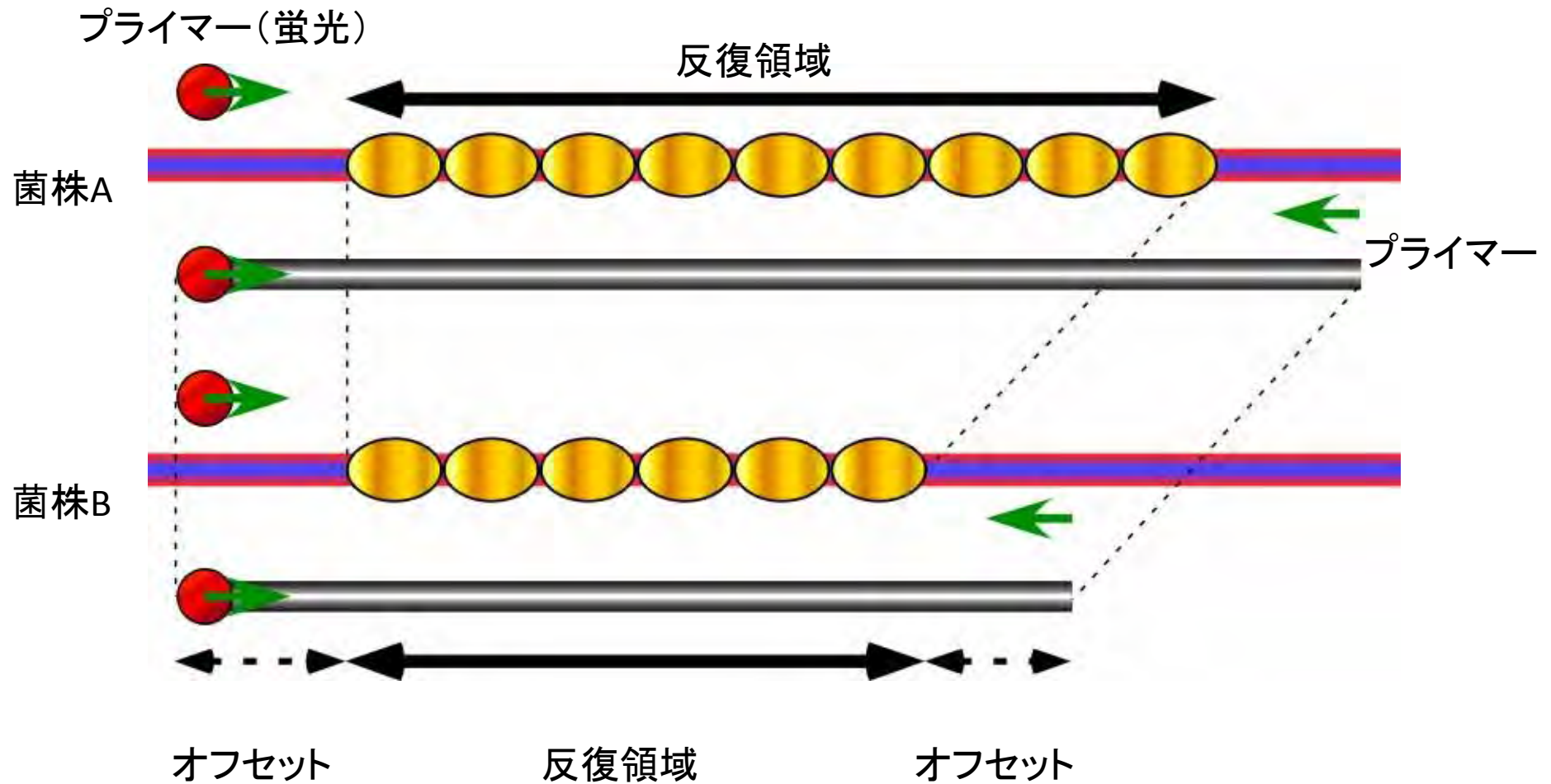
EHEC分子疫学解析法



(多検体処理能力はラボ環境に依存)

MLVA原理

〔検出される産物の大きさ〕－〔オフセット〕＝〔反復領域の大きさ〕
〔反復領域の大きさ〕／〔反復配列1ユニットの長さ〕＝〔リピート数〕



MLVA17 遺伝子座について

Reaction mix 1

<i>O157-34</i>	<i>EHC-1</i>	<i>EHC-2</i>	<i>O157-9</i>	<i>EHC-5</i>	<i>O157-3</i>	<i>O157-25</i>	<i>EH111-8</i>	<i>EH157-12</i>
	(SVL-3*)	(SVL-1*)	(SVL-2*)					

9か所

Reaction mix 2

<i>EH111-14</i>	<i>EH111-11</i>	<i>O157-17</i>	<i>O157-10</i>	<i>O157-36</i>	<i>O157-19</i>	<i>EHC-6</i>	<i>O157-37</i>	<i>EH26-7</i>
(SVL-7*)						(SVL-12*)	(SVL-11*)	

9(8)か所

CDC(O157): 8か所
PNJ(2014年4月～): 17か所

(Izumiya, et al., Microbiol Immunol. 54, 569-577, 2010.)

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125, 70-80, 2016.)

MLVA43 追加遺伝子座について

追加5血清群用 (O103, O121, O145, O165, O91)

Reaction mix q1

q1701 q1702 q1705 q1708 q1710 q1712 q1716 q1724 q1725 q1726 q1727 q1730 q1731
(SVL-5*) (SVL-6*)

13か所

Reaction mix q2

q1704 q1707 q1711 q1714 q1715 q1717 q1718 q1720 q1721 q1722 q1723 q1728 q1729
(SVL-23*)

13か所

17か所 + 26か所 ⇒ 43か所

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125: 70-80, 2016)

型数及びDiversity Indexの比較 (2018年株)

MLVA17	株数	型数	SID
O157	1760	704	0.994
O26	648	222	0.979
O111	86	54	0.994

MLVA43	株数	型数	SID
O103	139	48	0.833
O121	156	46	0.955
O145	49	24	0.921
O165	4	4	1
O91	35	31	0.993

MLVA型表記

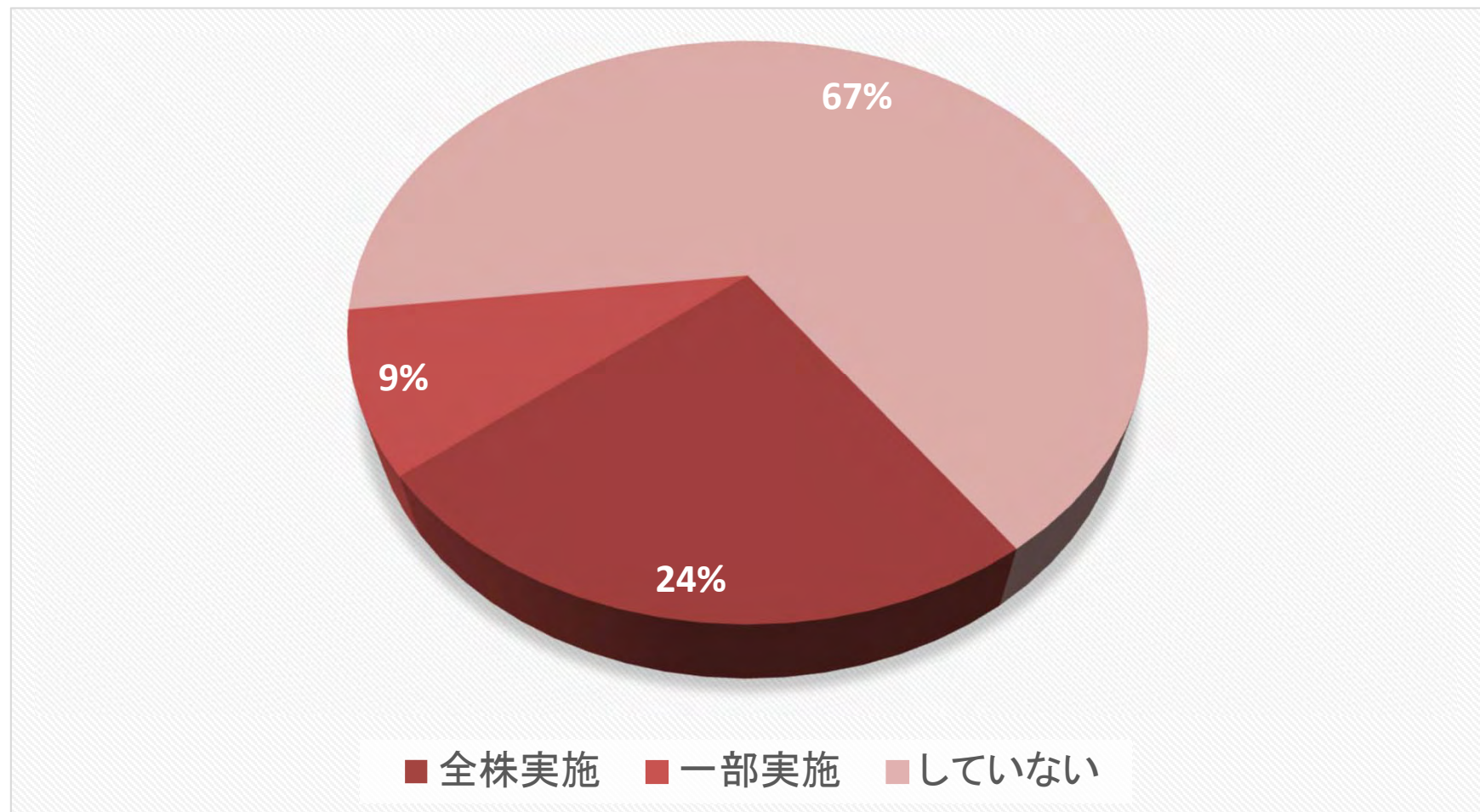
	MLVA型
O157	19m0xxx
O26	19m2xxx
O111	19m3xxx
O103	19m4xxx
O121	19m5xxx
O145	19m6xxx
O165	19m7xxx
O91	19m8xxx

広域株のブロック別分布（2018年）

血清群	毒素型	型／コン プレックス	株数	機関数*	北海道東 北新潟	関東甲信 静	東海北陸	近畿	中国四国	九州	関連事例
O157	VT1+VT2	18c016	65	29	7	26	3	14	7	8	
O157	VT1+VT2	18c035	44	27	14	15	9	1	5		ドームホテル
O157	VT2	18c010	32	18		21		6	5		
O157	VT1+VT2	18c041	27	17	3	15	2	7			
O157	VT1+VT2	18c002	45	15	3	40			1	1	サンチュ
O157	VT1+VT2	18c034	61	14		58	1	1		1	研修施設
O121	VT2	18m5019	36	14	6	30					ハンバーガー
O157	VT1+VT2	18c012	36	12	1	29		4	2		
O157	VT1+VT2	18c022	19	12	1	2		9	4	3	
O157	VT1+VT2	18c036	18	11	1	13	4				

*、上位10を示した

MLVA実施状況(2018年)

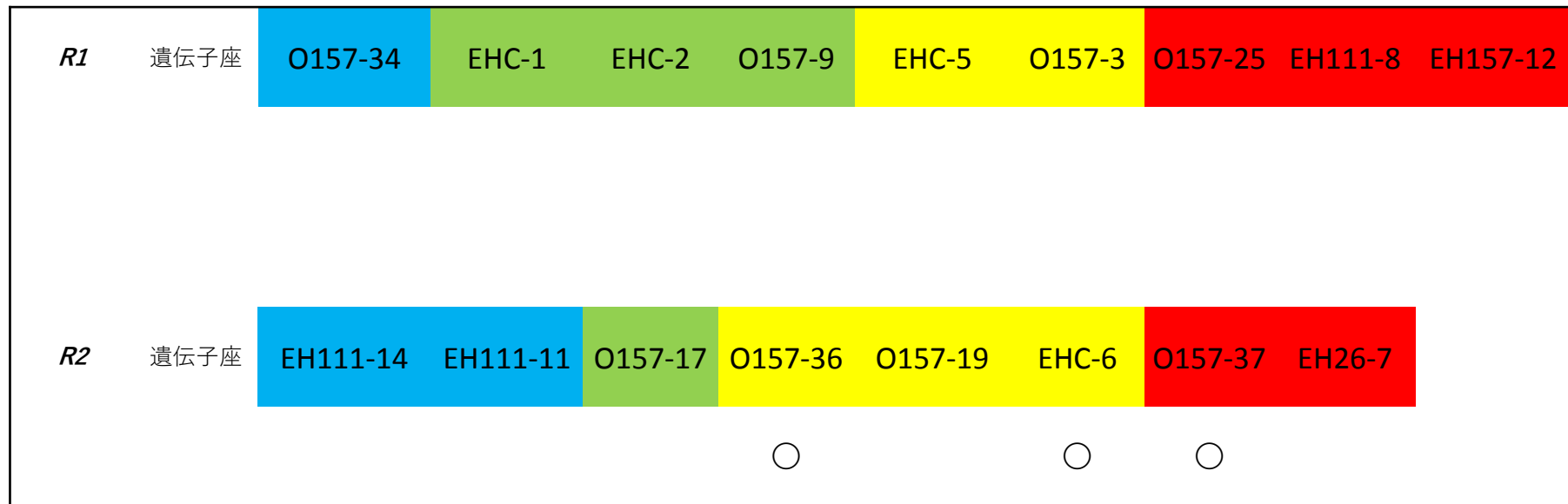


(厚労科研泉谷班)

O157、O26、O111においてピークの出現頻度が 99%以上(2017-2018年株)の遺伝子座

<i>R1</i>	遺伝子座	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH111-8	EH157-12
		○	○	○				○	○	○
<i>R2</i>	遺伝子座	EH111-14	EH111-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	
			○			○				

プラスミド(にあると考えられている)遺伝子座



18c0zz(あるいは18m0xxx) ZZZ県

型名もしくはComplex名
都道府県名

Key	date	source
co18xxx1	2018-m-d1	XXX
co18xxx2	2018-m-d2	YYY
co18xxx3	2018-m-d3	YYY
co18xxx4	2018-m-d4	AAA
co18xxx5	2018-m-d1	BBB

線の長さは
異なる遺伝子座の
数を表します

該当菌株
菌株番号、分離日、機関、型名、Complex名
【機関で色分け】

ComplexのMST

リポート数の違
いは反映され
ていません

現在(過去1-2か月以内)発生中の集発の一部と考えられます。
追加情報等ございましたらお知らせください。

コメント(参考)

18m0541

2019年3月以後

菌株版
(co)

~~コード+~~
地研番号

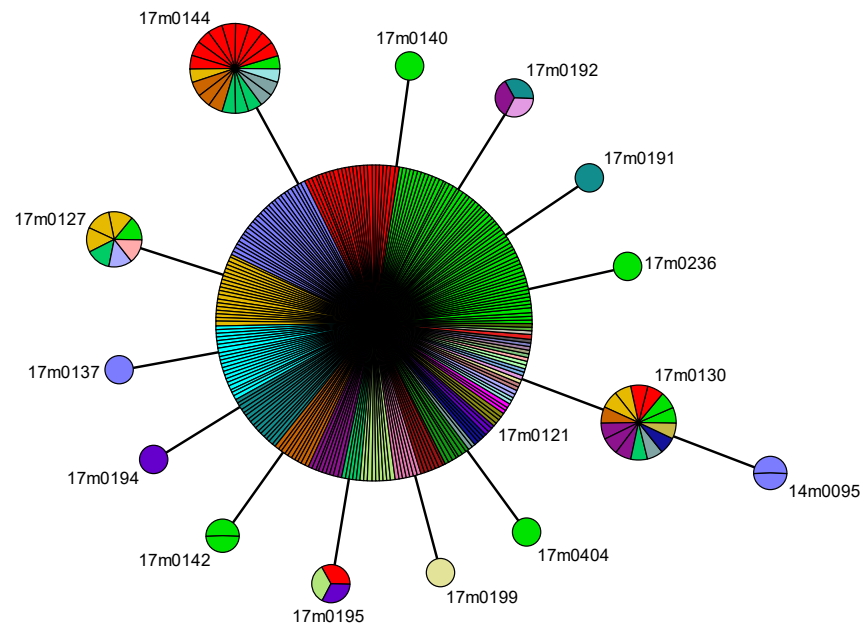
データ版
(dt)

Key	date	Chicken#	source	MLVA Type
co182963	2018-12-14	18121201		18m0541
co182964	2018-12-14	18121202		18m0541
co182965	2018-12-14	181213		18m0541
co190046	2019-01-09	190107		18m0541
co190278	2018-12-25	EC2018-329		18m0541
co190293	2019-02-21	E750		18m0541
co190298	2019-02-19	@@H31-2		18m0541
co190307	2019-02-24	30H91		18m0541
co190309	2019-02-22	30008		18m0541
co190316	2019-02-01	19-031		18m0541
co190317	2019-02-01	19-032		18m0541
co190318	2019-02-08	19-033		18m0541
co190350	2019-03-04			18m0541
co190533	2019-03-01	EH-6-2019		18m0541
co190544	2019-04-19	EC4035		18m0541
dt190017	2019-02-17	Y33095		18m0541
dt190021	2019-02-20	EH6309		18m0541
dt190023	2019-02-27	KIH19-15		18m0541
dt190024	2019-02-25	KIH19-16		18m0541
dt190027	2019-03-04	30H93		18m0541
dt190028	2019-02-22	EC2019002		18m0541
dt190030	2019-03-09	1		18m0541
dt190031	2019-03-09	2		18m0541
dt190032	2019-03-09	3		18m0541
dt190033	2019-03-09	4		18m0541
dt190034	2019-03-03	KIH19-42		18m0541

(26株)

回覧している Minimum Spanning Treeについて

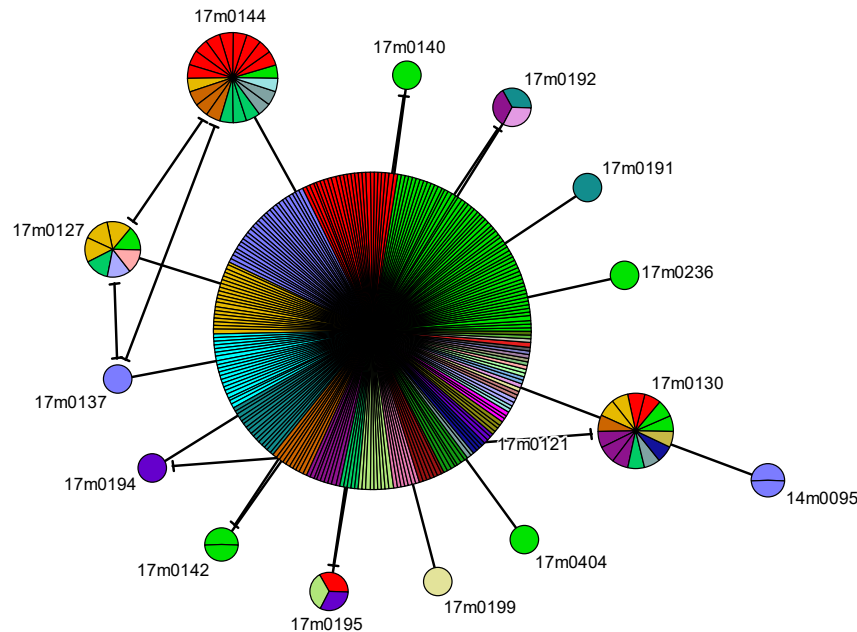
- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - 線の角度の意味はない



17c013

回覧している Minimum Spanning Treeについて

- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - Single locus variantがわかるように、クロスリンクを付加している
 - 「⊥」で区別



17c013

MLVAフローチャート 操作

鋳型DNA

- 菌株培養
- DNA抽出

PCR

- マルチプレックスPCR 2種類(8血清群)+2種類(追加5血清群)
- 産物の希釈(HiDi Formamideで)

電気泳動

- シーケンサー
- GeneScanサイズマーカー

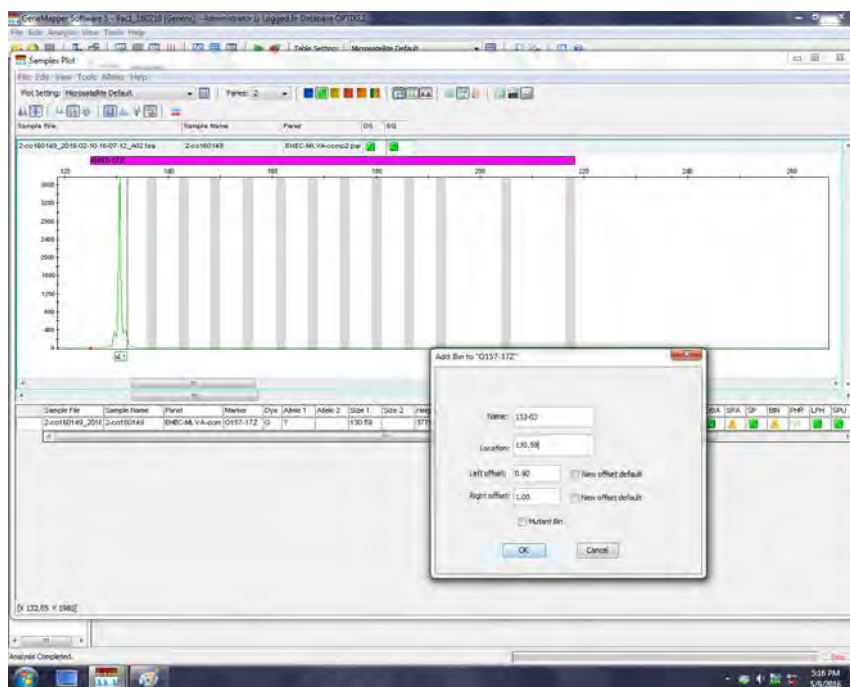
解析

- ピーク検出
- リピート数への変換

Genemapperのパネル・
bin設定ファイル

SeqStudio用パネルも
(2019年4月から)

Binの修正



- 機器によってBinの位置を修正する必要があります。
- Samples Plot画面等で修正してください。
- 全てのピーク位置をカバーしているわけではありませんので、Binの追加が必要な場合があります。

フラグメント解析ソフト パネル補足

- ビン位置の微調整
 - リピート数が既知の株でビンの位置を調整
- ビン追加
 - ビンが立っていないところにピークが出現
 - 出現位置が、近くのビンからリピートユニット分(6塩基など)の整数倍離れた場所
- 一括修正
 - 設定テキストファイル>エクセル上で(+0.5)などで修正>テキストファイルに保存>インポート
 - 空白セルに0.5を入力>コピー>形式を選択して貼り付け「加算」
- パネルのアリル名
 - 365-02
 - RIGHT関数: $\text{RIGHT}(XX,2) = "02"$
 - RIGHT関数: $\text{RIGHT}(XX,2) * 1 = "2"$

事務連絡（平成30年6月29日）

事 務 連 絡
平成 30 年 6 月 29 日

国立感染症研究所 御中

厚生労働省健康局結核感染症課
厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課

腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について

腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒については、平成 29 年夏期の発生事例を踏まえ、同年 11 月に腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめを行い、事例の検証、今後の対応等を整理し公表しています。

今般、当該取りまとめを踏まえ、病因物質が腸管出血性大腸菌 0157, 026, 0111 と疑われる場合は、下記の関係通知（※）に加え、別紙のとおり取扱うこととしますので、実施方よろしくお願いします。

送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

1

地衛研

感染研

菌株情報
MLVAデータ

解析1

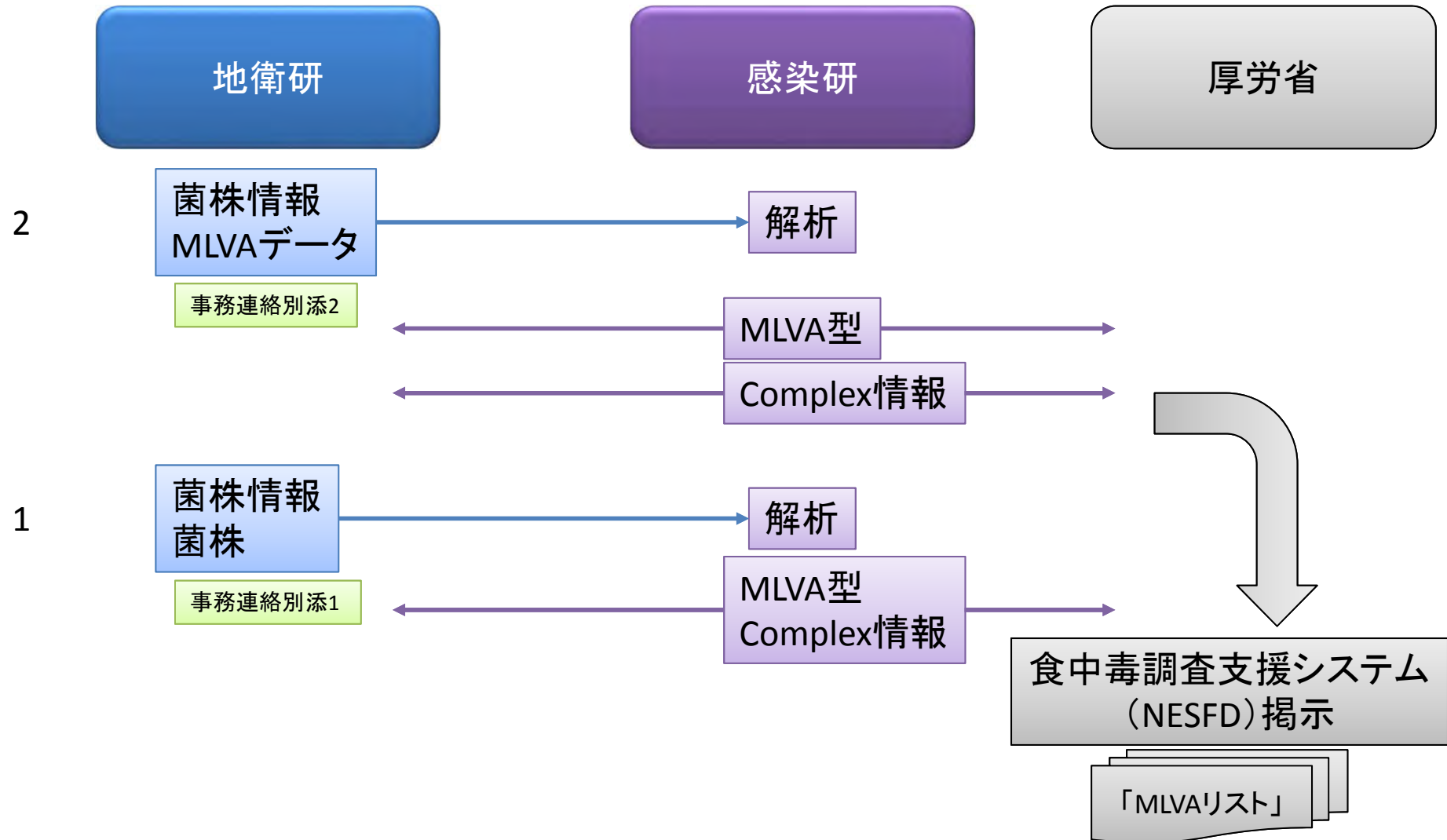
MLVA型

解析2

菌株からのデータ

コンプレックス

送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)



データ送付ファイル 別添2シートについてお願い

- 別添2シートをそのままお使いください
 - 別添1及び3のシートを非表示にしない。
 - 削除は可
 - カラムを隠したりしない。
- 1つのカラム中に改行を入れないでください。
- 見本、以前入力した内容は削除してから送付してください。
- 分離日（もしくは診断日）を入力してください。
- 複数ピークに関する情報は備考に記入してください。
 - データ欄には最も高いシグナルのリピート数を入力してください。
- 増幅なしの場合には[-2]と記入してください。

厚労省事務連絡後の菌株送付について

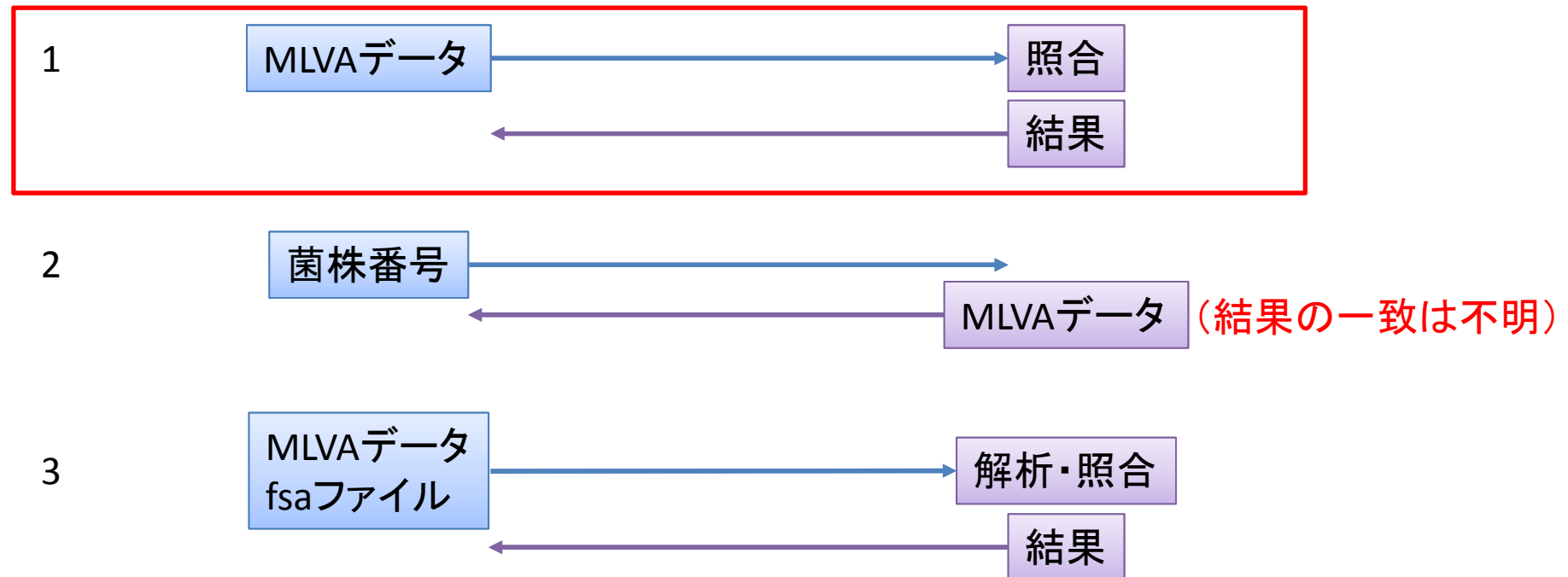
- 地衛研でMLVAを実施した菌株については菌株を送る必要はありませんが、結果の精度確認をする必要があります。
 - 適宜、菌株も送付しリポート数の確認をお願いいたします。

MLVAデータ精度確認について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

地衛研

感染研



MLVAデータ精度確認について

地衛研データ

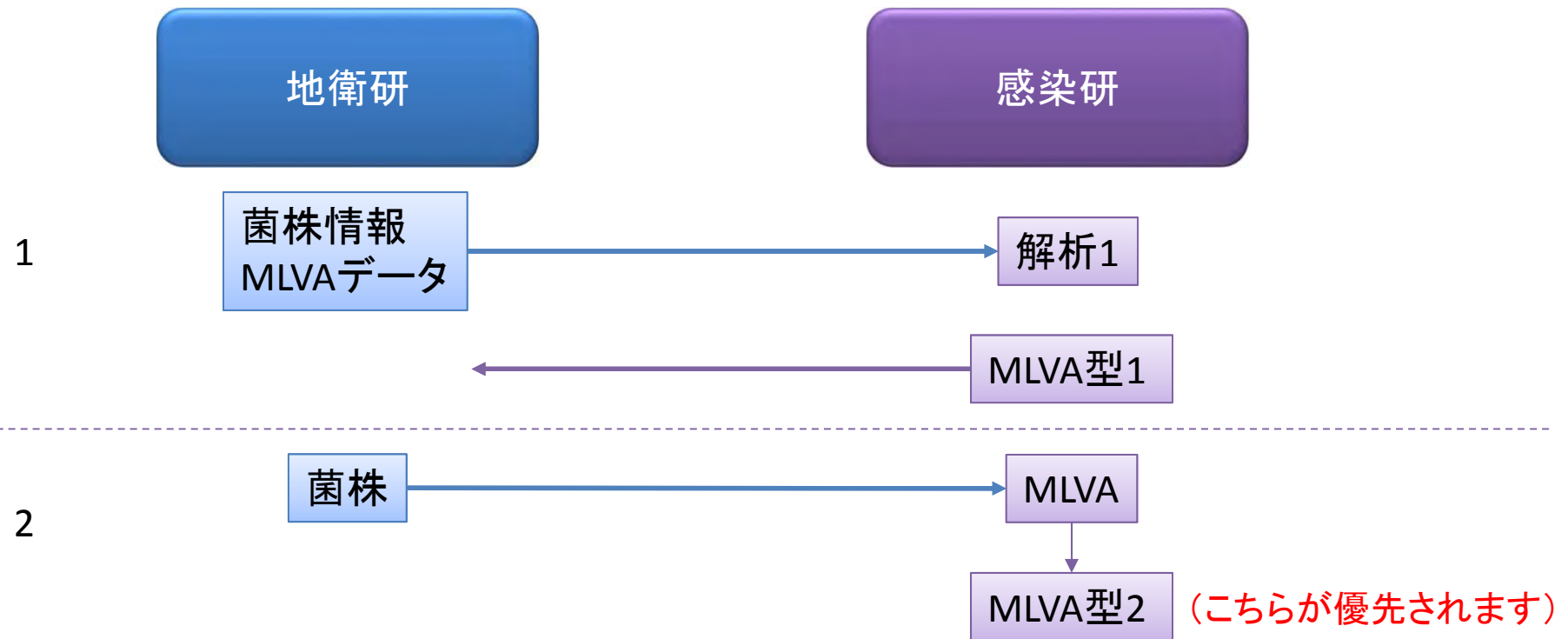
感染研データ

比較
一致 : 1
不一致: 0

テーマ		ページ設定		拡大縮小印刷		シートのオプション															
B34		✕	✓	fx		coYYYYYY															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1	地衛研データ	感染研データ	EH111-117EH111-146EH111-80	EH187-126EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-24V	O157-9M	O157-25L	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-27V					
2	XXXXXXXXXX		2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
3	XXXXXXXXXX		2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
4	XXXXXXXXXX		2	-2	1	6	-2	12	4	-2	-2	14	9	12	5	5	7	9	7		
5	XXXXXXXXXX		2	-2	1	1	-2	8	6	10	-2	-2	9	12	2	3	7	6	9		
6	XXXXXXXXXX		2	1	1	2	3	7	35	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2		
7	XXXXXXXXXX		2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	11	7	7	5	3	5		
8	XXXXXXXXXX		2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
9	XXXXXXXXXX		2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
10	XXXXXXXXXX		2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
11	XXXXXXXXXX		2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
12	XXXXXXXXXX		3	1	7	2	-2	6	17	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	4		
13	XXXXXXXXXX		4	1	5	2	-2	13	10	-2	3	-2	3	13	2	-2	1	-2	12		
14																					
15																					
16																					
17																					
18			EH111-117EH111-146EH111-80	EH187-126EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-24V	O157-9M	O157-25L	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-27V					
19		XXXXXXXXXX	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
20		XXXXXXXXXX	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
21		XXXXXXXXXX	2	-2	1	6	-2	12	4	-2	-2	14	9	12	5	5	7	9	7		
22		XXXXXXXXXX	2	-2	1	1	-2	8	6	10	-2	-2	9	12	2	3	7	6	9		
23		XXXXXXXXXX	2	1	1	2	3	7	35	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2		
24		XXXXXXXXXX	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	11	7	7	5	3	5		
25		XXXXXXXXXX	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
26		XXXXXXXXXX	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
27		XXXXXXXXXX	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
28		XXXXXXXXXX	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
29		XXXXXXXXXX	3	1	7	2	-2	6	17	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	4		
30		XXXXXXXXXX	4	1	5	2	-2	13	10	-2	3	-2	3	13	2	-2	1	-2	12		
31																					
32																					
33	地衛研データ	感染研データ	EH111-117EH111-146EH111-80	EH187-126EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-24V	O157-9M	O157-25L	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-27V					
34	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
35	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
36	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
37	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
38	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
39	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
40	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
41	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
42	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
43	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
44	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
45	XXXXXXXXXX		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

送付MLVAデータと送付菌株から得られたデータ (MLVA型)が異なる場合

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6



送付MLVAデータと送付菌株から得られたデータ (MLVA型)が異なる場合に考えられる原因

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

- 本質的に異なる場合
 - データがあつたりなかったり
 - PCRの条件設定、ピークの判定、データ転載における誤り
 - パネル設定(すべてが+1など)
- 実質的に同じだが、結果的に異なる場合
 - ダブルピークのとり方
 - 継代による変化

お知らせ

- 7月以後は2019年株のみと比較を行います。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。

16. 百日咳・ボツリヌス

百日咳・ボツリヌス

世話人

国立感染症研究所・細菌第二部

第一室 蒲地一成

第三室 加藤はる

百日咳レファレンスセンター



平成30年度の活動報告

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

● 百日咳に関する情報還元

1. 病原微生物検出情報 (IASR) 「百日咳 2018年11月現在」 IASR Vol. 40 p1-2: 2019年1月号. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/pertussis-m/pertussis-iasrtpc/8542-467t.html>
2. 全数報告サーベイランスによる国内の百日咳報告患者の疫学 (更新情報)
– 2018年疫学週第1週～52週 – . 国立感染症研究所 感染症疫学センター・同細菌第二部
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/1630-disease-based/ha/pertussis/idsc/idwr-sokuhou/8696-pertussis-190327.html>
3. Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, et al.
Bordetella pertussis population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. Microb Genom. 2018.

令和元年度の活動計画

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

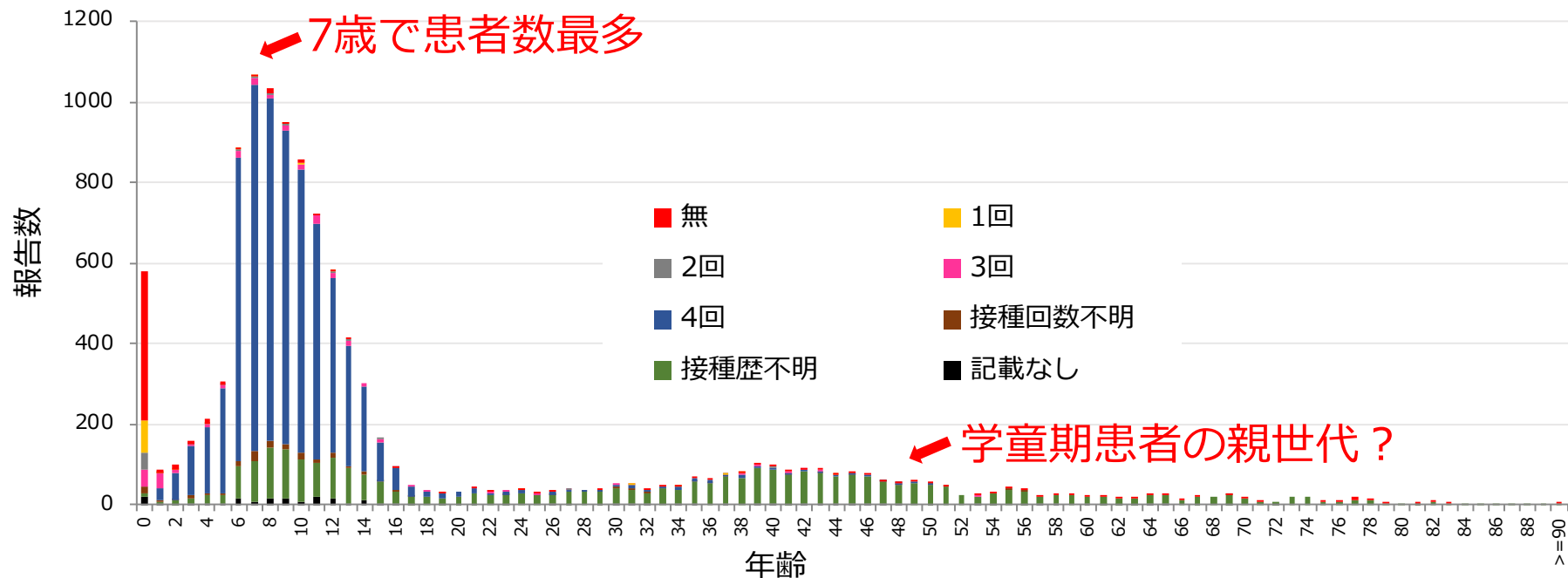
- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌

地域流行発生時などには百日咳菌・百日咳類縁菌の収集にぜひご協力ください



全数報告サーベイランスによる 国内の百日咳報告患者の疫学

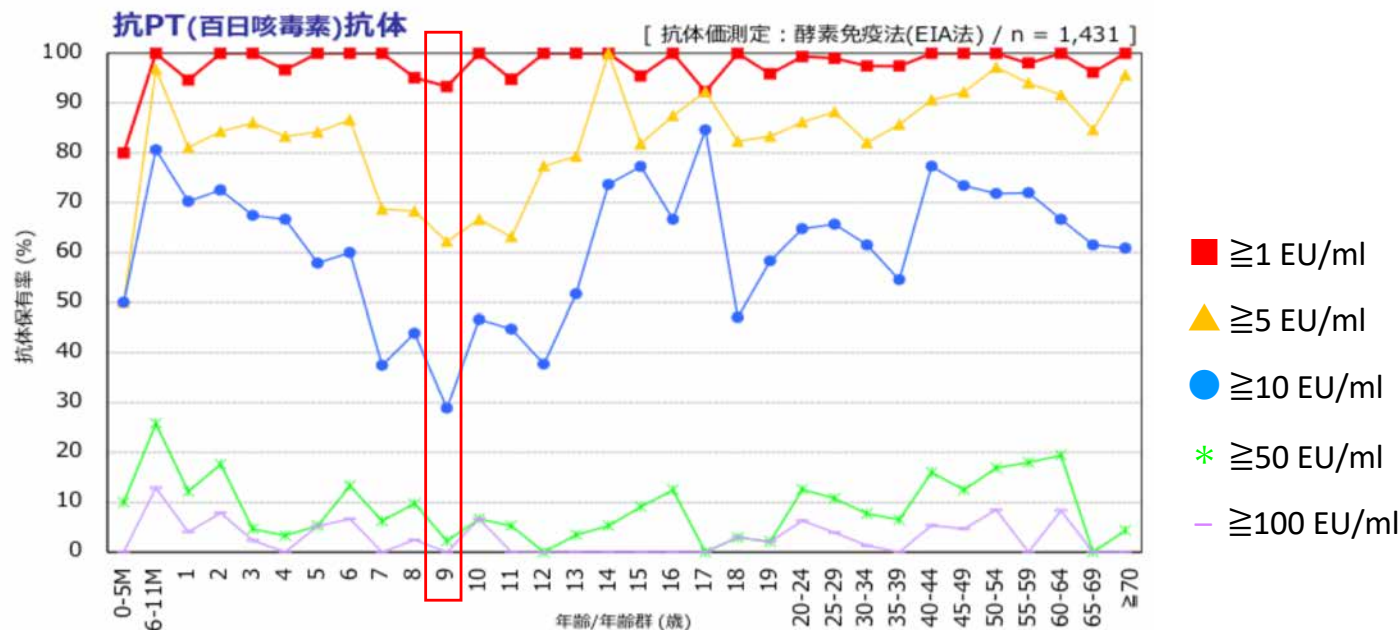
百日咳症例の年齢分布（2018年第1週～第52週, n=11,190）



- 患者：6ヶ月未満児(5%), 5~15歳未満の学童期小児(64%), 30~50代の成人(16%)に患者ピーク
- ワクチン歴：全体の58%, 5~15歳未満児の81%が百日せきワクチン4回接種歴あり

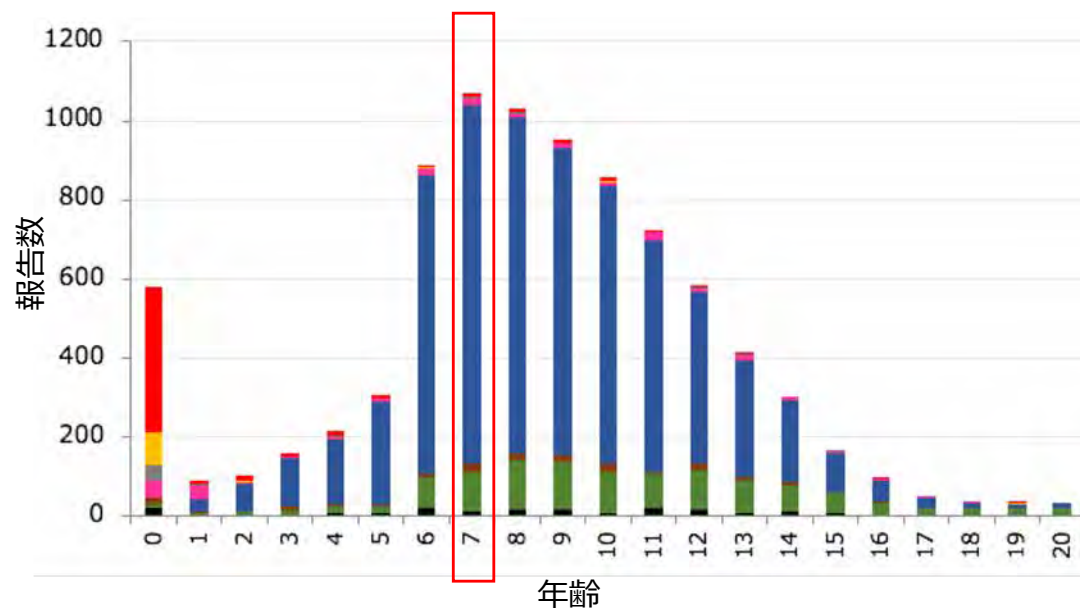
2018年流行予測調査（暫定値）

※1 主に2018年7～9月に採取された血清の測定結果：2019年3月現在暫定値



9歳で抗体保有率最低

2018年百日咳患者報告

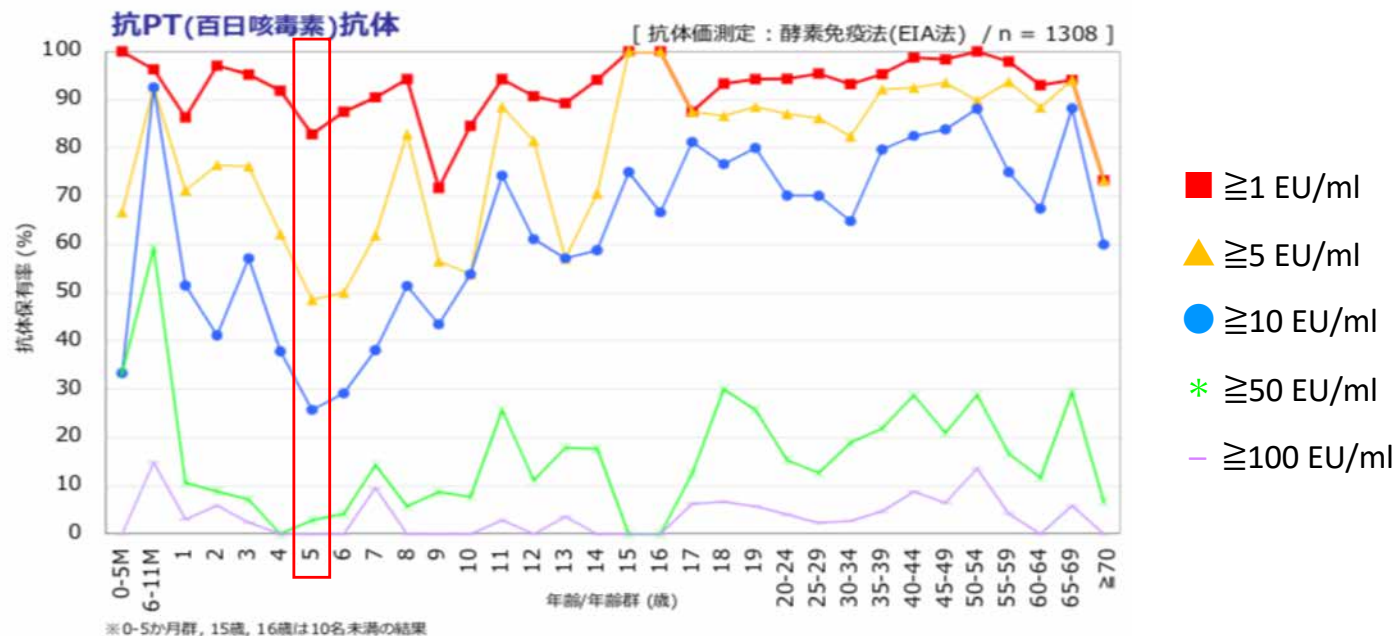


データの対応が認められる

7歳で患者数最多

2013年流行予測調査

※1 主に2013年7～9月に採取された血清の測定結果



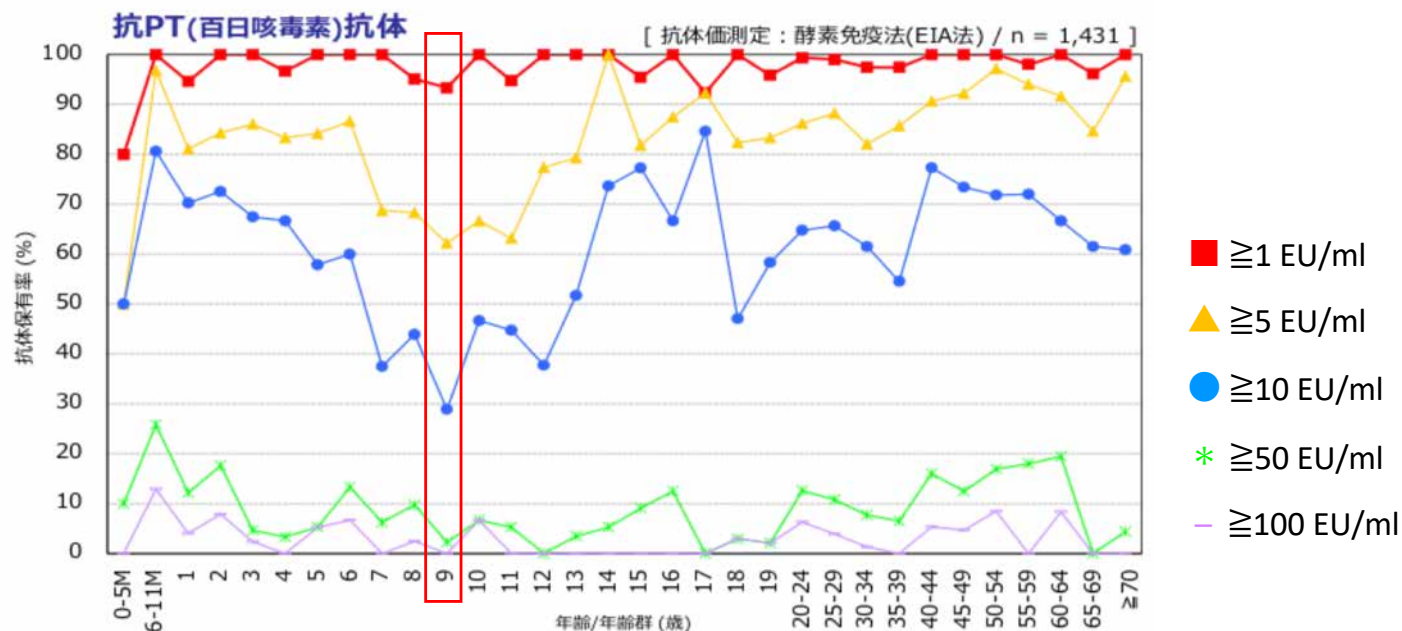
5歳で抗体保有率最低



5年経過

2018年流行予測調査 (暫定値)

※1 主に2018年7～9月に採取された血清の測定結果：2019年3月現在暫定値



9歳で抗体保有率最低

百日咳抗体測定キット ノバグノスト®百日咳/IgA, IgM

製造販売：シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

- 2016年 百日咳の新規血清診断法として健康保険適用
- 海外においても十分な使用実績がなく、キットの性能がよく分かっていない



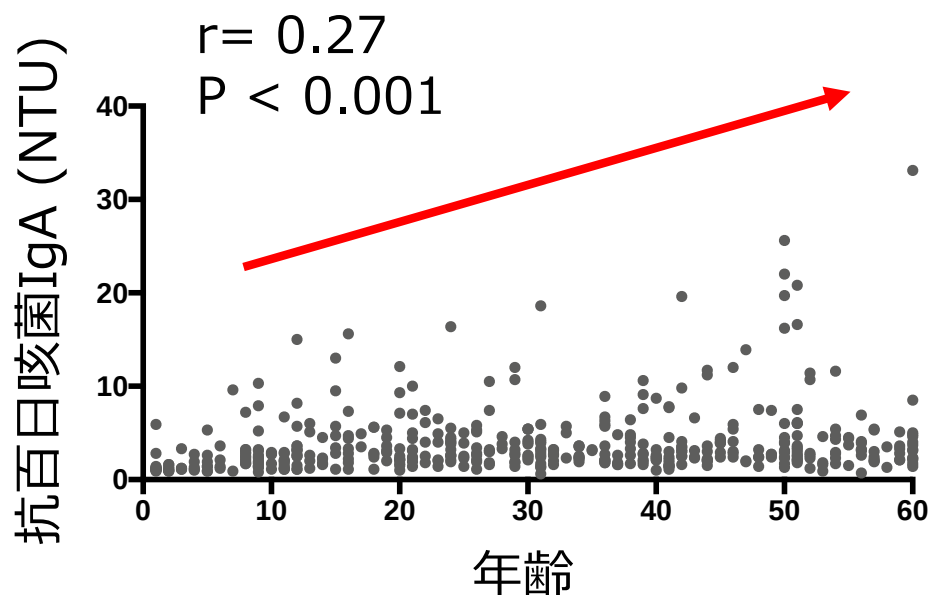
キットの基礎的評価が必要

- 健常人における抗体保有率を調査 (n=460)
- 抗百日咳菌IgA, IgM抗体価測定

判定値	陰性	判定保留	陽性
	< 8.5 NTU	8.5~11.5 NTU	> 11.5 NTU

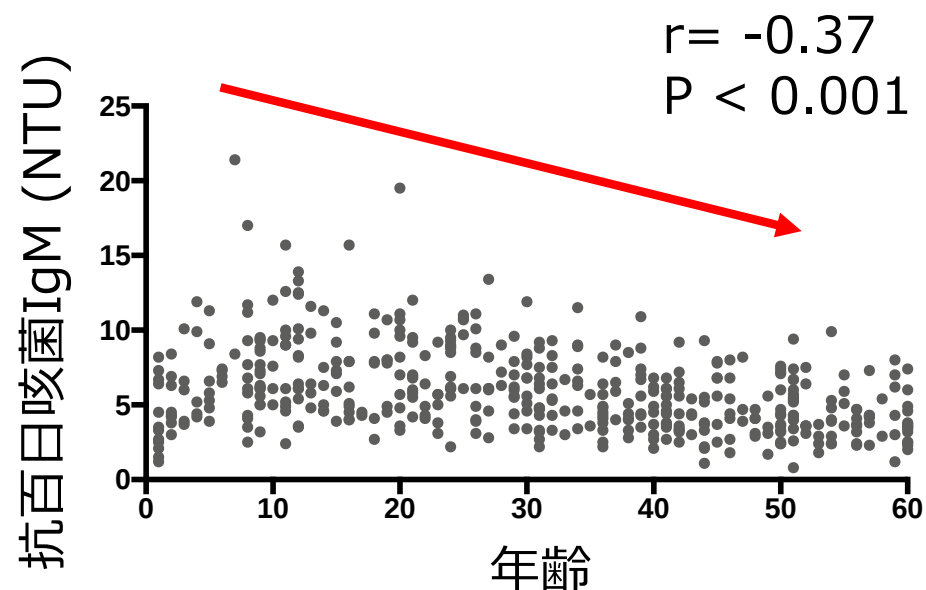
抗百日咳菌IgA, IgMの年齢分布

① 抗百日咳菌IgA



加齢とともに抗体価が上昇

② 抗百日咳菌IgM



加齢とともに抗体価が低下

健常人における抗百日咳菌IgA, IgM保有状況は被験者の年齢が大きく影響していた

Fumimoto R et al., Seroprevalence of IgA and IgM antibodies to *Bordetella pertussis* in healthy Japanese donors: Assessment for the serological diagnosis of pertussis. PLoS One. 1;14(7):e0219255

ボツリヌス症 レファレンスセンター

国立医薬品食品衛生研究所
国立感染症研究所

北海道 福島県
東京都 千葉県 神奈川県
大阪
三重県
愛媛県 山口県 岡山県
福岡県 熊本県 沖縄県

ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

1. 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。
2. 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。
3. 2018年度より、参加者によるマウス接種実施開始。
4. 参加ご希望の場合は細菌第二部 加藤まで

第7回講習会

2018年11月7日13:00~11月9日正午12:00

参加自治体:千葉市、沖縄県、福岡市

042-848-7096
cato@nih.go.jp

第8回講習会

2019年11月(日程未定)

1日目13:00から3日目正午12:00まで

参加者募集中(定員4名)

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

1. A、B、E、F型の診断用抗毒素は、リクエストに応じて配布していますので、国立感染症研究所まで連絡ください。
2. C、D、G型の診断用抗毒素は国立感染症研究所に保存してあります。C、D、G型毒素産生性ボツリヌス症を疑う場合は、国立感染症研究所までご連絡ください。
3. ボツリヌス毒素遺伝子検出用**PCR**のための、陽性コントロールが必要な場合はご連絡ください。

17. 動物由来感染症

令和元年度 衛生微生物技術協議会 動物由来感染症レファレンスセンター

担当：国立感染症研究所 獣医科学部

これまでの活動

動物由来感染症診断法の External Quality Assessment (EQA)

H21	野兔病	H26	狂犬病
H22	野兔病	H27	SFTS
H23	ブルセラ症	H28	野兔病
H24	炭疽	H29	ブルセラ症
H25	炭疽	H30	炭疽

まず、H30年度の結果報告から、

平成30年度 炭疽EQA実施内容について

炭疽菌DNAを用いた遺伝子検査

ブラインド・テストおよび検出限界算定

- 炭疽菌および近縁菌種由来のDNAを用いた conventional PCR法による遺伝子検出
- 炭疽菌由来DNAの10倍階段希釈液を用いた conventional PCR法による遺伝子検出限界の算定

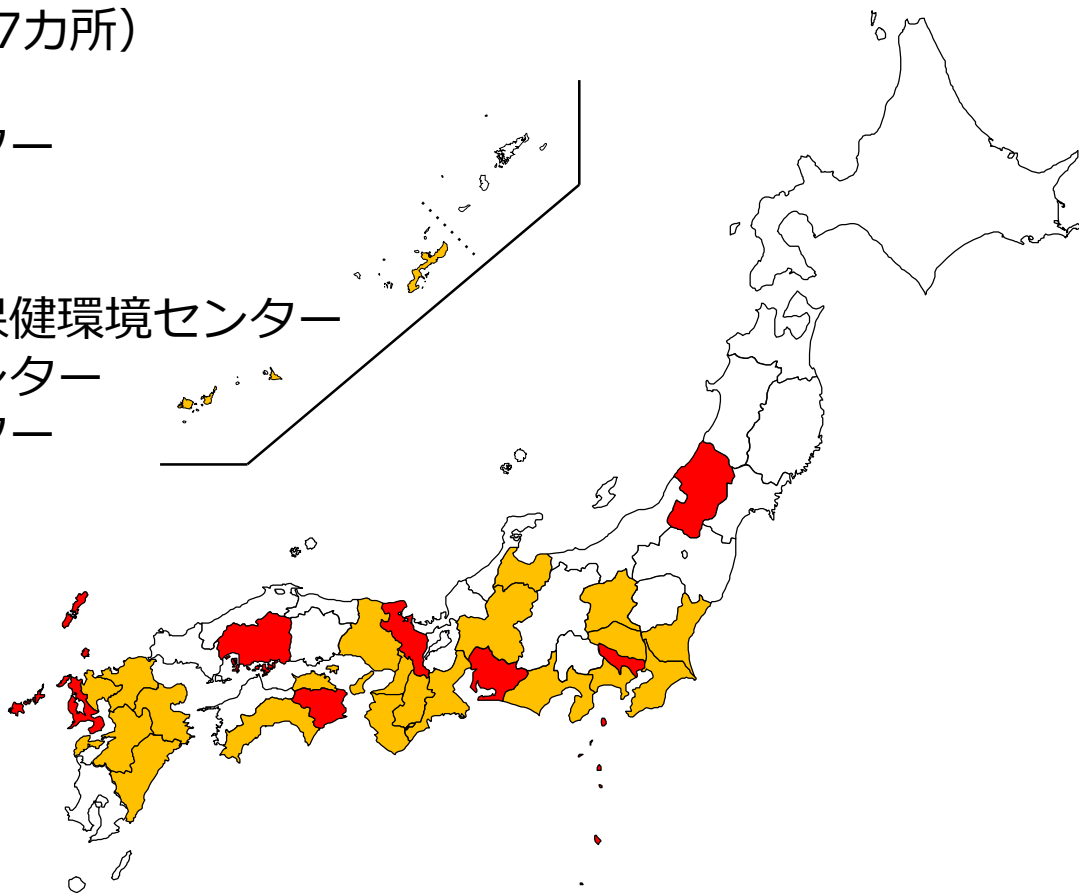
DNAおよびプライマーを配布して、
各研究所の所有機器で検査を実施

平成30年度 炭疽EQA実施機関

平成30年度 参加衛生研究所(37カ所)

- ◆ 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

など



平成30年10月中旬に一斉配布。
平成31年1月末日 提出締め切り。

炭疽菌PCRの概要

◇ 使用菌株 (炭疽菌を含む2菌種、2株)

炭疽菌 (*B. anthracis* 臨床分離株 : 1×10^7 CFU/ml)
10倍階段希釈列
(10^{-1} から 10^{-7} まで : $1 \times 10^6 \sim 10^0$ CFU/ml)

セレウス菌 (*B. cereus* 院内感染由来株)

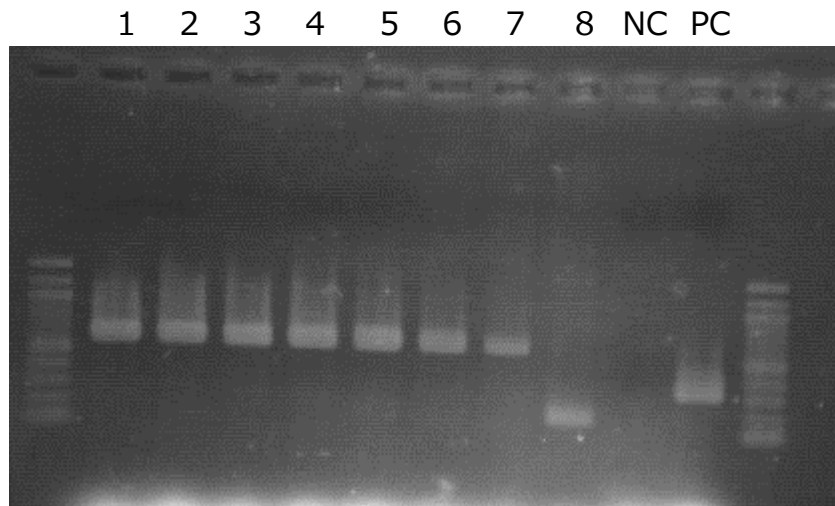
◇ 検査法 : 病原体検出マニュアルに準じる

◇ PCR陽性の判断

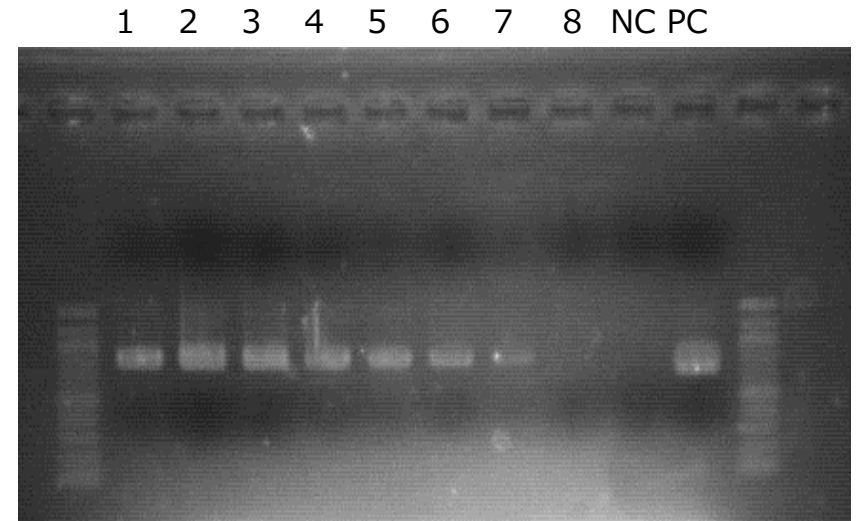
標的遺伝子	鋳型の増幅遺伝子	増幅サイズ
<i>pag</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>596bp</u>
	陽性対照DNA	⇒ <u>322bp</u>
		毒素プラスミド (pXO1)
<i>cap</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>846bp</u>
	陽性対照DNA	⇒ <u>720bp</u>
		莢膜プラスミド (pXO2)

配布した検体のPCR結果

*pag*遺伝子



*cap*遺伝子



アニーリング温度 52℃に設定

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8
検体	炭疽菌DNA							セレウス菌DNA
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-1}

炭疽菌*pag*遺伝子/*cap*遺伝子の conventional PCRの検出限界濃度

	検出限界 (DNA希釈濃度) と 提示機関数		
標的遺伝子	10^{-5} 希釈	10^{-6} 希釈	10^{-7} 希釈
<i>pag</i> 遺伝子	3 (機関)	17	17
<i>cap</i> 遺伝子	3	15	19

DNA polymerase

Th Thermal Cycler

検出限界
cap/pag

アニーリング温度

PCRプログラム

TaKaRa ExTaq 5Unit/uL	Applied Biosystems Veriti200	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	55°C	あり
KAPA2G Fast HotStart with dye	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	50°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Simpli Amp	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	ThermoFischer Scientific Pro Flex 3x32 PCR system	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TOYOBO Blend Taq Plus	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	50, 52, 55°C	
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa ExTaq	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700 (pag) TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (cap)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	52°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Bio-RAD T100	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	あり
TaKaRa Tks Gflex DNA polymerase	Astec PC-320	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	50°C	あり
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa Emerald Amp PCR Master Mix	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini TP100	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	50°C	
TaKaRa	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa ExTaq	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP650	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa ExTaq	Astec Gene Atlas G	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa	Bio-RAD T100 Thermal Cycler	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	55°C	あり
TOYOBO Quick Taq HS DyeMix	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
KAPA Taq Extra Hot Star Ready Mix with Dye	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Veriti	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Bio-RAD Engine Tetrad2	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	50°C	
TaKaRa Ex Taq Hot Start version	Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
TaKaRa ExTaq	ThermoFischer Scientific Pro Flex	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	
Promega Go Taq Hot Start Green Master Mix	Bio-RAD PTC-200	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	55°C	
Promega Go Taq Hot Start Green Master Mix	TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	50°C	
TaKaRa ExTaq	Eppendorf Mastercycler nexus gradient	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	55°C	

各参加機関別の
Polymerase,
ThermalCycler,
Endpoint,
Annealing温度

* TaKaRa EX Taq
Hot Start version

* Applied Biosystems

* Annealing temp. 55°C

が多い

考 察

1. 各参加機関の間でみられたconventional PCR検査系での検出限界の差は、

- 使用したサーマルサイクラー
- 使用酵素の活性やPCR反応条件
- 増幅産物の確認方法

の違いによるものと考えられる。

2. 炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には、通常 10^6 CFU/ml以上の炭疽菌が存在していることから、今回検証された検査系においては、参加機関全てで十分な検出限界を有していると考えられる。

R1年度の実施項目は…

1. SFTSの検査：

動物サンプルを想定した特異的遺伝子検出

2. 感染症の早期発見のために：

死亡野生動物サーベイランスシステムの
紹介と試行

3. ニパウイルス感染症の検査：

ELISAによる抗ニパウイルス抗体検出

(ただし、一部は衛微協の枠外として実施)

参加申込は、獣医科学部まで

以下、概略・・・

令和元年度 - 1

SFTS疑い動物検体からの
特異的遺伝子検出の実施

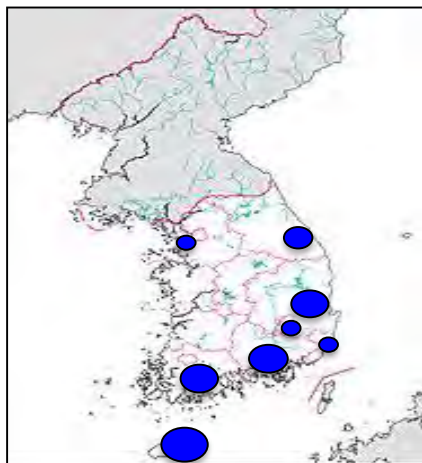
重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome)



症状：発熱、消化器症状（食欲低下、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛）
時に頭痛、神経症状、呼吸障害、出血症状、重症化による死亡

中国：2009-10年に患者6例
（初報告は2011年）
2010-14年：3,500名
（致命率：約10%）

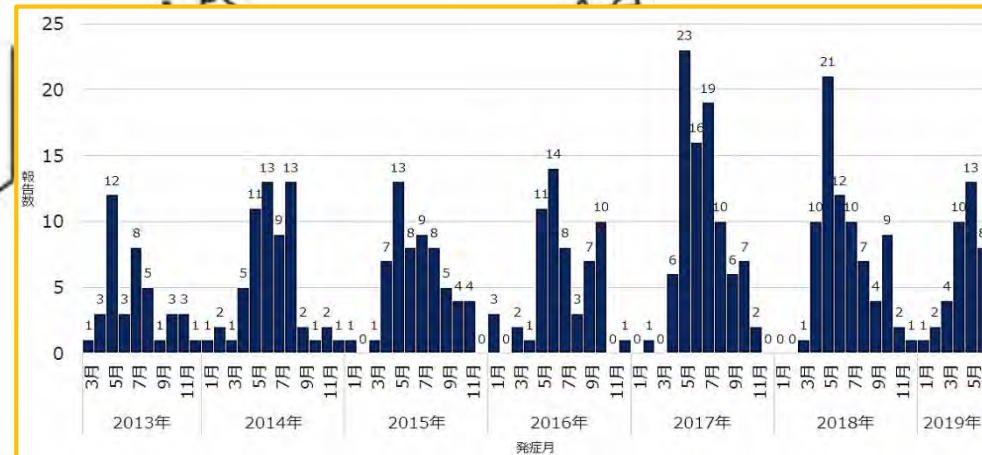
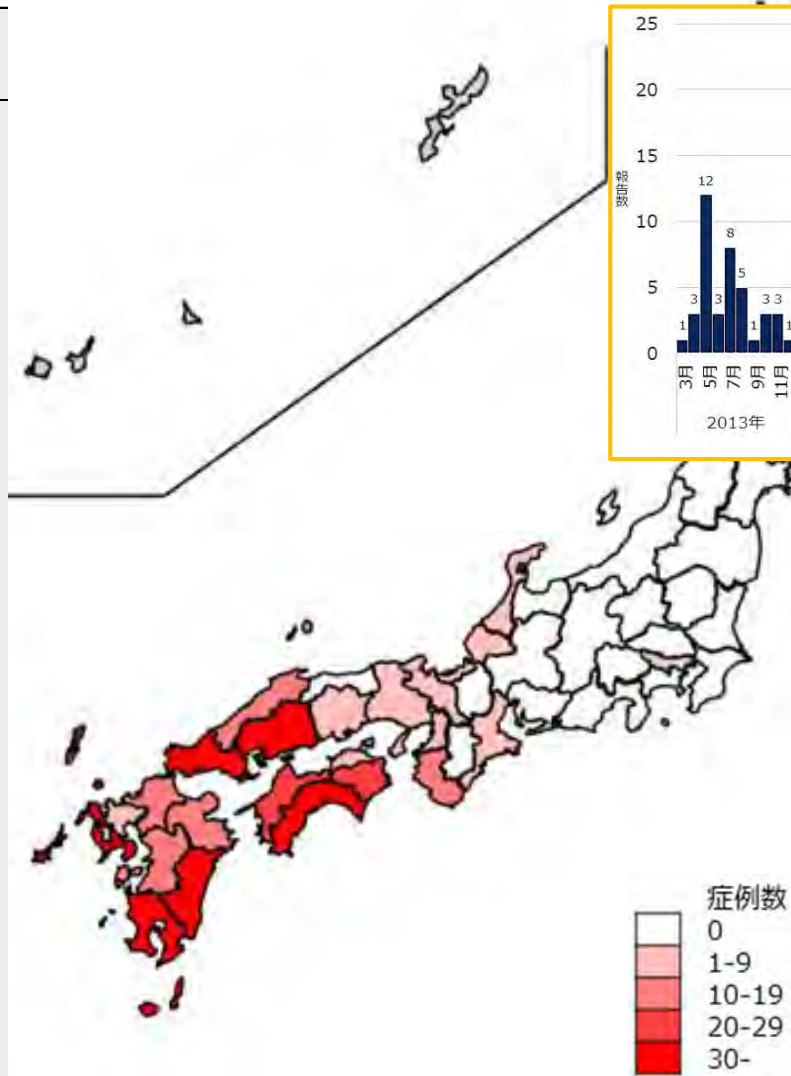


韓国：2013: 36 (死亡17)
2014: 55 (死亡15)
（致命率：35.2%）
神経症状出現率高い。
2008年にすでに患者が確認。

ベトナム：
2017.10～2018.3 - 2名患者確認

日本の確定診断されたSFTS患者 (~2019.6.26)

届出都道府県	症例数
東京都	1
石川	2
福井	2
三重	7
京都	6
大阪	2
兵庫	3
和歌山	18
島根	16
岡山	8
広島	36
山口	40
徳島	28
香川	6
愛媛	29
高知	38
福岡	13
佐賀	6
長崎	33
熊本	14
大分	18
宮崎	65
鹿児島	42
沖縄	1
合計	434



		生存例	死亡例	合計
報告数		368	66	434
性別	男	177	35	212
	女	191	31	222
年齢	中央値	73歳	80.5歳	74歳
	~20代	5	0	5
	30代	8	0	8
	40代	10	0	10
	50代	24	3	27
	60代	98	11	109
	70代	116	18	134
	80代	92	29	121
	90代~	15	5	20

さかのぼり調査では2005年にはSFTS患者が発生していたことが確認されている。
SFTS患者は西日本を中心に24都府県で確認されている。

愛玩動物が感染源に・・・

健感発 0724 第3号
平成 29 年 7 月 24 日

各 { 都 道 府 県
保健所設置市
特 別 区 } 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省健康局結核感染症課長
（ 公 印 省 略 ）

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）に係る注意喚起について

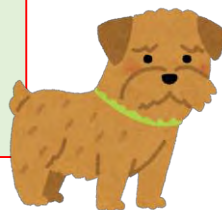
参考：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）について

<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000169522.html>

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）に関するQ&A（第4版）

http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/sfts_qa.html

ペットのイヌ・ネコ
— 発熱と衰弱などの症状
血小板減少



血液・糞便からSFTS ウイルス検出

動物病院勤務者の感染リスクと感染報告あり

イヌ・ネコの感染報告と
ネコ咬症後のSFTS
発症・死亡例

SFTS を発症し死亡したヒト

体調不良のネコからの
咬傷歴があった



2017.7: 動物園のチーター
2頭が感染して死亡

ネコ科の動物は感染すると
重篤化する？



感染疑いイヌ・ネコの調査－
抗体陽性は西日本中心

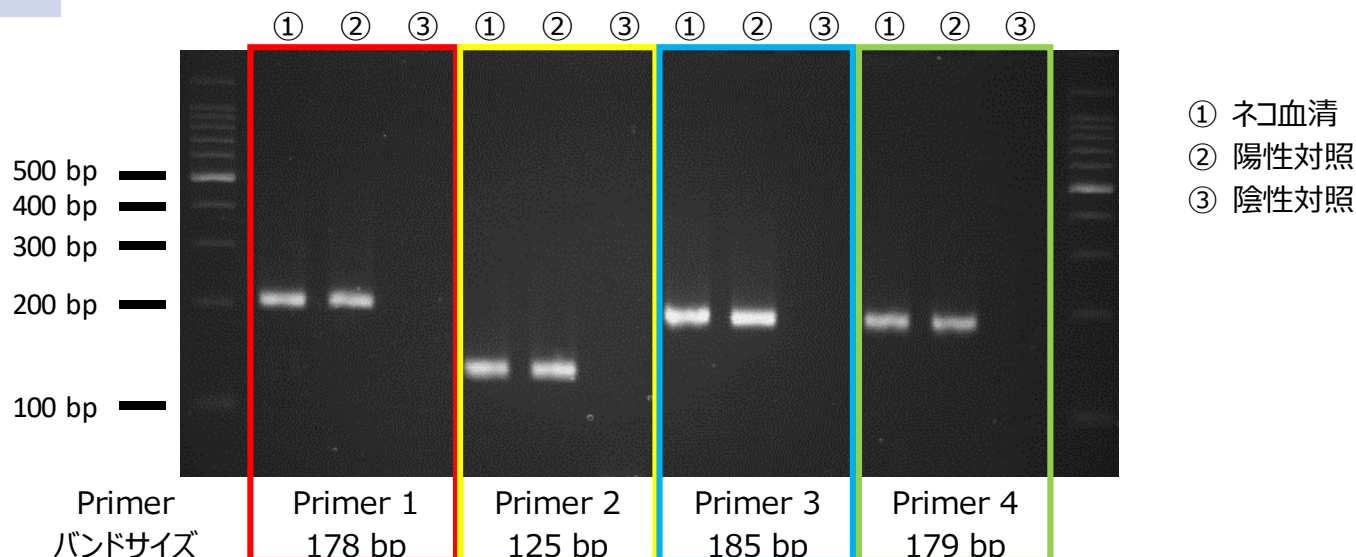
	抗体陽性（死亡）	致死率（%）
ネコ	47（23）	49
イヌ	4（1）	25

2019.4まで：ネコ120, イヌ7 感染を確認

EQA: 動物由来のSFTSV RNAを抽出し、 RT-PCR反応により遺伝子を検出する

動物検体からSFTSV遺伝子を検出できるRT-PCR法

検体	検出率 (%)
血清 (血漿)	100
口腔内スワブ	58.3
肛門スワブ	90.9



令和元年度 - 2

野生動物の死亡状況を把握するための Webシステムの試用

野生動物死亡状況調査の体制

野生動物の死亡個体数をモニタリング

統括

厚生労働省 結核感染症課



国立感染症研究所

データ解析

報告書の作成

調査システム



都道府県および
政令指定都市

現在のところ約10自治体が調査協力

調査協力

データ入力



検疫所・公園事務所
その他協力機関

現在のところ約3検疫所が調査協力

死亡動物調査

データ入力

登録されたデータは自動的に集計され、随時閲覧可能。

報告機能：週間および四半期の定期報告（希望ユーザのみ）、緊急報告（全ユーザ）



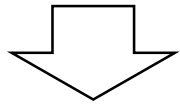
有事の際
迅速な情報の共有化

ウエストナイル熱や狂犬病等の早期流行を把握及び制御

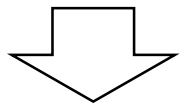
新システム【死亡動物調査(DAS)システム】の構成

新規登録

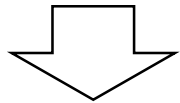
所属種別
(選択)



所属部署
(記入)
メールアドレス
(記入)
メール配信希望
(選択)



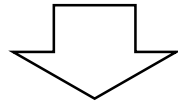
確認



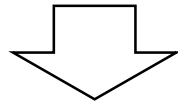
パスワード
発行

ログイン認証

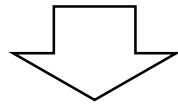
死亡動物数の報告



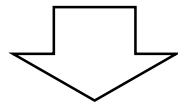
発見日
(選択)



発見場所
(〒番号)



動物種・数
(記入)



確認

集計データ

都道府県別死亡数
├ カラス
├ その他鳥類
└ その他動物

動物種別集計

年間死亡数の推移
├ カラス
├ その他鳥類
└ その他動物

種別比率
├ カラス
├ その他鳥類
└ その他動物

死亡動物の変動 (年別)
├ カラス
├ その他鳥類
└ その他動物

死亡動物数の変動 (年月別)
├ カラス
├ その他鳥類
└ その他動物

報告書

週間報告メール
四半期報告メール

ユーザ情報の編集

ユーザ情報の変更
ユーザ情報の削除

管理者用ページ

野生動物の死亡状況調査について

【背景】

ウエストナイル熱や狂犬病など、現在国内で確認されていないが、
海外では継続した流行が確認されている疾患がある
野生動物を介した侵入や拡大、定着のリスクがある
侵入や流行を早期に察知するには、野生動物死亡数調査も有効

【課題】

どのようにしてデータを集積して行くか？
問合せ？ 報告依頼？
頻度は（毎日、毎週、毎月）？
集積したデータを、どの様に管理するのか？
集積したデータから得られる情報の共有方法は？

【解決】

登録・データ集積機能を有する調査システムの構築
インターネットを活用する

【目的】

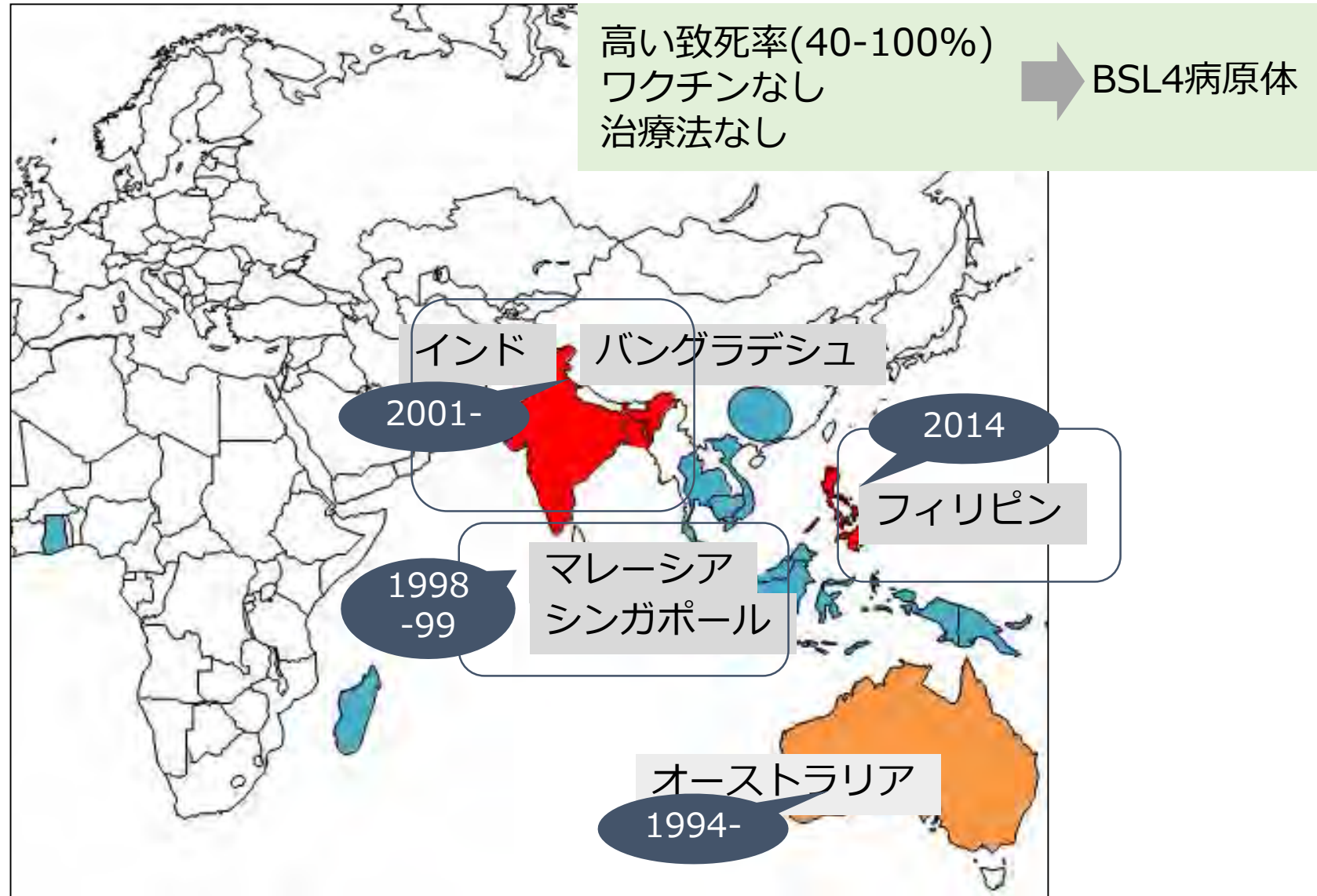
野生動物の死亡個体数調査し、様々な情報を、
関係機関と効率的に共有できる環境を構築する
DAS（Dead animal surveillance）システムの開発と運用

- * まず、システムの試用により内容を確認してもらう
- * 将来的な参加を検討してもらう
- * 同時に、問題点を指摘してもらい、システムの改良へつなげる

令和元年度 - 3

ニパウイルス感染症における 抗体検査法(ELISA)の実施

ニパウイルス感染症

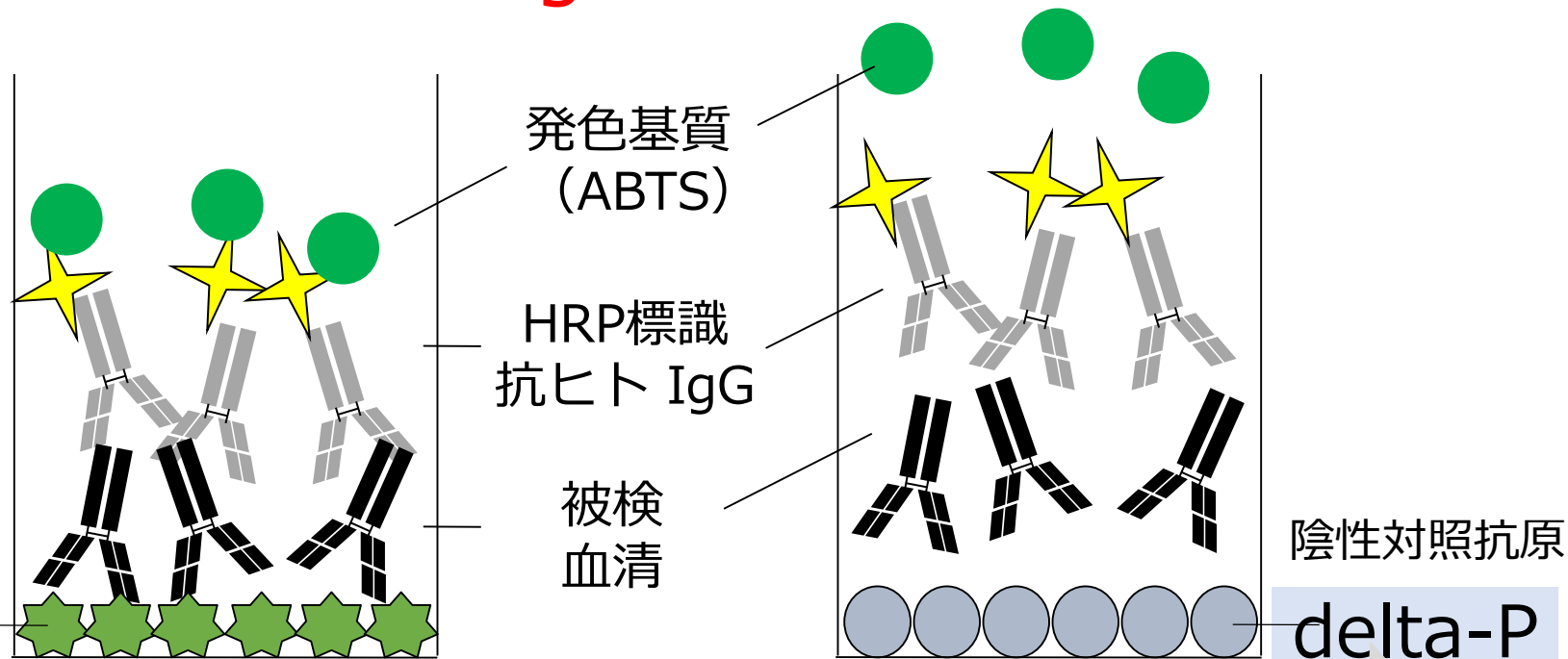


ニパ発生国

ヘンドラ発生国

オオコウモリから
ヘニパ抗体(+)確認

ニパウイルス IgG検出ELISA 模式図



NiV-N発現
バキュロウイルス
感染細胞より調製

OD値の差を測定

ポリヘドリン欠損
バキュロウイルス
感染細胞より調製

$[NiV-N]OD_{405}$ の平均
－ $[delta-P]OD_{405}$ の平均

$> \underline{0.2}$
 $\leq \underline{0.2}$

ELISA-reactive

ELISA-non-reactive

中和試験で
確定診断へ
(感染研)

- 1) 検討事項 1～3 より、実施可能な物、実施してみたい物を選択
(必ずしも全て実施する必要はない)
- 2) 実施期間は、9月～11月中を予定
- 3) 参加希望は、感染研 獣医科学部
担当者まで

以上