

衛生微生物技術協議会第42回研究会（静岡・オンライン） レファレンスセンター等報告

日時：令和4年6月30日-7月11日

Zoom開催

- 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（非開催）
- 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

2022.10.11（火）13:00-14:00
オンライン開催

令和4年度 麻疹・風疹レファレンスセンター会議

2021-2022年度活動報告

- 病原体検出マニュアル改定／新規作成（2022年10月公開済み）
- 2021年 麻疹・風疹・CRS検査実績調査
- 遺伝子検査用 参照RNAの頒布
（2021年度 麻疹3件、風疹4件）

病原体検出マニュアル改定（2022年10月公開済み）

<麻疹 第4版>

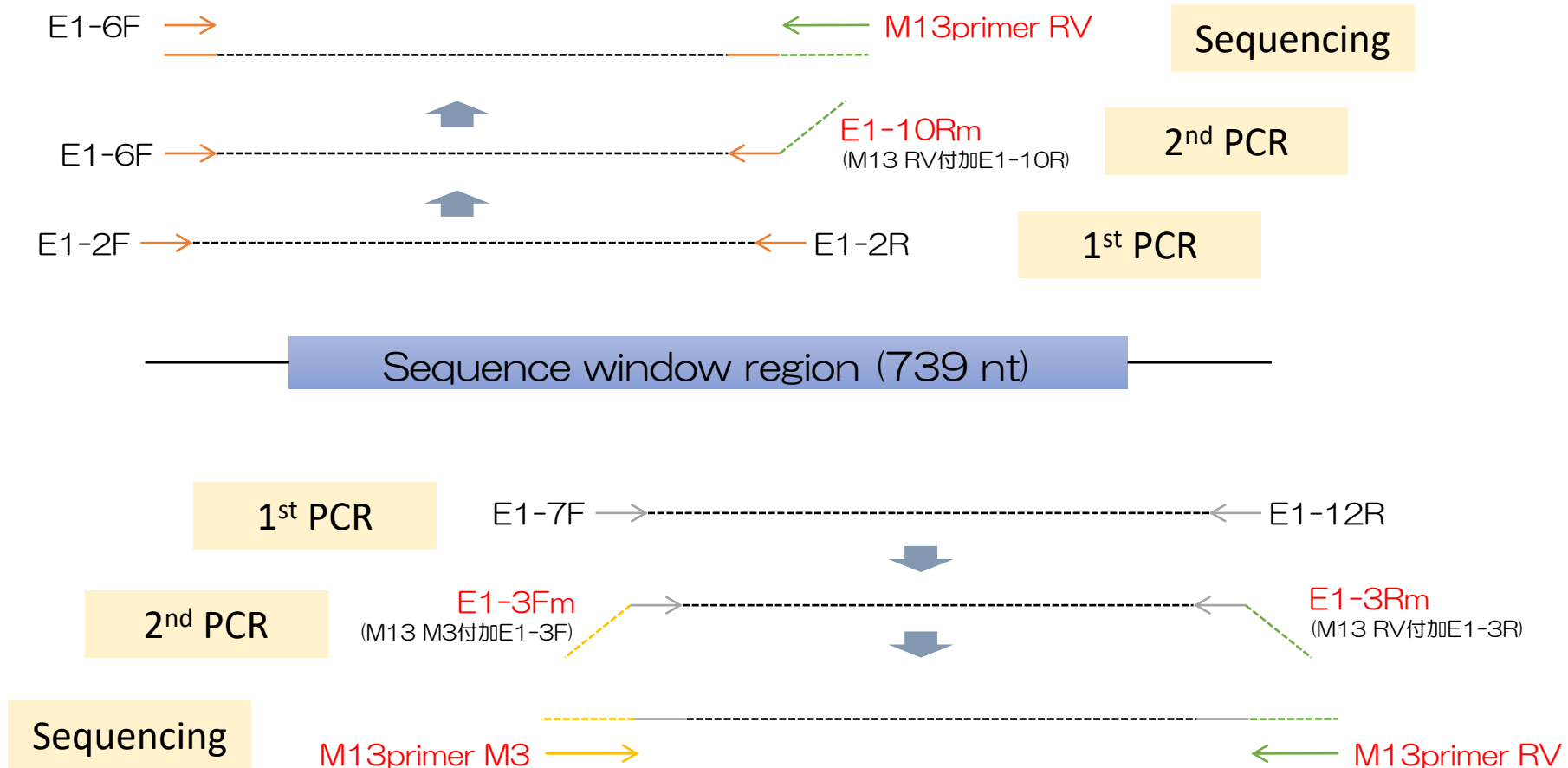
- 参照RNAに関する説明を、現行の参照RNA Ver3に合わせて変更
- 参照RNAの調製方法の記載変更
希釈液（キャリアRNA添加水）
乾燥RNAの溶解量に幅を持たせた
- マルチプレックスReal-time RT-PCRへの言及
- 風疹マニュアルとの整合性
検体処理等

病原体検出マニュアル改定（2022年10月公開済み）

<風疹 第5版>

- E1遺伝子解析法の変法記載（附属資料として）
- 参照RNAの調製方法の記載変更
希釈液（キャリアRNA添加水）
乾燥RNAの溶解液に幅を持たせた
- マルチプレックスReal-time RT-PCRへの言及
- 麻疹マニュアルとの整合性
検体処理等
血清学的検査法の記載順

風疹ウイルスE1遺伝子解析法の変法 (危機管理センター 岡本先生)



風疹ウイルスE1遺伝子解析法の変法で期待されること

- 末端解読可能部位の延長
→ E1-2断片とE1-3断片のオーバーラップ部分が長くなる
- 2nd PCR後のバンドが明確になりやすい
- シーケンス波形が改善

病原体検出マニュアル改定（2022年10月公開済み）

＜先天性風疹症候群 第4版＞

- 検体の記載整備
- 2次相談窓口医療機関一覧のリンク（2018年版）
- その他、記載整備

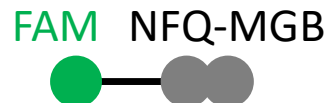
麻疹・風疹同時検出法 第1版

単独検出系

麻疹	プライマー	MVN1139F
		MVN1213R
	プローブ	MVNP1163P



風疹	プライマー	NS(32-54)Fwd
		NS(143-160)Rev
	プローブ	NS(93-106)Probe



マルチプレックス検出系

麻疹	プライマー	MVN1139F
		MVN1213R
	プローブ	MVNP1163P-VIC
風疹	プライマー	NS(32-54)Fwd
		NS(143-160)Rev
	プローブ	NS(93-106)Probe



その他の試薬・反応条件等は単独検出系と同一で実施

臨床検体を用いた麻疹・風疹マルチプレックスリアルタイムRT-PCRの検証

< 定性結果 >

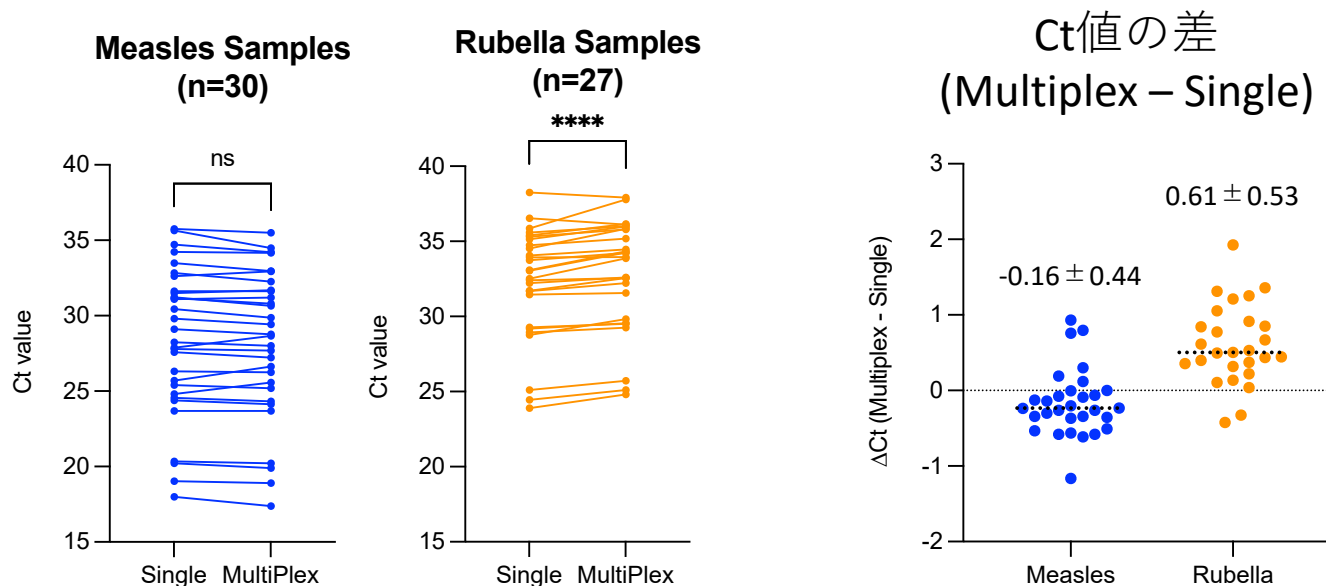
Multiplex RT-qPCR		
臨床検体 (n=82)	MeV陽性	RuV陽性
麻疹 (n=35)	35 (100%)	0 (0%)
風疹 (n=32)	1* (3.1%)	32 (100%)
両陰性 (n=15)	0 (0%)	0 (0%)

*: 風疹ワクチン株が分離された検体

分離培養 RuV GT1a (+), RuV-single Real-time RT-PCR は判定保留と陰性, MeV RuV-single Real-time RT-PCR は実施せず
(麻疹ウイルス遺伝子陽性は、MRワクチン株による可能性あり)

臨床検体を用いた麻疹・風疹マルチプレックスリアルタイムRT-PCRの検証

< 定量結果 >



麻疹：単独検出法と差は認められなかった

風疹：単独検出法より若干検出が遅れる（Ct値 0.61 ± 0.53 ）が、実際の使用において問題はほとんど生じないと思われる

2021年 麻疹・風疹・CRS検査実績調査

- 2021年1月1日～12月31日に地方衛生研究所等で実施された麻疹・風疹・CRS検査の状況を調査
- 内容：
 1. **検査全般**（検査症例数、標準搬入期間に検体が搬入された症例数、標準検査期間に検査された症例数、陽性症例数）
 2. **ウイルス遺伝子検出検査**（検査症例数、陽性症例数、ワクチン株検出症例数）
 3. **遺伝子配列および遺伝子型決定**（検査症例数、成功症例数、遺伝子型）
 4. **遺伝子配列の報告**（NESID登録数、DDBJ等登録数、未登録数）
 5. **ウイルス分離**（検査症例数、分離症例数）

<結果>

- 全国78ヶ所からの回答
- 遺伝子検査全国総数
麻疹：2018年 6093件、2019年 7409件、2020年 658件、2021年 349件
風疹：2018年 6081件、2019年 6839件、2020年 722件、2021年 341件
- 本データは、WHO西太平洋地域 麻疹風疹排除認定委員会に提出した国内の年次資料に活用した

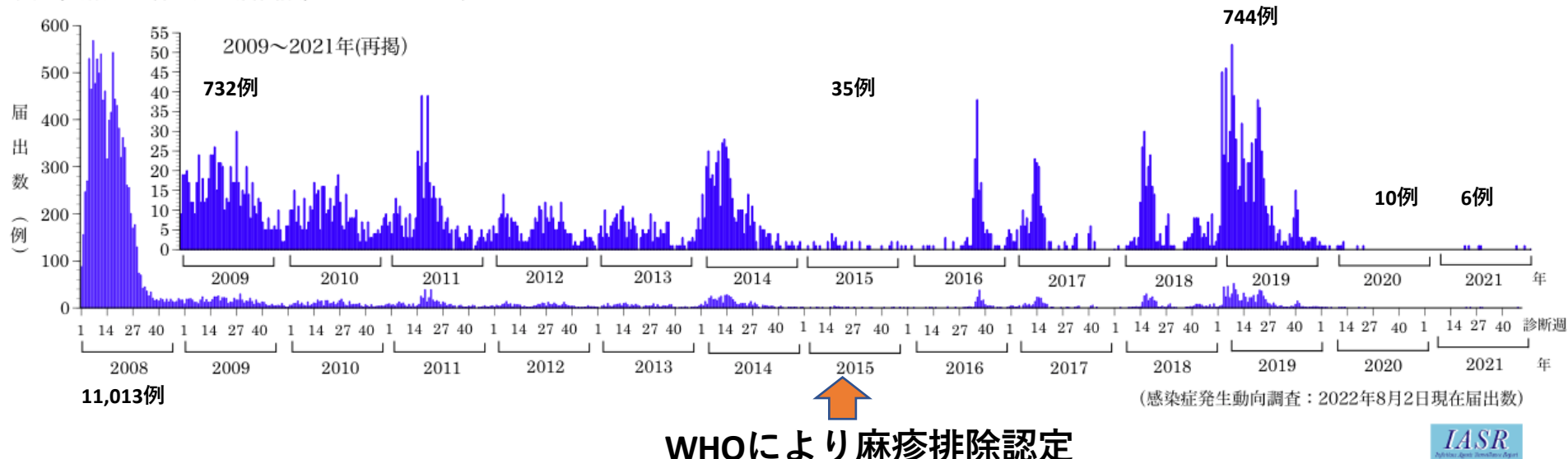
令和4年（2022年）10月11日(火) 13:00～ web開催
麻疹・風疹レファレンスセンター会議

麻疹の国内外の状況

年別麻疹報告数（2008-2021年）

IASR 9月号より改変

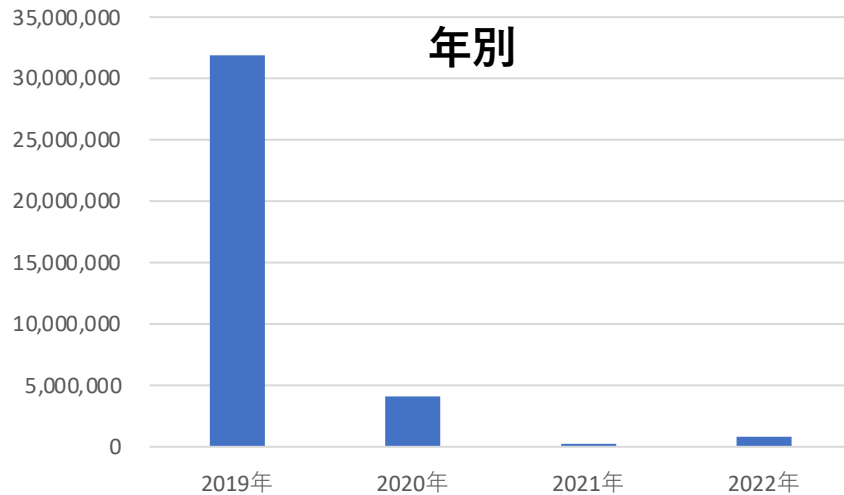
図1. 麻疹患者の週別届出数，2008～2021年



2022年はこれまで5例の報告

2020年新型コロナウイルス流行後、麻疹の発生は大きく減少

訪日客の推移



2021年・2022年は輸入例

2022年7月

インドネシア渡航歴ありの
1歳6ヶ月男児

出典：静岡県HP（2022年7月29日付）

<http://www.pref.shizuoka.jp/kousei/ko-420a/documents/masinkanjyanohassei.pdf>

2021年12月

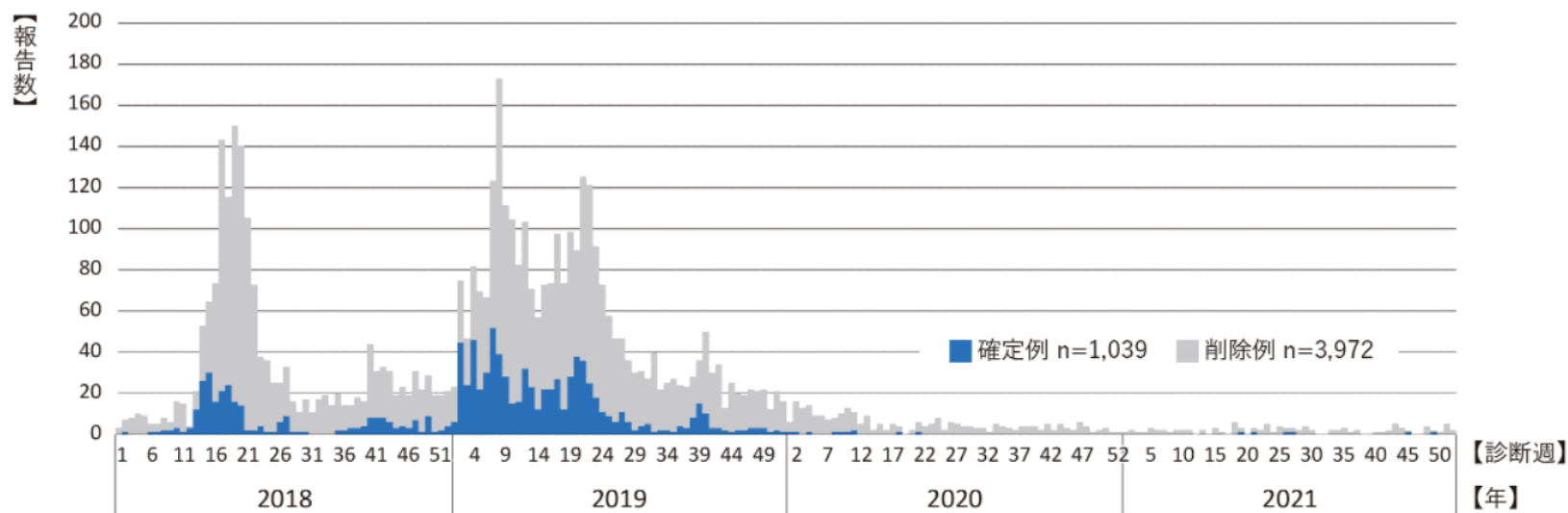
パキスタンより帰国
10歳未満女性

出典：愛知県HP（2021年12月10日付）

<https://www.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/400871.pdf>
(IASR 9月号に記事あり)

大分県でも8月に報告あり：こちらもインドネシアからの輸入例

NESIDへの麻疹症例届出数（確定例および削除例）



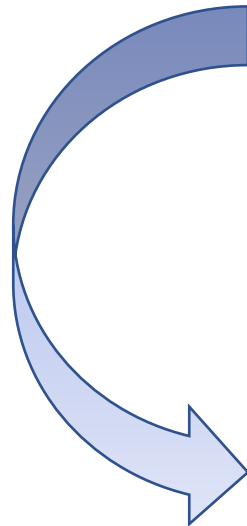
	2018年	2019年	2020年	2021年
確定例	279	744	10	6
削除例	1,446	2,177	254	95
確定例の割合	16%	25%	4%	6%

図. NESIDへの麻疹症例届出数、診断週別、2018～2021年



NESIDへの麻疹症例報告数、疑い例削除理由 2018-2021年

	疑い例（削除） n=3,072	
	例数	割合
PCR検査結果：陰性	2883	94%
抗体検査結果：陰性	80	3%
ワクチン株検出	56	2%
別疾患と診断	32	1%
症状不一致	13	0.4%
重複・誤登録	8	0.30%



うち他の病原体検出が判明したもの：263例

風疹ウイルス	208例
ヘルペスウイルス 6 型・7 型	27例
パルボウイルスB19	24例
その他	4例

ワクチン株の検出や他の病原体との鑑別が必要

国内の風疹の状況

風しんに関する特定感染症予防指針

平成29年12月21日一部改正、平成30年1月1日適用

第一 目標

**早期に先天性風しん症候群の発生をなくすとともに、平成三十二年
度（2020年度）までに風しんの排除を達成すること**を目標とする。

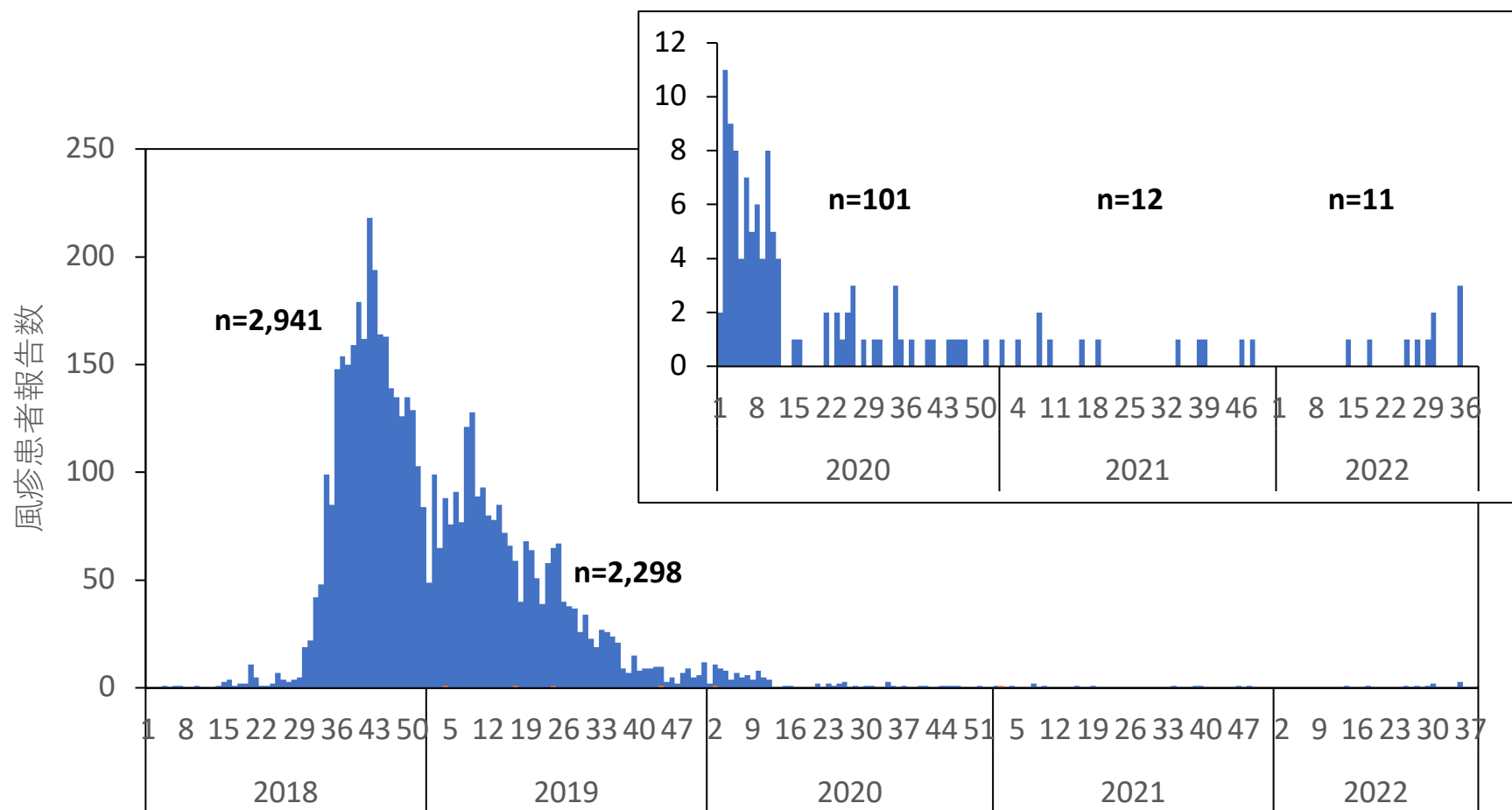
風しんの排除

「適切なサーベイランス制度の下、土着株による感染が一年以上確認されないこと」

WHO地域の認定会議による排除認定

「継続して3年間以上、土着株による伝播が遮断されていることを示す」

国内の週別風疹およびCRS患者報告数（2018-2022.38w）



2021～2022年の風疹報告症例の検査状況（2022.10.6時点）

年	症例数	病型	症例数	検査法 *	実施 n=	陽性 n=
2021	12	検査診断例	12	IgM	12	12
				IgGペア血清	1	1
				RT-PCR	3	0
		臨床診断例	0			
2022 (10/6時点)	11	検査診断例	10	IgM	10	10
				IgGペア血清	1	0
				RT-PCR	3	1
		臨床診断例	1	RT-PCR	1	0

*重複あり

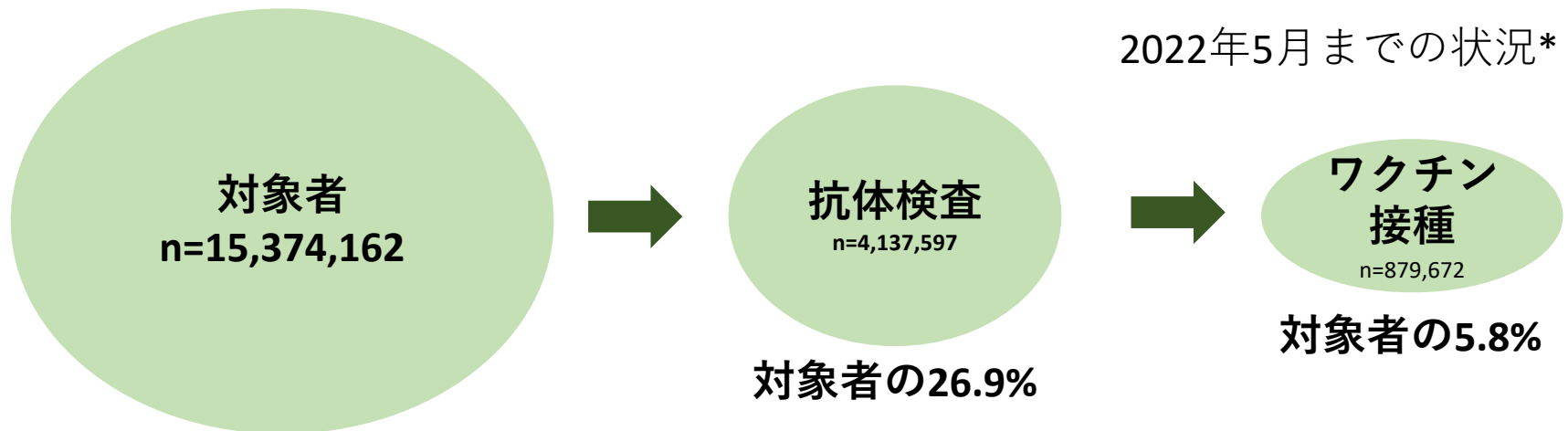
第5期風しん定期接種

対象者：1962年4月2日から1979年4月1日生まれの男性

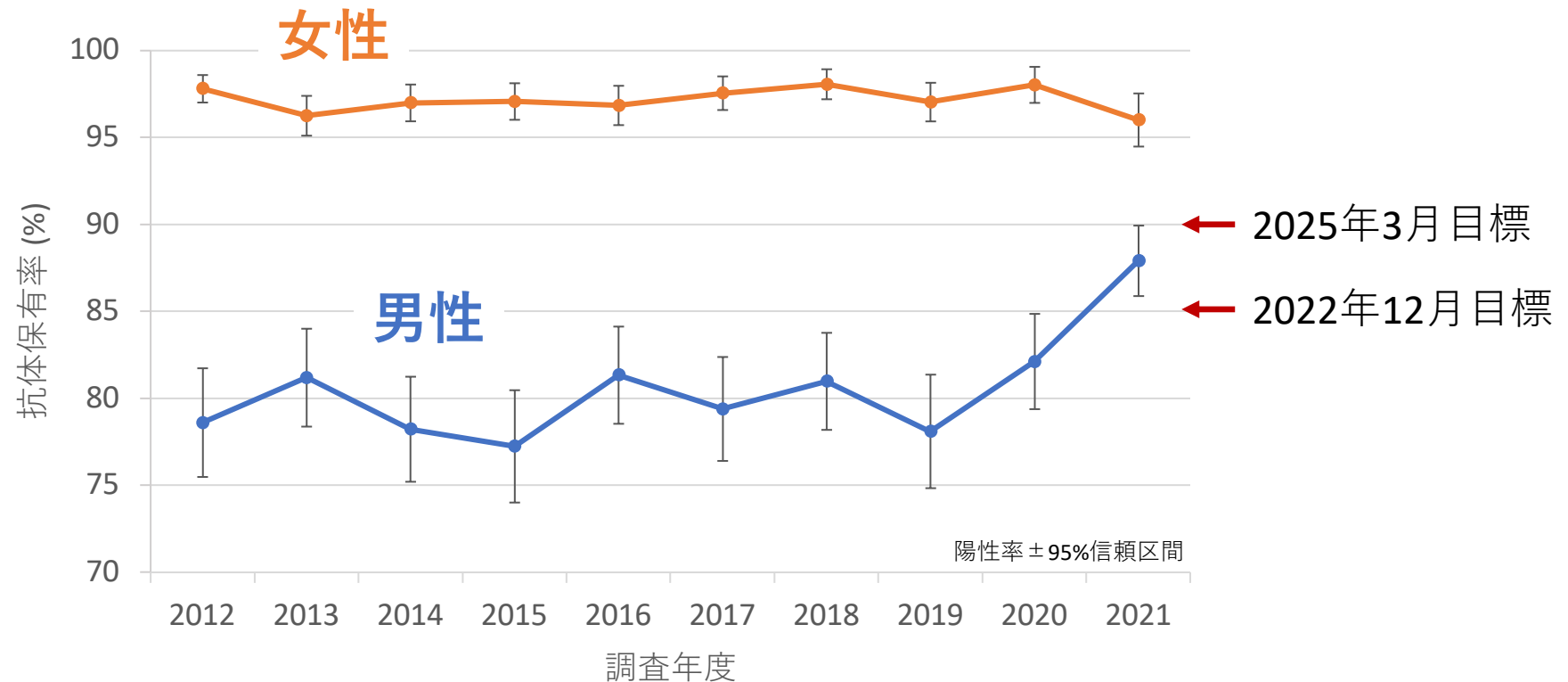
実施期間：2019年から**2024年度末**

目標：

1. **2022年12月**までに、対象者の世代の抗体保有率を**85%**以上
2. **2024年度末**までに、対象者の世代の抗体保有率を**90%**以上



1962年～1978年度生まれの男女の抗風疹HI抗体（HI価: 8以上）の保有率の推移



風疹排除認定を受けるための課題

- 2021～2022年の風疹検査診断例は、検査としてはほとんどが抗風疹IgM検査陽性のみに基づいている。風疹ウイルス遺伝子検査実施が少ない。
 - より遺伝子検査を実施できるような道筋が望まれる。
 - 地衛研に血清が搬入されている場合には、感染研で風疹IgG Avidity検査を行うことが可能です（AMED森班）。
- 第5期定期接種のさらなる推進
- 海外の流行状況のモニタリング、輸入例の速やかな探知

今年度の活動予定

- ・ 麻疹風疹Multiplex Real-time RT-PCR用 麻疹プローブの頒布
- ・ 2022年 麻疹風疹検査実績の調査（2023年1月予定）

2. HIV関連

第42回衛生微生物協議会レファレンスセンター関連会議 HIV感染症

令和4年度（2022年）HIV関連感染症のレファレンスセンター関連会議の開催は見送りました。コアメンバーにてHIV診断薬に関する情報を収集し、意見交換しました。主な内容をご報告します。

主な内容

1. IC法を原理とする確認検査試薬（Geenius）に関する情報
 - 基本事項
 - HIV-2判定保留例の紹介
 - Geenius導入に際しての提案：精度管理と早期診断の重要性
2. HIVスクリーニング検査に関する情報
 - ルミパルスHIV Ag/Ab、ルミパルスプレストHIV Ag/Abの検体種の適応拡大
 - ダイナスクリーン HIV Combo の偽陽性例の紹介
3. 自治体におけるHIV検査の縮小・中止状況

1. IC法を原理とする確認検査試薬 (Geenius)に関する情報

Geenius・WB法の確認事項

WB法試薬について

- ・ **本年6月30日で販売中止**
- ・ **最終ロットの有効期限は、HIV-1用が来年1月、HIV-2用が本年12月まで。**

Geenius HIV 1/2キットについて

- ・ 抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体の有無を、IC法の仕組みを利用した1つの試薬デバイスで判定可能
- ・ 検体として血清・血漿（5 μ L）または全血（15 μ L）を使用可能
- ・ 短時間（30分以内）で結果判定可能
- ・ Geeniusリーダー、PC用ソフトウェアとコントロール試薬により、自動解析、結果の電子的保存、精度管理が可能

※ スクリーニング検査陽性検体の確認検査用としてのみ使用可能



WB法とGeenius HIV 1/2キットの比較

	WB法 (LAV BLOT I/II)	Geenius HIV 1/2
所要時間	4時間	30分以内
必要検体量	20μL (40μL)	5μL
検査対象	HIV-1またはHIV-2	HIV-1,2両方同時
HIV-1/2型別	△	○
結果読み取り	目視	リーダー※
判定	技術者の判断	自動
感染性廃棄物	多 (洗浄液・トレイ等)	少 (試薬デバイスのみ)
消耗品	多 (水・ピペット)	少 (チップのみ)
結果の保存・保管	検査紙片	電子的 (PDF)
精度管理	×	○
装置の大きさ	大	小



※目視による判定も可能であるが、
精度管理の観点からもリーダーの使用が
推奨される。

Geenius HIV-2 判定保留事例

スクリーニング検査：HIV Ag/Ab コンボアッセイ（CLIA法：アボット社 Alinity）
陽性 3.85 S/CO

確認検査：Geenius（バイオ・ラッド社） **HIV-2 判定保留**（HIV-2 gp140を検出）

その他の検査：ジェネディアHIV-1/2 Mix（富士レビオ社） 陽性（抗体価 2⁸倍）
バイダスHIVデュオII（ビオメリュー社） **陰性**

Geenius HIV 1/2

Sample ID:	No34	Reader S/N:	DPOG884802
Cassette ID:	10E004029501	Geenius version:	2.0.203.002
Kit Lot - Exp. Date:	0E0040 - 4/10/2022	Last Calibration:	3/2/2022 17:44:39
Order date:	3/2/2022 18:02:27	Controls Lot number: NC11F0046220617 Last run on: 2/9/2022 12:14:15 Lot number: PC11F0046220614 Last run on: 2/9/2022 12:14:03	
Analysis date:	3/2/2022 18:02:29		
Test run by:			
Test version:	2.0-OUS		
Rule(s):	HIV-1 Criteria - HIV-2 Criteria		

Image



Interpretation		
Interpretation type: Automatic		
Band analysis:		
#	Name	Result
1	gp36	Absent
2	gp140	Present
3	p31	Absent
4	gp160	Absent
5	p24	Absent
6	gp41	Absent
7	CTRL	Present

Conclusion: HIV-2 INDETERMINATE

Status: Validated **by:**

追加スクリーニング検査を行えば、HIV陰性と判定可能であるが、それなしでGeeniusを実施するとHIV-2判定保留となり、フォローアップが必要となる事例

Geenius導入に際しての提案

1. 精度管理

近年、国際的な動向として感染症の診断において精度管理の重要性が高まっている。Geenius導入に際し、目視での結果の解釈も可能であるが精度管理の観点からリーダーを用いた判定・情報の管理が推奨される。

2. 早期診断の重要性

HIV感染症の早期診断の重要性の観点から、医療機関においてはGeeniusとNAT（核酸増幅検査）の両方を実施（エイズ学会推奨法）されている。その一方で、自治体におけるHIV検査においては一部の地方衛生研究所ではNATが実施されておらず、急性感染事例が判定保留（あるいは陰性）として扱われてしまう例が増加する可能性が懸念される。NATは感染急性期の確認検査として有用であると考えられる故、NATの導入を積極的に検討していただきたい。

2. HIVスクリーニング検査に関する情報

検体種に全血（血液ろ紙抽出液）が適用されました 

ルミパルス® HIV Ag/ Ab

ルミパルスプレスト® HIV Ag/ Ab

の適用検体種に、従来の血清・血漿に加えて全血（乾燥血液ろ紙抽出液）が加わりました

- ✓ 化学発光基質を用いた酵素免疫測定法により、抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体およびHIV-1 p24抗原を高感度に同時検出する試薬です（第4世代）
- ✓ 平成24年1月発売より、長年にわたり広くご使用いただいております
- ✓ 試薬そのものの変更はございません
- ✓ 装置のパラメータを更新いただき、入力画面で「HIVDBS」（Dry Blood Spot）を選択することにより、全血（乾燥血液ろ紙抽出液）モードでの陽性／陰性判定が得られます
- ✓ 血清および血漿検体の場合は、「HIV4th」を選択することにより、陽性／陰性判定が得られます

全血（乾燥血液ろ紙抽出液） 使用上の注意



全血（乾燥血液ろ紙抽出液） 特有の注意事項がございます

- 血清、血漿を用いた測定に比べ感度が低下する（プレスクリーニングの位置づけです）＊
- 全血を用いる場合、乾燥血液ろ紙抽出液を使用（全血そのものは使用できません）
- 乾燥血液ろ紙作製に際し、使用するろ紙の取扱説明書に従うこと
＊ 弊社社内データは、輸送採血ろ紙セット（栄研化学）にて実施しております
- 乾燥血液ろ紙の状態での保存安定性について
 - － 新鮮な検体を用い、
 - － 7日間を超えて保管する場合は－20℃以下で保存
 - － 繰り返し凍結融解することは避ける
- 乾燥血液ろ紙および乾燥血液ろ紙抽出液間の汚染が生じないように注意する
＊ 1回血液ディスクを打ち抜くごとに、ろ紙余白部分を3回以上打ち抜く



【輸送採血ろ紙セット】
管理医療機器
認証番号：224AFBZX00082000

＊ 濾紙検体を用いたHIV 検査の適正な提供に関する声明（2021年3月25日 日本エイズ学会）
<https://jaids.jp/wpsystem/wp-content/uploads/2021/03/79ed9d5923ce6d99f3804ef28c59275a.pdf>

ダイナスクリーン HIV Combo の偽陽性例について

(アボット ダイアグノスティクス メディカル株式会社)

30歳 男性 (2021年11月)



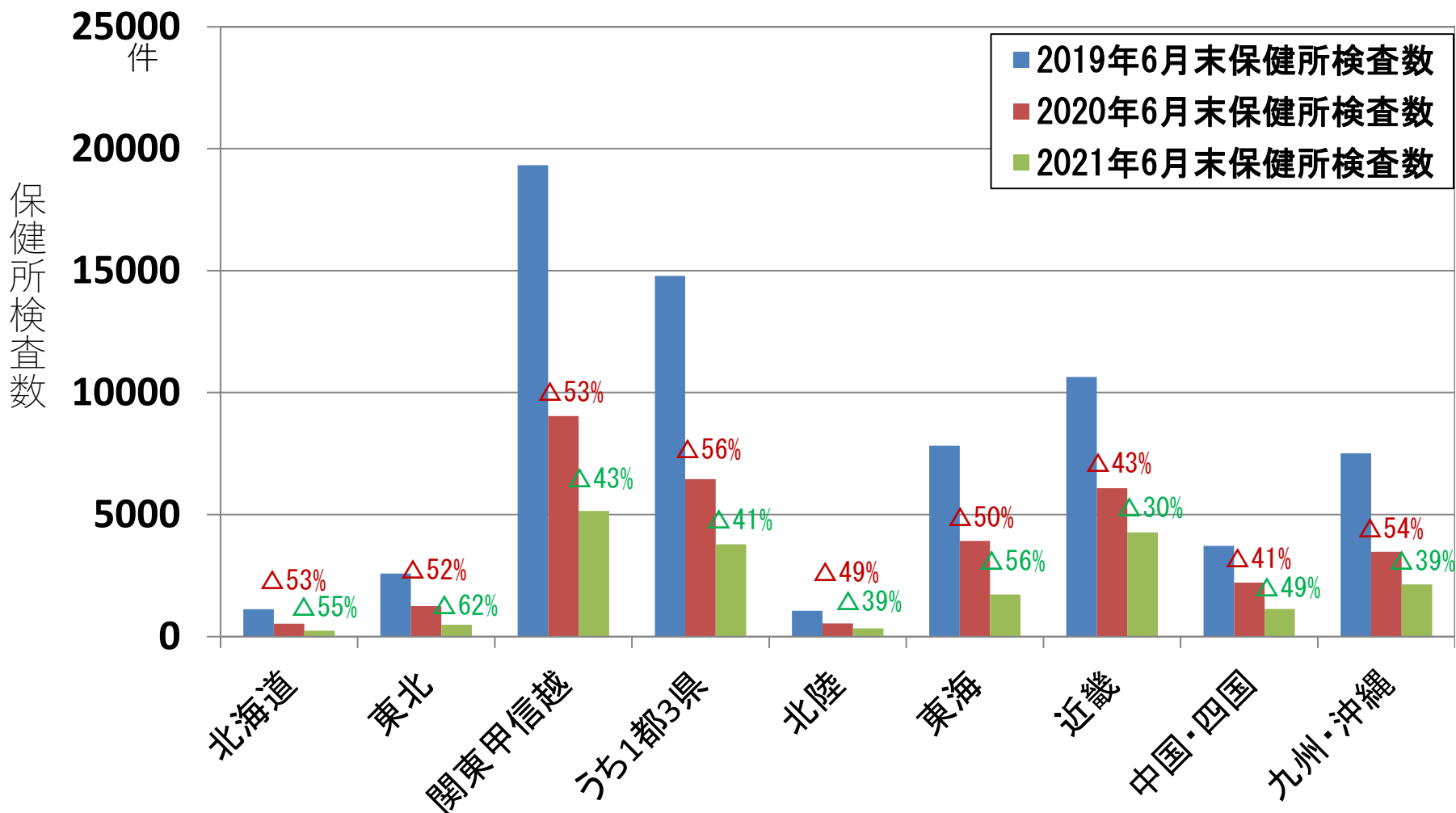
スクリーニング検査試薬	結果
ダイナスクリーン HIV Combo	抗体陽性、抗原陽性
エスプライン HIV Ag/Ab	抗体陰性、抗原陰性
ジェネディア HIV 1/2 ミックス	陰性
バ イダ スアッセイキット HIV DUO II	陰性
確認検査試薬	結果
ラブ ブロット 1	陰性
ラブ ブロット 2	陰性
イムノクロマト法 (Geenius)	陰性
リアルタイムPCR	陰性

1. 抗原・抗体の両ライン出現により、感染初期疑い例として確認検査依頼があった。
2. 当所で再検査したところ、出現ラインは発色ムラが見られたが、赤い線として判定できた。
3. アボット社に問い合わせたところ、以下の回答が得られた。
 - ・本結果は確かに珍しい。異なるロットで再現されているので、患者側の要因と思われる。
 - ・原料にマウス由来の成分が入っており、患者との相互作用等で偽陽性が見られる。
 - ・アボット社として本事例について追加検討は行わない。

3. 自治体におけるHIV検査の縮小・中止状況

地域ブロック別の保健所でのHIV検査数の推移

(2019年1-6月、2020年1-6月、2021年1-6月)



(エイズ動向委員会報告資料より抜粋)

地域ブロック別のHIV検査中止・縮小割合（自治体数）

地域ブロック	掲載自治体数	2020年				2021年			
		3月末時点	5月末時点	9月末時点	12月末時点	3月末時点	5月末時点	9月末時点	12月末時点
北海道	5	0%	60%	40%	60%	20%	40%	20%	0%
東北	15	0%	27%	20%	20%	53%	53%	60%	40%
関東甲信越 (うち1都3県)	55 (42)	31% (33%)	76% (91%)	49% (52%)	46% (52%)	46% (52%)	50% (55%)	73% (74%)	43% (43%)
北陸	6	0%	33%	33%	17%	17%	17%	33%	17%
東海	12	42%	92%	67%	67%	54%	54%	77%	38%
近畿	24	17%	67%	33%	17%	21%	42%	38%	21%
中国/四国	19	5%	42%	32%	21%	26%	32%	32%	16%
九州/沖縄	18	33%	61%	50%	39%	33%	17%	44%	33%
総計	154	21%	61%	42%	36%	38%	42%	55%	32%

（自治体HIV検査サイトの掲載情報閲覧により集計）

地域ブロック別のHIV検査中止・縮小割合（施設数）

地域ブロック	掲載 施設数 (保健所 等)	2020年				2021年			
		3月末 時点	5月末 時点	9月末 時点	12月末 時点	3月末 時点	5月末 時点	9月末 時点	12月末 時点
北海道	40	0%	33%	30%	30%	3%	30%	5%	0%
東北	61	0%	12%	10%	13%	29%	26%	27%	19%
関東甲信越 (うち1都3 県)	179 (113)	11% (13%)	44% (63%)	26% (33%)	22% (32%)	23% (32%)	25% (33%)	46% (59%)	20% (27%)
北陸	22	0%	9%	9%	5%	5%	5%	9%	5%
東海	58	10%	55%	38%	38%	12%	46%	61%	8%
近畿	82	7%	40%	13%	5%	10%	16%	15%	10%
中国・四国	79	1%	20%	13%	14%	9%	19%	11%	8%
九州・沖縄	87	12%	29%	20%	21%	13%	8%	15%	7%
総計	608	7%	33%	21%	19%	16%	22%	29%	12%

（自治体HIV検査サイトの掲載情報閲覧により集計）

HIVレファレンスセンター・コアメンバー

(敬称略)

神奈川県衛生研究所 佐野貴子、近藤真規子

大阪府健康安全基盤研究所 川畑拓也

東京都健康安全研究センター 長島真美、貞升健志

国立感染症研究所エイズ研究センター 草川茂 松岡佐織

3. インフルエンザ

インフルエンザレファレンスセンター

2022年6月10／11日 センター会議を開催

2022-23シーズンの季節性インフルエンザサーベイランスに関する説明と動物由来インフルエンザの近況・検査についての情報共有を行った。

資料は地方衛生研究所と共有済

世話人 渡邊真治

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

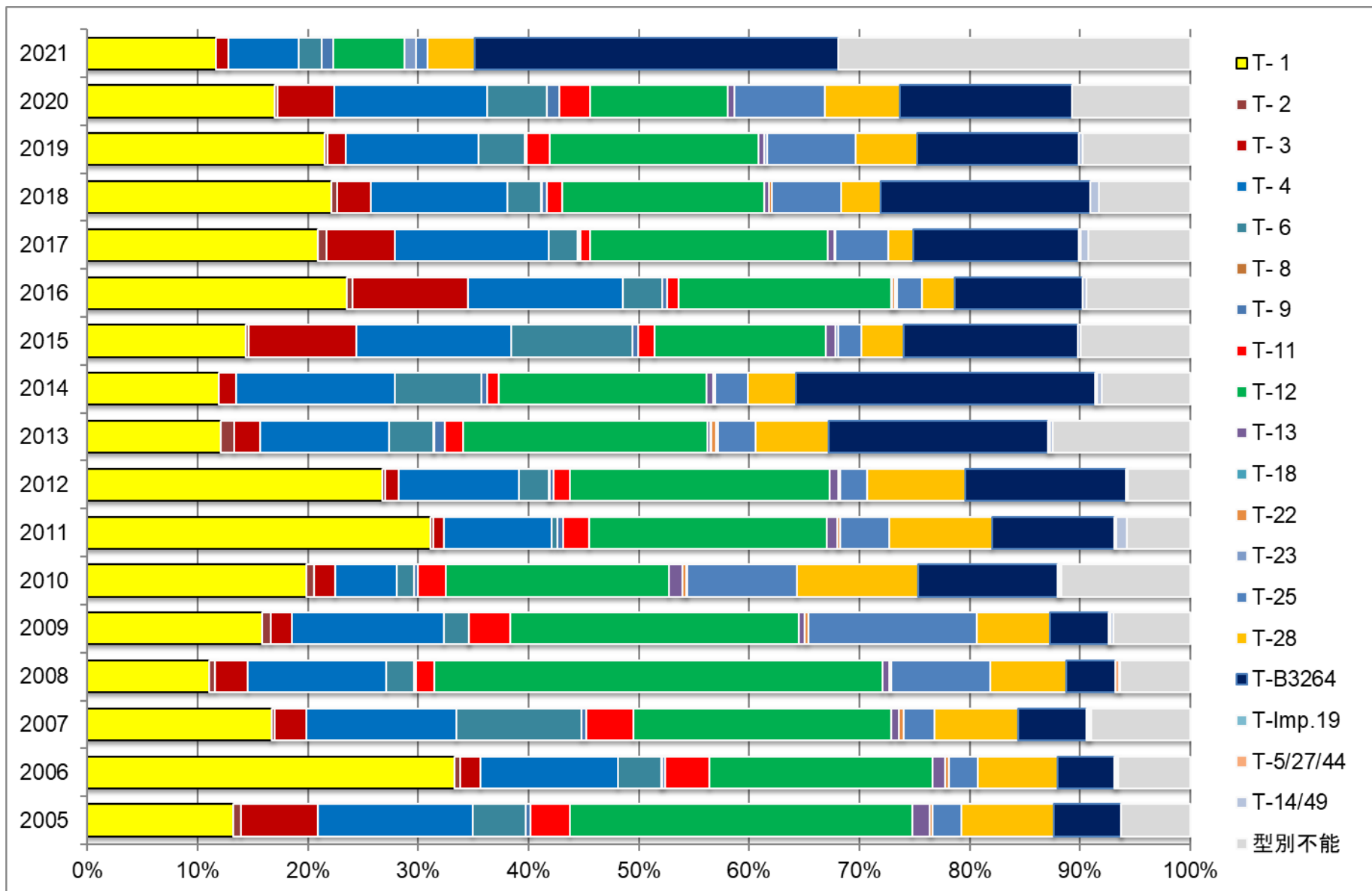
- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

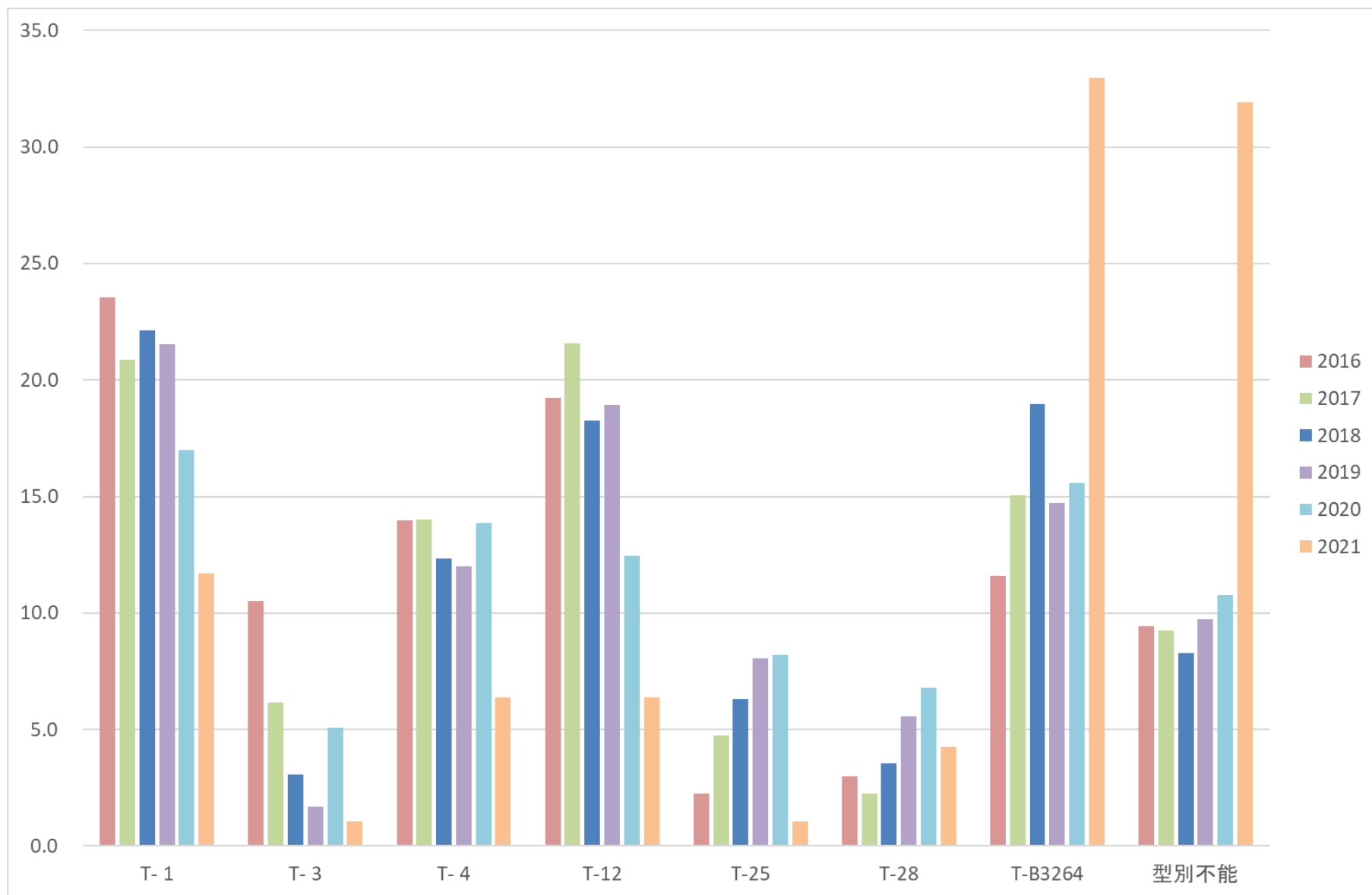
- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

咽頭炎由来全国集計(2005-2021)分離比率棒グラフ



全国集計(2016-2021)比率年変化棒グラフ



5. カンピロバクター

令和4年6月29日10時～12時
Zoom Online

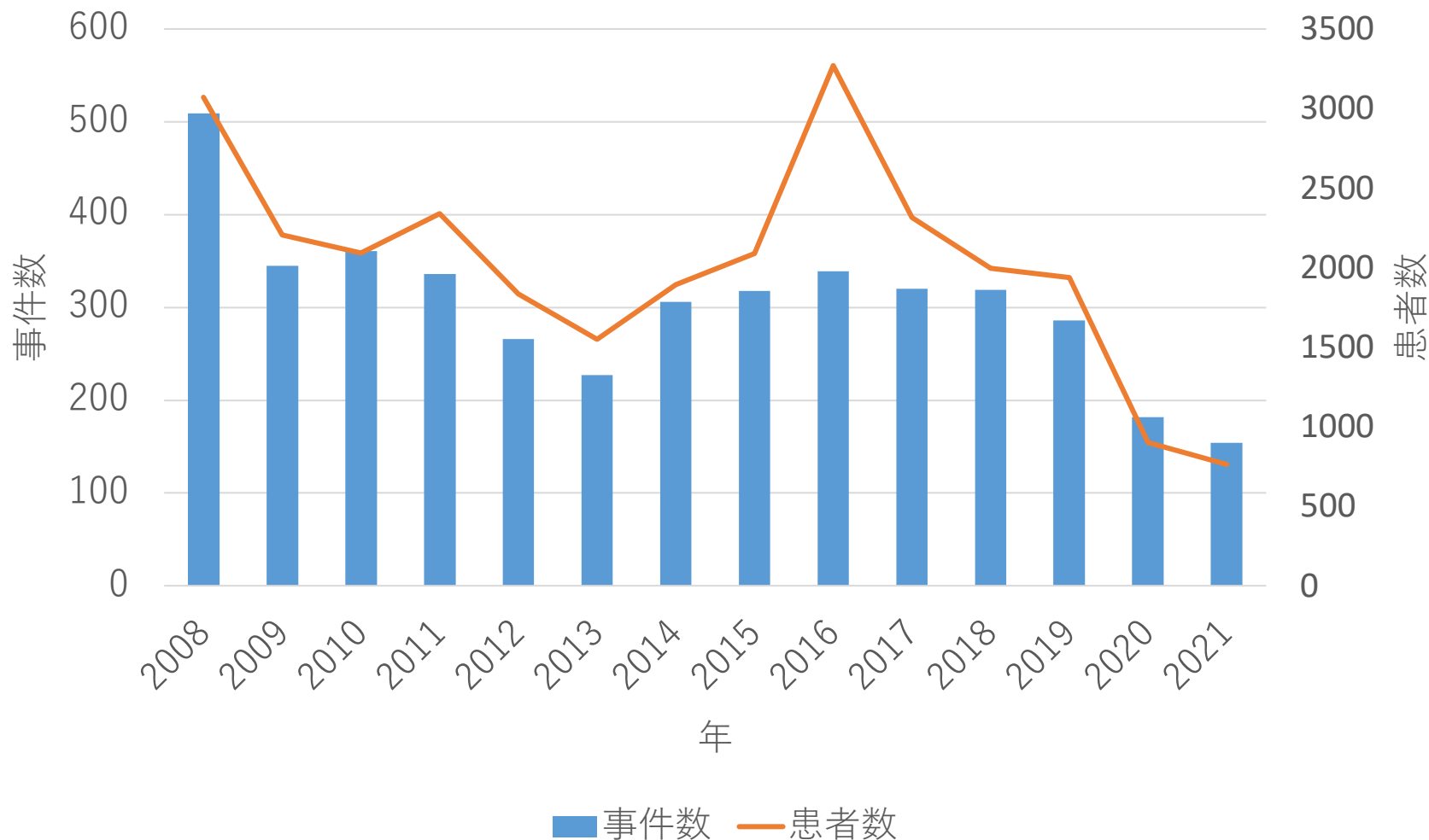
衛生微生物技術協議会
令和4年度レファレンスセンター会議
カンピロバクター

令和4年度 カンピロバクター・レファレンスセンター名簿

ブロック等	主担当者	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	大塚 仁	山口県環境保健センター	保健科学部
九州・沖縄	伊豆 一郎	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

- ・ 令和 3（2021年）の発生状況：事件数 154件（全体の21.5 %）
患者数 764名（全体の 6.9 %）
- ・ 本菌による食中毒が事件数総数に占める割合は大きく減少はしていない。



令和3年度の活動報告

① 薬剤感受性試験：散発事例由来株を対象に4剤への感受性を検討。

- シプロフロキサシン耐性は49株（40.2%）、テトラサイクリン耐性及びエリスロマイシン耐性は共に20株（16.4%）となり、昨年度とほぼ同等の結果を認めた。
- エリスロマイシンについては1センターで高い耐性率を認めた。
- テトラサイクリン感受性判定では、E-testを用いることの有用性が確認された。

EM	TC	CPFX	ABPC	菌株数	割合 (%)
S	S	S	S	54	44.3
S	S	S	R	5	4.1
S	S	R	S	20	16.4
S	R	S	S	4	3.3
R	S	S	S	4	3.3
S	S	R	R	3	2.5
S	R	R	S	9	7.4
S	R	S	R	1	0.8
R	S	R	S	4	3.3
R	S	S	R	5	4.1
R	S	R	R	7	5.7
S	R	R	R	6	4.9



多剤耐性率は28.7%（35/122）

（*C. jejuni* 計122株の成績を示す）

② Penner-PCR法を用いた菌株型別：散发事例由来 *C. jejuni* 計122株

Penner-PCR型	対応するHS抗原型	菌株数	薬剤耐性株数（耐性率）			
			EM	TC	CPFX	ABPC
gB 群	HS:2	31	3 (9.7%)	3 (9.7%)	10 (32.3%)	6 (19.4%)
gO 群	HS:19	16	2 (12.5%)	10 (62.5%)	12 (75.0%)	6 (37.5%)
gD 群	HS:4/13/16等	13	1 (7.7%)	1 (7.7%)	6 (46.1%)	1 (7.7%)
gG 群	HS:8/17	13	0	0	1 (7.7%)	1 (7.7%)
gC 群	HS:3	7	4 (57.1%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	4 (57.1%)
gR 群	HS:23/36/53	7	0	2 (28.6%)	1 (14.3%)	1 (14.3%)
gJ 群	HS:11	5	0	0	3 (60.0%)	0
gI 群	HS:10	4	0	0	1 (25.0%)	0
gE 群	HS:5	3	1 (33.3%)	0	2 (66.7%)	0
gF 群	HS:6/7	2	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0	1 (50.0%)
gK 群	HS:12	2	1 (50.0%)	0	1 (50.0%)	2 (100.0%)
gU 群	HS:31	2	1 (50.0%)	0	1 (50.0%)	0
gL 群	HS:15	1	0	0	0	0
gN 群	HS:18	1	0	0	0	0
gP 群	HS:21	1	0	0	0	0
gY 群	HS:37	1	0	0	0	0
UT	-	12	6 (50.0%)	1 (8.3%)	6 (50.0%)	5 (41.7%)
計		122	20 (16.4%)	20 (16.4%)	49 (40.2%)	27 (22.1%)

③ mP-BIT法等の試行の開始

- Penner-PCR法の適用範囲は*C. jejuni* (*C. coli*には適用できない)
- 同一のPenner-PCR型を示す株にも多様性が想定される



令和3年度より実施可能なセンターでmP-BIT法等の試行を開始。

Penner PCR型	菌株数	mP-BIT score	菌株数	対応センター数
gB群 (HS:2)	27	15-55	8	3
		59-127	4	2
		15-439	2	2
		138-53	2	2
		0-260	2	1
		その他	9	1
gC群 (HS:3)	7	11-55	5	2
		その他	2	1
gD群 (HS:4)	12	11-55	4	1
		その他	7	1
gG群 (HS:8/17)	7	11-55	2	1
		62-63	2	1
		その他	3	1
gO群 (HS:19)	16	0-388	8	3
		その他	8	1

6. 結核

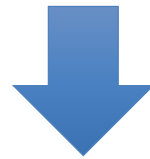
結核菌VNTR分析に関する 外部精度評価について

公益財団法人 結核予防会結核研究所
村瀬 良朗、細谷真紀子、御手洗 聡

厚生労働省 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」

背景

- 「結核に関する特定感染症予防指針」では、VNTR分析を用いた分子疫学調査の実施が推奨されており、多くの自治体で実施されている。
- 2016年より検査精度保証に関する取り組みが制度化されている。



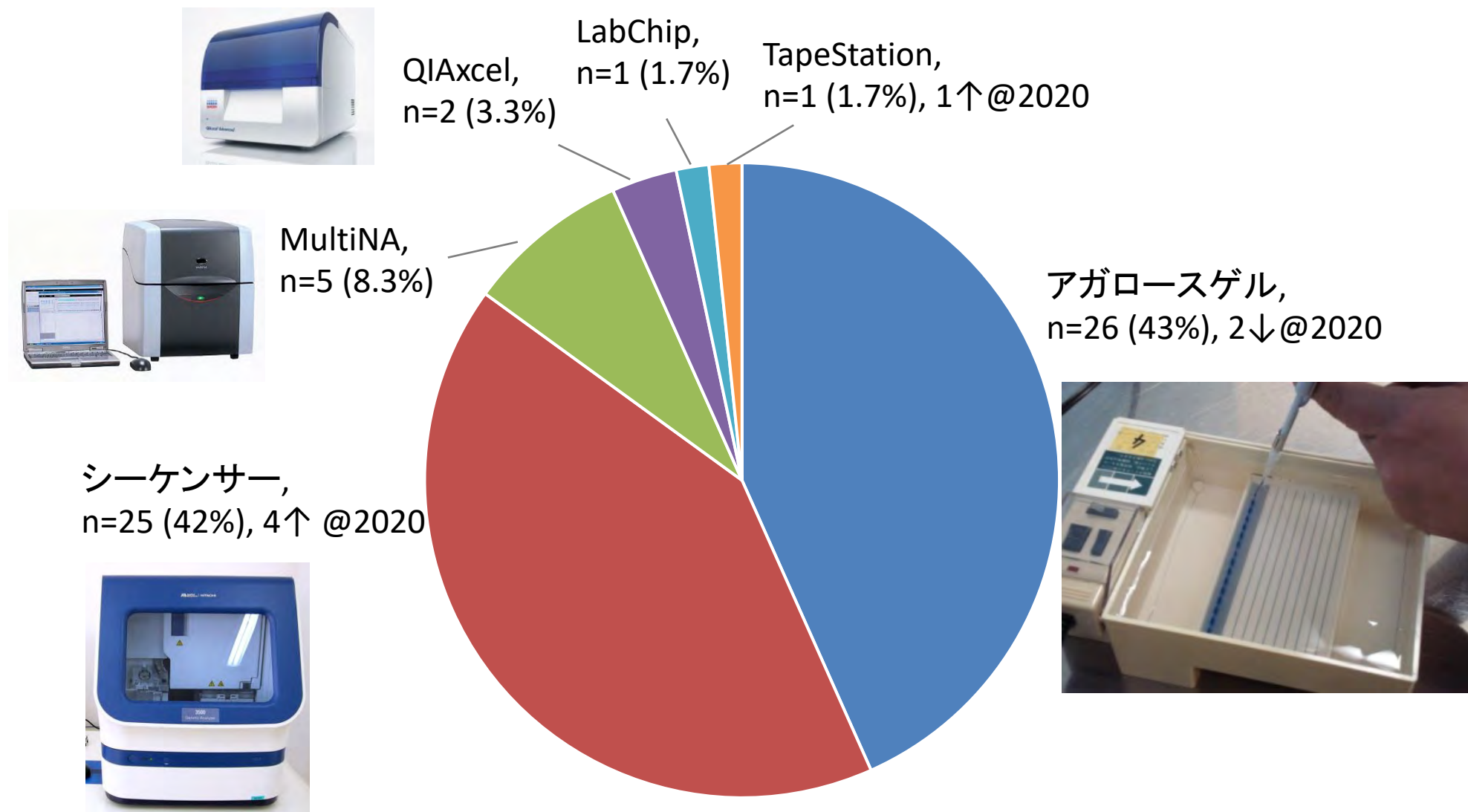
「結核菌VNTR解析の外部精度評価」に関する研究を
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」(主任研究者 宮崎義継)の
一部として実施

2021年度VNTR分析外部精度評価の概要

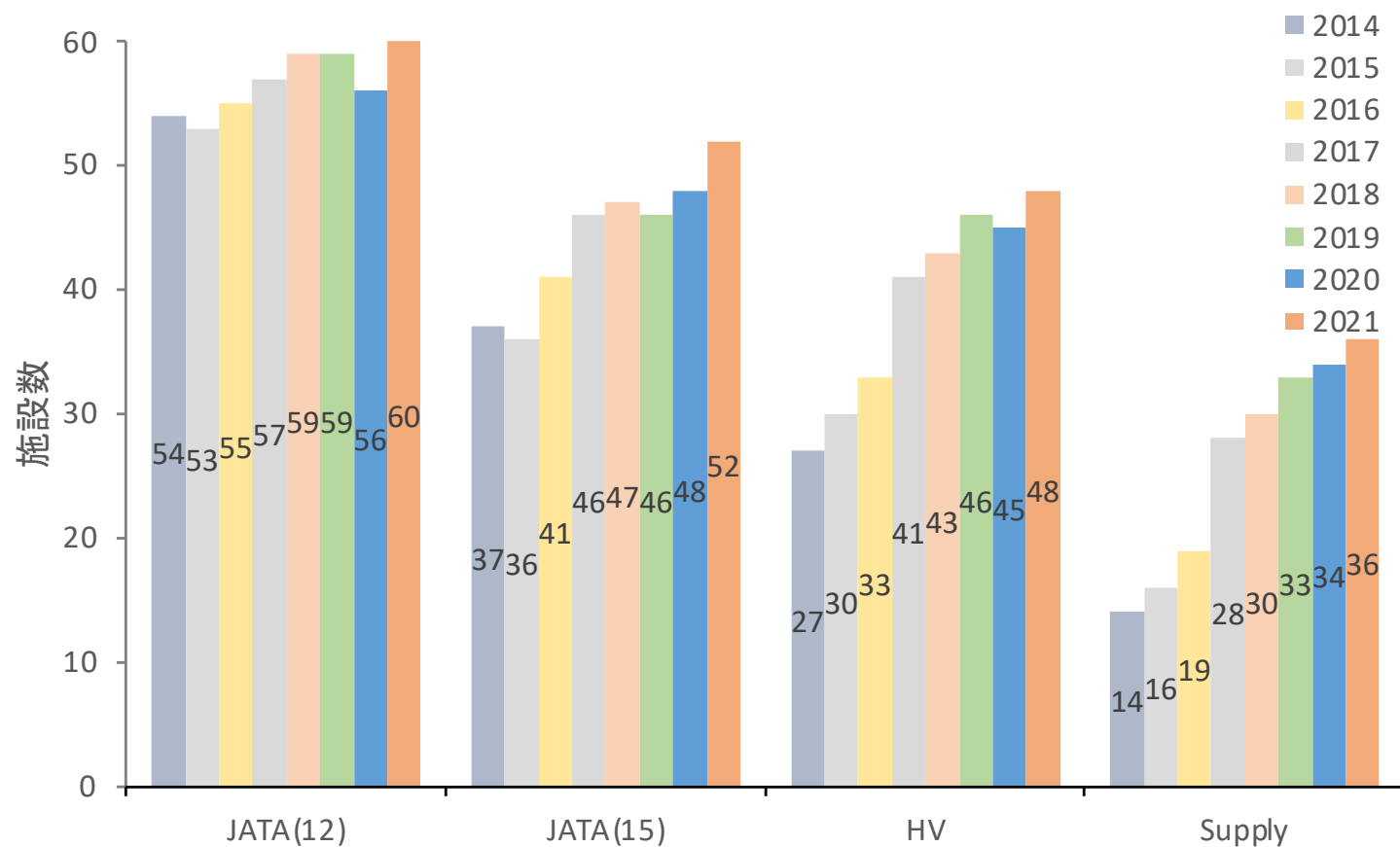
- 2021.9.30に結核レファレンス委員より地方衛生研究所へ開催の案内
- 2021.11.15までに61施設より参加の回答（2020年度[n=56]）
- 2021.11.16に検体DNAを参加施設へ送付
- 報告期限(2022.1.31)までに58施設から報告、その後、2施設から報告あり
- 個別成績、全体成績をまとめた報告書を参加施設へ報告(2022.3.29)

2021年度外部精度評価の分析結果

各施設で用いられていたDNA分子量の測定法 (2021年度, 60施設)



参加施設で採用されているVNTR分析システム



- JATA-12は基本的に全施設で実施
- 任意の実施としたJATA-15、HV、Supplyの分析施設数が年々増加

2021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)	2019 (59施設)	2020 (56施設)	2021 (60施設)
完全一致 (n, [%])	36 (67%)	49 (92%)	48 (87%)	40 (70%)	55 (93%)	53 (90%)	49 (88%)	54 (90%)
1 locus違い (n, [%])	7 (13%)	1 (2%)	5 (9%)	12 (21%)	3 (5%)	2 (3%)	3 (5%)	6 (10%)
2 loci以上の 違い (n, [%])	11 (20%)	3 (6%)	2 (4%)	5 (9%)	1 (2%)	4 (7%)	4 (7%)	0 (0%)

- 2021年度は90%の施設が完全一致、10%が1 locus違い、2 loci以上異なった施設は無かった
- 2021年度は良好な成績であったが、エラーのある施設もあるため、外部精度評価の必要性がある

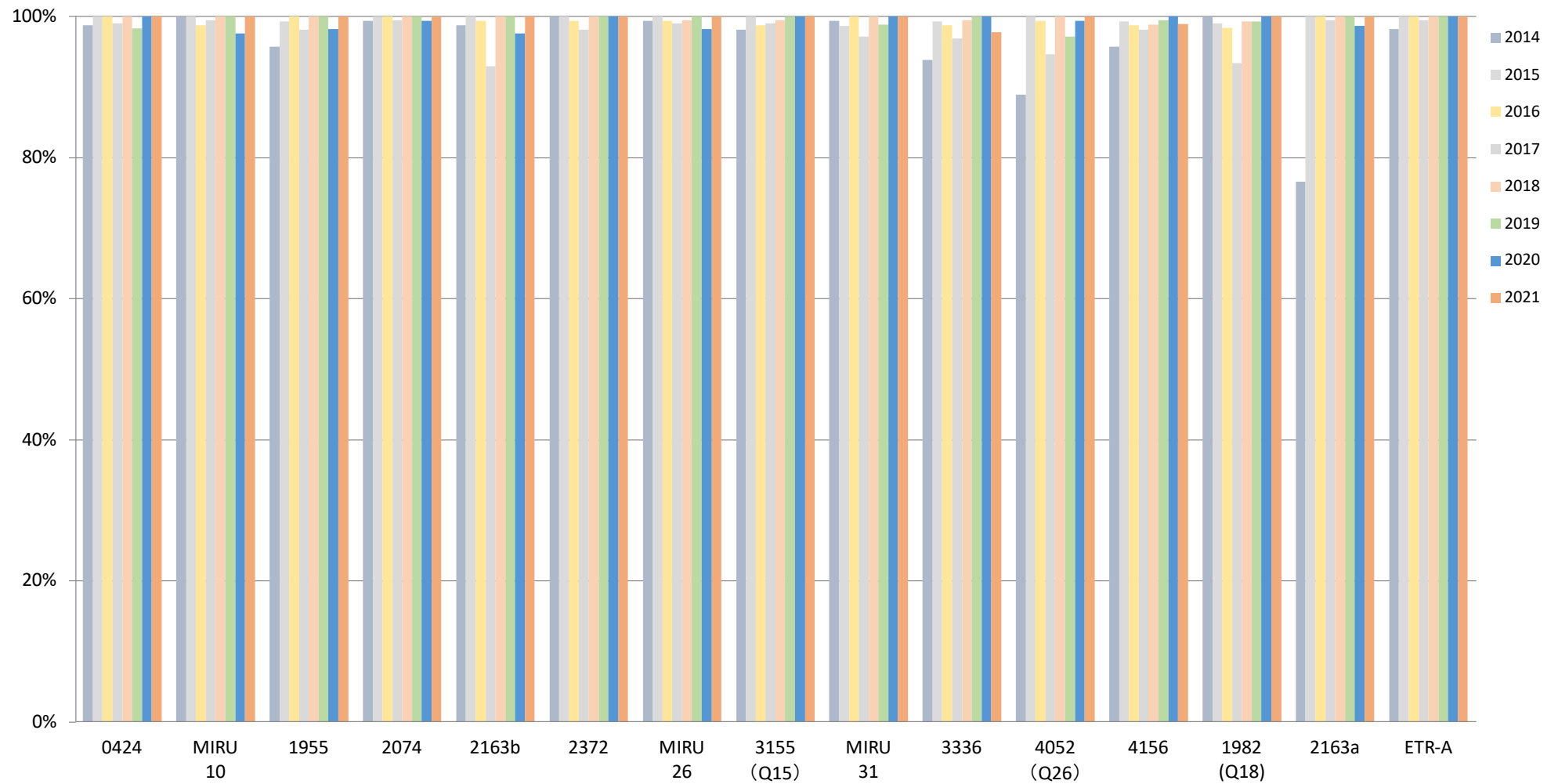
分子量測定法とローカスセットの正答率(2021)

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	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)	n	正答率(%)
アガロースゲル電気泳動	26	99.6	18	100	17	100	7	100
自動シーケンサー	25	99.9	25	100	24	99.1	24	99.8
MultiNA	5	99.4	5	100	3	100	2	97.2
QIAxcel	2	100	2	100	2	100	1	100
LabChip(PE)	1	100	1	100	1	100	1	100
TapeStation	1	100	1	100	1	100	1	100

- 2021年度は、MultiNAのSupplyを除けば、すべての測定法、ローカスセットで正答率が高かった
- MultiNA、QIAxcel、LabChip では例年、正答率が低い施設が散見されたが、2021年度は改善していた（複数測定方法の併用による？）

各locusにおける正答率(%)



2021年度における1 locusあたりの正答率は97.8-100%であり、特定のlocusで正答率が低くなる現象は認められなかった

その他の活動

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.00 Date: of release 2020/Nov./xx Page: 1 of 15
---	---	--

1. 原理

本 SOP では、結核研究所抗酸菌部で実施している 24_{Beijing}-VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats ; 反復配列多型) の分析手順を示す (資料 1、2)。本分析では、PCR 反応によって VNTR 領域を増幅後、キャピラリー・シーケンサーを用いてその鎖長を分析 (フラグメント解析) し、24 ヶ所の VNTR 領域におけるコピー数を同定する。

検査材料として、結核患者から分離培養された *M. tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*) から抽出したゲノム DNA を用いる。ゲノム DNA を鋳型とし、1 つの反応溶液で複数の領域を同時に増幅する Multiplex PCR を組み合わせ、24 ヶ所の VNTR 領域を 12 反応溶液で増幅する。この PCR 反応に蛍光標識プライマーを用いることで、VNTR 領域の増幅と同時に、フラグメント解析に必要な蛍光色素を PCR 産物に付加する。続くフラグメント解析では、キャピラリー・シーケンサーが 5 色の蛍光色素を同時に測定することで、1 run あたり PCR 産物 4 色と内部分子量マーカー 1 色を識別する。したがって、得られた PCR 反応溶液を 4VNTR 領域ずつ混合後、内部分子量マーカーと共にキャピラリー・シーケンサーで分析し、1 検体あたり 6 run で 24 VNTR 領域の分子量を測定する。得られた分子量をもとに、24VNTR 領域毎のコピー数と分子量の換算表に従い、GeneMapper ソフトウェア上で被験菌株の 24_{Beijing}-VNTR プロファイルを同定する。

2. 定義と略語

定義

・ VNTR 法

ゲノム DNA 上に複数存在するミニサテライト様の反復配列領域における反復数 (コピー数) の多型を利用した遺伝子型別法であり、結核菌では 2000 年代から国際的に使用されている。VNTR 法を用いて十分な菌株識別能を得るためには、複数の反復配列領域を分析する必要がある。調査地域における結核菌流行株の違いや検査目的に応じ、複数の反復配列領域の組み合わせが提案されている (表 1)。

・ JATA (Japan Anti-Tuberculosis Association) 12、JATA 15

日本国内で分離される結核菌株を少ない解析領域で効率的に菌株識別するため、結核研究所から提案された 12 または 15 ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである (資料 3)。自治体間で VNTR 情報を共有・比較するため、JATA12 を共通解析領域として使用することが提案されている。患者同士の接触が疑われる事例 (集団感染疑い等) において菌の同一性を鑑別する場合、JATA12、15 は十分な菌株識別能を有していると考えられている。一方、地域で発生した結核菌株を網羅的に分析し、VNTR 型の一致から帰納的に感染経路を推定する場合には、推定精度を高めるために、他の VNTR 領域を組み合わせる分析することが推奨される (24_{Beijing}-VNTR 等、後述)。

・ Supply 15

国際的な標準法として提唱された 15 ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである (資料 4)。Supply 15 の二次型別法として、9 ヶ所を追加した Supply 24 も存在する。

標準作業手順書の公開

- 自動シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の SOPを結核研究所HPにて公開(2021.4)
- DNA調製法、multiplex PCR法等の手順を記載

蛍光プライマーセットの小分けキット化

- 自動シーケンサー分析系を導入する上で、蛍光プライマー一式の購入費用が課題 (24 loci: 2万円 x 24 ペア = 48万円)
- 小分けキット化をThermoFisherに要望
- 24 loci用プライマーセット一式の小分けキットが2022年5月より入手可能
- 150反応分、77,000円
- 発注番号:A54818JP

まとめと展望

- 2021年度は60施設に対して外部精度評価を実施中(8回目)
- 2021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54施設(90%)
- 今後も外部精度評価等を通じて、VNTR分析の精度の維持と向上を図る必要がある。また、ゲノム解析に対応した外部精度評価を検討していく必要がある。

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・古川一郎
- 東海北陸：富山県衛生研究所・金谷潤一
- 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・塚本伸哉

世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 村瀬良朗，御手洗聡

7. アルボウイルス

アルボウイルスレファレンスセンター等 関連会議

2022年7月29日(金)

国立感染症研究所ウイルス第1部第2室



DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用 陽性コントロールの作製

国立感染症研究所・ウイルス第一部
田島茂

アルボウイルスセンター会議
2022年7月29日



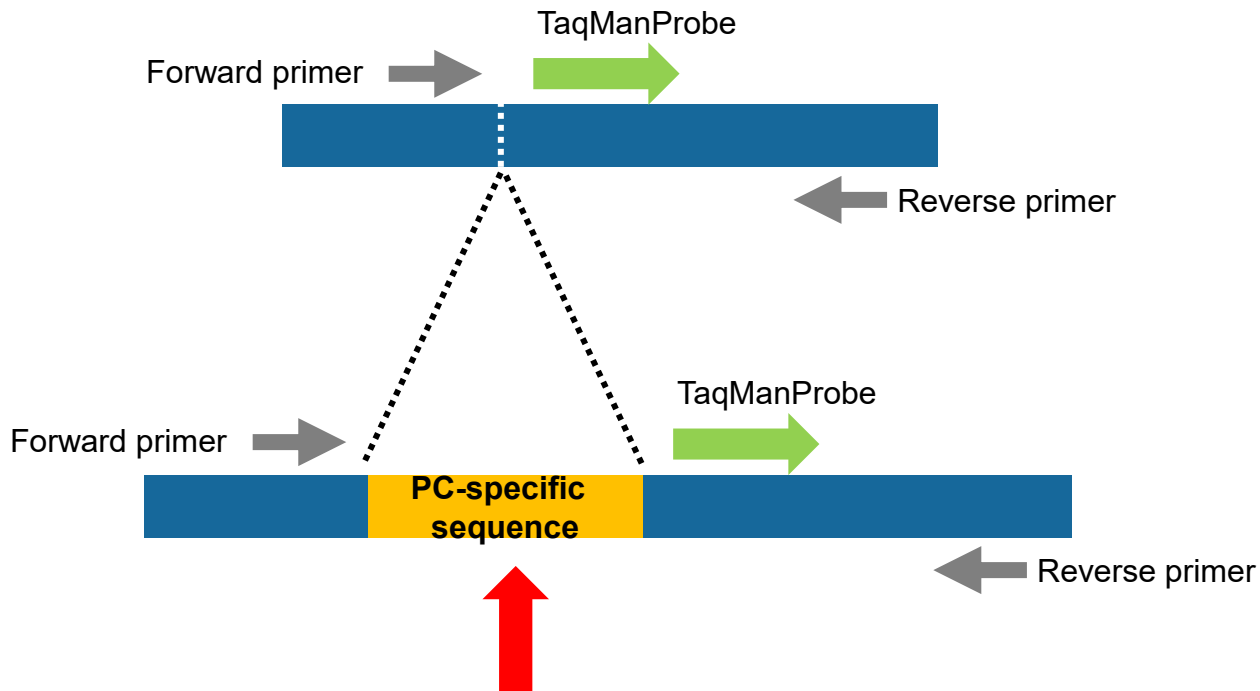
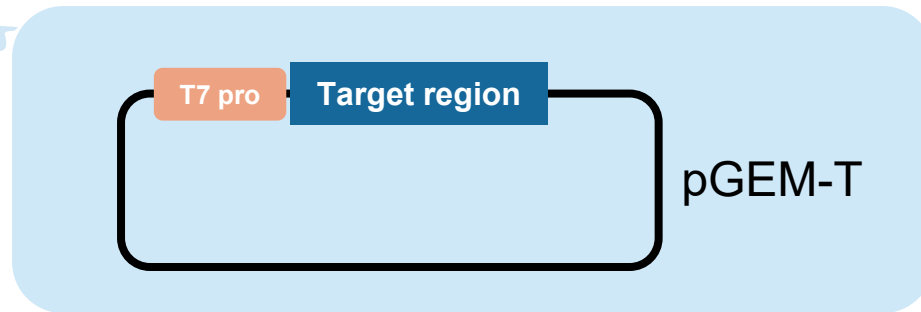
目的

これまで当研究室では、アルボウイルス（デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルス）のリアルタイムPCR法によるゲノム検出用陽性コントロールとして、感染性ウイルスから抽出したウイルスゲノムRNAを提供してきた。

しかしこれらは、ウイルスゲノムの検体中のコピー数算出には使用できない。さらに、反応系や臨床検体への陽性コントロールのコンタミネーションの可能性を判断することも困難である。

そこで今回当研究室では、これらの問題点を改善するために、新たな陽性コントロールを作製した。

陽性コントロール特異的配列の挿入



Contamplicon (CA) probe: VIC(or HEX)-AGT AGC TTG CTC TTT CAT CTG TTA CG-none(or BHQ1)

Forward primer

Probe

ContAmplicon

Reverse primer

DENV1

GGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAAAGGAAGCCTTATAACGTGTGCTAAG
TTCAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACCTTGAAATATTCAGTAATAGTCACCGTCCACAC
TGGAGACCAGCACCAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACTGCAACTATAACACCTCAAGCTCTACagtag
cttgctctttcatctgttacgGACAGAAATACAGTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTACCTAGAACAG
GACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCA

DENV2

AAGGAAAAATCGTGCAACCAGAAAACCTTGGAGTACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGAAGAGAATGCAGTCGGA
AATGACACAGGAAAACACGGCAAGGAAATTAAAGTAACACCACAGAGTTCATCACAGAAGCAGAACTagtagcttgctc
tttcatctgttacgAACAGGCTATGGCACTGTCAAGATGGAATGCTCTCCGAGAACGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT
GTTGCTGCAGATGGAAAACAAGGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCTTAGACCTGCCGTTACCATGGCTGCCCGGAG
CAGAC

DENV3

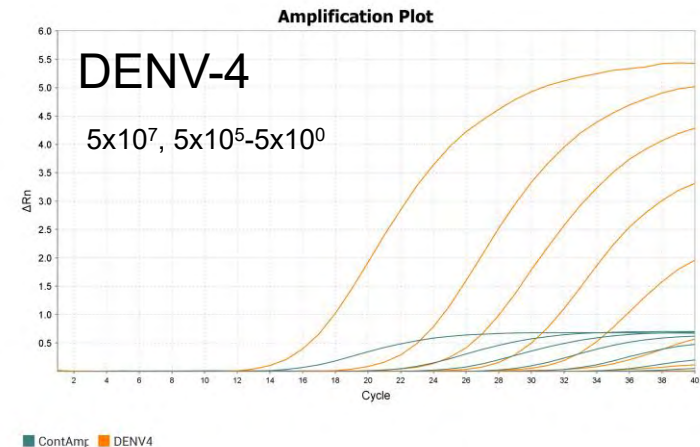
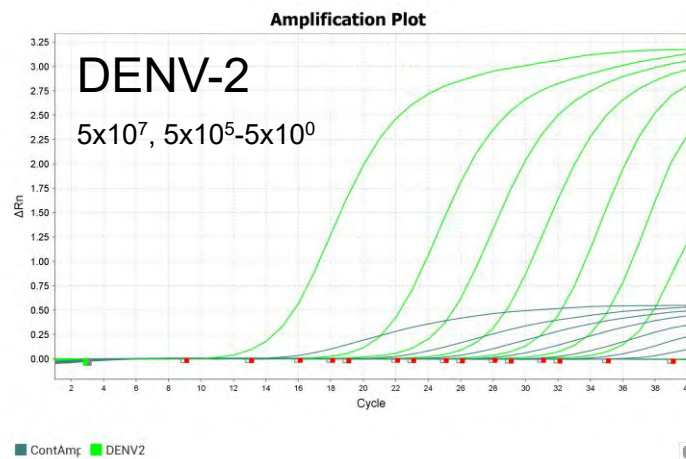
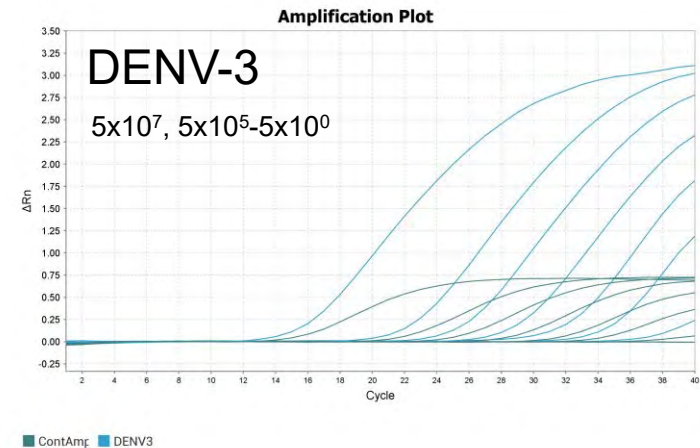
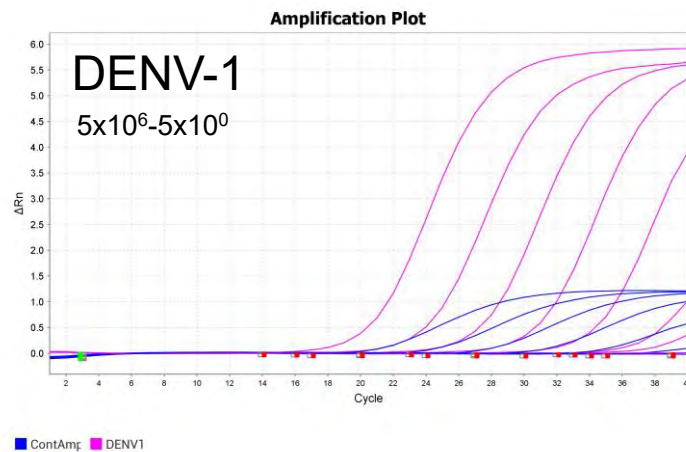
TGGCGTTAGCTCCTCATGTCGGCATGGGACTGGACACACGCACCCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAA
GTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCTCTATTTCTTGCCCATTACATAGGCAC
TTCCTTGACCCAGAAAGTGGTTATTTTTATACTACTAATACTGGTCACTCCATCCATGGCAATGAGATGCGTGGGAGTAG
GAAACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCagtagcttgctctttcatctgttacgGGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGC
TCGAAC

DENV4

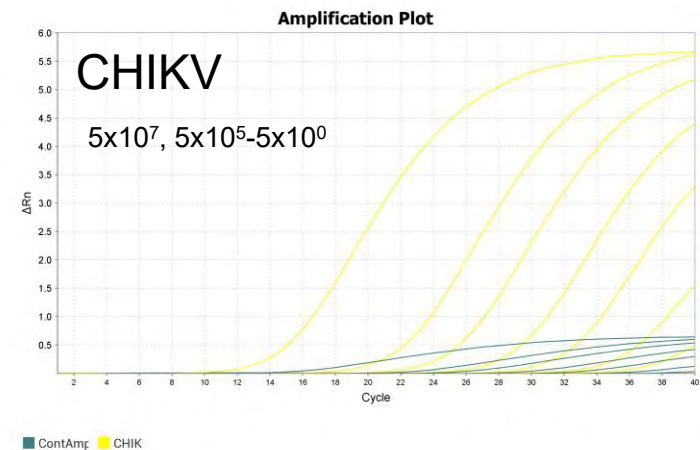
CTTCAATGAGATGATCCTGATGAAAATGAAAAAGAAAACATGGCTCGTGCATAAGCAATGGTTTTTGGATCTGCCTCTTC
CATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTGGAATTACAAAGAGAGAATGGTGACATTTAAGGTTCTCATagt
agcttgctctttcatctgttacgGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTGGGATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCC
CTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGATGGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGA
GAAATT

CHIKV

AACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATCGACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTT
AACGGACATGTCGTGagtagcttgctctttcatctgttacgCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCTCAGACTTTGGGGG
CGTCGCCATTATTAAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTTCGATGACTAACGCCGTCCTATTTCGGG
AAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCCGCGTA
CAAGTC



ZIKVはDNA組換え実験が
大臣確認実験であったため、
保留



ContAmplicon_DCZ Realtime RT-PCRの反応系

(FV1step DCZ-CA)

TaqMan mix prep.				Duplex(V-CA)		
					Mixture	
				x1	x10	
DW				7.2	72.0	
4x Master Mix (Thermo Fisher: Fast Virus 1-step kit)				5.0	50.0	
Primer FR mix (5pmol each)				2.0	20.0	
TaqMan probe Virus [10pmol/ul]				0.4	4.0	
TaqMan probe CA [10pmol/ul]				0.4	4.0	15uL
Sample RNA				5.0		
Total				20.0		

	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	CHIKV
Primer F	D1MGBEn469s	D2MGBEn493s	D3MGBEn1s	D4TEEn711s	Taq-Chik607F
Primer R	D1MGBEn536r	D2MGBEn568r	D3MGBEn71r	D4TEEn786c	Taq-Chik672R
Probe Virus	D1MGBEn493p	D2MGBEn545p	D3MGBEn27p	D4TEEn734p	Taq-Chik638P
Probe CA*	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon	ContAmplicon

*CA: VIC-Noneまたは
Hex-BHQ1

Machine:
QuantStudio5

RT	48°C	5 min
Denature	95°C	20 sec
Amplifiy	95°C	3 sec
40cycle	57°C	30 sec

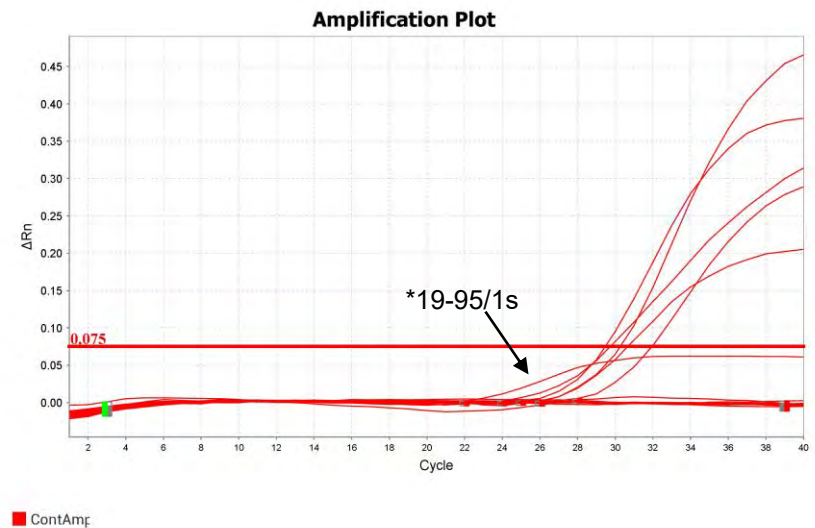
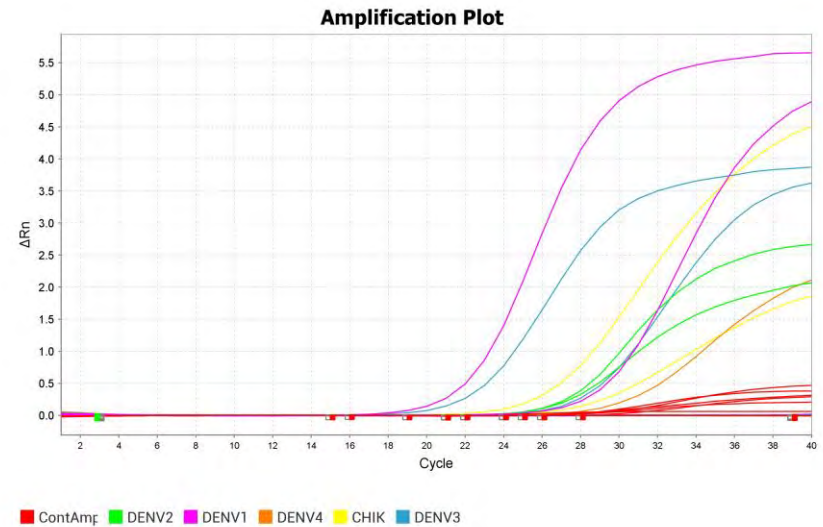
(fast)

臨床検体を使用した検討 (single well)

Ct値

Reaction mix	PC+CA	NC	19-92/1s (CHIKV)	19-95/1s (D1)	19-98/1s (D3)	19-103/1s (D2)
D1	29.7	UD	UD	22.3	UD	UD
D1-CA	30.3	UD	UD	UD*	UD	UD
D2	27.1	UD	UD	UD	UD	27.3
D2-CA	30.7	UD	UD	UD	UD	UD
D3	28.9	UD	UD	UD	22.9	UD
D3-CA	29.5	UD	UD	UD	UD	UD
D4	31.0	UD	UD	UD	UD	UD
D4-CA	31.9	UD	UD	UD	UD	UD
CHIKV	25.2	UD	28.8	UD	UD	UD
CHIKV-CA	29.7	UD	UD	UD	UD	UD

- ✓ 検体RNAサンプルは原液を2倍希釈して使用
- ✓ D1-4 PC+CA: 2.5×10^3 copies/uL
- ✓ CHIKV PC+CA: 10^4 copies/uL

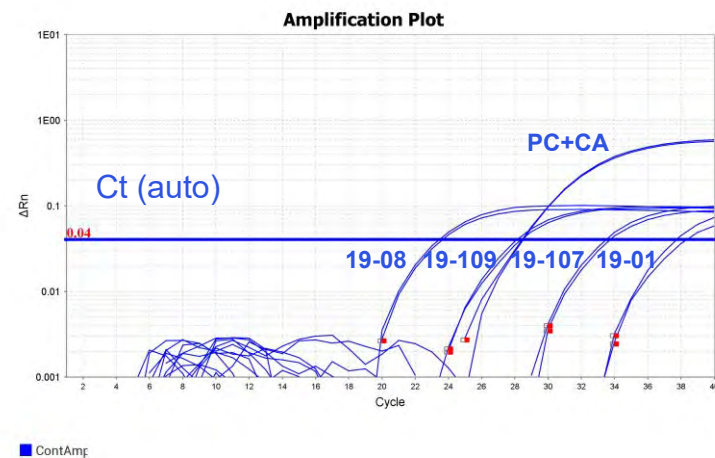
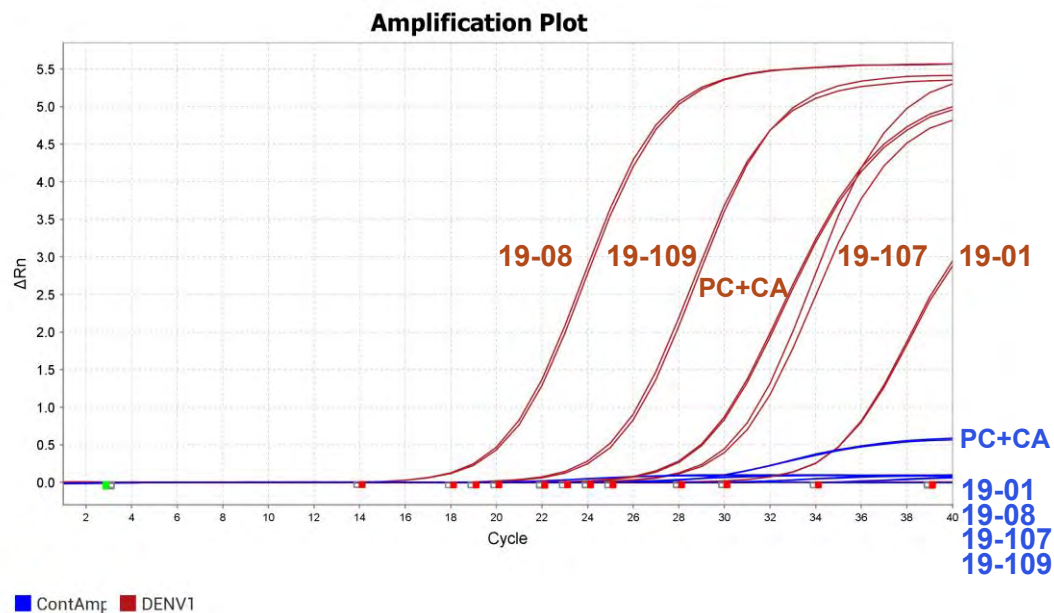
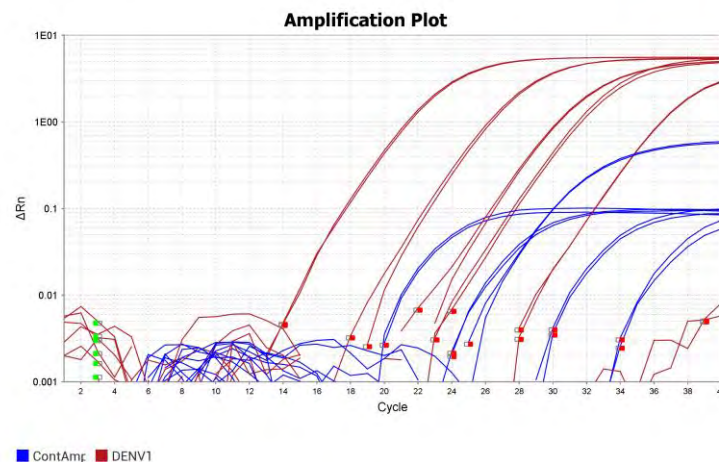


臨床検体を使用した検討（DENV1-positive samples, duplicate）

Ct値*

Reaction mix	PC+CA	NC	19-01/1s	19-08/1s	19-107/1s	19-109/1s
D1	28.9	UD	35.0	20.1	30.2	24.9
D1-CA	28.4	UD	37.99	23.5	33.6	28.2

*auto, mean value



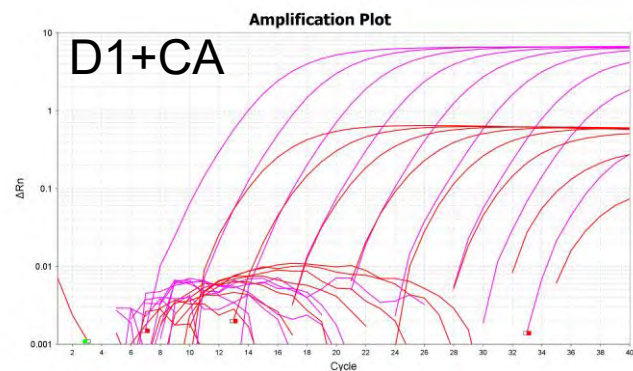
デングウイルス1型ゲノムと少し反応してしまうが、増幅パターンで判別可能。

ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについて

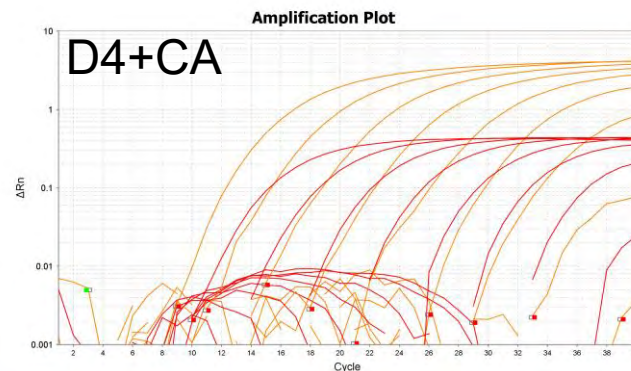
- ✓ 今回は4種類のデングウイルス各血清型（D1+CA, D2+CA, D3+CA, D4+CA）の陽性コントロール（ 10^9 コピー/uLに調製したRNA液各100uL）を配布予定しています。
- ✓ プラスミドクローンより、in vitro transcription法により合成後、精製したRNAです。
- ✓ こちらを適当に希釈して使用してください（1点ならば、 10^3 コピー/uLなど）。
- ✓ コピー数を算出したい場合は、適当に階段希釈して使用してください。
- ✓ 希釈には、10ug/mL yeast tRNA溶液 (Thermo #AM7119を希釈)を使用してください。
- ✓ 5uL程度を1反応に使用してください。
- ✓ 凍結融解は数回以内にしてください。希釈後（低濃度物）は特に注意してください。
- ✓ ContAmplicon Probe DCZ（10uM, 10pmol/uL）100uLも一緒にお配りいたします。
- ✓ まずは各々使用している通常の反応系で試用してください。

（2021年度に配布済み）

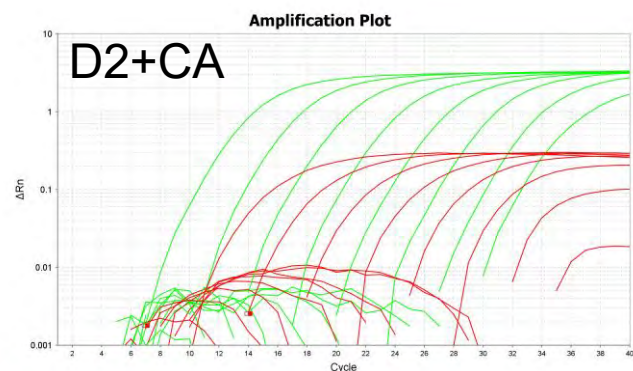
実際に送付する陽性コントロールおよびCAプローブのチェックデータ (5×10^8 - 5×10^0 copies/rxn)



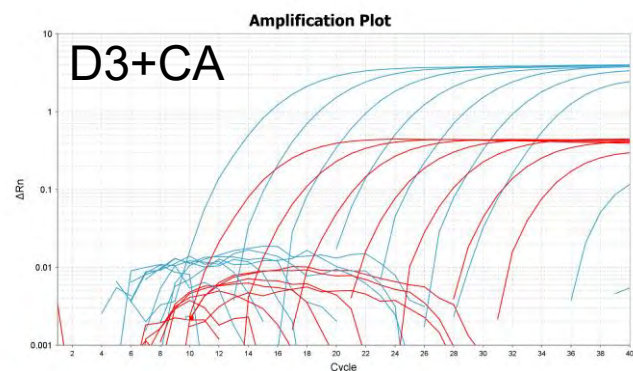
■ ContAmpr ■ DENV1



■ ContAmpr ■ DENV4



■ ContAmpr ■ DENV2

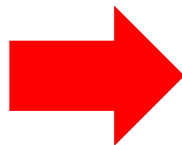
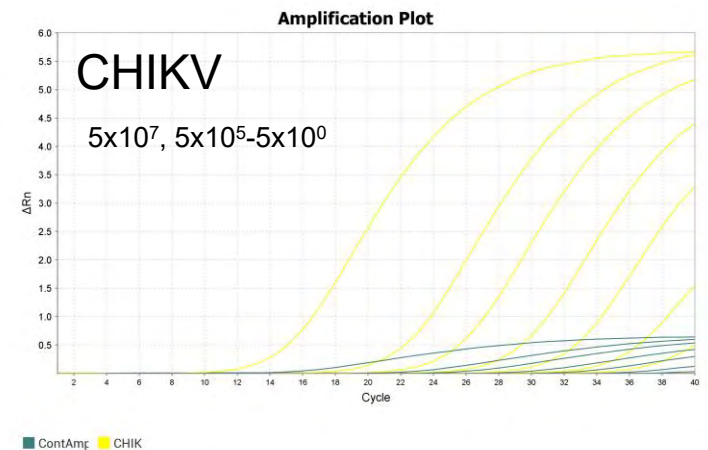
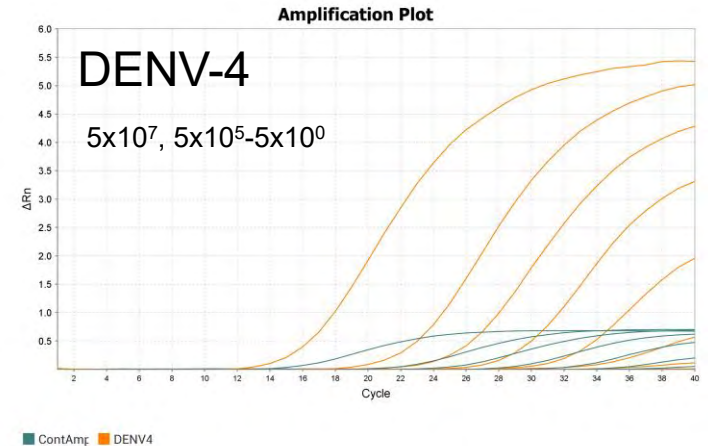
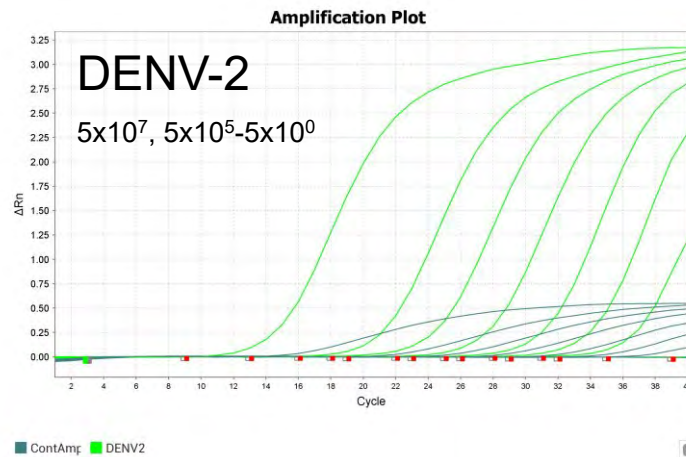
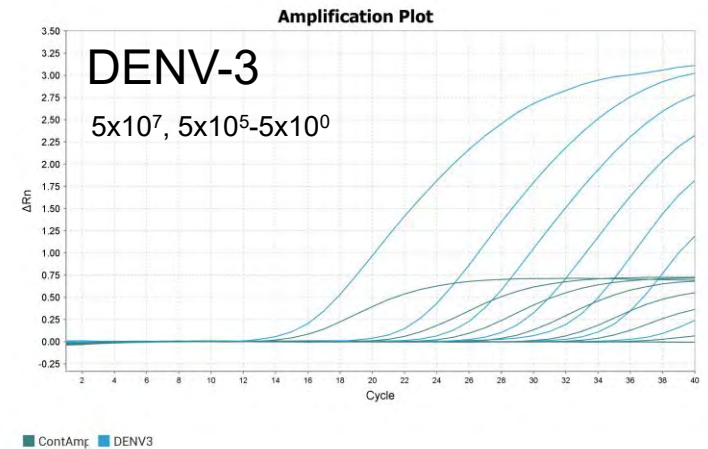
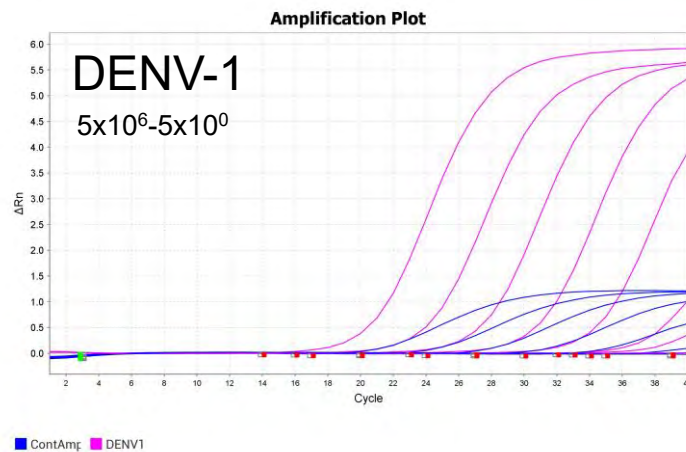


■ ContAmpr ■ DENV3

Posi. Contrl*.	Ct値** (5×10^2 copies/ rxn)	
	Virus	CA
D1+CA	32.4	33.5
D2+CA	31.3	33.9
D3+CA	33.0	33.0
D4+CA	34.1	34.9

*HEX-BHQ1, ** auto

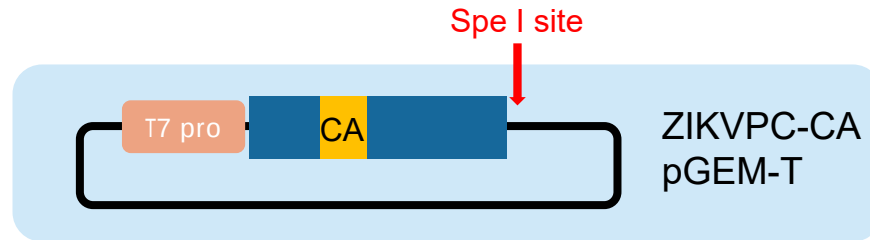
✓ 通常、 1×10^3 copies/uL程度に希釈して使用



ZIKVはDNA組換え実験が
大臣確認実験であったため、
保留

機関承認で可能になった

陽性コントロール特異的配列の挿入



ZIKV

ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCCGGC
 ATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTC
 TTGGAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCA
 GCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCTGACAG**CCGCTGCCCAACACA**
AGGTagtagcttgctctttcatctgttacgGA**AGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAGAA**
CGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGAAATGGATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC

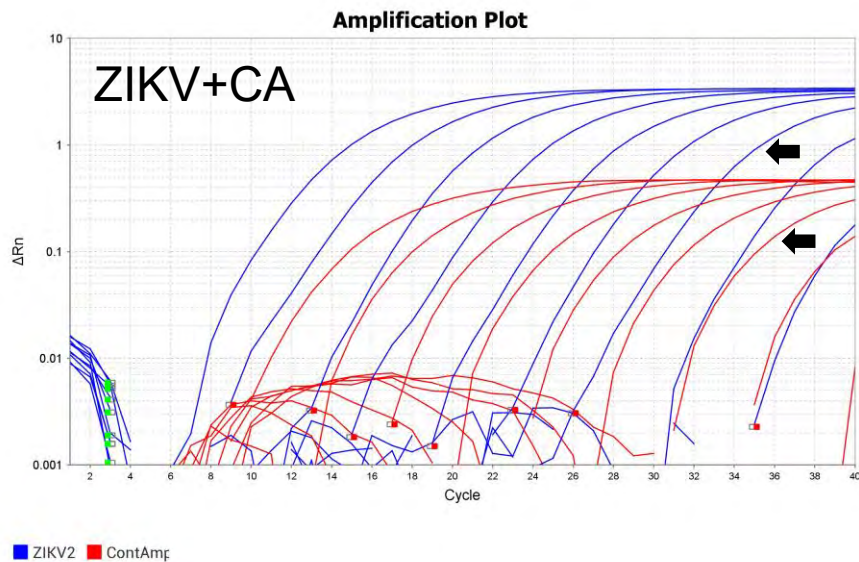
Forward primer

Probe

ContAmplicon

Reverse primer

ZIKV・CHIKV陽性コントロールおよびCAプローブのチェックデータ (5×10^8 - 5×10^0 copies/rxn)



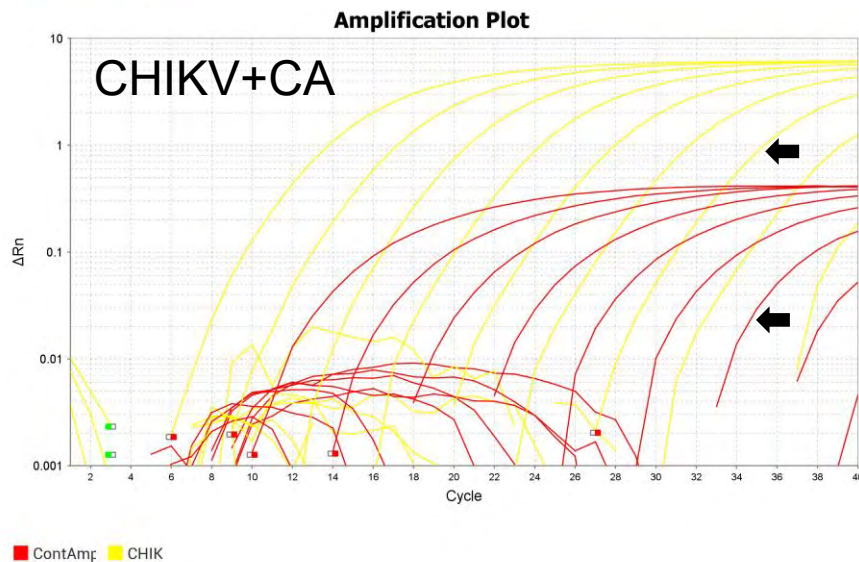
← : 5×10^2 copies/rxn

Posi. Contrl*.	Ct値** (5×10^2 copies/ rxn)	
	Virus	CA
ZIKV+CA	31.6	33.3
CHIKV+CA	33.6	35.5

*HEX-BHQ1, ** auto

✓ 通常、 1×10^3 copies/uL程度に希釈して使用

今後送付用に調製する予定

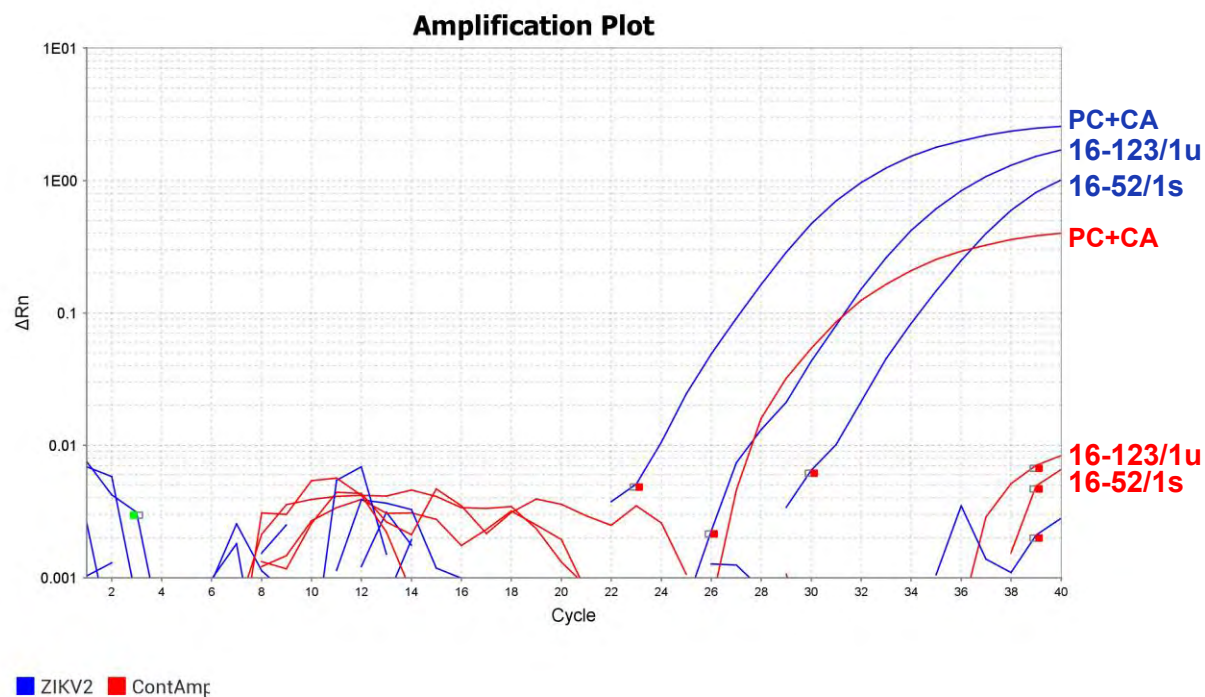


臨床検体を使用した検討（ZIKV-positive samples）

Ct値(auto)

Probe	PC+CA*	NC	16-52/1s	16-123/1u
ZIKV	28.1	UD	35.4	32.3
CA	29.4	UD	UD	UD

* 5×10^3 copies/rxn

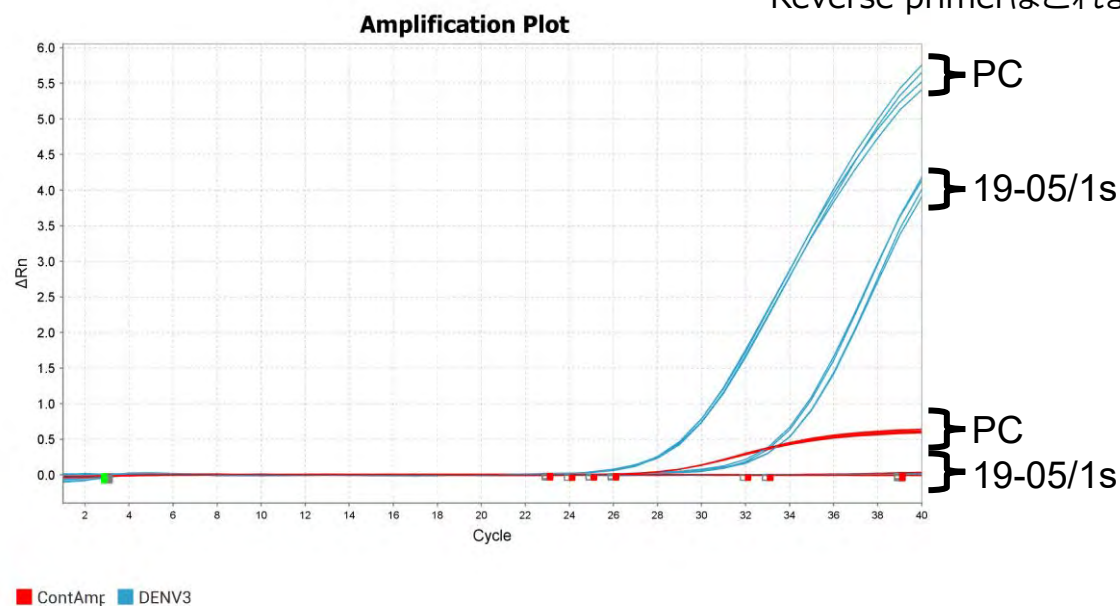


DENV3用プライマー配列の変更

東京都健康安全研究センター：森先生からのご提案（より多くのDENV3に対応可能）

Set	Forward primer	Sequence
Ver. 1	D3MGBEn1s	ATG AGA TGY GTG GGA GTR GGA AAC
Ver. 2	D3MGBEn1s.v2	ATG AGA TGY GTG GGA GTR GGA AAC

*Reverse primerはこれまで通り

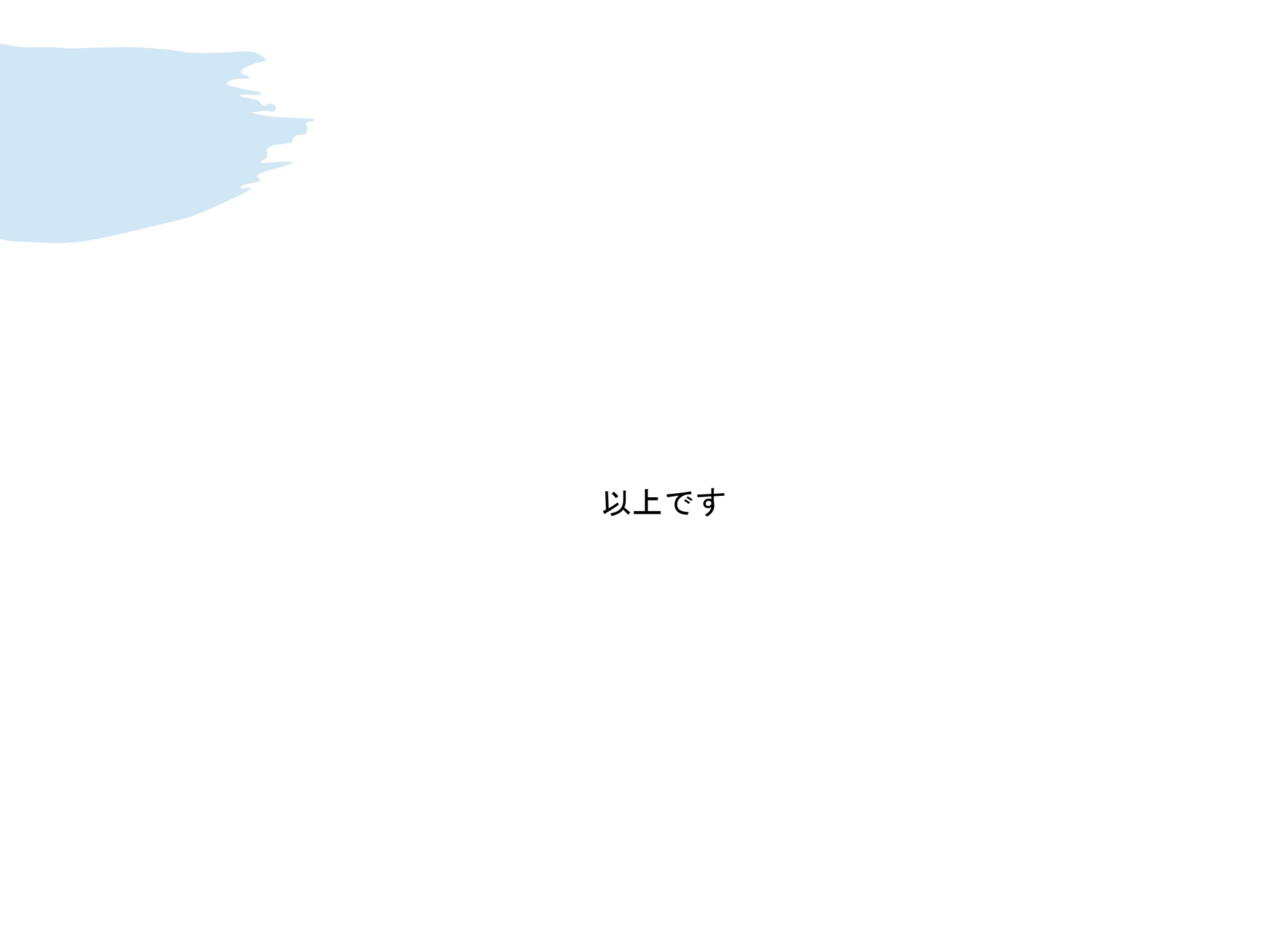


Ct値(auto)

Set	PC / CA	NC / CA	19-05/1s / CA
Ver. 1	29.1 / 28.5	UD / UD	33.6 / UD
Ver. 2	29.1 / 28.5	UD / UD	33.7 / UD

DCZ Primer-Probe sequence (2022.7) (2022.10.26 ZIKVプローブ配列修正)

	Primer	Sequence	Probe	Sequence
D1	D1MGBEn469s	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT	D1MGBEn493p	FAM-ACACCTCAAGCTCC-MGB
	D1MGBEn536r	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTCA		
D2	D2MGBEn493s	ACACCACAGAGTTCCATCACAGA	D2MGBEn545p	FAM-CGATGGARTGCTCTC-MGB
	D2MGBEn568r	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC		
D3*	D3MGBEn1s.v2	ATGAGATGYGTGGGAGTRGGAAA	D3MGBEn27p	FAM-AGATTTTGTGGAAGGYCT-MGB
	D3MGBEn71r	CACCACDTCAACCCACGTAGCT		
D4	D4TEEn711s	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	D4TEEn734p	FAM-CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRG GATC-TAMRA
	D4TEEn786c	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG		
CHIKV	Taq-Chik607F	GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT	Taq-Chik638P	FAM- TACCAGCCTGCACYC-MGB
	Taq-Chik672R	GCC CCC RAA GTC KGA GGA R		
ZIKV	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACACAAG	ZIKV1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACAC TCAA-TAMRA
	ZIKV1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT		
CA			ContAmplicon	HEX(VIC)-AGTAGCTTGCTCTTTCATCTGTTACG- BHQ1(none)



以上です

2019年以降に日本で報告された日本脳炎患者 から検出された日本脳炎ウイルスの遺伝子型

前木 孝洋¹⁾、田島 茂¹⁾、中山 絵里¹⁾、勝田 奈穂子¹⁾、柴崎 謙一¹⁾、谷口 怜¹⁾、林 昌宏¹⁾、
西條 政幸²⁾、海老原 秀喜¹⁾

1) 国立感染症研究所 ウイルス第一部

2) 札幌市保健福祉局・保健所

令和4年7月29日

日本脳炎 (Japanese encephalitis, JE)

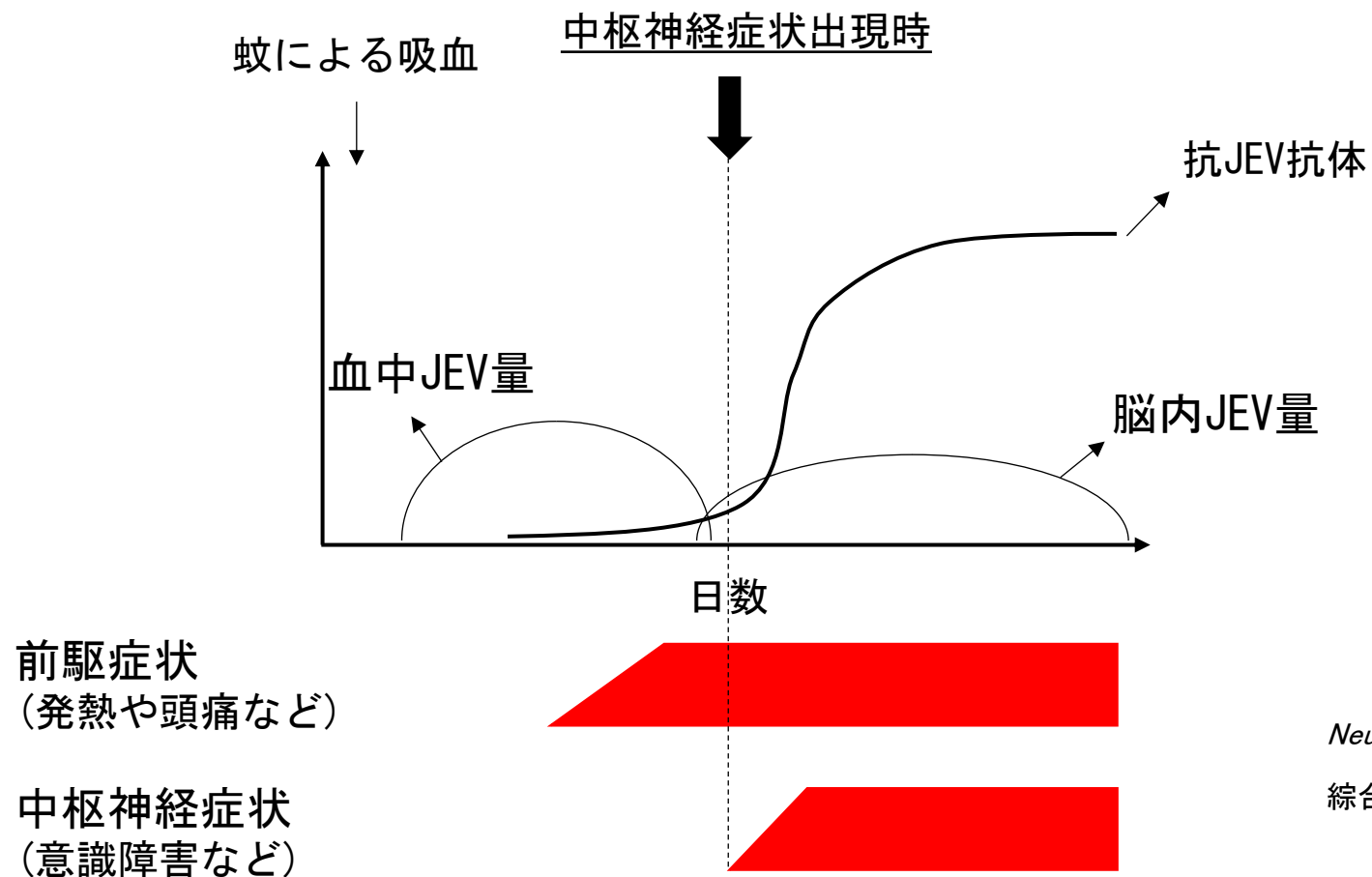
- 原因
 - 日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus, JEV)
- 感染経路
 - 主に、コガタアカイエカによる吸血
- 症状
 - 大半は無症状
 - 発症例では、発熱や頭痛などの前駆症状の後に痙攣や意識障害などが出現
 - 発症例の約20%が死亡、50%が後遺症を残して回復
- 治療法
 - 特異的な治療薬は存在しない
- 予防
 - 日本ではVero細胞由来の不活化ワクチン

2012年から2021年のJE患者報告数

10年間で44人 → 4.4人/年

年	JE患者報告数
2021	2
2020	4
2019	8
2018	0
2017	3
2016	11
2015	2
2014	2
2013	9
2012	2

JEの診断

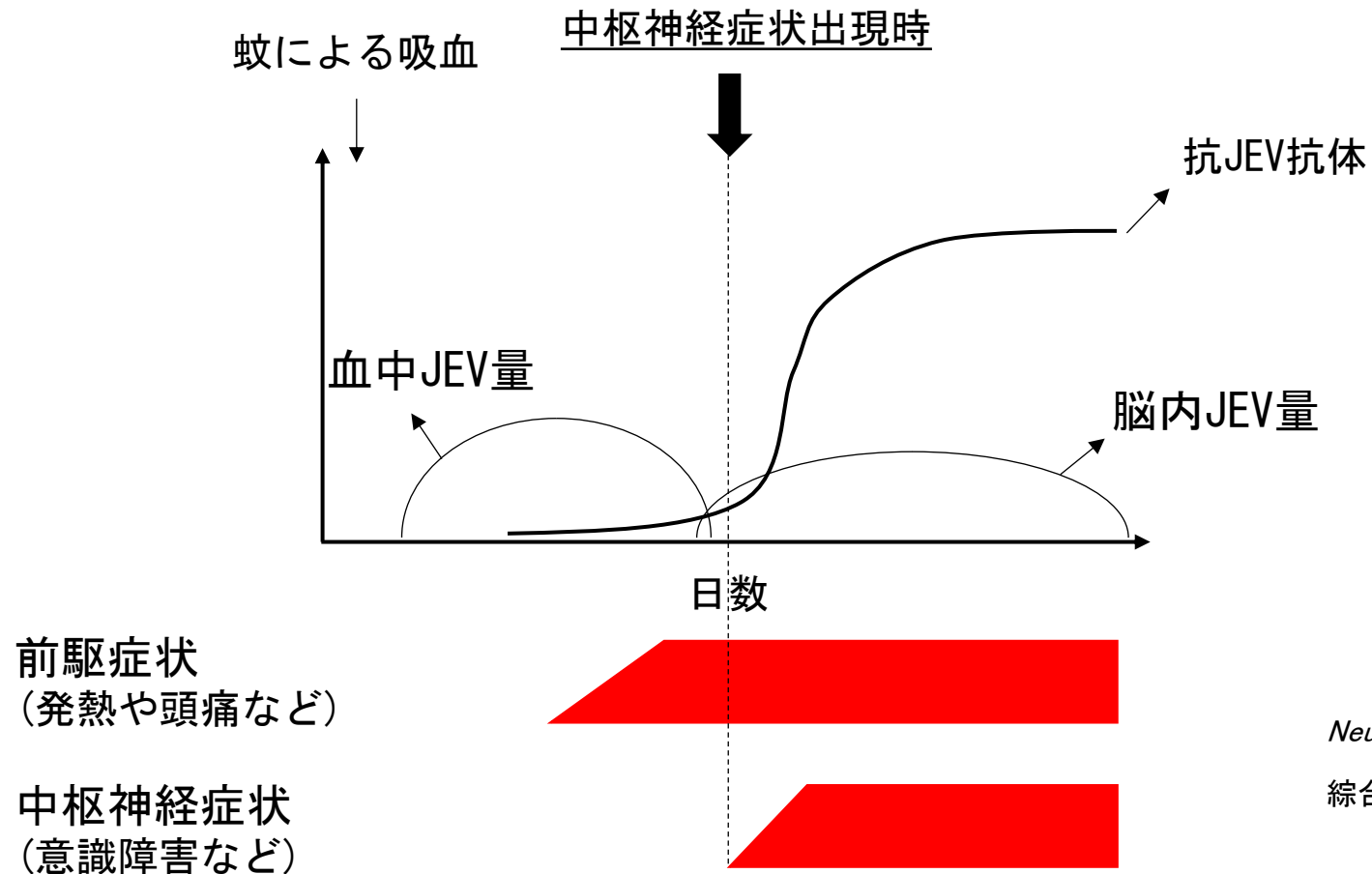


Neurol Clin 2008;26:727-57

綜合臨床 1982. 31 (3) 452-456, 図1
(一部修正)

JEの診断

中枢神経症状が出現した時点では
JEV遺伝子は血液や髄液からはほとんど検出されない

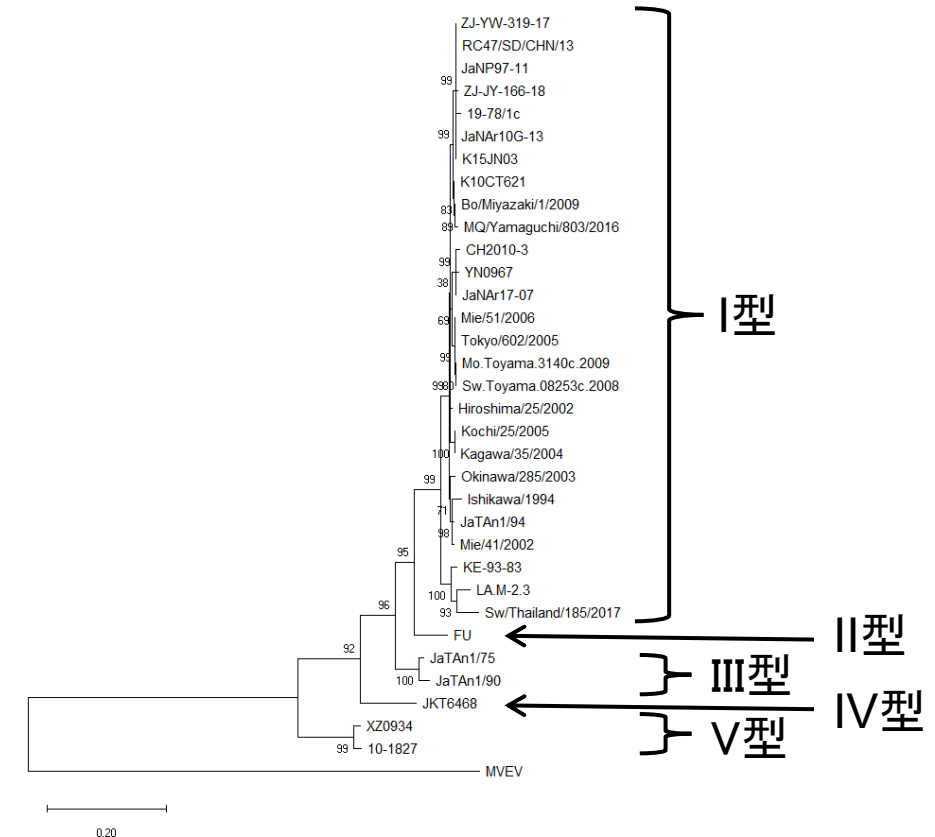


Neurol Clin 2008;26:727-57

総合臨床 1982. 31 (3) 452-456, 図1
(一部修正)

JEV

- 分類: フラビウイルス科フラビウイルス属
- 血清型: 1つ
- 遺伝子型: 5つ (I型 ~ V型)
 - 日本で検出された株
 - ~1990年代: III型
 - 1990年代~: I型
 - 日本で使用されているワクチン: III型株



▲ JEVの系統樹

JEVの遺伝子型間でのアミノ酸配列の相同性

JEV V型株は他の遺伝子型株との相同性が低い

株名	遺伝子型	アミノ酸配列の差異(%)				
		K9P05 (I型)	FU (II型)	Nakayama (III型)	JKT6468 (IV型)	Muar (V型)
K9P05	I		—	—	—	—
FU	II	2.1		—	—	—
Nakayama	III	3.1	2.2		—	—
JKT6468	IV	6.2	5.3	4.8		—
Muar	V	9.9	8.6	8.5	9.2	

JEV V型

JEV V型株が近年、中国および韓国で検出された

年	報告内容
1952	JEV V型株が脳炎患者の脳組織から分離された ～50年間以上、JEV V型株が発見されたという報告はなかった～
2009	中国のコガタアカエイカからJEV V型株が分離された
2010	韓国のイエカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2012	韓国のアカエイカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2020	韓国のJE患者 (2015年発症)の髄液からJEV V型株が分離された

JEV V型

JEV V型株が近年、中国および韓国で検出された



日本にJEV V型株が侵入する可能性

年	報告内容
1952	JEV V型株が脳炎患者の脳組織から分離された ～50年間以上、JEV V型株が発見されたという報告はなかった～
2009	中国のコガタアカエイカからJEV V型株が分離された
2010	韓国のイエカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2012	韓国のアカエイカからJEV V型株の遺伝子が検出された
2020	韓国のJE患者 (2015年発症)の髄液からJEV V型株が分離された

目的と方法

- 目的
 - 近年の日本でJEの原因となっているJEVの遺伝子型を決定する。
- 方法
 - 2016年以降に行政検査、あるいは医療機関からの依頼でJE診断のために検査*を実施し、JEV遺伝子が検出され、エンベロープ(envelope, E)領域の配列を確定できた検体の結果を解析した。

* ウイルス第一部で実施している検査

検体	検査
急性期検体(髄液、血清)	Real time RT-PCR
髄液(急性期、回復期)、血清(急性期、回復期)	IgM捕捉ELISA
血清(急性期、回復期)	中和試験

2016年以降に報告されたJE患者から採取された急性期検体と検査結果

年	患者番号	検体番号*	発症後日数 (日)	Real time RT-PCR結果**	JEV特異的 IgM捕捉ELISA結果
2016年	16-94	/1c	0	-	+
		/1s	6	-	+
		/0c	1	-	+
		/1c	6	-	+
		/1s	2	-	+
		/1s	4	-	+
	16-104	/1c	4	-	+
		/1c	4	-	+
	16-109	/1c	5	-	+
	16-113	/1c	5	-	+
2017年	17-69	/1c	3	-	+
		/1s	3	-	+
	17-78	/1s	0	-	+
2019年	19-78	/1c	2	+ (33.9)	-
		/1s	4	-	+
	19-99	/1c	1	-	+
		/1p	1	-	+
	19-104	/1s	3	-	+
	19-105	/1s	5	-	+
	19-106	/1s	5	-	+
2020年	20-12	/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
		/2c	3	-	+
		/2s	5	-	+
	20-13	/1c	4	+ (32.9)	-
		/1s	7	-	+
	21-01	/1c	2	-	+
2021年	21-08	/1s	2	-	+
		/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
		/2s	2	-	+
2022年	22-01	/1c	4	-	+
		/1s	3	+ (36.0)	+
		/1B		+ (22.1)	

25検体中3検体で、E領域の塩基配列を決定できた

* 検体番号
c: 髄液 (csf)
s: 血清 (serum)
p: 血漿 (plasma)
B: 脳組織 (brain)

** ()内の数字はCt値を表す

2016年以降に報告されたJE患者から採取された急性期検体と検査結果

年	患者番号	検体番号*	発症後日数 (日)	Real time RT-PCR結果**	JEV特異的 IgM捕捉ELISA結果
2016年	16-94	/1c	0	-	+
		/1s	6	-	+
		/0c	1	-	+
		/1c	6	-	+
		/1s	2	-	+
		/1s	4	-	+
	16-104	/1c	4	-	+
		/1c	4	-	+
	16-109	/1c	5	-	+
	16-113	/1c	5	-	+
2017年	17-69	/1c	3	-	+
		/1s	3	-	+
	17-78	/1s	0	-	+
2019年	19-78	/1c	2	+ (33.9)	-
		/1s	4	-	+
	19-99	/1c	1	-	+
		/1p	1	-	+
	19-104	/1s	3	-	+
	19-105	/1s	5	-	+
	19-106	/1s	5	-	+
2020年	20-12	/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
		/2c	3	-	+
		/2s	5	-	+
	20-13	/1c	4	+ (32.9)	-
		/1s	7	-	+
2021年	21-01	/1c	2	-	+
		/1s	2	-	+
	21-08	/1c	1	-	+
		/1s	1	-	+
2022年	22-01	/2s	2	-	+
		/1c	4	-	+
		/1s	3	+ (36.0)	+
		/1B		+ (22.1)	

25検体中3検体で、E領域の塩基配列を決定できた



遺伝子型は3つともI型

* 検体番号

c: 髄液 (csf)

s: 血清 (serum)

p: 血漿 (plasma)

B: 脳組織 (brain)

** ()内の数字はCt値を表す

22-01と相同性の高い株

(E領域)

株名	地域	年	検体の由来	相同性(%)
JEV/Hu/Okayama/NIID13/2020	岡山県	2020	JE患者髄液	1492/1500 (99.5%)
IM-OI34	愛媛県	2019	キチマダニ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Mo/Kagawa/NIID09/2020	香川県	2020	コガタアカイエカ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Hu/Hiroshima/NIID78/2019	広島県	2019	JE患者髄液	1489/1500 (99.3%)
JaNP97-11	諫早湾(長崎県)	2011	ブタ血清	1488/1500 (99.2%)

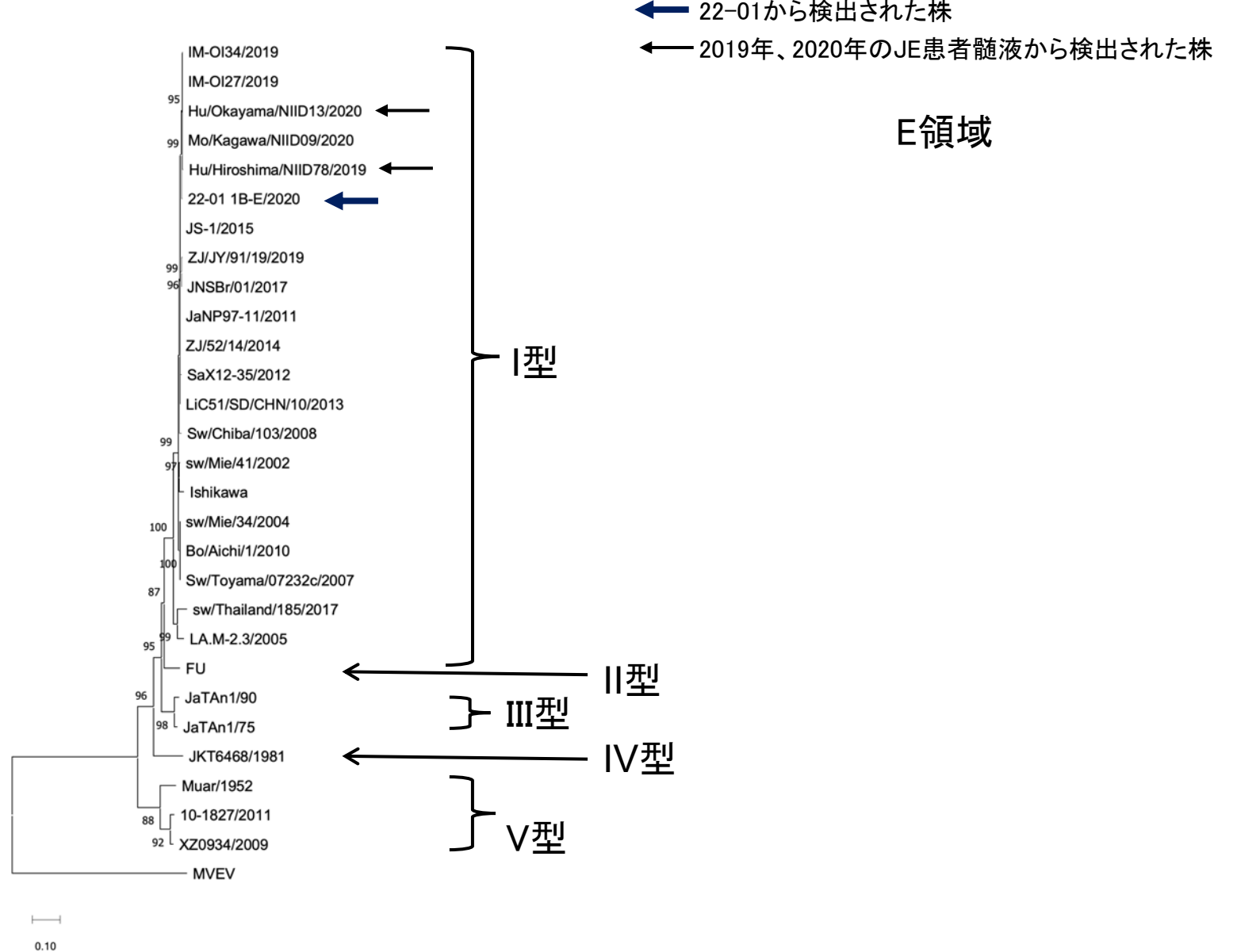
22-01と相同性の高い株

近年の西日本で検出された株と相同性が高い

(E領域)

株名	地域	年	検体の由来	相同性(%)
JEV/Hu/Okayama/NIID13/2020	岡山県	2020	JE患者髄液	1492/1500 (99.5%)
IM-OI34	愛媛県	2019	キチマダニ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Mo/Kagawa/NIID09/2020	香川県	2020	コガタアカイエカ	1490/1500 (99.3%)
JEV/Hu/Hiroshima/NIID78/2019	広島県	2019	JE患者髄液	1489/1500 (99.3%)
JaNP97-11	諫早湾(長崎県)	2011	ブタ血清	1488/1500 (99.2%)

22-01の系統樹解析結果



まとめ

- 2016年以降に日本で発症したJE患者から採取された検体のうち3検体でJEVのE領域の配列を決定でき、遺伝子型はいずれもI型であった。
- 上記3株はいずれも近年の西日本で検出された株と高い相同性を示した。
- 近年の西日本でJEの原因となっているJEVは日本に土着しているものである可能性が高いと考えられた。

アルボウイルス・リケッチアレファレンスセンター等関連合同会議

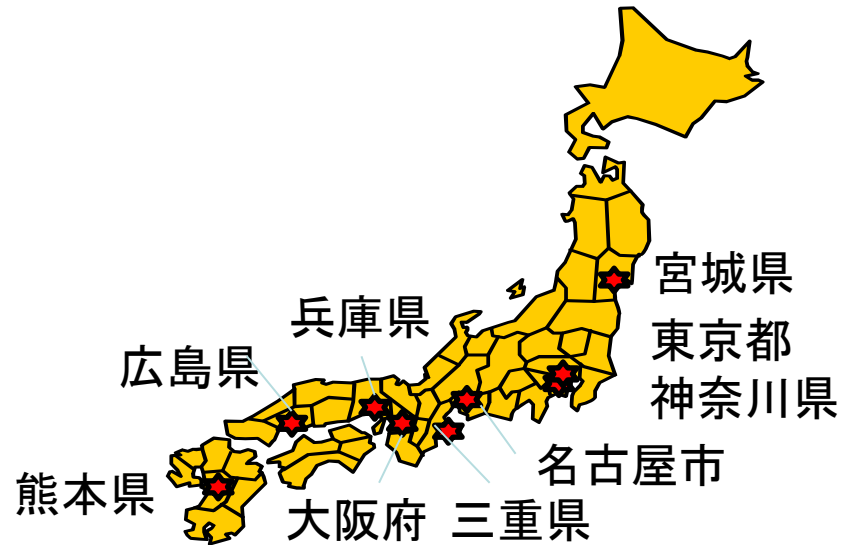
近年のアルボウイルス感染症の流行状況

2022年7月29日(金)

国立感染症研究所ウイルス第1部第2室

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

微生物部ウイルス研究科

神奈川県衛生研究所

所長

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

微生物部ウイルス課

兵庫県立健康科学研究所

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

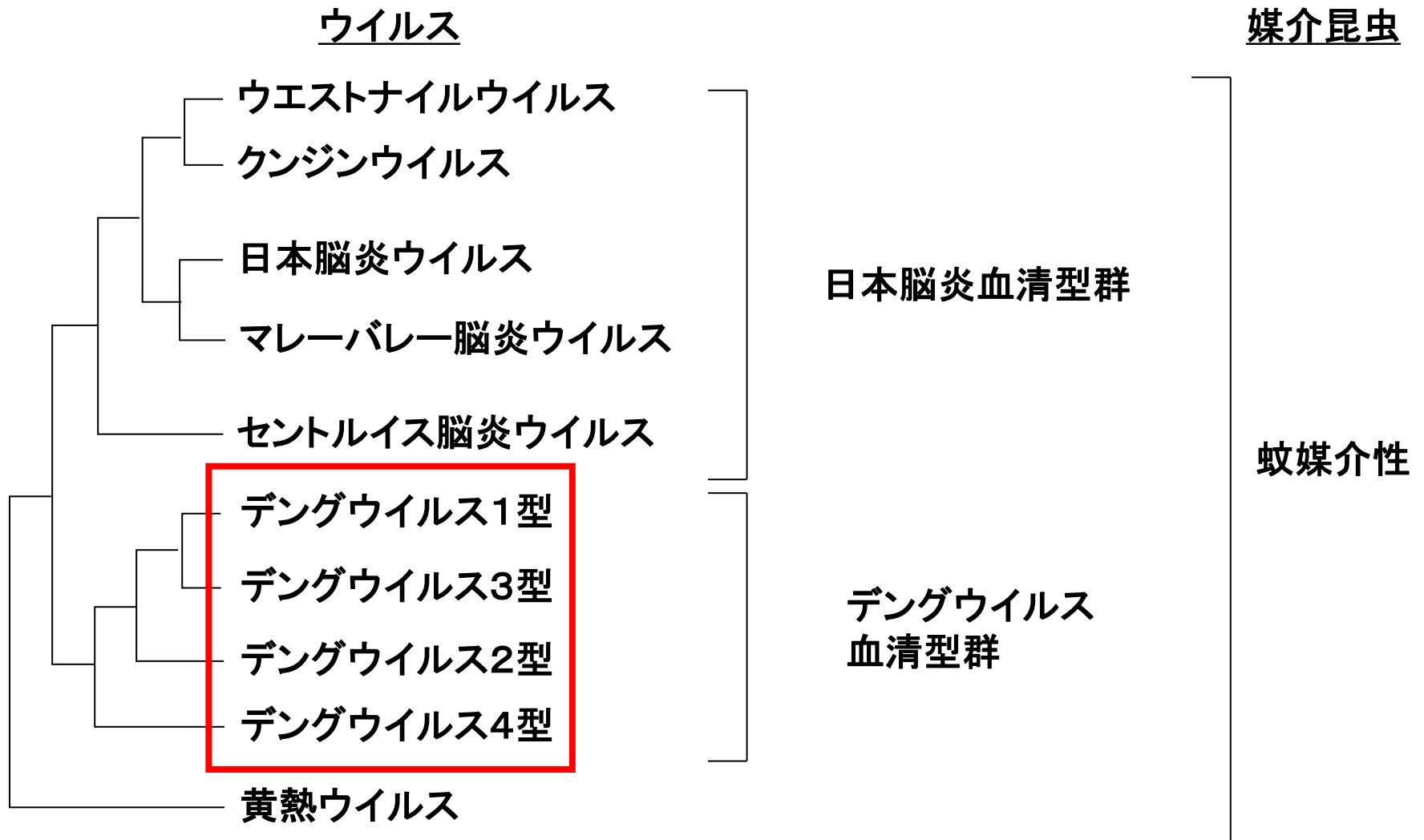
微生物科学部

国立感染症研究所

ウイルス第1部第2室

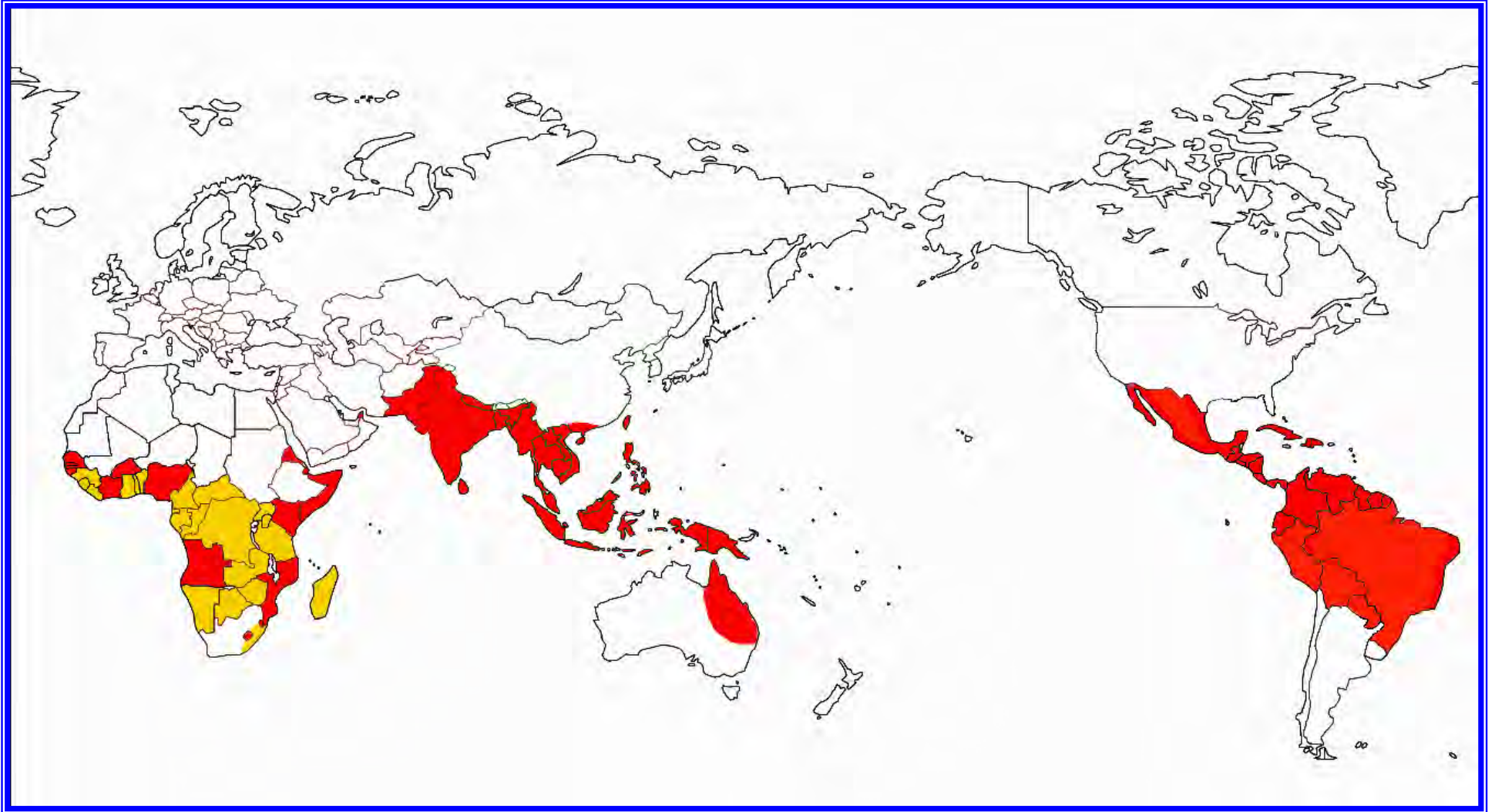
デングウイルス

デングウイルス



(Fields Virology より改変)

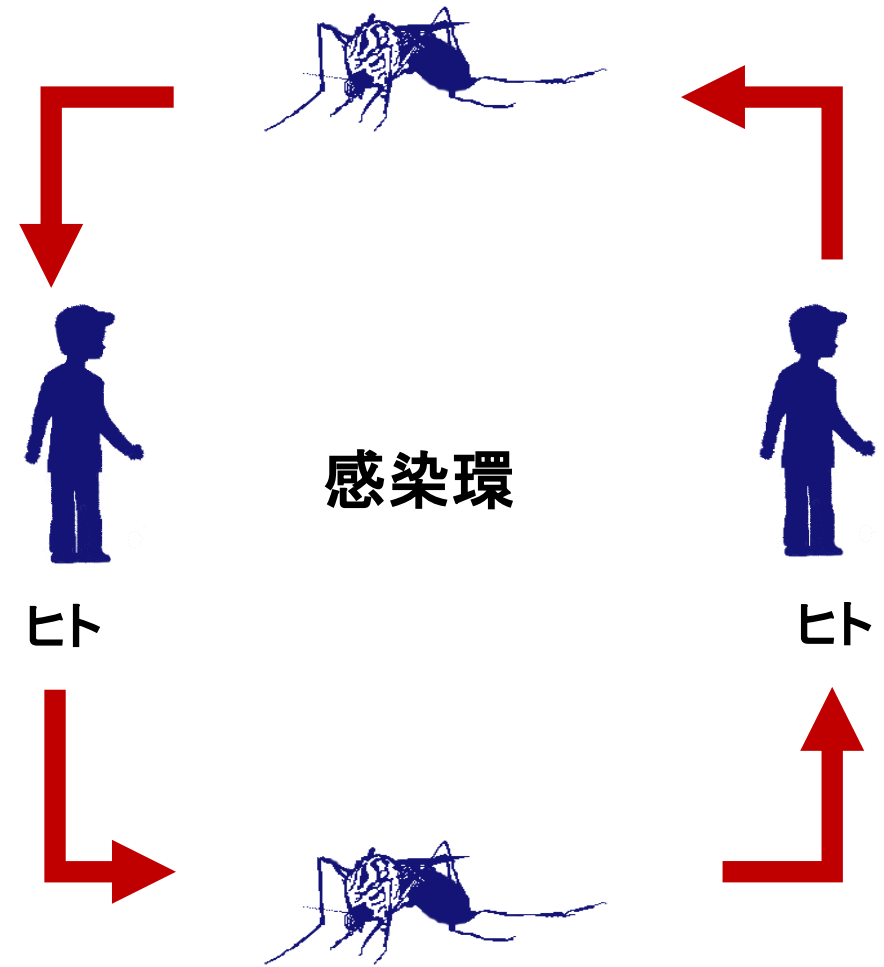
デングウイルスの分布域



デング熱

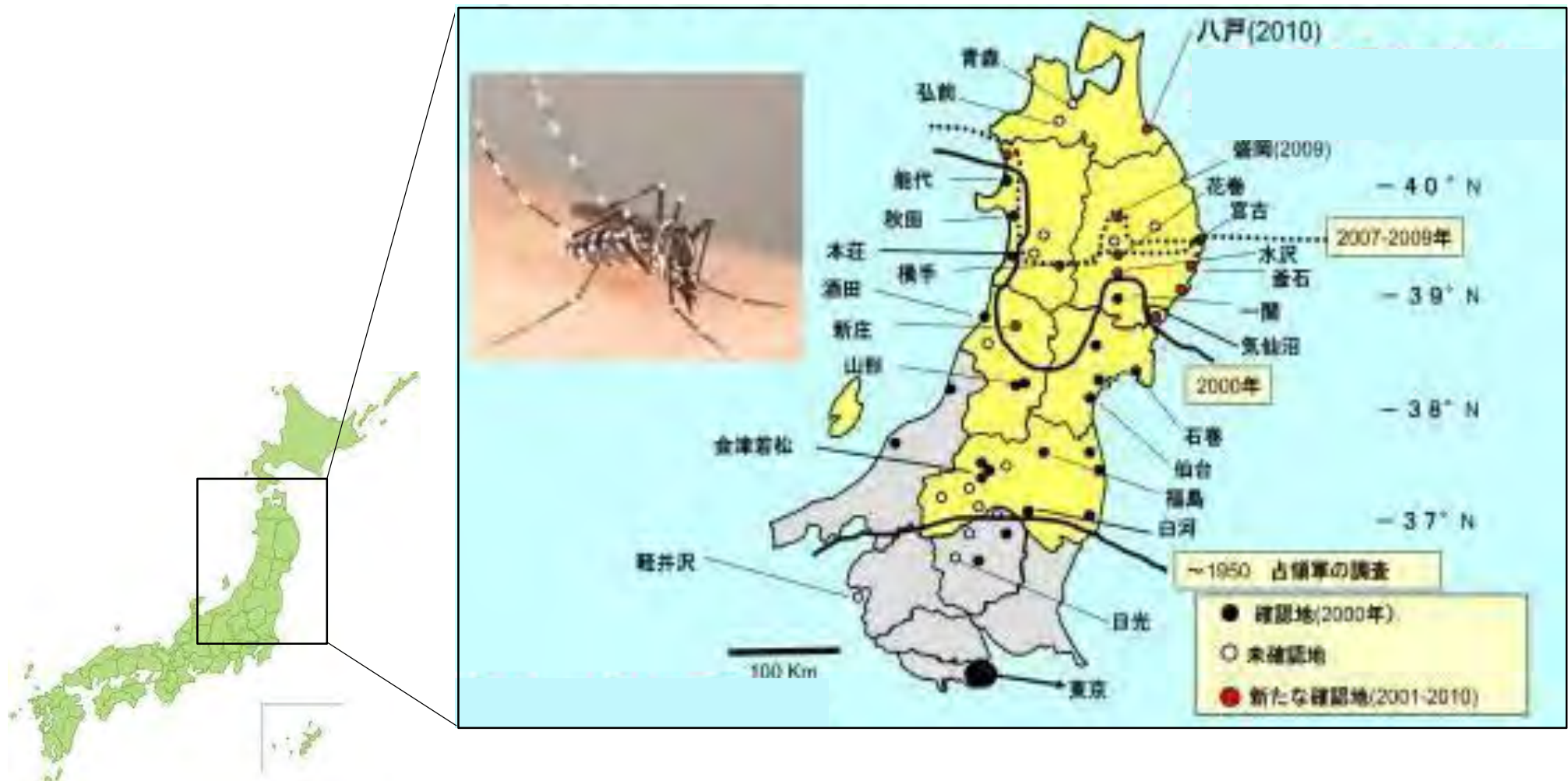
- デングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である
- ヒトが感染しても無症候感染の頻度は50～80%で、症候性の場合の病態には軽症のデング熱と血管透過性亢進を伴うデング出血熱がある（WHOガイドライン1997年）
- WHOガイドライン(2009年)ではショック症状を伴うデング出血熱や重篤な出血、重篤な臓器障害を伴う場合を重症デングと呼称している
- 感染症法上では4類感染症

デングウイルスの感染環



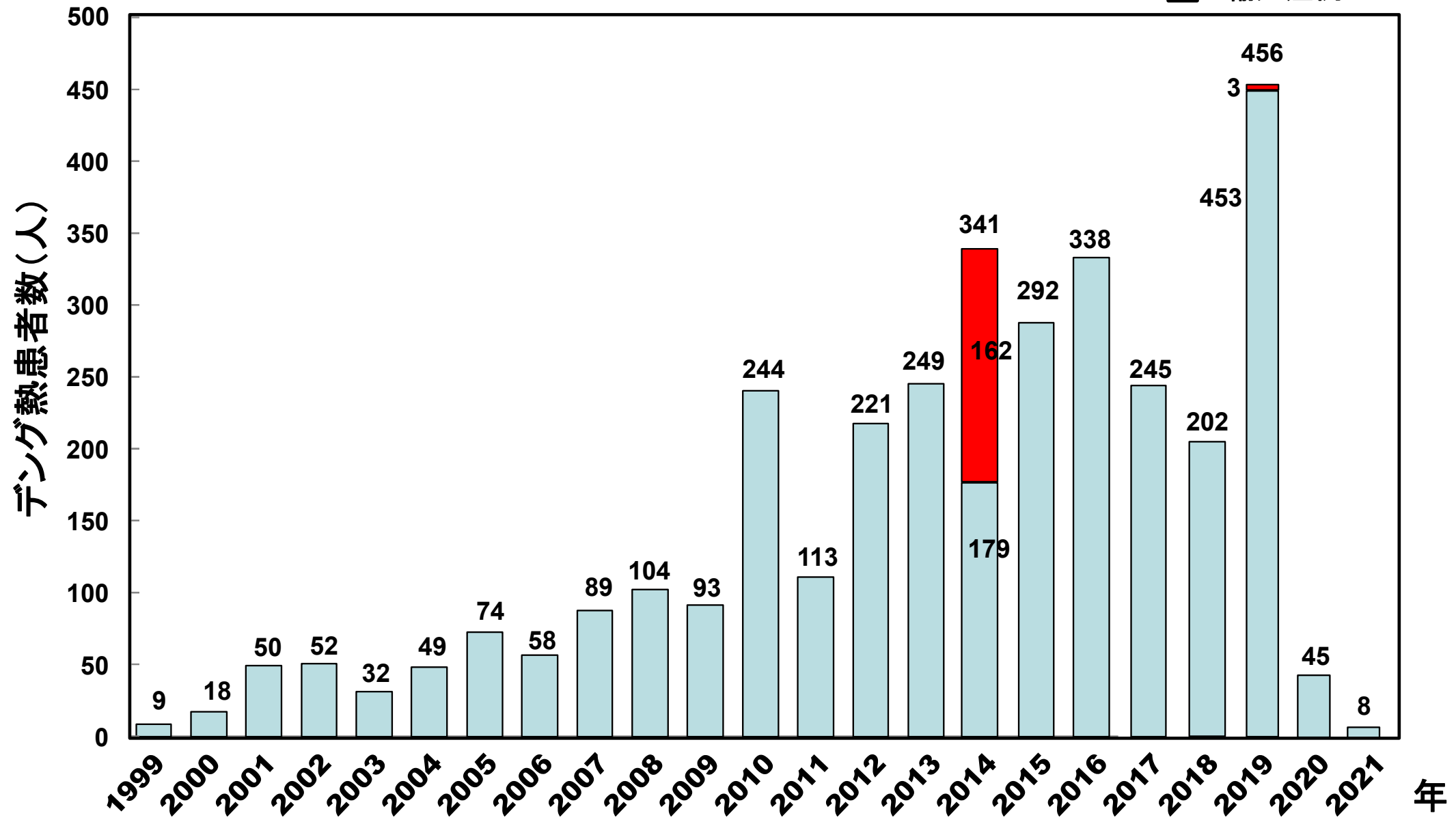
ヒトスジシマカ (*Ae. albopictus*)
ネッタイシマカ (*Ae. aegypti*)

国内におけるヒトスジシマカの分布域の拡大

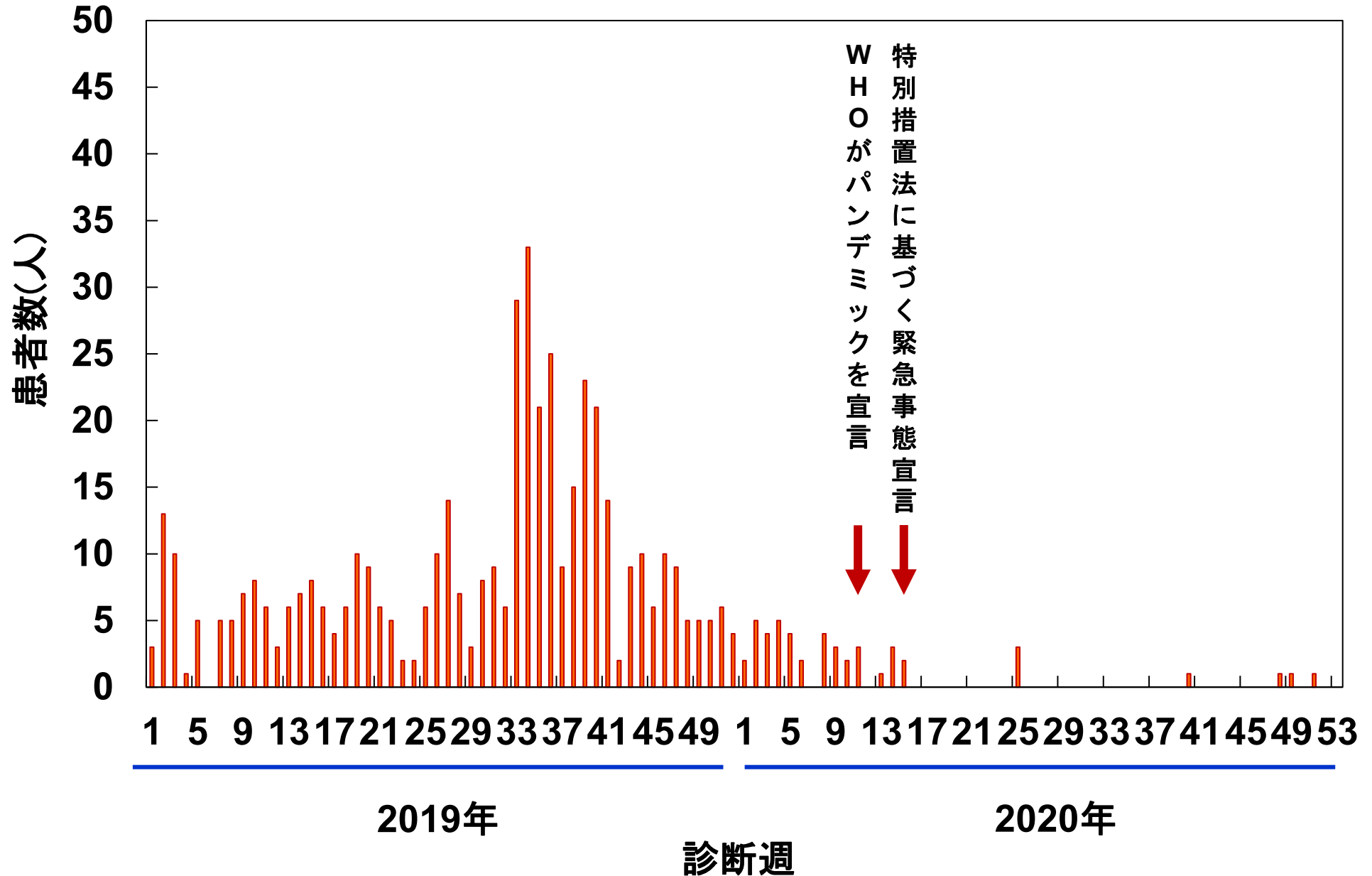


国内の1999年4月-2021年1におけるデング熱症例の推移

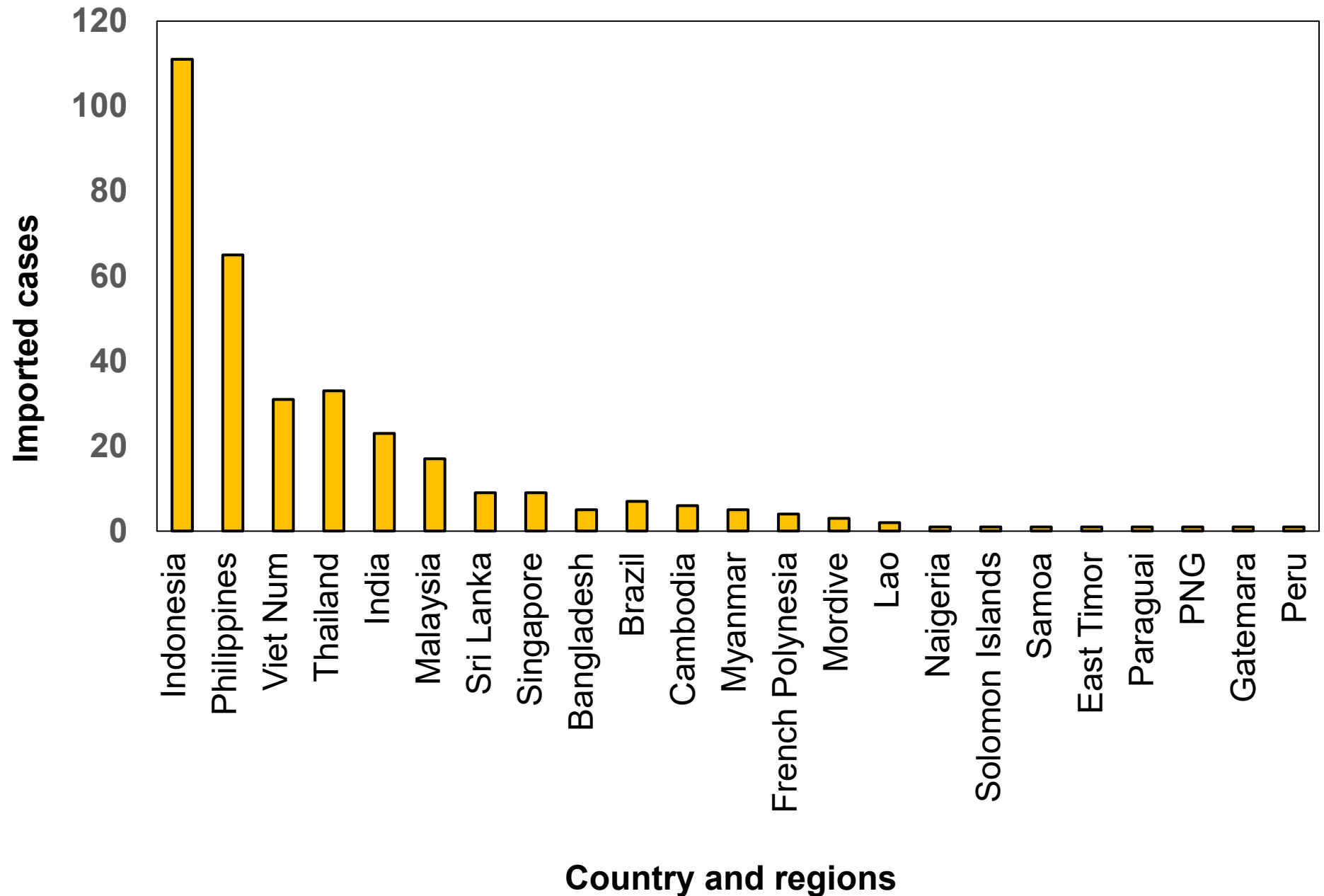
■ 国内発生例
■ 輸入症例



2019年～2020年における診断週別デング熱症例数の推移(n=508)



2016年におけるデング熱輸入症例



まとめ

- デング熱・デング出血熱はデングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である
- 2013年9月に国内で感染した可能性のあるドイツ人のデング熱症例が報告された
- 2014年8月に代々木公園およびその周辺という限られた地域で短期間にデングウイルス1型に起因する多数のデング熱症例の集積が認められた
- 2019年に5年ぶりに3例のデング熱国内発生が東京都で報告され、これら症例は、京都、奈良での感染の可能性が示唆された。
- インバウンドの減少によりデング熱患者数は減少したが、海外との交流の再開に伴う患者数の増加が考えられるため引き続き注視したい

日本脳炎ウイルス

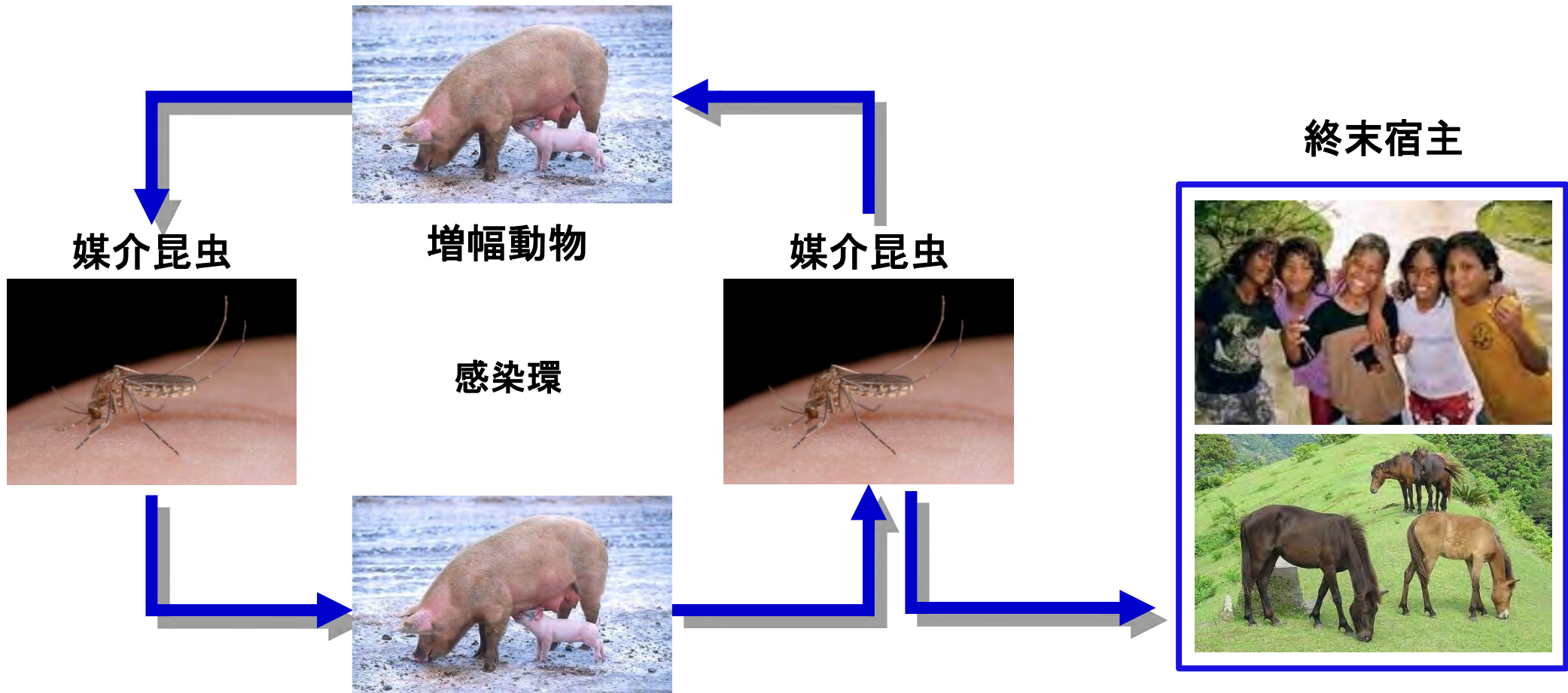
日本脳炎の分布

- アジアの温帯地方、熱帯地方に広く分布している
- 過去日本脳炎の報告がなかったパプアニューギニアにおいても、1997年に患者の報告がなされた
- 1995年にオーストラリアのトレス海峡Badu島、1998年にBadu島・ヨーク岬半島にて日本脳炎患者の発生
- 2022年にオーストラリア南部にて日本脳炎患者が報告
- アジア以外の地域への日本脳炎ウイルスの広がりが見られるようになった



2012 WHO

日本脳炎ウイルスの生態



- 日本やタイではコガタアカイエカとブタの間で日本脳炎ウイルスの感染環が形成されている
- 日本脳炎ウイルスは、おもにブタの体内で大量に増えて、その血を吸った蚊が感染し、ウイルスを排出する
- ヒトは日本脳炎ウイルスに感染したコガタアカイエカに吸血されることで感染する
- ヒトで血中に検出されるウイルスは一過性であり、量的にも極めて少なく、ヒトからヒトへの感染はない

国内における日本脳炎患者数の推移(1991年～2020年)

year	total	under 14	under 7	year	total	under 14	under 7
1991	14	1	0	2007	9	0	0
1992	4	0	0	2008	3	0	0
1993	8	0	0	2009	3	2	2
1994	4	0	0	2010	4	1	1
1995	2	1	1	2011	9	2	1
1996	4	0	0	2012	2	0	0
1997	4	0	0	2013	9	0	0
1998	2	0	0	2014	2	1	1
1999	5	0	0	2015	2	1	1
2000	7	0	0	2016	11	0	0
2001	5	1	0	2017	3	0	0
2002	8	0	0	2018	0	0	0
2003	2	1	0	2019	10	0	0
2004	4	0	0	2020	4	0	0
2005	7	0	0	2021	3	0	0
2006	8	1	1				

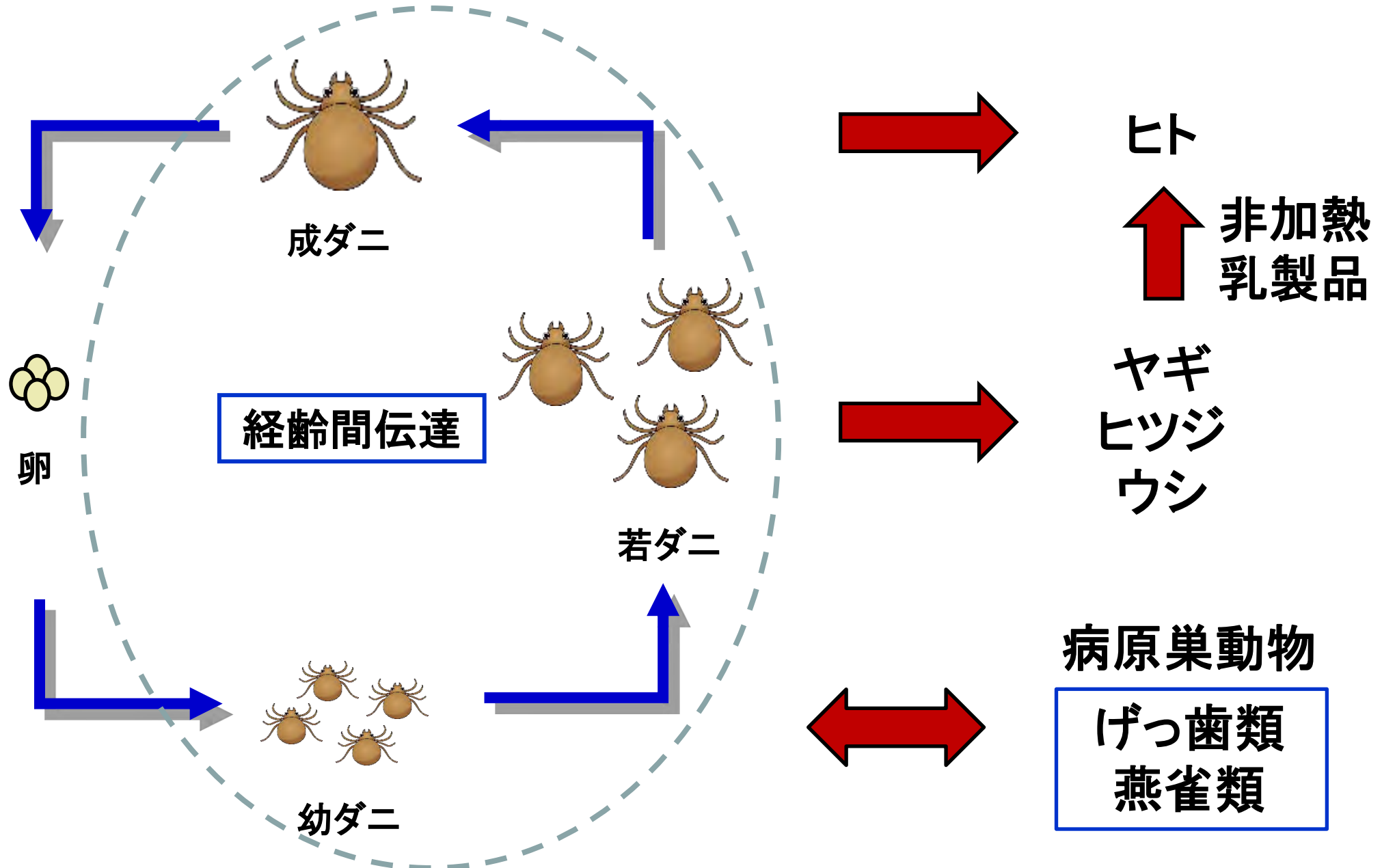
WHO西太平洋地域における日本脳炎患者数の推移

Country and Region	Surveillance program	Number of reported cases							
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019 (year)
Australia	National	1	4	1	3	0	1	0	3
Cambodia	sentinel (6)	55	41	60	48	10	5	11	1
China	sentinel (27)	1763	2178	858	624	1130	1147	1800	369
Japan	National	2	9	2	2	11	3	0	10
Lao	sentinel (3)	23	9	4	13	19	9	11	96
Malaysia	National	22	12	47	36	59	20	28	48
Papua New Guinea	sentinel (1)	0	0	1	4	0	1	0	0
The Philippines	sentinel (9)	24	25	69	115	312	361	204	143
Korea R.	National	20	14	26	40	28	9	-	34
Singapore	National	0	0	0	-	-	0	0	-
Viet Num	sentinel (9)	183	224	421	368	357	200	313	196

WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system

ダニ媒介脳炎

ダニ媒介脳炎ウイルスの生態



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

- 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
- 世界的に流行が継続しているデングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスの流行状況を注視する
- 国内で流行が継続している日本脳炎、ダニ媒介脳炎の流行状況を注視する
- アルボウイルス感染症レファレンスセンターを中心にアルボウイルス感染症の検査体制を維持・強化する

アルボウイルス感染症レファレンスセンターネットワークの強化

- 衛衛生微生物技術協議会・第41回研究会アルボウイルスレファレンスセンター等関連会議をリケッチアレファレンスセンターとオンラインにて2021年7月に共同開催し情報共有を実施した
- ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブについて紹介した
- まずは全国のアルボウイルスレファレンスセンターに配布し各センターにおいて検討することにした

ContAmplicon挿入陽性コントロール、プローブの配布について

- 4種類のデングウイルス各血清型(D1+CA, D2+CA, D3+CA, D4+CA)の陽性コントロール (10^9 コピー /uLに調製したRNA液各 100uL) を配布した
- ContAmplicon Probe_DCZ (10uM, 10pmol/uL) 100uLも同時に配布した
- これにより汚染確認とコピー数の算出が可能である
- 陽性コントロールの希釈液 (10ug/mL yeast tRNA溶液 (Thermo #AM7119)も同時に配布した

まとめ

- 各地衛研の希望により、遺伝子検査用陽性対照を分与した
- 遺伝子検査用陽性対照の見直しを行い、各アルボウイルスレファレンスセンターに新たに作製したデングウイルス1型～4型のContAmplicon挿入陽性コントロールおよびプローブを配布した結果、検体中の遺伝子コピー数の測定が可能となり、また汚染対策も強化された
- 今後はアルボウイルスレファレンスセンターにおける汚染コントロール配列を挿入した陽性対照の検討を経て、各地衛研への陽性対照の配布を実施する
- また今後は他のアルボウイルスについても汚染コントロール配列を挿入した陽性対照を作製し、地衛研への配布を行う

議題

- アルボウイルス感染症の流行状況について
- デングウイルス診断用プライマーとデングウイルス3型
プライマーの改良について
- デングウイルス診断用プライマーの配布方法について

8. エンテロウイルス

令和4年度

エンテロウイルスレファレンスセンター会議報告

日時: 2022年6月3日 (金)

場所: Zoom開催

参加者:

エンテロウイルスレファレンスセンターブロック代表者(順不同 敬称略)

北川 和寛 福島県衛生研究所(北海道東北新潟)

佐野 貴子 神奈川県衛生研究所(関東甲信静)

伊藤 雅 愛知県衛生研究所(東海北陸)

中田 恵子 大阪健康安全基盤研究所(近畿)

河瀬 曜 愛媛県衛生環境研究所(中国四国)

濱崎 光宏 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

村松 正道

有田 峰太郎

吉田 弘

西村 順裕

喜多村 晃一

菊池 みなみ

会議の概要

議題1: 担当者(連絡先)確認

総括1: 有田から、担当者の人事異動による連絡先の引継ぎが共有されない場合があるため、可能であれば担当部署の代表連絡先(代表メールアドレス)を教えてくださいという提案をした。

議題2: 今後のエンテロレファレンスセンター会議の活動内容

総括2: 人事異動による担当者の交替による影響の懸念が、現在も解決されていない。従来通り、できる範囲でレファレンスセンターの活動としてサポートする。

議題3: AFPサーベイの現状

総括3: 有田から感染研における国内AFPサーベイランスの現状を報告した。体系に依然として課題があるが、連携を取りつつ検討を重ね引き続き実施していく。

議題4: 手足口病病原体検出マニュアル改訂案について

総括4: 現在手足口病病原体検出マニュアル改訂作業は感染研ではなく地方衛生研究所(群馬県)が主体となっているが、実施で支障をきたすことがないよう、エンテロレファレンスセンターの意見が反映されるべきである。使用可能な試薬の記載、検査の選択方法の記載、検査の感度の情報の記載等が必要である。

議題5: 地衛研からのエンテロウイルス分離状況の報告

総括5: 特筆すべき事項なし。

9. ノロウイルス

ノロウイルス（下痢症ウイルス） レファレンスセンター会議報告

世話人：染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部

令和4（2022）年 7月 4日 13:30～

Zoom会議室



地方衛生研究所担当者の皆さま

- 日頃よりノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター活動にご協力頂き、ありがとうございます。
- ノロウイルスレファレンスセンター地区担当者変更の際は、ウイルス第二部 染谷（someya@niid.go.jp）までご一報をお願いします。
- 新型コロナウイルス感染症の流行に伴い、下痢症ウイルスの流行が抑えられています。これにより、下痢症ウイルス感染症に対して免疫力のない、あるいは、低下した人たちが蓄積されていると考えられますので、今後大流行の発生が懸念されます。継続的な注意喚起が必要と考えます。

標準プラスミド（陽性コントロール）請求先

- ノロウイルス

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

第七室 岡本 貴世子（ k-okmt@niid.go.jp ）

- ロタウイルス、サポウイルス

国立感染症研究所 ウイルス第二部

第一室 染谷 雄一（ someya@niid.go.jp ）

報告事項

- ノロウイルス分類法について（村上主任研究官）
- ロタウイルス検査法について（藤井主任研究官）

令和4年7月4日 (月)
ノロウイルスレファレンスセンター

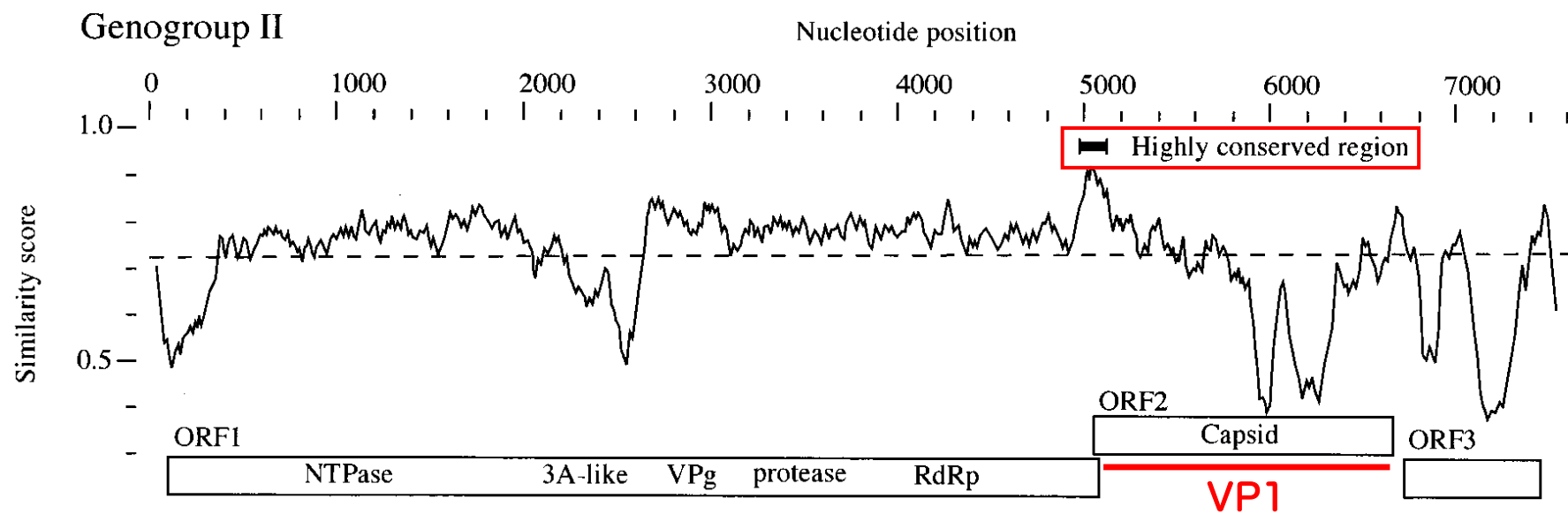
～ノロウイルス～

ノロウイルスの分類法について

国立感染症研究所
ウイルス第二部第一室
村上耕介



ノロウイルスの遺伝子構造と 遺伝子型内の類似度



抗原性に関するカプシド (VP1) により分類された

遺伝子型の再分類 (2013年当時)

Genogroup I

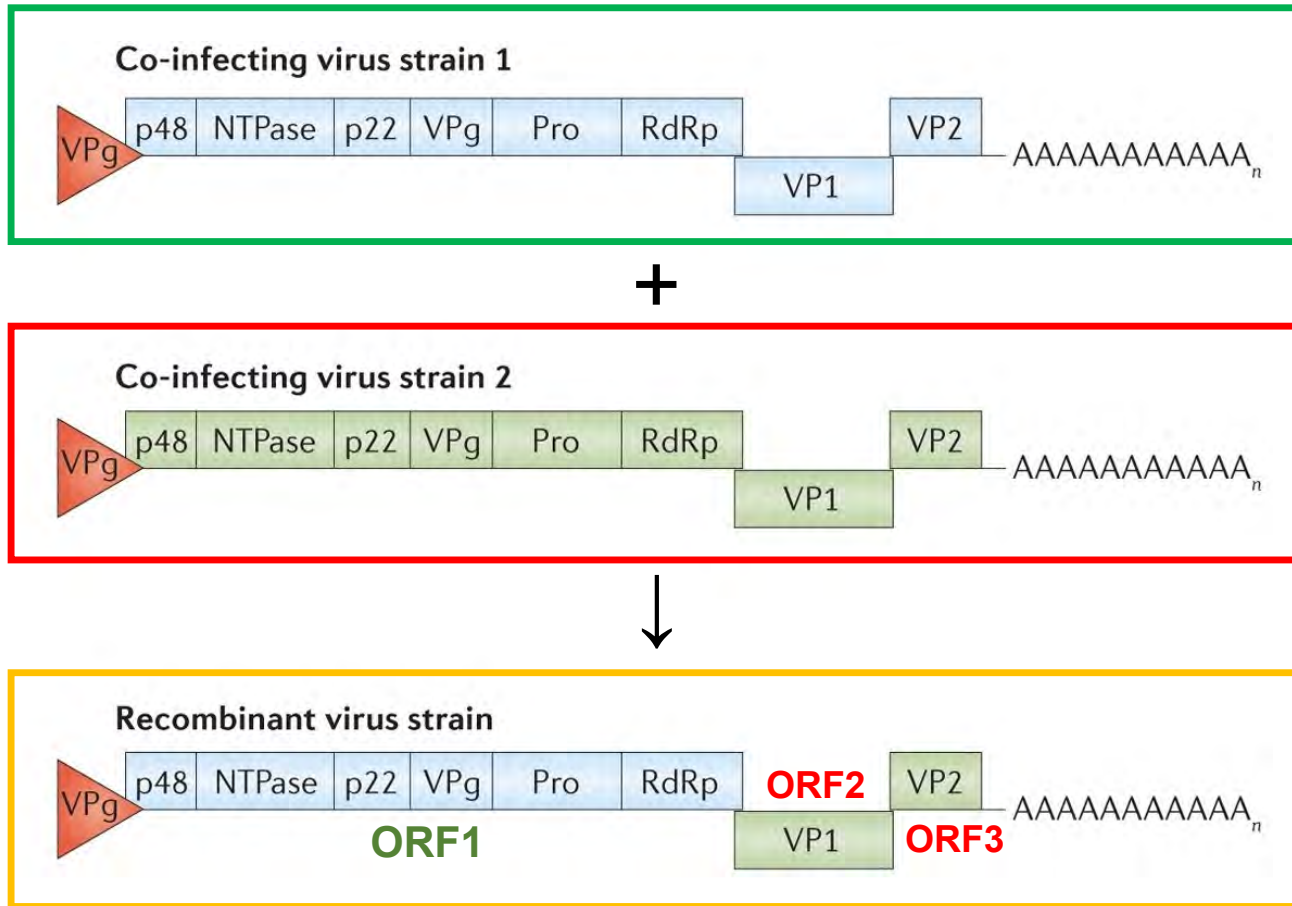
旧表記	新表記
GI/1	GI.1
GI/2	GI.2
GI/3	GI.3
GI/4	GI.4
GI/5	GI.5
GI/6	GI.6
GI/7	GI.7
GI/8	GI.6
GI/9	GI.5
GI/10	GI.8
GI/11	GI.3
GI/12	未定NA
GI/13	GI.9
GI/14	GI.3

Genogroup II

旧表記	新表記
GII/1	GII.1
GII/2	GII.2
GII/3	GII.3
GII/4	GII.4
GII/5	GII.5
GII/6	GII.6
GII/7	GII.7
GII/8	GII.8
GII/9	GII.9
GII/10	GII.10
GII/11	GII.17
GII/12	GII.12
GII/13	GII.14
GII/14	GII.13
GII/15	GII.16
GII/16	GII.21
(GII/17=GIV)	—
GII/18	GII.22
GII/19	GII.15
—	GII.11
—	GII.18
—	GII.19
—	GII.20

2013年の再分類で
GII/17がGIVに変更された

リコンビナント株の登場 (発見)



ORF1とORF2-3が入れ替わっている
→ VP1だけでなくORF (RdRp)による分類も必要

新しい分類法の提案

JOURNAL OF
GENERAL VIROLOGY

RESEARCH ARTICLE

Chhabra *et al.*, *Journal of General Virology* 2019;100:1393–1406
DOI 10.1099/jgv.0.001318



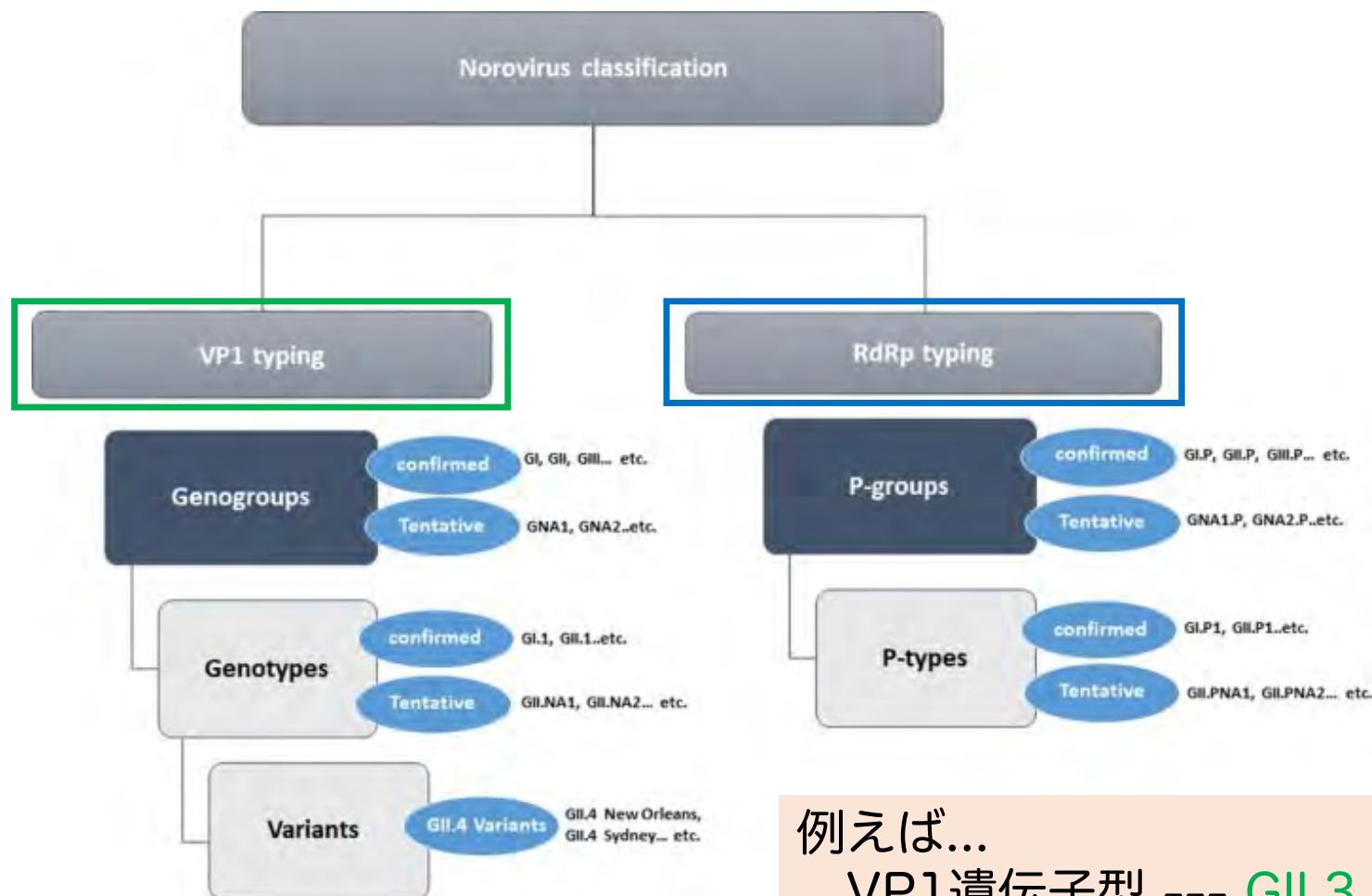
Updated classification of norovirus genogroups and genotypes

Preeti Chhabra^{1*}, Miranda de Graaf², Gabriel I. Parra³, Martin Chi-Wai Chan⁴, Kim Green⁵, Vito Martella⁶, Qihong Wang⁷, Peter A. White⁸, Kazuhiko Katayama⁹, Harry Vennema¹⁰, Marion P. G. Koopmans² and Jan Vinjé¹

Abstract

Noroviruses are genetically diverse RNA viruses associated with acute gastroenteritis in mammalian hosts. Phylogenetically, they can be segregated into different genogroups as well as P (polymerase)-groups and further into genotypes and P-types based on amino acid diversity of the complete VP1 gene and nucleotide diversity of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) region of ORF1, respectively. In recent years, several new noroviruses have been reported that warrant an update of the existing classification scheme. Using previously described 2× standard deviation (SD) criteria to group sequences into separate clusters, we expanded the number of genogroups to 10 (GI–GX) and the number of genotypes to 49 (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI and 1 genotype each for GVII, GVIII, GIX [formerly GII.15] and GX). Viruses for which currently only one sequence is available in public databases were classified into tentative new genogroups (GNA1 and GNA2) and genotypes (GII.NA1, GII.NA2 and GIV.NA1) with their definitive assignment awaiting additional related sequences. Based on nucleotide diversity in the RdRp region, noroviruses can be divided into 60 P-types (14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII and 1 GX), 2 tentative P-groups and 14 tentative P-types. Future classification and nomenclature updates will be based on complete genome sequences and will be coordinated and disseminated by the international norovirus classification-working group.

ORF1/ORF2による分類



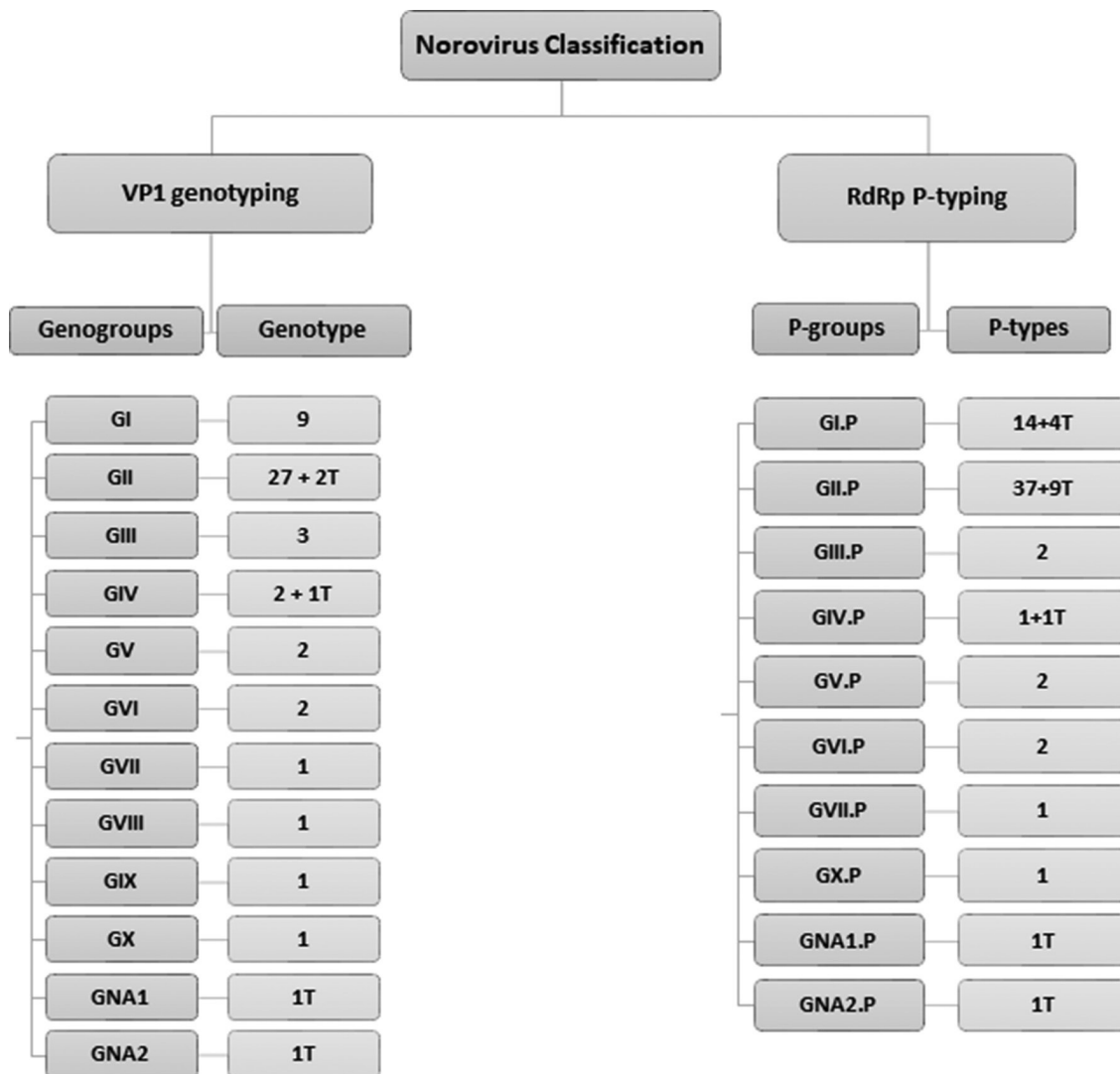
例えば...

VP1遺伝子型 --- GII.3

RdRp遺伝子型 --- GII.P12

→ GII.3[P12]

遺伝子群/遺伝子型の新しい分類



Dual typing法に用いるプライマー

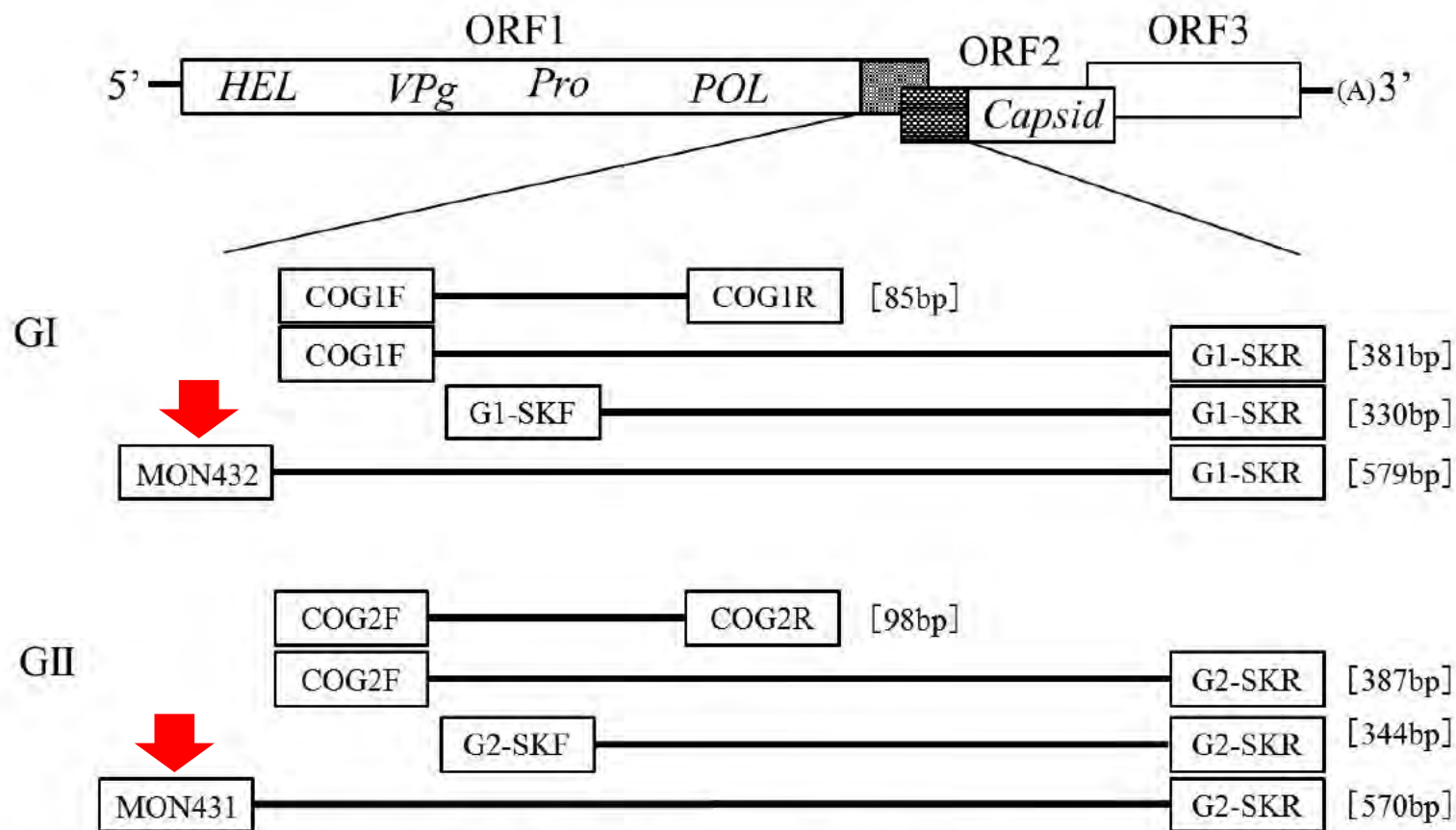
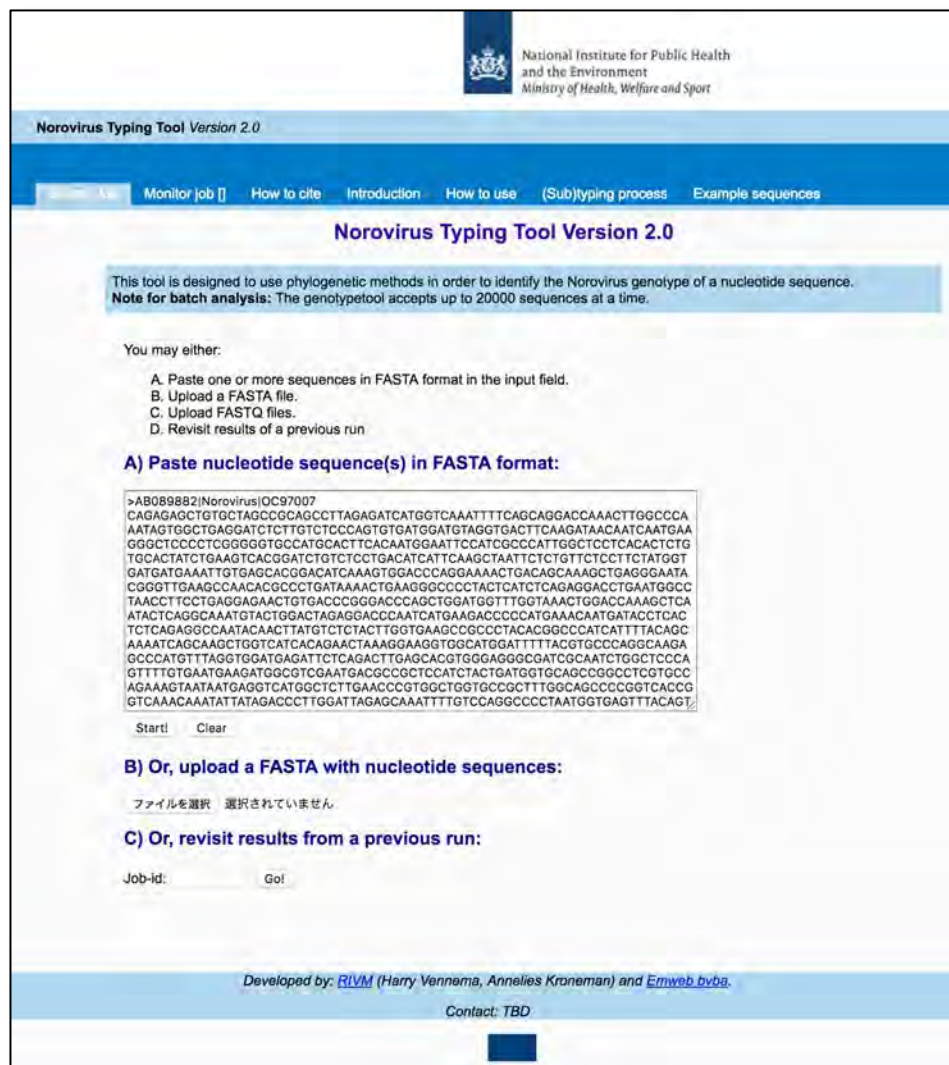


図 2. NoV 検査に使用するプライマーとプローブの位置

ノロウイルス遺伝子型判定ツール

オランダ国立公衆衛生環境研究所による提供
<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>



The screenshot shows the web interface of the Norovirus Typing Tool Version 2.0. At the top, there is a header for the National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport. Below this is a navigation bar with links: Home, Monitor job [], How to cite, Introduction, How to use, (Sub)typing process, and Example sequences. The main title is "Norovirus Typing Tool Version 2.0". A description states: "This tool is designed to use phylogenetic methods in order to identify the Norovirus genotype of a nucleotide sequence. Note for batch analysis: The genotyping tool accepts up to 20000 sequences at a time." Below this, it says "You may either:" followed by four options: A. Paste one or more sequences in FASTA format in the input field, B. Upload a FASTA file, C. Upload FASTQ files, and D. Revisit results of a previous run. Option A is selected, and a text area contains a long FASTA sequence starting with ">AB089882|Norovirus|QC97007". Below the text area are "Start!" and "Clear" buttons. Option B is also listed: "B) Or, upload a FASTA with nucleotide sequences:". Below this is a file upload button labeled "ファイルを選択" and a message "選択されていません". Option C is listed: "C) Or, revisit results from a previous run:". Below this is a "Job-id:" label and a "Go!" button. At the bottom, it says "Developed by: RIVM (Harry Vennema, Annelies Kroneman) and Emweb bvba." and "Contact: TBD".

病原体検出マニュアルの改訂 (再周知)



こちら研究部
画像・映像アーカイブ
感染研年報
国際協力

サーベイランス

感染症発生動向調査週報 (IDWR)
病原微生物検出情報 (IASR)
感染症流行予測調査 (NESVPD)
院内感染 (JANIS)
実地疫学専門家養成コース (FETP-J)

刊行・マニュアル・基準

JJID 感染研発行の国際学術雑誌
病原体検出マニュアル
病原体安全管理規程等
生物学的製剤基準
感染研・学会出版書籍

研究トピックス

新型コロナウイルスの新規抗体はウイルスの弱点を攻撃することでSARS類縁ウイルスや変…
A SARS-CoV-2 Antibody Broadly Neutralizes SARS-related Coronaviruses and Variants by Coordinated Recognition of a Virus Vulnerable Site Taishi Onodera, Shunsuke Kita, Yu Adachi, Saya Moriyama, Akihiko Sato, Takao Nomura, Shuhei Sakakibara, Takeshi Inoue, Takashi Tadokoro, Yuki Anraku, Kohei Yumoto...

ハイスループットな中和試験法によるタイのフラビウイルス中和抗体の血清疫学調査: 201…
Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012 Atsushi Yamanaka, Mami Matsuda, Tamaki Okabayashi, Pannamthip Pitaksajjakul, Pongrama Ramasoota, Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Haneda...

IDWR 2021年第41号<注目すべき感染症> 梅毒
2021年10月29日

IDWR 2021年第41号 (第41号)
2021年10月29日

更新履歴

アクセスの多い記事

インフルエンザ流行レベルマップ 第9週 (3/12更新)
コロナウイルスとは
新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連情報について
マイコプラズマ肺炎とは
日本の予防接種スケジュール
SARS (重症急性呼吸器症候群) とは
風疹Q&A (2018年1月30日改訂)
風疹とは
IDWRトップ
ヘルパンギーナとは

更新情報
記事一覧
感染症の話
ACCESS
IDSC
IDWR
IASR
感染流行予測調査 NESVPD
JANIS
公開講座 研修のお知らせ
抗生物質標準品
国際協力 International Cooperation
検体パネル
検定合格情報

病原体検出マニュアル
ノロウイルス (第1版)
平成31年6月

新しい分類に対応したシーケンス方法等が収載されています

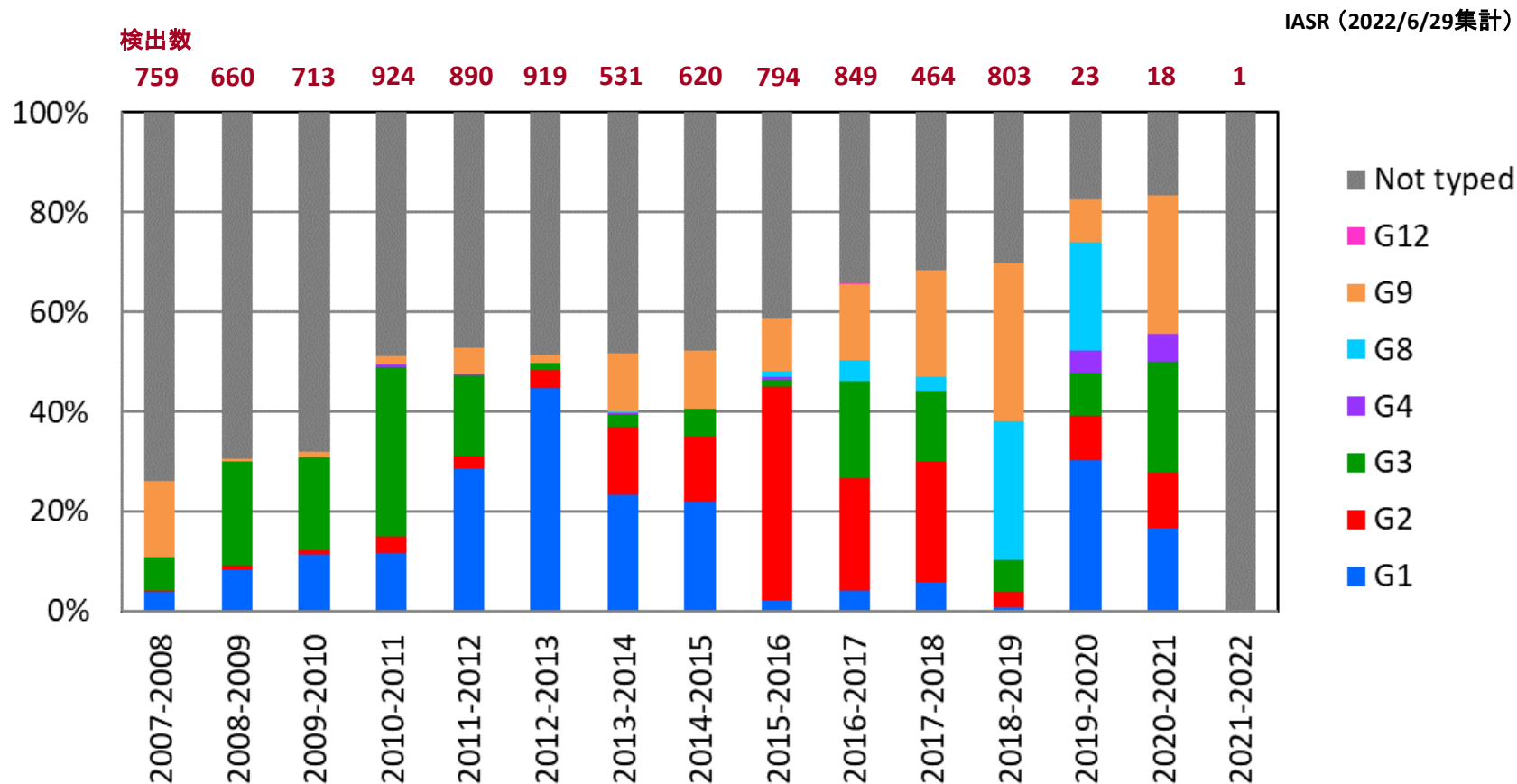
ノロウイルス（下痢症ウイルス） レファレンスセンター報告

～ ロタウイルスについて ～

国立感染症研究所 ウイルス第二部

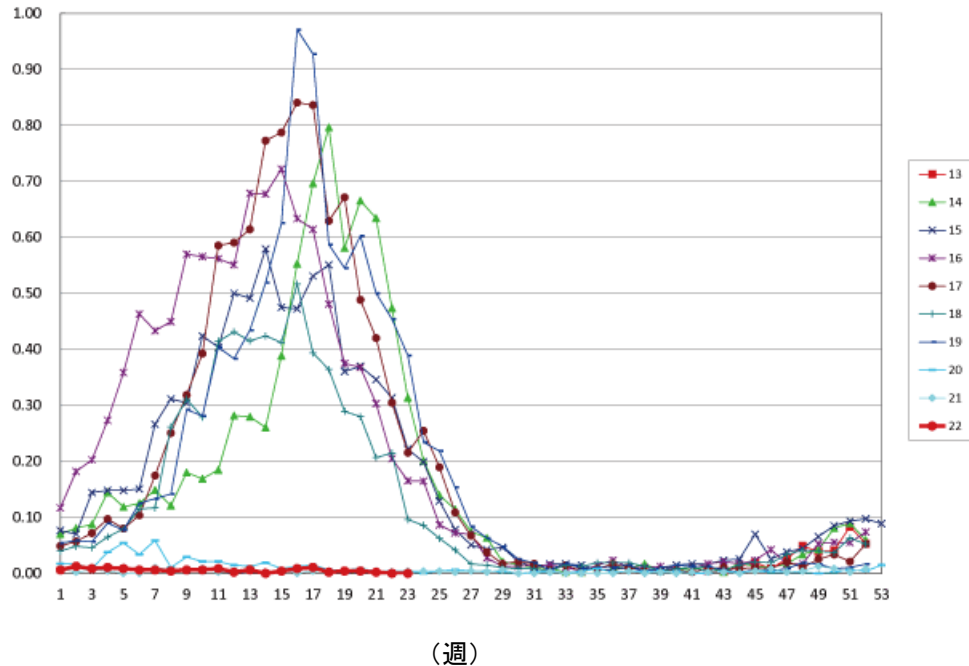
2022年7月4日

ロタウイルスの検出状況 (IASR)



- ◆ 2020年以降、ロタウイルスの検査報告数は非常に少ない。
- ◆ 遺伝子型の特定は年々積極的にされている傾向にある。

ロタウイルスの流行状況(発生動向調査、IDWR)



和暦	西暦	報告数	定点あたり
平成26年	2014年	4030	8.48
平成27年	2015年	4068	9.16
平成28年	2016年	5266	11.04
平成29年	2017年	4991	10.46
平成30年	2018年	3234	6.74
令和元年	2019年	4693	9.82
令和2年	2020年	250	0.52
令和3年	2021年	91	0.19
令和4年	2022年	62	0.13

- 2020年以降、ロタウイルスの検出報告数は非常に少ない。
- 定期接種化は2020年10月からだが、2020年春の流行はほとんど無かった。

新型コロナウイルス流行に伴い、保育所・学校等の登園・登校自粛等の行動変容や、衛生管理の意識が格段に向上した影響と思われる。

病原体検出マニュアル

病原体検出マニュアルは、感染症法に基づいて感染症の報告がなされる際の検査の標準化のために、国立感染症研究所と全国地方衛生研究所の共同作業で作成されたものであり、感染症対策に係る行政対応における大きな根拠となっております。本マニュアルを使用し、常に評価し、科学の進歩にあったものに改善していくことが常に求められています。

5類感染症 定点把握

- [RSウイルス感染症](#) 2020年6月版
- [咽頭結膜熱](#) 2017年3月版
- [A群溶血性レンサ球菌咽頭炎](#) 2013年8月版
- [感染性胃腸炎](#)
- [ロタウイルス](#) 2019年6月版
- [ノロウイルス](#) 2019年6月版
- [サボウイルス](#) 2021年7月版
- [アデノウイルス下痢症](#) 2022年5月版
- [水痘](#) 2011年10月版
- [手足口病](#) 2018年2月版
- [伝染性紅斑](#)
- [突発性発しん](#) 2015年8月版
- [ヘルパンギーナ](#) 2018年2月版
- [流行性耳下腺炎](#) 2015年1月版

ロタウイルス検出マニュアル

目次

I. ロタウイルスの概説

- I-1. 病原体
- I-2. 分類
- I-3. 疫学
- I-4. 臨床症状
- I-5. ワクチン

II. 検査準備

- II-1. 検査材料の取り扱い
- II-2. 検査の進め方
- II-3. 検査材料の採取
- II-4. 10%懸濁液の作製

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. シークエンス解析
- ※ワクチン株との鑑別について

ロタウイルスのリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットについて

- 現在、2種類のプライマー・プローブセットが広く利用されている。
(ターゲットはいずれもNSP3遺伝子だが、位置が異なる)
- セット①、②とも、主要流行株(T1型、T2型)は概ね検出可能。

セット①(Jothikumar *et al.*)

Journal of Virological Methods 155 (2009) 126–131

Target	Primer name	5' – sequence –3'	Product size	Position
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	131	17–39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA		123–147
	JVKP	ACAACTGCAGCTTCAAAAGAAGWGT		72–96

セット②(Freeman *et al.*)

Journal of Medical virology 80 (2008) 1489–1496

Target	Primer name	5' – sequence –3'	Product size	Position
NSP3	NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	87	988–1007
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		1055–1074
	NVP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA		1009–1041

※Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ(5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ)の使用を推奨。

セット①の問題点（検出可能な遺伝子型が限定的）

セット① (Jothikumar *et al.*)

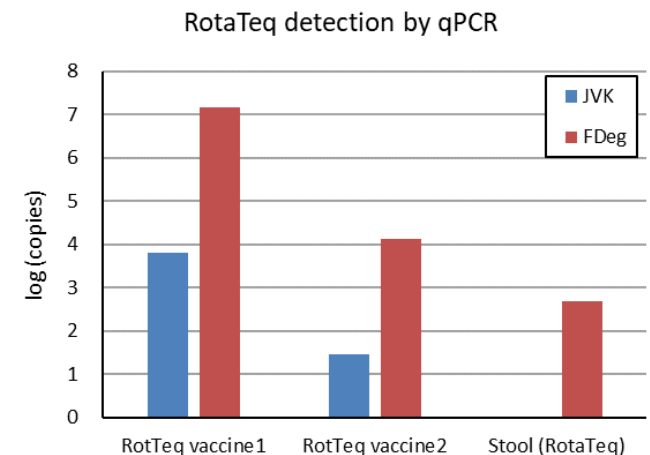
Journal of Virological Methods 155 (2009) 126–131

Target	Primer name	5' – sequence –3'	Product size	Position
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	131	17–39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA		123–147
	JVKP	ACAAC TGCAGCTTCAAAAGAAGWGT		72–96

- 主要流行株 (T1型、T2型) は検出可能だが、AU-1型株 (T3型) を検出できない。
- ワクチン株のうち、ロタリックス (T1型) は検出可能だが、
ロタテック (T6型) は検出感度が大幅に落ちる。(1/1000程度)
→ セット①は非推奨。



- 次回のマニュアル更新で削除する予定。



セット②の問題点（非特異反応の発生）

セット② (Freeman *et al.*)

Journal of Medical virology 80 (2008) 1489–1496

Target	Primer name	5' – sequence – 3'	Product size	Position
NSP3	NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCCTC	87	988–1007
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		1055–1074
	NVP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA		1009–1041

※Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ) の使用を推奨。

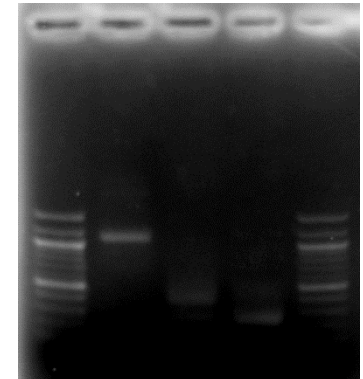
- セット②は幅広いロタウイルス株を検出可能。

ただし、便検体ではしばしば非特異反応が見られ、

陰性検体でも10～100 copies/uL前後の増幅が見られ偽陽性となる場合がある。

100 copies/uL以上を陽性として判定するのが無難。

- ヒトゲノム、腸内細菌、アストロウイルス等、様々な要因で非特異反応が起こっている。
- 低コピー ($10^2 \sim 10^3$ 程度未満) の場合はRT-PCRによる確認を推奨。



セット②の反応条件の改良

セット② (Freeman *et al.*)

Primer name	5'- sequence -3'	終濃度 (μM)	
		従来	改良
NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	0.25	0.4
NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCCTATA	0.25	0.2
NVP3-Probe	ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	0.25	0.2

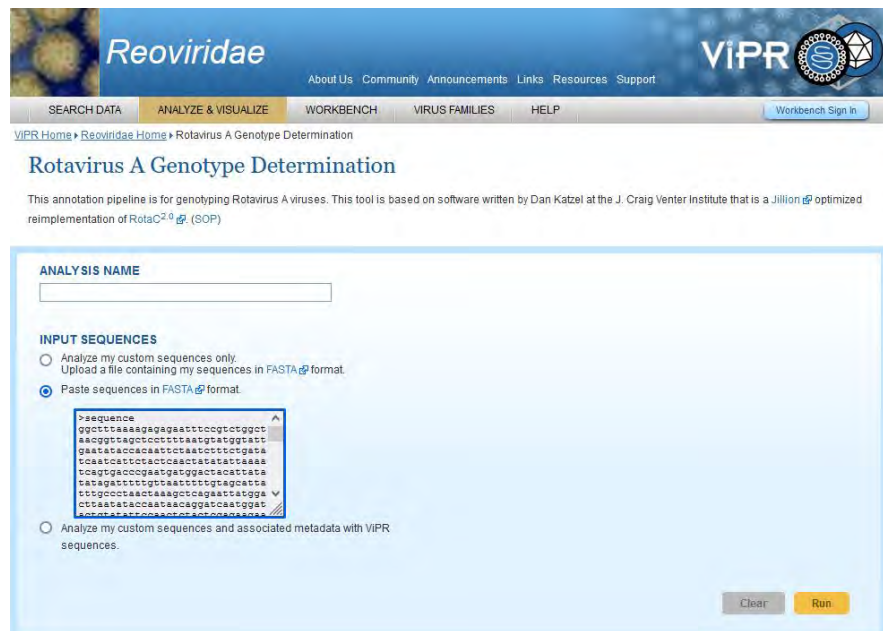


プライマーの濃度を変更することにより、非特異反応が軽減される可能性あり。
(検証用の手持ちサンプルセットで、非特異発生率20-25% → 12%程度)

- 追加の検証をして頂ける方、募集中。
- 次回のマニュアル更新で反映させる予定。

ロタウイルス遺伝子型判定ツール

◆ ロタウイルスの塩基配列データから、どの遺伝子で、どの型か判定してくれるツール。



The screenshot shows the Reoviridae ViPR website. The main navigation bar includes 'SEARCH DATA', 'ANALYZE & VISUALIZE', 'WORKBENCH', 'VIRUS FAMILIES', and 'HELP'. Below this, the 'Rotavirus A Genotype Determination' tool is highlighted. The tool's description states: 'This annotation pipeline is for genotyping Rotavirus A viruses. This tool is based on software written by Dan Katzel at the J. Craig Venter Institute that is a Jillion optimized reimplementation of RotaC².⁹ (SOP)'. The interface includes an 'ANALYSIS NAME' field, 'INPUT SEQUENCES' section with radio buttons for 'Analyze my custom sequences only' (with sub-options for FASTA upload or paste) and 'Analyze my custom sequences and associated metadata with ViPR sequences'. A text area contains a sample sequence. At the bottom are 'Clear' and 'Run' buttons.



Rotavirus A Genotyping Report (SOP)

[Download Raw Result](#)

Results of Genotyped Sequences

Sequence Identifier	Segment Number	Gene Name	Genotype	Closest Strain	Query Coverage %	Ident %	E Value
sequence	9	VP7	G1	RVA/Human-wt/BGD/Dhaka16/2003/G1P8	93.88	96.84	0E0

Results of Non-Genotyped Sequences

No Sequences in the input fasta cannot be genotyped

- 以前の「RotaC」は閉鎖。
- 現在はViPR (Virus Pathogen Resource) サイト内にRotaCの後継ツール「Rotavirus A Genotype Determination」があり、同様の解析が可能。

感染症流行予測調査

National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (NESVPD)

- ワクチンの定期接種化に伴い、
2020年度（令和2年度）から
ロタウイルスの流行予測調査
（感染源調査）を実施しています。

ご参加お待ちしております。
（ご相談は疫学センターまで）

令和3年度感染症流行予測調査実施要領

目 次

疾病別実施地区数及び対象数	1
第1 感染症流行予測調査の概要	2
第2 ポリオ	
1 感受性調査（1型・3型ポリオウイルス）	6
2 感受性調査（2型ポリオウイルス）	6
3 感染源調査（環境水からのポリオウイルス分離・同定）	7
資料1 環境水からのポリオウイルス分離（採水・濃縮・分離方法）	9
第3 インフルエンザ	
1 感受性調査	10
2 新型インフルエンザウイルスの出現監視を目的とした感染源調査	11
資料2 インフルエンザウイルス分離のための検体の採取	13
資料3 インフルエンザウイルス分離のためのフローチャート	14
第4 日本脳炎	
1 感受性調査	15
2 感染源調査	15
3 確認患者調査	17
第5 風しん	
感受性調査	18
第6 麻しん	
感受性調査	20
第7 ヒトパピローマウイルス感染症	
感受性調査	21
第8 水痘	
感受性調査	22
第9 B型肝炎	
感受性調査	23
第10 インフルエンザ菌感染症	
感染源調査	24
第11 肺炎球菌感染症	
感染源調査	25
第12 ロタウイルス感染症	26
感染源調査	
第13 新型コロナウイルス感染症	
感受性調査	27
第14 血清取扱要領	28

今後の検討事項

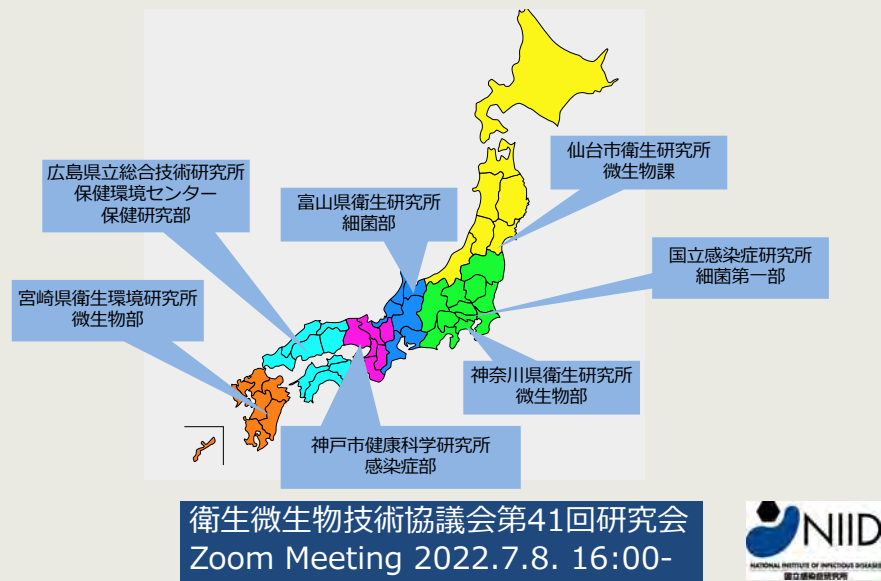
- RNAコントロールの検討
 - RNAウイルスの検査にDNAコントロールを用いるのでよいのか
- 病原体検出マニュアルの作成、更新
 - アストロウイルスは作成に向け、準備中
 - 既出のものは必要があれば更新
- 新規検査法の検証
 - 特筆なし
- 既存の検査法の精度向上、簡素化に向けた検討
 - マルチプレックスPCR法の位置付け

そのほか

- 検査法の提案、検査法の検証、改善点の指摘、検出マニュアルの作成、など
ご意見、ご要望は、染谷 (someya@niid.go.jp) までお寄せください
- 直接でも結構ですし、地区担当者に取りまとめてお送り頂いても構いません
- 今後ともご協力をお願いいたします

10. レジオネラ

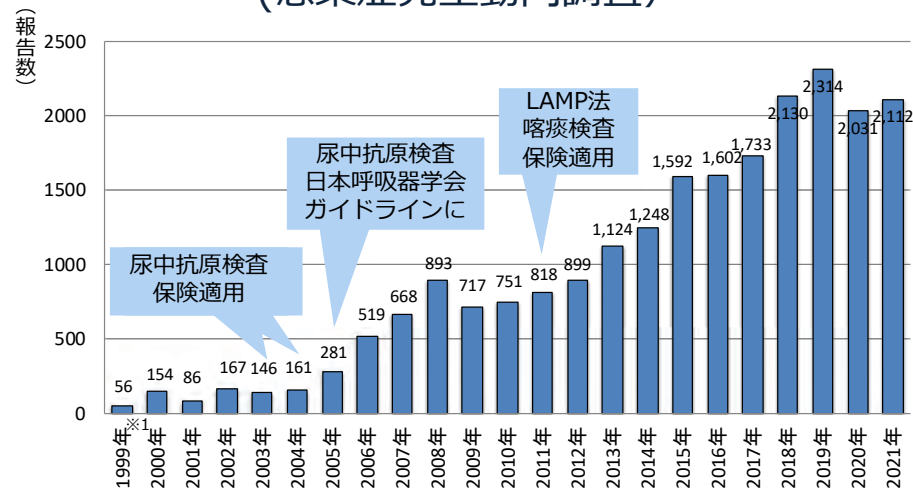
レジオネラ・レファレンスセンター会議



今日の議題

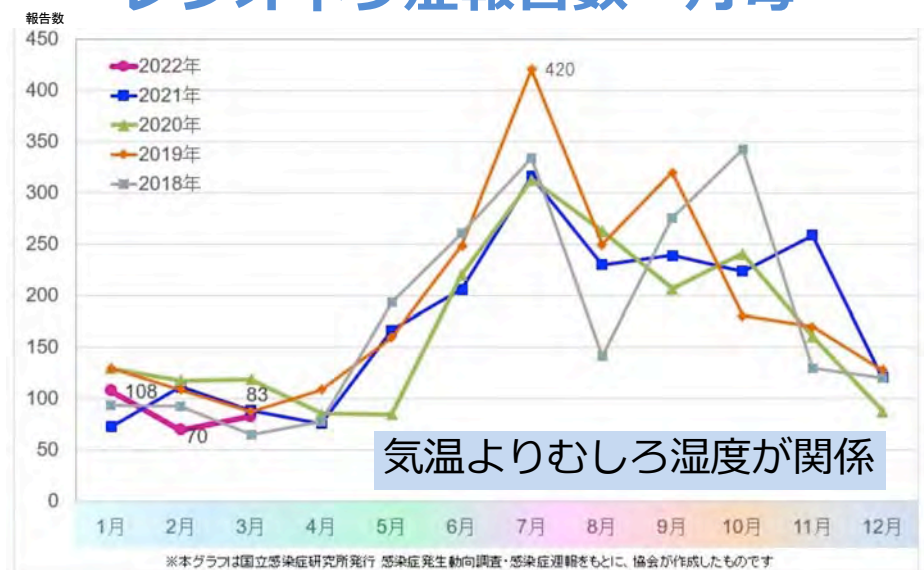
- ！ レジオネラ症発生動向
- ！ 臨床分離株の収集
- ！ 昨年度活動報告
- ！ 今年度活動予定
- ！ 各支部報告

年別レジオネラ症報告数 (感染症発生動向調査)



※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

レジオネラ症報告数・月毎



レジオネラ症の推定感染源・ 感染経路の割合

2011年第1週～2021年第35週
国立感染症研究所 感染症疫学センター

水系感染 5,465例 (32.5%)
塵埃感染 953例 (5.7%) (重複あり)
→ 多くは不明

入浴施設での感染疑いは3割程度？

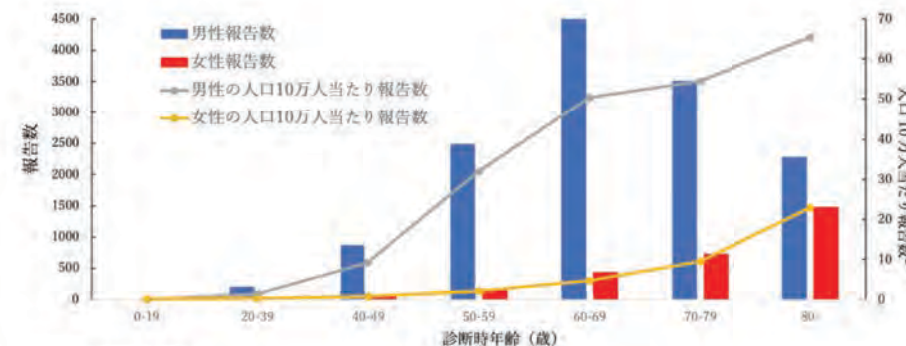
レジオネラ症患者の性別年齢分布

2011年第1週～2021年第35週

国立感染症研究所 感染症疫学センター



16,841例 50歳以上が93%



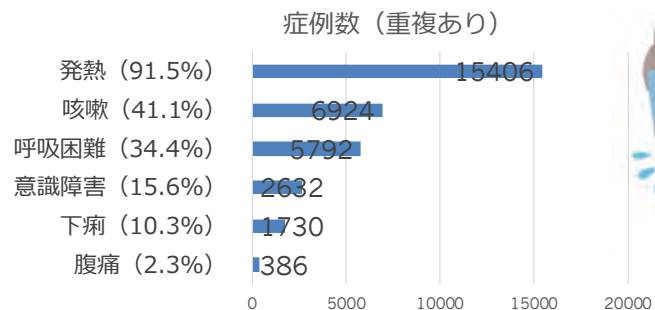
*2015年人口推計値を使用

レジオネラ症患者の症状

2011年第1週～2021年第35週 16,841例

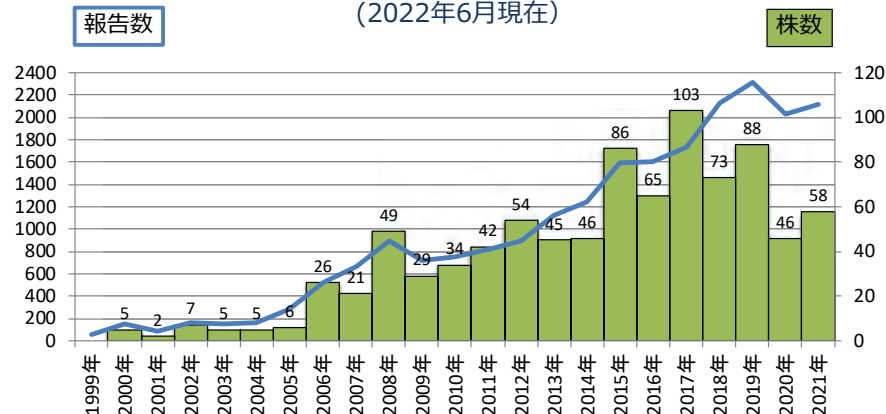
肺炎型 94.8% (15,973例)
ポンティアック型 4.3% (726例)
無症状病原体保有者 0.8% (142例)

届出時多臓器不全 7.9% (1,332例)
届出時死亡 1.4% (229例)



国立感染症研究所
感染症疫学センター
2021年11月4日現在

分離年別 収集レジオネラ臨床分離株 (2022年6月現在)



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

2022年6月現在

<i>L. pneumophila</i> 886株 (98.4%)		<i>L. anisa</i> 1株 (0.1%)
SG1 795株 (88.3%)	SG9 9株 (1.0%)	<i>L. bozeman</i> 1株 (0.1%)
SG2 20株 (2.2%)	SG10 5株 (0.6%)	<i>L. dumoffii</i> 1株 (0.1%)
SG3 18株 (2.0%)	SG12 2株 (0.2%)	<i>L. feeleii</i> 2株 (0.2%)
SG4 4株 (0.4%)	SG13 2株 (0.2%)	<i>L. londiniensis</i> 1株 (0.1%)
SG5 13株 (1.4%)	SG14 1株 (0.1%)	<i>L. longbeachae</i> 7株 (0.8%)
SG6 11株 (1.2%)	SG15 1株 (0.1%)	<i>L. rubrilucens</i> 1株 (0.1%)
SG7 2株 (0.2%)		
SG8 2株 (0.2%)	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 900株 (100%)

SBTによる遺伝子型別結果は個別に報告

2021年度活動

- 市販されていないレジオネラ免疫血清の受注生産品（デンカ）の配布

レジオネラ・ニューモフィラ混合血清 （混合1, 2, 3, 2-15群）

□ングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジョルダニス
□ンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハッケリー（1,2群混合）

- レジオネラ属菌検査外部精度管理
70地衛研等が参加

2022年度活動予定

- 市販されていないレジオネラ免疫血清の受注生産品（デンカ）の配布

Primer-Mix
も可

レジオネラ・ニューモフィラ混合血清 （混合1, 2, 3, 2-15群）

□ングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジョルダニス
□ンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハッケリー（1,2群混合）

- レジオネラ属菌検査外部精度管理

マルチプレックスPCRによる血清型別法

Legionella pneumophila の15血清群を12のグループに分けることができる。

血清群1、血清群2、血清群3/15、血清群4/10、血清群5、血清群6/12、
血清群7、血清群8、血清群9、血清群11、血清群13、血清群14*

*血清群14のプライマーは未発表データ

26本のプライマー

マルチプレックスPCR用の酵素
が必要

→（株）ファスマックがPrimer-Mixを製品化

レジオネラレファレンスセンター活動報告

＜北海道・東北・新潟ブロック＞

(1) レジオネラ属菌外部精度管理サーベイについて

令和3年12月に希望する10地研(北海道4・青森県・宮城県・仙台市・福島県・新潟県・新潟市)が参加した。

(2) 班会議等への出席及び血清配布について

令和3年6月・12月にweb開催された、厚生労働科学研究「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」の研究班班会議への出席及びWGへの参加協力を行った。また、厚労科研費にて購入の血清を、ブロック内で希望する11地研あてに配布した。

(3) ブロック内レジオネラ患者発生状況及び感染研あて菌株送付について(表1・表2)

表1 感染症法による届出数(R3年)

	R3年
北海道(札幌市・函館市除く)	27
札幌市	21
函館市	3
青森県	11
秋田県	22
岩手県	16
宮城県(仙台市除く)	41
仙台市	28
山形県	39
福島県	38
新潟県	31
新潟市	17
合計	294

表2 感染研への菌株送付状況(R3年)

No	患者年齢	性別	菌種	血清群	その他
1	82歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
2	83歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
3	63歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
4	56歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
5	71歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
6	67歳	女	<i>L.pneumophila</i>	1	
7	73歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
8	66歳	女	<i>L.pneumophila</i>	1	
9	80歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
10	93歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
11	52歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
12	58歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
13	67歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
14	72歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
15	57歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
合計 15 株(No.1～14 山形県、No.15 新潟県)					

(4) 各地研における検査状況について(詳細は、表3「R3年度 検査状況」参照)

・特筆すべき事例(北海道)

① R3年(2021年)6～7月の事例:

LAMP法で陽性となり届出された患者の気管支洗浄液から、*Legionella* sp.が検出された。分離株の同定は、遺伝子検査(CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit)及びレジオネラテックステストで行った。この事例では、発症から届出まで約3週間かかった(6/19発症、6/21初診、7/2届出)。

② R3年(2021年)12月の事例:

同一宿泊施設の大浴場清掃員2名が、レジオネラ症として届出され、そのうち1名の喀痰から *L. pneumophila* 血清群1が分離された。

③ R4年(2022年)1月の事例:

別の疾患で長期入院中の患者1名がレジオネラ症として届出され、同一病棟の入院患者に呼吸器症状を呈している者が多数いたことから、届出患者1名、同一病棟の患者(届出なし)6名の喀痰、病棟

内の環境検体(水、拭き取り)41検体に対して遺伝子検査(CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit)と培養検査を実施した。その結果、届出患者は遺伝子検査・培養検査ともに陰性、同

病棟の患者(届出なし)1名及び環境検体6検体で遺伝子検査陽性・培養検査陰性、その他の患者(届出なし)5名及び環境検体35検体は遺伝子検査陰性であった。

(5) 質問事項について(岩手県より)

MLVA法について、地衛研での普及の状況と今後の方向性

表3 R3年度 検査状況

	検査数	内訳（陽性検体数／検体数）															検出菌・血清群等
		浴槽水	シャワー水	ふきとり	上がり湯	冷却塔水	給湯水	修景水	プール	貯水槽	その他	喀 痰	咽頭拭い液	気管支洗浄液	血 液	菌 株	
北海道	56	0/4	0/12 シャワー・ カラ水	0/13							0/16 トイレ・洗面 台水	2/10		1/1			喀 痰から <i>L.p</i> SG1、気管支洗浄液から <i>Legionella</i> sp.
札幌市	81	12/51	4/13 シャワー・ カラ水						0/1	3/12 貯水槽・ 回収槽	2/4 原水						浴槽水から <i>L.p</i> SG 1,3,5,6,7,15、貯水槽・回収槽から <i>L.p</i> SG 3 シャワー水・カラ水から <i>L.p</i> SG 3,5,6、 <i>L.bozemanii</i> 原水から <i>L.p</i> SG 5、 <i>L.bozemanii</i>
函館市	1	0/1															
青森県	0																
秋田県	73	6/66				0/2						0/5					浴槽水から <i>L.p</i> SG 1, 3, 5、 <i>L.londiniensis</i> SG2
岩手県	19	0/9	0/3 シャワー・ カラ水							0/5		1/2					喀 痰から <i>L.p</i> SG1
宮城県	127	26/110			1/17												浴槽水から <i>L.p</i> SG1,2,3,4,5,6,7,9,12、UT、 <i>L.londiniensis</i> SG1、 <i>L.dumoffii</i> 、 <i>Legionella</i> sp. 上がり用湯から <i>L.p</i> SG6
仙台市	15		0/7			2/5		0/1 噴水			0/2 井戸水・加湿 器						冷却塔水から <i>L.p</i> SG1、 <i>Legionella</i> sp.
山形県	26											13/26					喀 痰から <i>L.p</i> SG1
福島県	90	15/90															浴槽水から <i>L.p</i> SG 2, 5, 6, 10, 12
新潟県	16	2/2	1/1				1/9					1/4					浴槽水から <i>L.p</i> SG1,14 シャワー水から <i>L.p</i> 給湯水から <i>L.p</i> UT 喀痰から <i>L.p</i> SG1
新潟市	84	6/42 (シャ ワー水 含む)				3/16		1/17 池水				4/5		0/1		3/3	浴槽水から <i>L.p</i> SG1,5、 <i>L.Dumoffii</i> 、 <i>Legionella</i> sp. 冷却塔水から <i>L.p</i> SG1 修景水から <i>Legionella</i> sp. 喀痰から <i>L.p</i> SG1,5 及び 菌株から <i>L.p</i> SG1,5
合計	588	67/375	5/36	0/13	1/17	5/23	1/9	1/18	0/1	3/17	2/22	21/52	0/0	1/2	0/0	3/3	

R3(2021)年度の関東甲信静支部活動状況

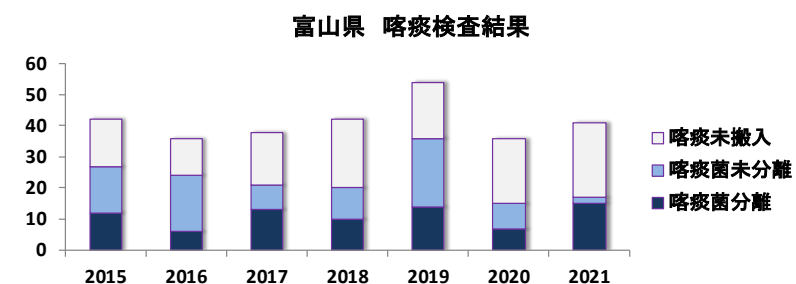
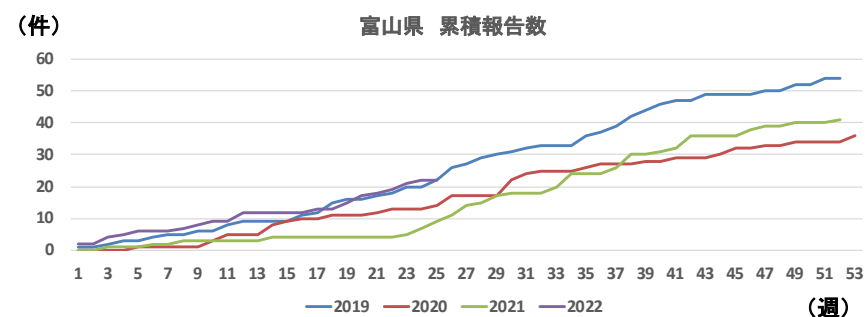
- 外部精度管理事業に22機関が参加
- 25機関にレジオネラ血清等試薬を配布
- 希望機関にSBTデータベースファイルおよびSBT検索ツールを配布

神奈川県における 喀痰検体からのレジオネラ属菌検出状況(2018-2021年度)

	2018	2019	2020	2021
検査検体数	22	33	15	22
検出病原体	件数	件数	件数	件数
<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1	7	13	3	8
<i>L.p.</i> 血清群2	0	0	1	0
<i>L.p.</i> 血清群5	0	3	0	1
<i>Legionella sp.</i>	0	3	1	0
<i>L. bozemanai</i>	0	0	1	0
レジオネラ属菌 合計	7 (31.8%)	16 (48.5%)	6 (40.0%)	9 (40.9%)

人口10万人当たり報告数

年	1位	2位	3位	全国平均
2018	岡山	富山	広島	1.67
	4.28	3.87	3.42	
2019	富山	群馬	長野	1.81
	4.97	3.78	3.03	
2020	岡山	富山	栃木	1.61
	4.12	3.32	3.14	
2021	石川	富山	山形	1.66
	3.88	3.78	3.42	
2022 (25 週)	富山	長野	岐阜	0.60
	2.03	1.21	1.15	



感染研への菌株送付(富山県)

2021 年 16 株

*L. pneumophila*血清群 1 15 株

*L. pneumophila*血清群 6 1 株 (ST1992)

No.	地域	Year	Month	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST	Group
1	W	2021	Mar	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
2	E	2021	Feb	2	3	5	11	2	1	6	120	S1
3	W	2021	Jun	7	6	17	3	11	11	9	505	B2
4	W	2021	Jun	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
5	E	2021	Jul	2	3	6	15	51	1	6	876	S1
6	E	2021	Jul	2	3	6	11	2	1	6	1621	S1
7	W	2021	Jul	2	3	9	10	2	1	10	384	S1
8	W	2021	Jul	2	3	9	10	2	1	6	23	S1
9	W	2021	Aug	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
10	W	2021	Aug	2	3	5	11	2	1	6	120	S1
11	E	2021	Sep	7	10	17	10	13	4	11	1798	B2
12	E	2021	Oct	4	10	11	15	29	1	6	89	S1
13	E	2021	Oct	2	3	9	13	56	5	6	905	S1
14	W	2021	Oct	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
15	E	2021	Dec	7	6	17	10	13	11	6	1273	B2

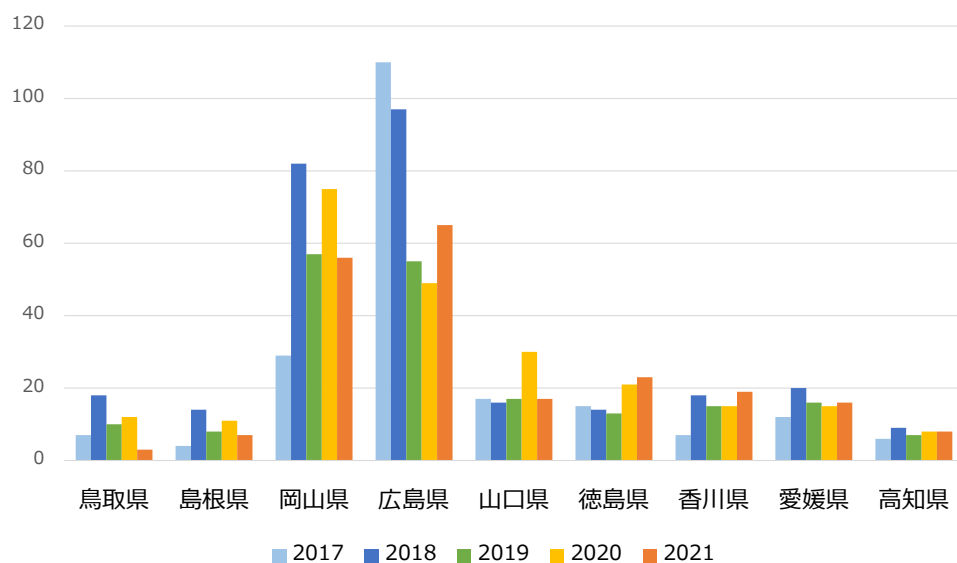
中四国支部報告

広島県立総合技術研究所保健環境センター
平塚 貴大

令和3年度レファレンスセンター活動内容

- 「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班会議への参加 (Web開催)
- 中四国支部の外部精度管理参加募集
- レジオネラ免疫血清 ニューモフィラ混合1～3の配布
- 新規検査法についての周知

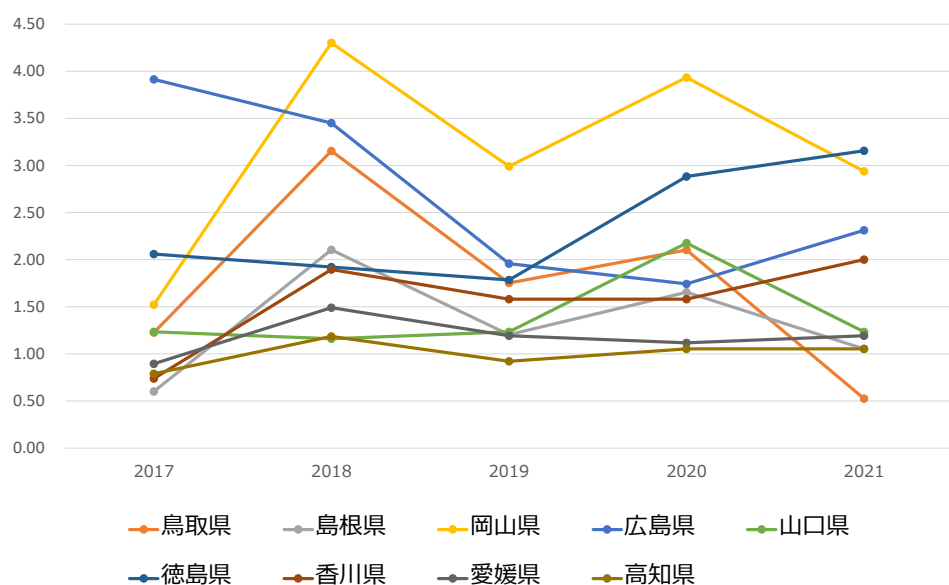
中四国地方のレジオネラ症届出数 (実数)



2021年報告数

	報告数	全国順位
鳥取県	3	47
島根県	7	46
岡山県	56	15
広島県	65	12
山口県	17	33
徳島県	23	28
香川県	19	32
愛媛県	16	36
高知県	8	45

中四国地方のレジオネラ症届出数 (10万人対)



2021年報告数(10万人対)

	報告数	全国順位
鳥取県	0.53	47
島根県	1.05	43
岡山県	2.94	8
広島県	2.31	14
山口県	1.23	34
徳島県	3.16	5
香川県	2.00	18
愛媛県	1.19	37
高知県	1.05	41

全国平均 **1.67**

届出数まとめ

- 多くの県で例年と同数から減少傾向
- 広島県，徳島県が増加傾向
- 10万人当たりの報告数では4県が全国平均以上

九州ブロック レジオネラレファレンスセンター報告

宮崎県衛生環境研究所

2022. 6. 30

1. 九州ブロックにおけるレジオネラ患者発生状況(年)

	2017	2018	2019	2020	2021
福岡県	46	55	79	56	60
佐賀県	3	10	9	2	9
長崎県	13	18	28	21	17
熊本県	24	29	46	45	44
大分県	17	18	14	14	14
宮崎県	9	7	8	9	13
鹿児島県	7	8	17	16	13
沖縄県	21	22	30	22	21
九州計	140	167	231	185	191
全国	1731	2142	2316	2058	2131

2. 令和3年度の活動状況

○レジオネラ属菌外部精度管理調査への参加協力依頼（九州ブロック：10 地研の参加）

令和2年度は枠が埋まらなかったが、昨年度は参加希望が多く、すぐに埋まった。

○免疫血清の配布

本県を除く 6 地衛研へ配布した。

1 1. 薬剤耐性菌

令和4年度 薬剤耐性菌レファレンスセンター会議報告

- 世話人 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 松井真理
- 開催日時 令和4年6月20日（木）13:00-14:00 @Zoom
- 参加者 各ブロック 薬剤耐性菌レファレンス担当施設

○議題

1. 令和4年度 薬剤耐性菌検査に関する研修計画案について

基本コース ⇒ Zoom Webinar/各施設実技 ハイブリッド2日間（実施時期 10月予定）

Webinar接続	時間	内容
Day1 9:30-13:00 (16:00-17:00)	9:30-	抗菌薬総論
	10:00-	薬剤耐性機構とβ-ラクタマーゼ
	11:00-	薬剤耐性菌検査法
	13:00-	各施設でディスク法実施（R1精度管理株*）、質問受付
	16:00-（希望者のみ）	復習・質疑応答
Day2 13:30-17:00	各施設で試験結果判定**、質問受付（11時頃まで）	
	13:30-	VREとMDRA
	14:30-	CRE病原体サーベイランス報告方法とデータ
	15:00-	判定方法&結果解説（R1精度管理株*）

*R1精度管理事業非参加施設には、事前に菌株分与

**各施設の試験結果確認のため、レファレンス担当施設で講師参加可能な方に協力を依頼

2. 陽性コントロールDNA等配布について

例年同様、12月～1月頃に希望施設宛に送付予定

（追加送付希望があれば感染研へ連絡、年度途中でも対応可）

3. 令和4年度 その他活動計画

CRE病原体サーベイランス

⇒ 2020年検体採取株の集計結果はIASR掲載準備中、2021年集計時期は改めて連絡する

4. その他要望、意見など

NGSを用いた薬剤耐性菌解析に関する手順書の作成配布の希望あり

参考資料 令和3年度 薬剤耐性菌検査に関する研修報告

図1. 今後の研修実施方法（令和3年度研修後の参加者アンケート、n=57）

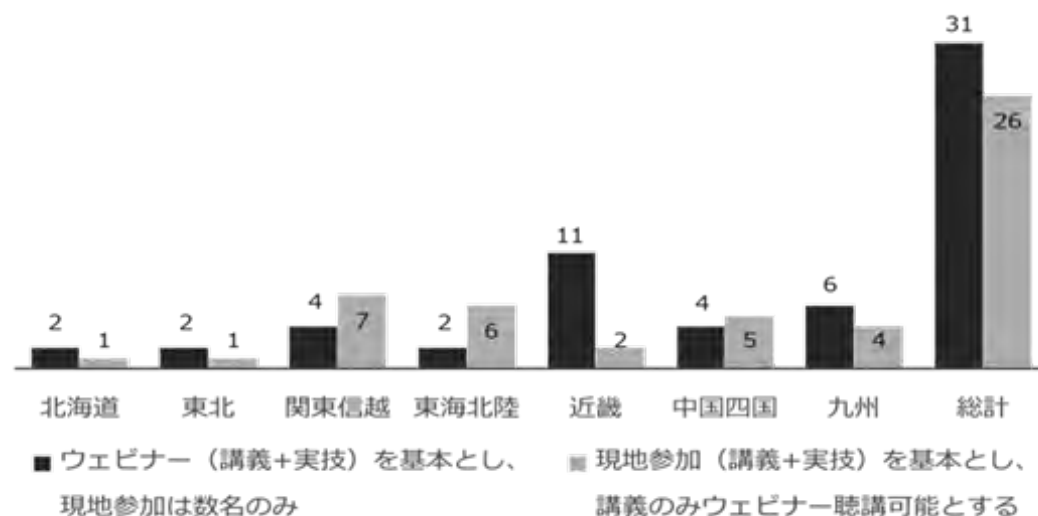


表1. 令和3年度研修準備スケジュール

時期	内容
5月～6月	研修計画立案、薬剤耐性菌レファレンスセンターからの意見募集
7月	研修参加希望調査
8月～9月	Web参加施設への菌株分与手続き
9月下旬	Web参加施設へ実技準備物品についてメール周知
9月下旬	Zoomウェビナー接続手順書作成、メール周知
10月13日	Zoomウェビナー接続テスト（希望施設のみ対象）
10月20日 10月21日	研修実施 研修後、アンケート実施

参考資料 令和3年度 薬剤耐性菌検査に関する研修報告

表2. 令和3年度研修当日スケジュール

1日目（10月20日）		
9:30-9:40	講義	あいさつ
9:40-10:10	講義	抗菌薬総論
10:10-11:00	講義	薬剤耐性機構とβ-ラクタマーゼ
11:00-12:00	講義	薬剤耐性菌検査法
12:00-13:00	昼食休憩	
13:00-13:30	講義	実技内容説明、検査手技動画を使ったデモンストレーション
13:30-16:00	実技	各施設で検査実施
16:00-17:00	講義	復習、質疑応答
2日目（10月21日）		
-11:00	実技	各施設で検査結果判定 報告書提出
11:00-11:30	-	理解度テスト実施、提出 (感染研・レファレンスセンター担当者は、参加施設の検査結果確認)
13:30-15:30	講義	検査結果解説、講評
15:30-16:00	講義	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）病原体サーベイランス
16:00-16:30	講義	バンコマイシン耐性腸球菌の疫学と検査
16:30-17:00	講義	薬剤耐性アシネトバクターの疫学と検査

令和3年度研修参加者

Web参加（講義/実技）	53名（43施設）
現地参加	2名（2施設）
講師	5名（4施設）
Web聴講（講義聴講のみ）	57名（30施設）

14. アデノウイルス

アデノウイルスレファレン スセンター 会議 <概要>

国立感染症研究所
感染症危機管理研究センター
アデノウイルスレファレンスセンター
世話人 花岡希

地区代表

(敬称略)

<北海道・東北・新潟地区>

青森県環境保健センター 小川 裕貴

新潟県保健環境科学研究所 渡部 香

<関東・甲・信・静地区>

東京都健康安全研究センター 長谷川 道弥

<東海・北陸地区>

福井県衛生環境研究センター 高橋 美帆

<近畿地区>

大阪健康安全基盤研究所 廣井 聡

<中国・四国地区>

広島市衛生研究所 藤井 慶樹 (代理出席 山木戸 聡)

<九州・沖縄地区>

熊本県保健環境科学研究所 八尋 俊輔

会議概要

<実施日>

2022年12月26日 14時～16時まで Zoom会議。

<参加者>

地区代表（議決権有）、国立感染症研究所関係者、地方衛生研究所等関係者（自由参加）。

<参加者数概要>

60を超える自治体から少なくとも80名以上が参加した。

<主要課題と会議概要>

・小児肝炎対応から得られた課題のまとめ：2022年初頭から欧米で発生した小児急性肝炎症例の集積にアデノウイルスF種の関与が示唆され、日本でも2022年4月～5月にかけて積極的な小児急性肝炎症例のアデノウイルス等のスクリーニング検査が各自治体に求められた

（<https://www.mhlw.go.jp/content/000934970.pdf>）。アデノウイルスレファレンスセンターを中心に、緊急のマニュアルアップデート（下痢症アデノ）と、地区内検査体制の確認や整備、陽性コントロールの配布などを行った。現在も対応は継続しており、これまでの対応や今後の課題も含めて、検討を実施した。

・咽頭結膜熱・流行性角結膜炎病原体検査マニュアル第4版採用の決定：新型コロナウイルス感染症の影響等で、ウイルス病原体検査の目的が単純な検出の有無だけではなく、遺伝学的背景の解析が同時に求められている。アデノウイルスも遺伝型での型別判別が重要となっているが、簡便かつ安価な完全長ゲノム解析法はまだ確立されていない。このような現状において、継続的なサーベイランスの実施に支障をきたさないように、NESID登録のために必要な型別情報の取得に関して、段階的かつ選択的に遺伝学的解析が可能なようにマニュアルを変更し、改定を行い、採用が決定された。

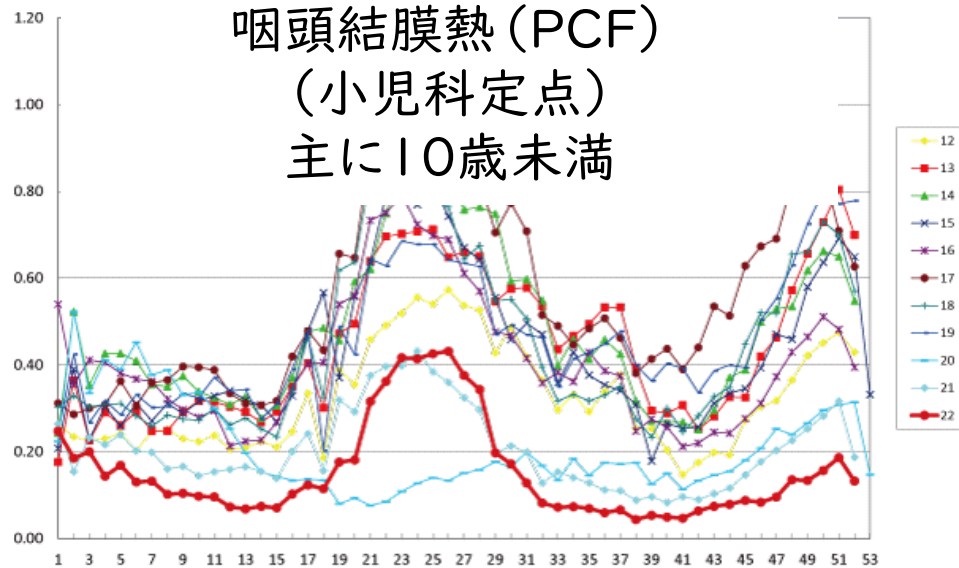
検討課題詳細（議事抜粋）

- 小児急性肝炎対応に関する疫学的まとめ報告（国立感染症研究所 実地疫学センター FETP 大竹正悟先生）
- アデノウイルス病原体探索の行政的課題と確認事項
- （アデノ）（ウイルス）の病原体探索に関連する連絡網の把握と共有
- 小児肝炎対応における各自治体での実態と調査結果の共有
- 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎病原体診断マニュアルの追加、改変、改定に関して。（議決）
- アデノウイルスの新型に対するレファレンスセンター対応（NESID対応など）
- Human mastadenovirus D type 8 Trim 株問題
- コロナ渦におけるアデノウイルス感染症発生動向の考察

次年度に向けた主な課題

- 各自治体におけるアデノウイルス検査担当者（連絡先等）の共有と確認、更新
- 新規マニュアルの公表と共有
- 新型アデノウイルス登録方法に関する検討の実施
- 標準株の整備等

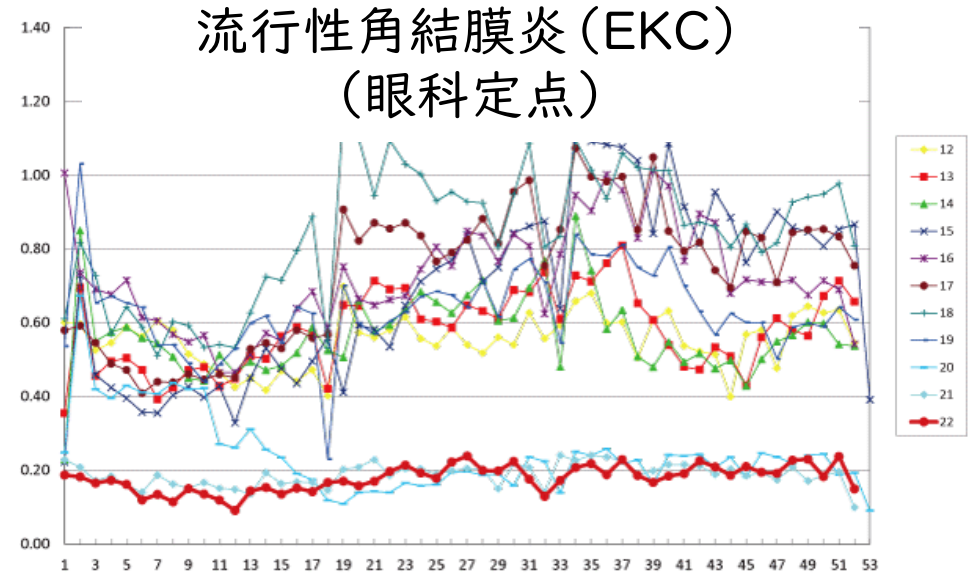
コロナ渦におけるアデノウイルス感染症発生動向の考察 (花岡2022)



IDWRより
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1645-02pcf.html>

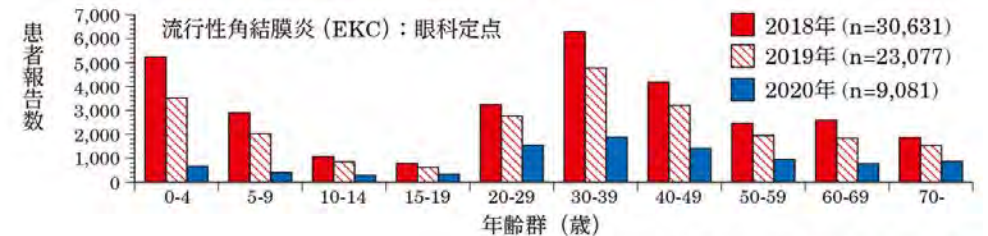
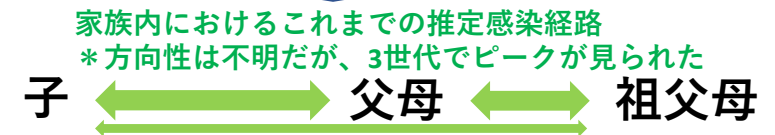
コロナ渦における行動制限解除の
 影響が大きく出ている(?)
 20年での大幅減少から
 21年、22年で大幅上昇

PCFでの小児感染状況の回復が、
 EKCでは見られないことから、EKCは親世代
 から子供世代への感染の方向性が示唆(?)



IDWRより、<https://www.niid.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1656-15ekc.html>

コロナ渦で、20年、21年、22年で大幅減少



(感染症発生動向調査: 2021年1月22日現在報告数)

PCF、EKC感染状況から推測される
 家族内における推定感染経路

IASR

コロナ渦での感染症発生動向から感染症の感染環の推測が可能

15. 大腸菌

腸管出血性大腸菌の現況について

伊豫田 淳, 李 謙一, 窪村亜希子, 泉谷 秀昌, 明田 幸宏

国立感染症研究所・細菌第一部



本日の発表内容

- EHECの現況
- EHECの陰性確認方法
- MLVA法（泉谷）
- 全ゲノム解析法（李）

表1. 腸管出血性大腸菌感染症届出数

診断年 (1/1~12/31)	届出数*	(うち有症者)	(%)
2011	3,939	(2,659)	(68)
2012	3,770	(2,363)	(63)
2013	4,045	(2,624)	(65)
2014	4,156	(2,839)	(68)
2015	3,568	(2,338)	(66)
2016	3,648	(2,247)	(62)
2017	3,904	(2,606)	(67)
2018	3,855	(2,584)	(67)
2019	3,745	(2,513)	(67)
2020	3,090	(1,985)	(64)
2021	3,236	(2,022)	(62)
2022**	177	(82)	(46)

平均届出数 : 3,848

→ 80.3%

→ 84.1%

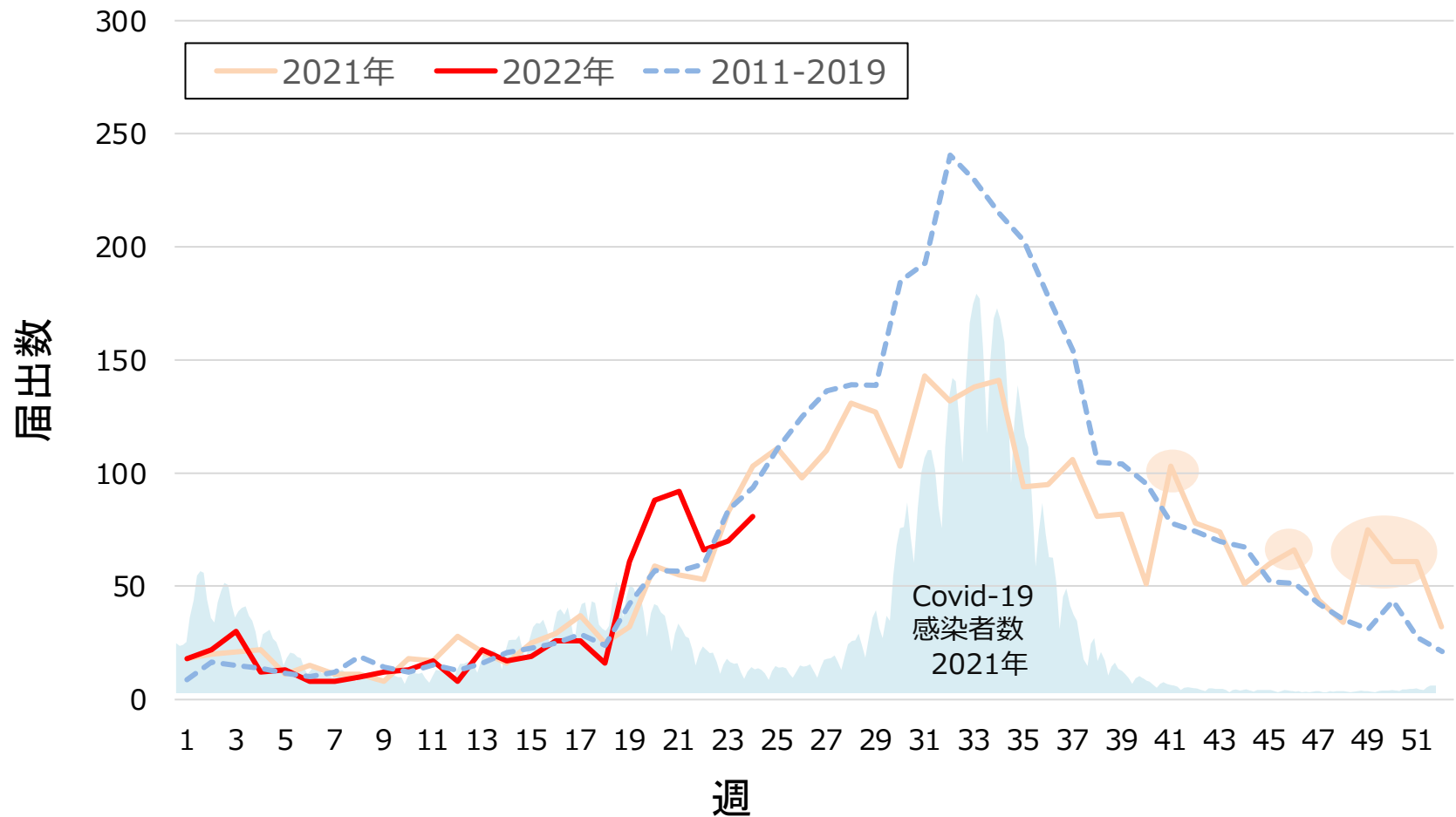
Covid-19 の
EHEC届出総数へ
の影響は限定的？

*無症状病原体保有者を含む

** 2022年のみ期間が1/1~4/1

(感染症発生動向調査：2022年4月1日現在届出数)

EHEC週別届出数 (2011-2022 24w)



感染症 サーベイランスシステム : National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) 集計データ

Covid-19感染者数データ (https://www3.nhk.or.jp/n-data/opendata/coronavirus/nhk_news_covid19_domestic_daily_data.csv)

表2. 腸管出血性大腸菌感染症集団発生事例, 2021年

No.	発生地	発生期間	推定感染経路	発生施設	血清型	毒素型	発症者数	摂取者数	菌陽性者数 ／被験者数	家庭内二次 感染者*	IASR 参照記事
1	前橋市	6 / 4 ~ 6 / 25	人→人または食品媒介	保育施設	O172:H25	VT2 VTNT	48	208	12 / 215	不明	本号5ページ
2	横浜市	5 / 22 ~ 6 / 18	人→人	保育施設	O111:H-	VT1	49	—	63 / 271	有 (18)	
3	奈良県	6 / 29 ~ 8 / 25	人→人	保育施設	O157:H7	VT1&2	20	—	20 / 230	有 (7)	
4	岩手県	8 / 28 ~ 9 / 10	人→人	保育施設	O157:H-	VT2	4	—	10 / 68	有 (5)	
5	福島県	12 / 13 ~ 2022 / 1 / 1	人→人	保育施設	O26:H11	VT1	15	—	13 / 68	有 (6)	
6	堺市	8 / 2 ~ 8 / 15	人→人	保育施設	O157:HNT	VT1&2	25	—	26 / 201	有 (8)	
7	滋賀県	6 / 26 ~ 7 / 4	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	2	5	2 / 2	不明	
8	滋賀県	7 / 1 ~ 7 / 2	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	2	6	4 / 4	不明	
9	滋賀県	6 / 28 ~ 7 / 8	食品媒介	飲食店	O157:H7	VT1&2	6	10	7 / 10	不明	
10	長崎県	12 / 8 ~ 12 / 20	人→人	保育施設	O157:H-	VT1&2	12	—	12 / 178	有 (5)	

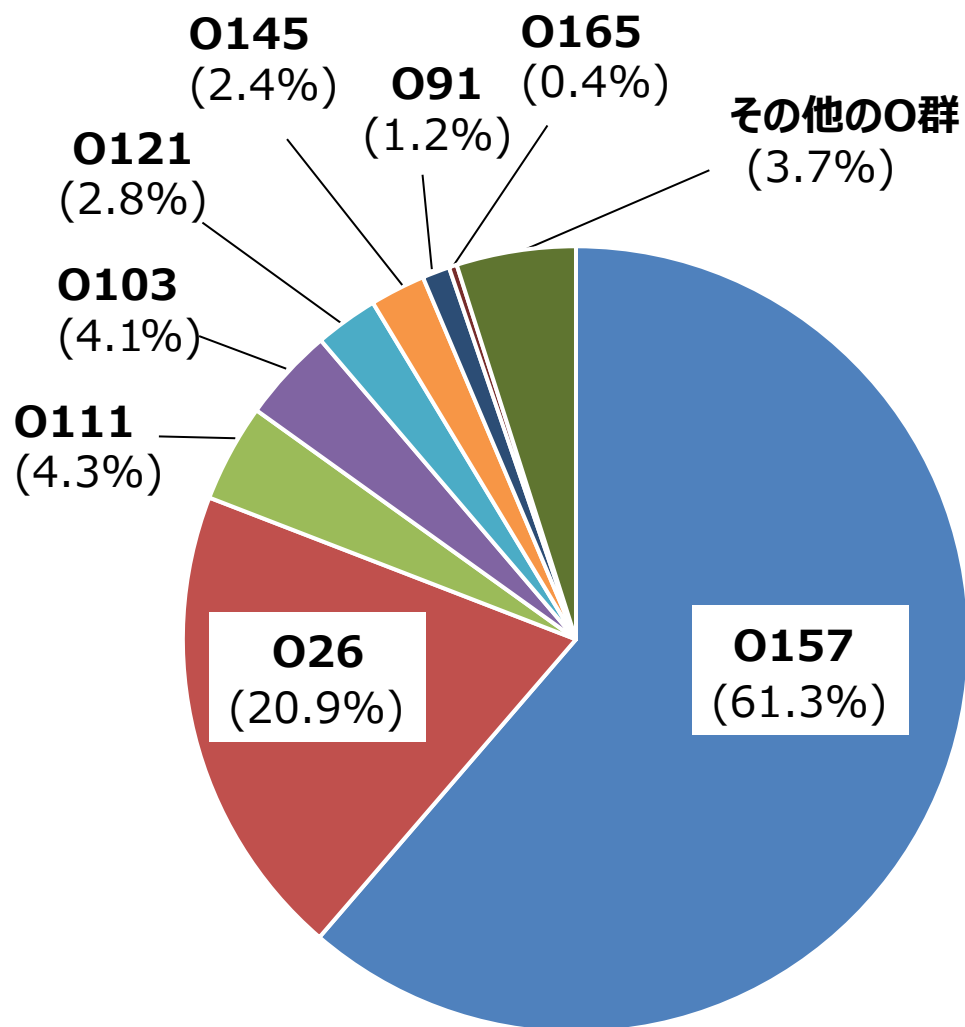
菌陽性者（無症状者を含む）10名以上の事例。 NT：Not typed、—：人→人伝播と推定されているので該当せず。 *（ ）内は二次感染者数
 地方衛生研究所からの「集団発生病原体票」および「病原体個票」速報（NESID病原体検出情報：2022年2月21日現在）と食中毒事件詳報およびIASR記事による

1) 夏期以外での集団発生事例

2) 分離される血清型の多様化 → 非定型なEHECによる集団発生

- O172:H25 による集団発生
- O156:H25 による散在的広域発生

ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2021)



$n=42,176$

分離株の多様化

O157, O26, O111, O103, O121, O145, O091, および O165 以外 (その他のO群) の分離率

2008 : 1.9% 8.5%



2013 : 4.5% 17.1%



2018 : 6.7% 19.6%

令和3-5年

厚労科研 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

「感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」
の改訂に資する研究

研究代表者：五十嵐 隆（国立成育医療センター）
世話人分担研究者：宮入烈（浜松医大）

分担研究者：伊豫田 淳
協力研究者：李 謙一
（感染研・細菌第一部）

感染症の病原体を保有していないことの確認方法について

1 腸管出血性大腸菌感染症

- ・ 患者については、24時間以上の間隔を置いた連続2回（抗菌剤を投与した場合は服薬中と服薬中止後48時間以上経過した時点での連続2回）の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。
- ・ 無症状病原体保有者については、1回の検便によって菌陰性が確認されれば、病原体を保有していないものと考えてよい。

2 コレラ及び細菌性赤痢

- ・ 患者については、抗菌剤の服薬中止後48時間以上経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。
- ・ 無症状病原体保有者については、無症状病原体保有確認後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回（抗菌薬を投与していた場合にあっては服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続2回）の検便によって、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。

3 腸チフス及びパラチフス

- ・ 患者については、発症後1ヶ月以上を経過していて、抗菌薬の服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回の検便において、いずれも病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。また、尿中に病原体が検出されている場合にあっては、前記の検便における病原体の陰性確認に加えて、検尿の結果も検便の場合と同様に病原体が検出されなかった場合において、病原体を保有していないものと考えてよい。
- ・ 無症状病原体保有者については、無症状病原体保有確認後1ヶ月以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回（抗菌薬を投与していた場合にあっては服薬中止後48時間以上を経過した後に24時間以上の間隔を置いた連続3回）の検便によって、病原体が検出されなければ、病原体を保有していないものと考えてよい。また、尿中に病原体が検出されている場合にあっては、前記の検便における病原体の陰性確認に加えて、検尿の結果も検便の場合と同様に病原体が検出されなかった場合において、病原体を保有していないものと考えてよい。

EHEC陰性化確認手法改訂に向けた研究課題

R3-4年度分担項目：

1) EHEC陰性化確認手法の改訂

「病原体の検出」を「菌分離」ではなく「PCR」による陰性化確認とする（を加えるか）？ 現在の確認期間を短縮出来るか？



- ・ 地方衛生研究所等への実施状況確認・まとめ
- ・ EHEC検査・診断マニュアル（感染研HPから入手可能）の改訂

2) EHEC陰性化確認のための細菌学的研究課題

- ・ 同一患者由来で同一血清型EHEC株のゲノム多様性
- ・ 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析手法の確立

EHEC陰性化確認法について (1)

意見聴取1 (2021年2-3月：4地衛研の担当者)

・PCRは既に導入済み

- 1) 増菌培養液のPCRで陰性の場合は陰性と判定している
- 2) 1) で陰性であってもプレート上の濃厚発育部位のスワイプPCRを実施
(プレート培養後のPCRの方が感度がよい場合もある)

→ 1-2日の短縮は可能

・PCRは大腸菌分離後のVT確認時のみ使用

- ・ 便中への排菌量は増減が激しい (1回の検査だけでは不十分)
- ・ 通知またはマニュアル化 (EHEC検査マニュアル [感染研HP掲載]) を希望
- ・ 保育所等の事例では48hインターバルで2回の陰性確認が必須 (現在のガイドライン)

EHEC陰性化確認法について（2）

地方衛生研究所からの意見聴取（最終まとめ）

2021年8-9月, 79施設, eメール：57施設から回答済み（2022年2月28日現在）

質問項目：

- 1) 分離途中段階でPCRによる確認を取り入れるべきか否か（培養法および分離株のPCR検査のみを実施する）？
- 2) PCRを取り入れるとした場合、どの段階（便から直接、増菌培養後、コロニースイープなど）でやるのがよい？
- 3) PCRの鋳型抽出法は、（アルカリ）ボイル法でよい、あるいはDNA精製を行ったものを使用すべき？
- 4) PCRはコンベンショナル（エンドポイント）でよい、リアルタイムPCRとする必要はあるか？
- 5) その他コメント（**抗菌剤を投与した場合は服薬中と服薬中止後48時間以上経過した時点での連続2回**となっているのは何故か？）
- 6) 各施設での陰性確認の方法

- 1) 分離途中段階でのPCRのみによる陰性確認の是非について
 - ・肯定（すでに実施、実施すべき、実施が望ましい、実施可能）：39施設
 - ・否定（すべきでない）：4施設（科学的データが必要、感染症法上の規定に反する、増菌後PCRで陰性でもEHECが分離されることがある、コロニースイープPCRを実施しているため、死菌を検出する）
- 2) 増菌培養後のPCRのみで陰性確認：4施設（その他：増菌培養後 and/or コロニースイープPCR）
- 3) アルカリボイル法：27施設
- 4) リアルタイム：13施設、コンベンショナル：18施設、どちらでもよい(選択可能として欲しい)：7施設
LAMP法：1施設
- 5) 理由は不明：他の3類感染症（コレラ、赤痢、チフス、パラA）との違いが不明（今後の課題）
- 6) 厚労省の指針またはEHEC検査・診断マニュアルに準じて実施している施設がほぼすべて（外注：1施設）

EHEC陰性確認手法の改訂案

現時点での改訂案

- ・ 検査時間短縮のためにPCR法による陰性確認法を実施可能とする。
(増菌培養後のPCR および/または コロニースイープPCR)

ただし、

- ・ 増菌培養に用いる培地について
評価は困難；感染研ではHUS患者便からのEHECの検出にはBPW, mEC（ノボビオシン添加），TSBを増菌培養液として使用（提案事項としてEHEC検査・診断マニュアルに記載）。
- ・ PCRの結果は陰性確認に限定する（PCR陽性の場合は分離確認が必要）。
- ・ O157, O26, O111等選択分離培地が有効なO群については培養法のみによる確認も可能とする。
- ・ リアルタイム/コンベンショナル, DNA調製法は各施設での選択とする。

その他の要望・問題点（同一のコメントが複数あったもの）

- ・PCRの場合、検査対象にもよるが、少なからず死菌の影響を受ける事もあるかと思うが？
- ・菌数が少ない場合や死菌が存在する場合にPCR陽性でも培養で陰性のケースが考えられるが、その際にどこまで培養を継続すべきか？
- ・抗菌剤を投与されなかった場合の陰性確認採便のタイミングを示してもらえると現場としては助かる。
- ・AMR対策により、有症者の中でも軽症者に対しては抗菌剤を投与されない。有症者の場合、抗菌剤が投与されていない場合でも、2回陰性確認をしているところですが、なかなか陰性化しないことが多く、陰性確認検査が数週間と長引くことがあります。「抗菌剤を使用しない場合には発症後〇日後を目途に検査」等を明記していただくとありがたい。

- MLVA法（泉谷）

EHEC MLVAについて

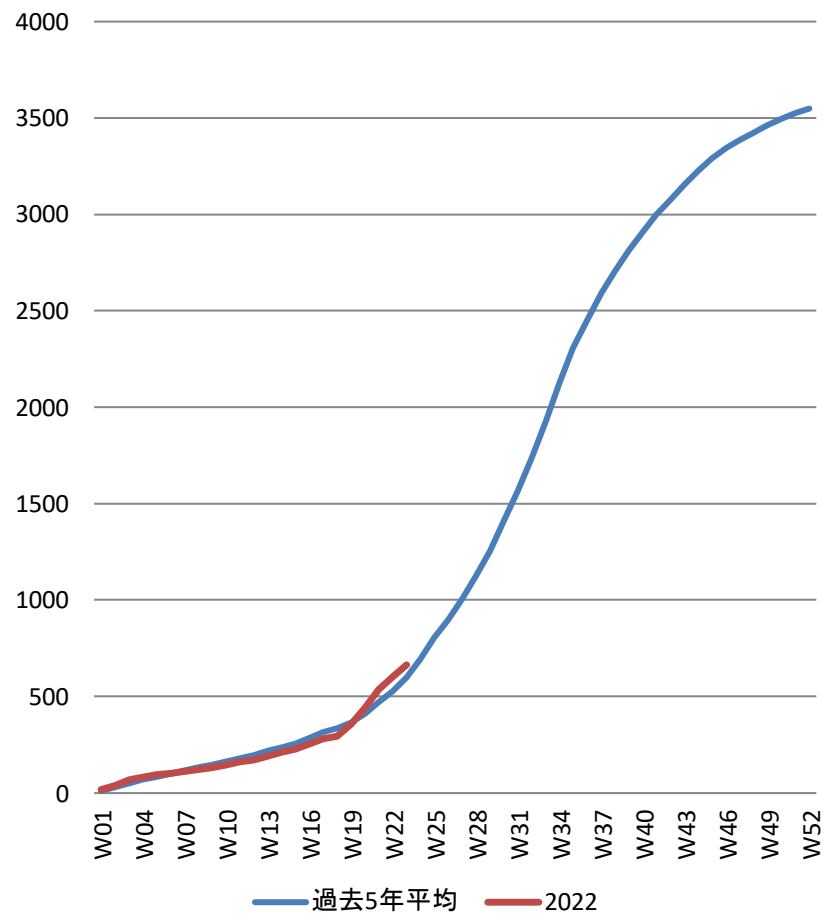
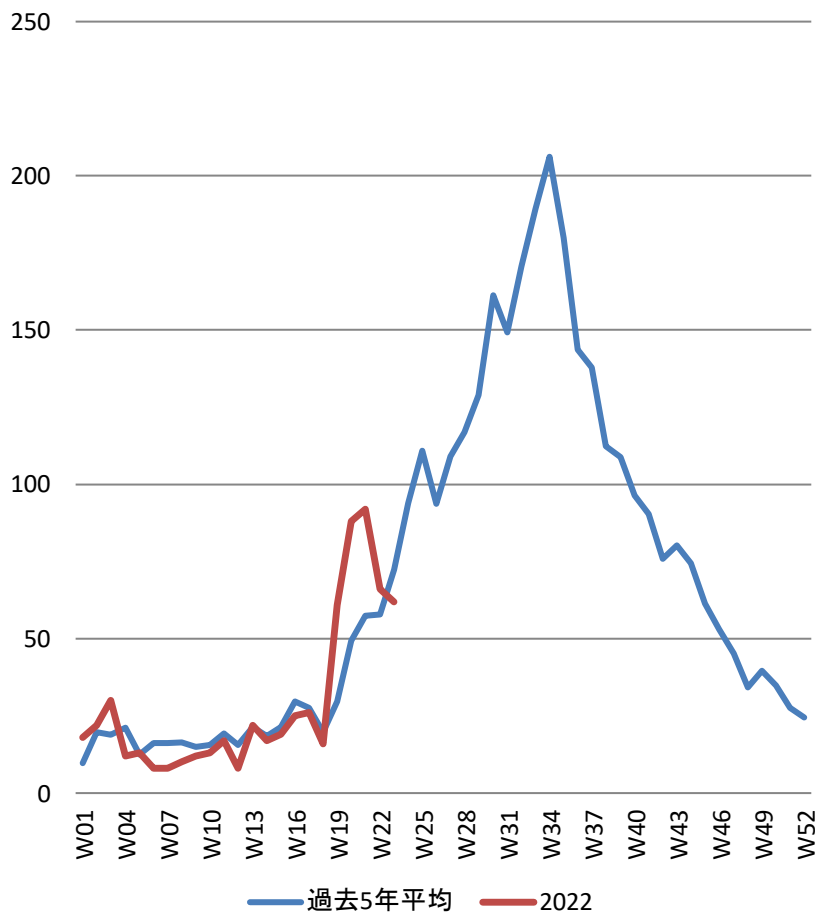
衛生微生物技術協議会第42回研究会

一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

2022年EHEC感染症発生状況



(NESID)

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学解析手法

1996

PFGE

- la,l,l
(RAPD)
(AEI P)

2004

PFGE

(Pulsenet
protocol)

2012

IS-PS

- O157
- 32箇所の
IS
- +4種類の病
原性遺伝子

2014

MLVA17

- O157
- O26
- O111

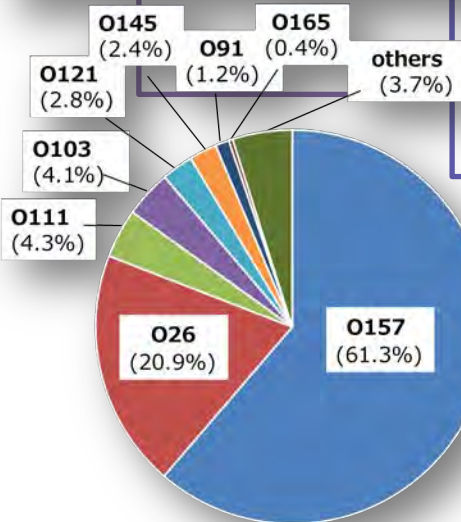
統一手法

(2017:追加5血清群)

2018事務連絡

ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2020)

N#858など



n=40,066

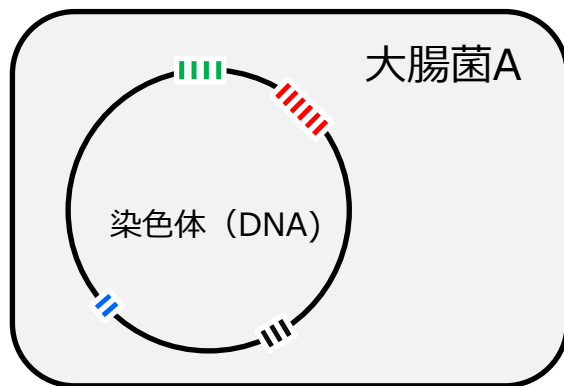
腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について(平成30年6月29日)

- 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O157, O26, O111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。
- 別紙 1. 概要
- 腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒の調査について、事案の早期探知、関係部門間の連携及び情報の共有等を目的として新たに、疫学情報に感染症サーベイランスシステムにて付与された番号(以下「NESID ID」という。)を付して管理するとともに反復配列多型解析法(Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis 以下「MLVA 法」という。)による解析結果を一覧化して共有を行うこととするため、その取り扱いについて定める。また併せて、国、都道府県等関係機関1の連携・協力体制を確保するため、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情報の共有手順等について定める。

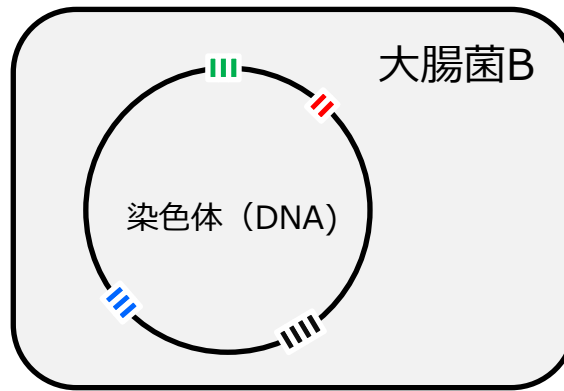
MLVAについて

原理

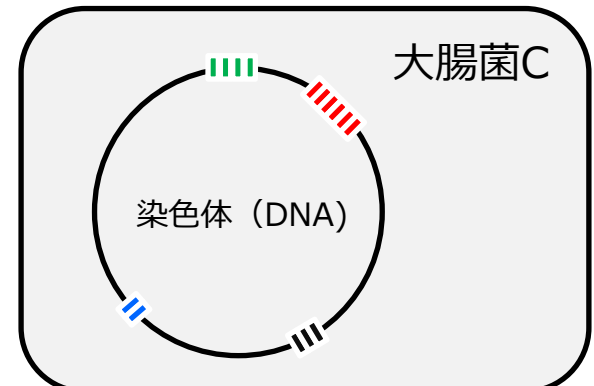
大腸菌の染色体上に存在する複数箇所（緑－赤－黒－青）の反復配列領域を解析してそれぞれの繰り返し回数を数える。



緑 4－赤 6－黒 3－青 2



緑 3－赤 2－黒 4－青 3

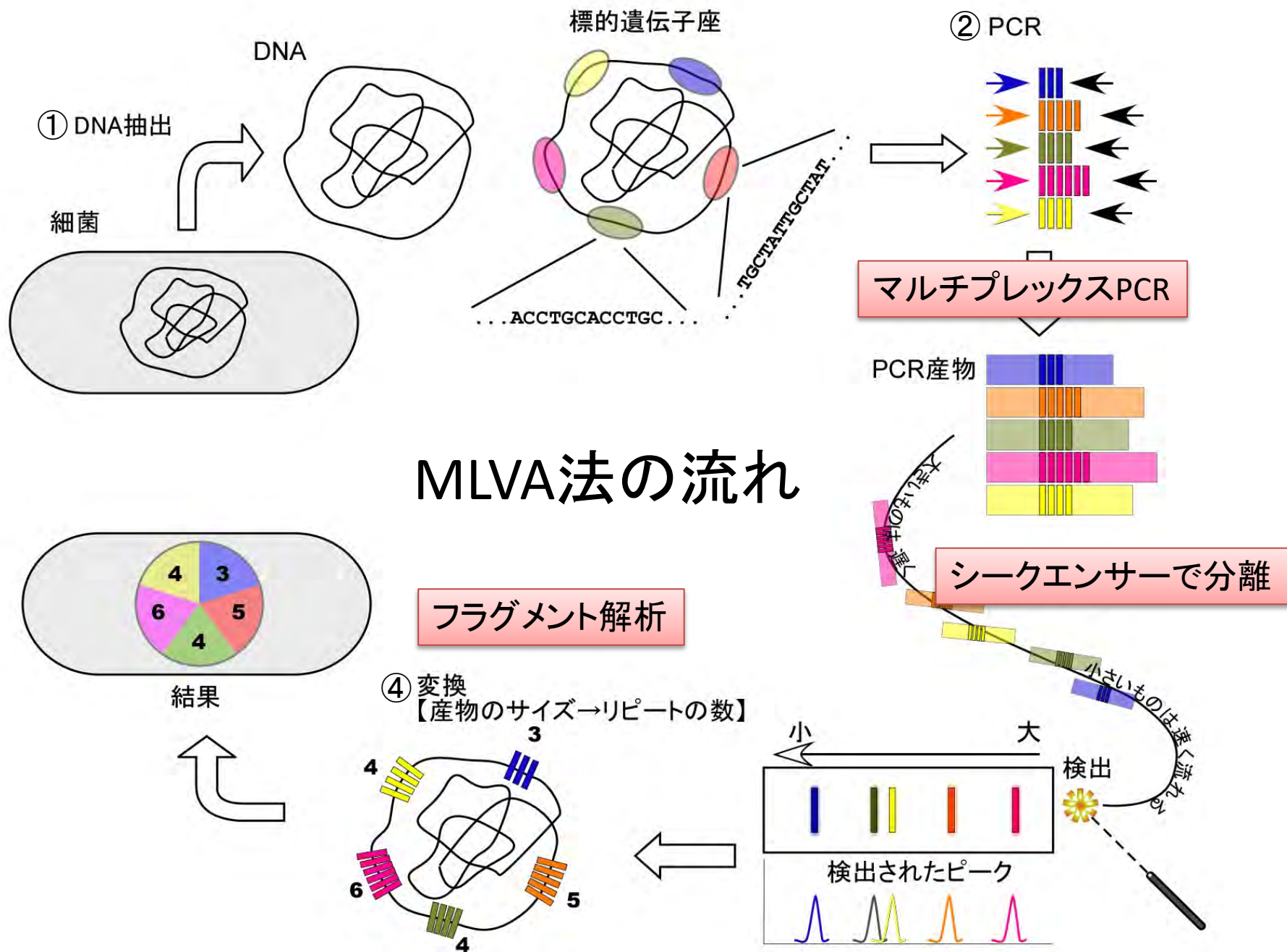


緑 4－赤 6－黒 3－青 2

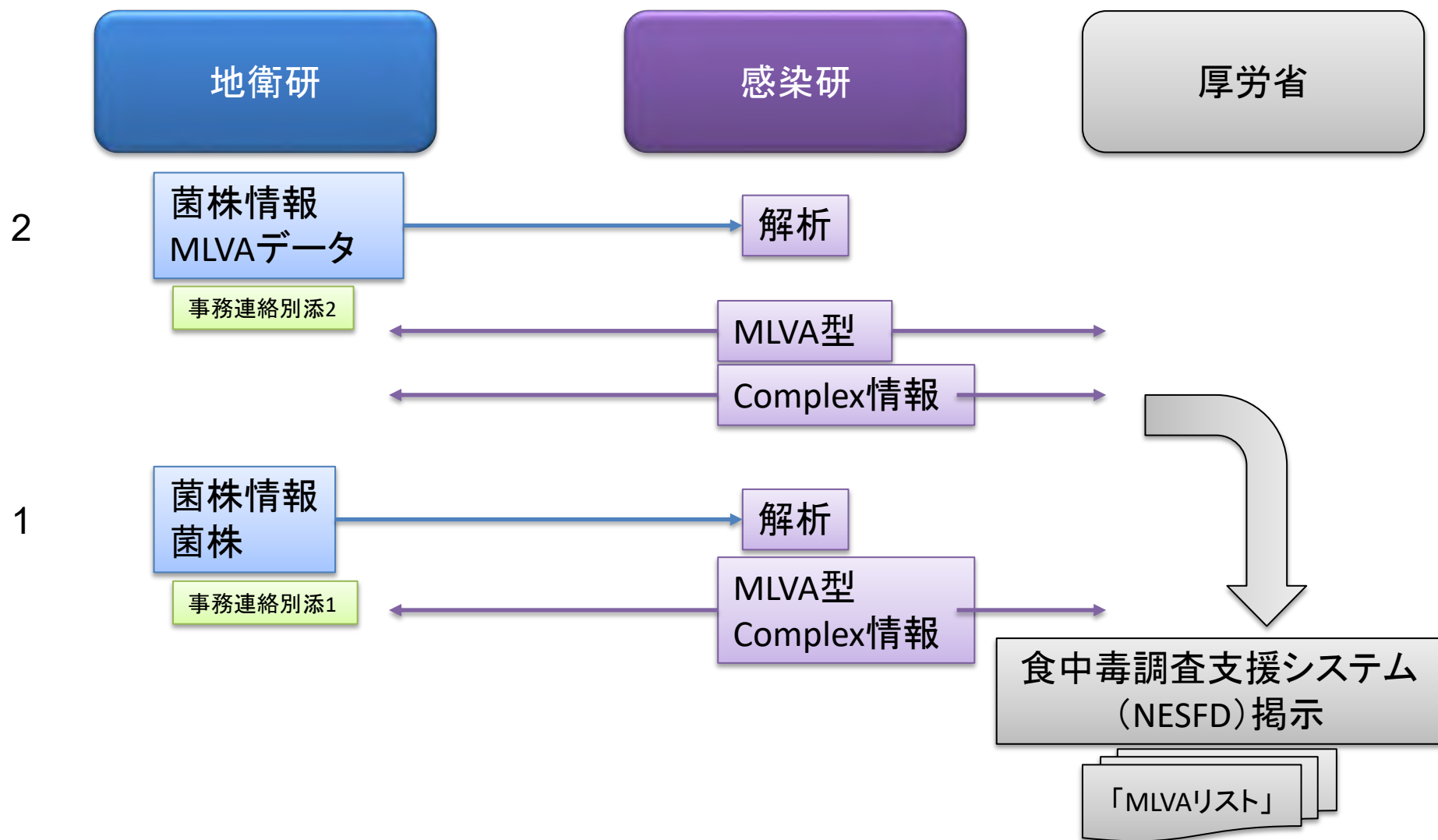
実際のデータ

MLVA型 19m0487	遺伝子座	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH111-8	EH157-12
	リピート数	9	8	4	11	-2	15	5	1	7
	遺伝子座	EH111-14	EH111-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	
	リピート数	-2	2	4	4	7	-2	9	-2	

(-2: 増幅産物なし)



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)



別添1

別添1: 2_1.xlsx - Excel

別添1 (菌株送付) | 別添2 (MLVA結果送付) | 別添3 (厚労省→NESID)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
発症日	分離日 (不明の場合は診断日)	地研菌株	疫学情報 (散発・集発)	症状	O:H	感染研O:H	VT1	VT2	測定法	MLVAtyp	MLVAcon	PFGEコ	入手先	NESID#	自治体名	
2018/4/1	2018/4/7	nnnn1			O157:H7		-	+	P,R,I				yy衛生研究所		A都	
2018/4/1	2018/4/7	nnnn2			O157:H7		-	+	P,R,I				yy衛生研究所		B県	
2018/4/1	2018/4/7	OS1			O157:H7		+	+	P				zz衛生研究所		C市	

※灰色セルは、感染研入力データ

別添2

増幅なしは
「-2」

備考欄:ダブルピークの情報など

MLVA型付与について

導入時

- 送付済み菌株のMLVAデータ送付
- 感染研→地研

導入後

- 菌株とMLVAデータの送付（地研→感染研）
- 精度確認（答え合わせ）（感染研→地研）

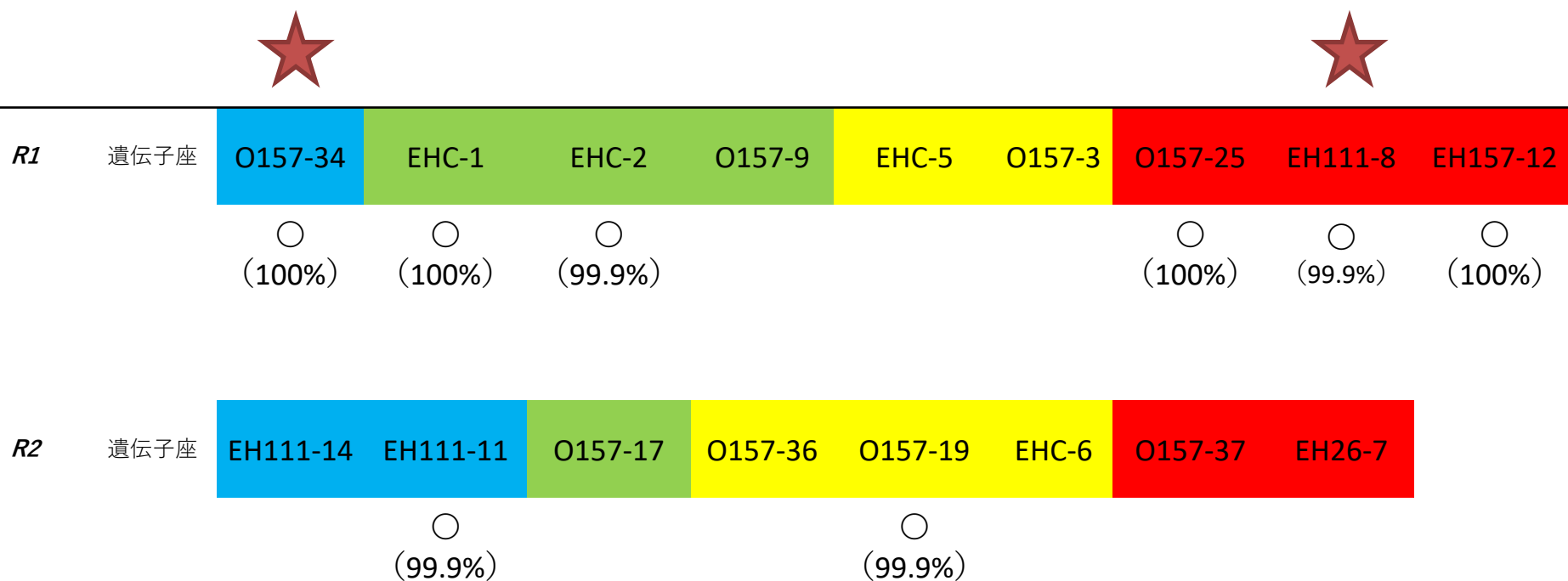
感染研側からも地研側からもデータのやり取りに問題がないと判断

型名付与

- MLVAデータの送付（地研→感染研）

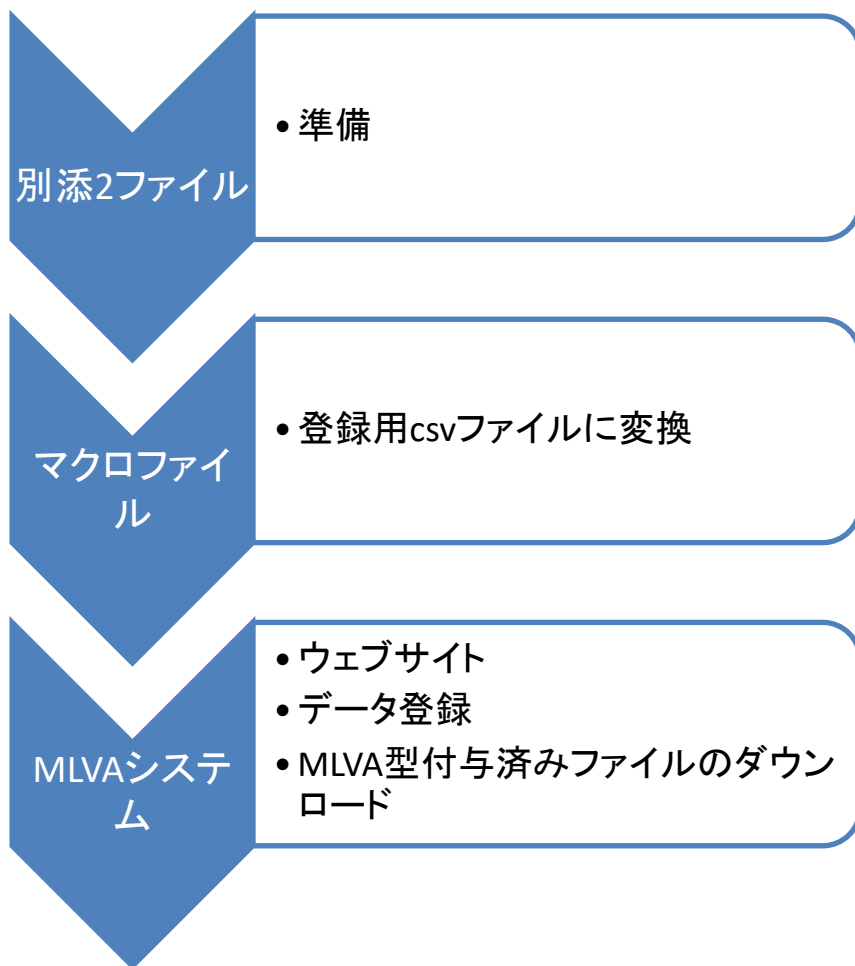
定期的に菌株を送付（地研→感染研）して精度確認（感染研→地研）

O157、O26、O111においてピークの出現頻度が 99%以上(2017-2020年株)の遺伝子座



データ送付前に最低限チェックしていただきたい箇所

MLVAシステムについて



- オンライン上でMLVA型が付与されるシステム
- 利用前提
 - 結果が安定している
 - リアルタイムにMLVAを実施
 - マクロファイルが使用可能
 - 使用できない場合には、各機関のIT担当部署に相談してください



利用条件を満たしていると判断された場合には、ご連絡いたします。

精度確認 (答え合わせ)

- メールベース、システム経由にかかわらず、定期的に菌株を送付し、精度確認を実施してください。
 - シーズンオフ中
 - 担当が変わった際

お知らせ

- 7月以後は2022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。

- ・ 全ゲノム解析法（李）

衛生微生物技術協議会 第42回研究会
EHECリファレンス委員会
全ゲノム解析関係

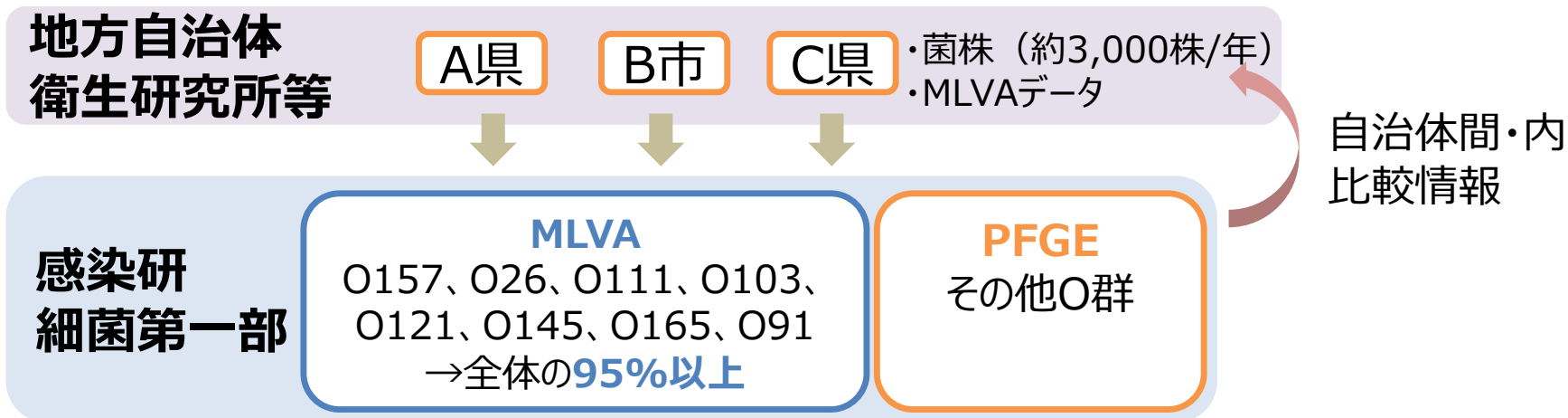
2022-06-30



国立感染症研究所・細菌第一部

李 謙一

EHECの全国サーベイランス



全ゲノム配列(whole-genome sequencing: WGS)解析による
精度の高いサーベイランスのために・・・

・解析パイプラインの構築・評価 ・ゲノム情報データベース化 ・従来法との比較

PFGEとWGSの比較
O121 広域散発事例
(Lee et al. Front. Microbiol. 2017)

MLVAとWGSの比較
類似MLVA型 O157
(Lee et al. Appl. Environ. Microbiol. 2019)

WGSを用いた
サーベイランス
(試行的)

WGSを用いたサーベイランス：対象菌株・目的

2012～'21年のEHEC菌株数

Year	全株	MLV対象 O群の型数（同一MLVA型は含まない）									PFGE対象 O群
		O157	O26	O111	O12 1	O103	O145	O16 5	O91	計	
2012	2,840	17	1	0	0	0	0	0	0	18	2,818
2013	3,350	695	216	47	0	0	0	0	0	958	1,293
2014	2,786	646	213	45	0	0	0	0	0	903	237
2015	3,187	573	234	51	0	2	0	0	0	860	870
2016	2,679	586	221	44	28	48	16	8	21	972	28
2017	3,362	597	246	52	33	46	19	8	30	1,031	595
2018	2,972	679	231	55	46	53	27	4	30	1,105	186
2019	2,896	524	163	59	35	55	21	4	25	886	791
2020	2,271	521	170	58	28	58	18	4	30	887	263
2021	2,119	476	145	64	19	46	9	4	29	792	317

一部株を
WGS

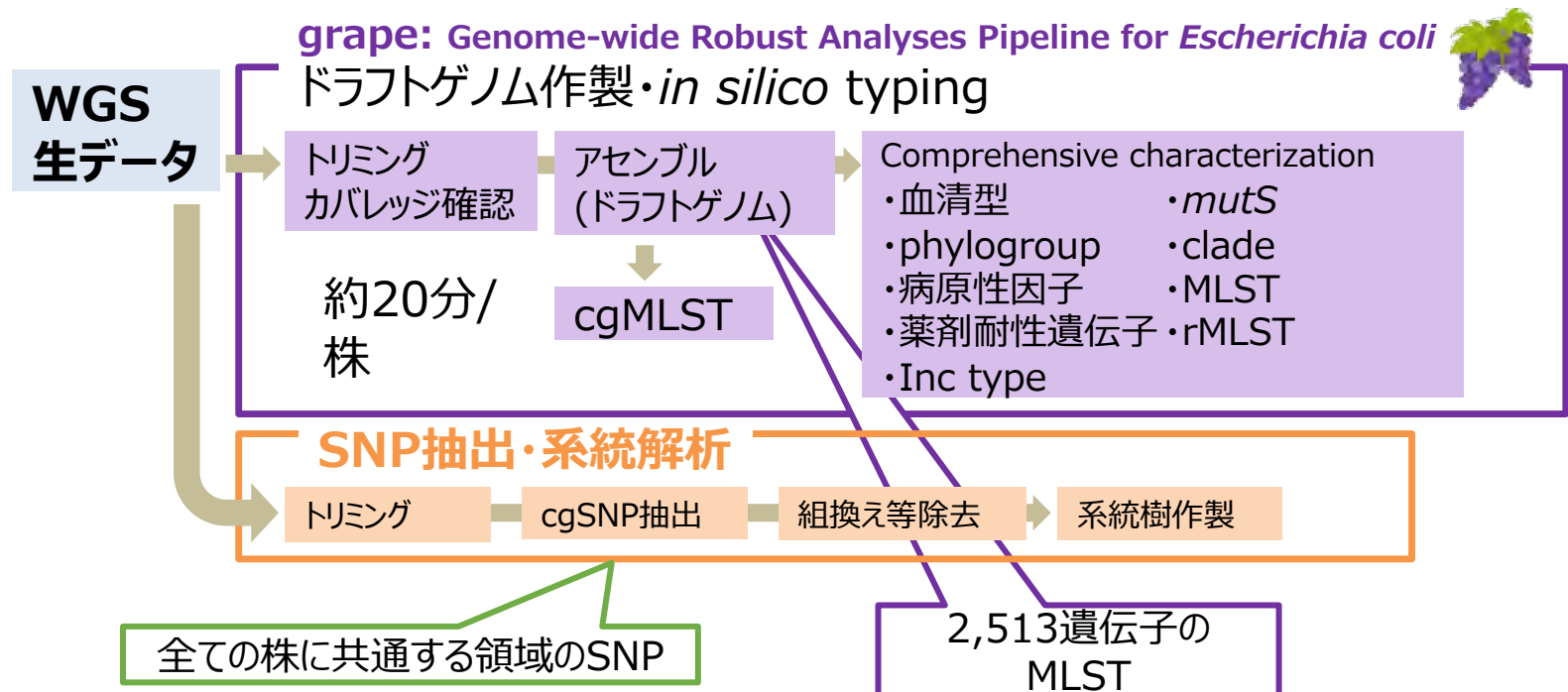
全株のWGS
*同一MLVA型
を除く

目的

- ・従来法（MLVA等）の評価
- ・より精度の高いクラスター検出（集団感染/散発株の関連性）
- ・長期的な流行系統の検出

WGS解析パイプライン

ほぼ自動で基本的な解析（血清型、保有遺伝子、系統樹）ができる体制を構築



WGSデータベース化と迅速解析法の確立



集団感染株の
WGS

**cgMLST
データベース**
=大規模解析向き

国内EHEC
約8,000株

公共データベース
(主に海外株)
約20万件

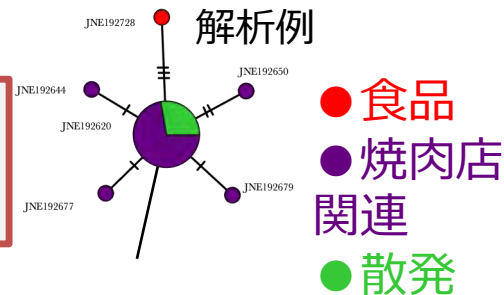
・国内EHECのcgMLST・
cgSNPのデータベース化

**cgSNP
データベース**
=詳細解析向き

国内EHEC
約8,000株

・新たなゲノム情報が得られた
際に、迅速にデータベースから
近縁株を抽出する手法を確立

国内・海外株データベースから
迅速に（4日～）
最も近縁な株を抽出



その他国内・海外株とは40SNP以上異なる

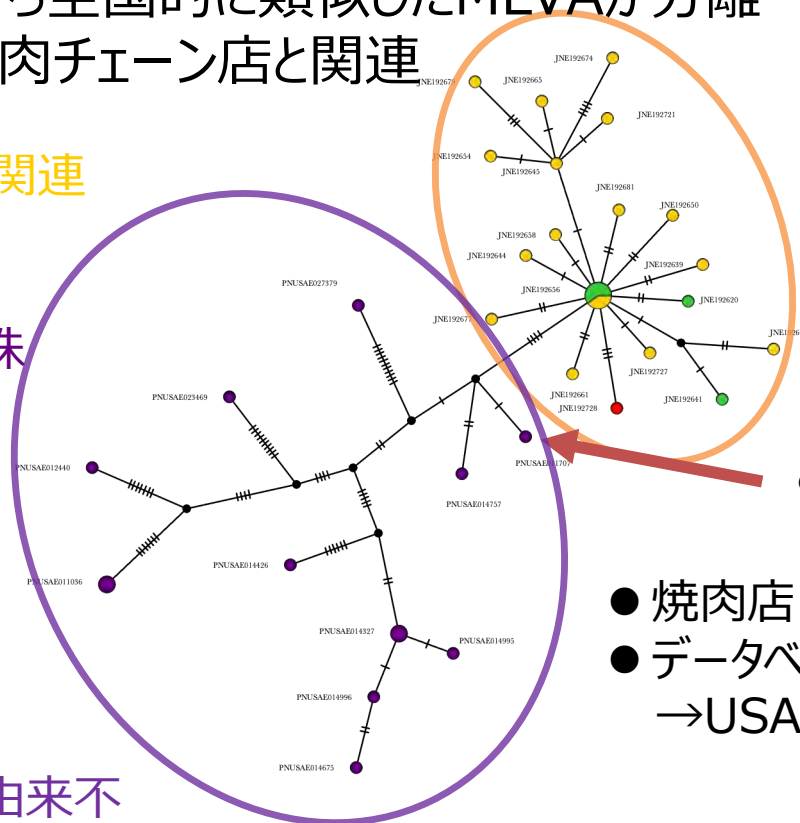
2019年焼肉店食中毒と海外株

【背景】

- 2019年11月から全国的に類似したMLVAが分離（19c058）
- 一部の株は、焼肉チェーン店と関連

- 焼肉店関連
- 食品
- 散発
- アメリカ株

USA
いずれも由来不明



日本19c058

- 焼肉店関連
- 散発例

→8SNP以内

由来不明USA株
と最小で5SNP

- 焼肉店・散発株は同一クローン
- データベース株との比較
→USA株と近縁

お願い①：動物由来STECのWGS

技術的には原因となる
農場・動物まで
さかのぼることが可能

↓
原因動物・農場が
分かれば、
**原因となる食品・伝播
経路**が分かる可能性



動物由来株の収集

↓
WGS・ヒト由来株との比
較

※結果は分与元で発表い
ただいて差し支えありません

協力いただける方は
感染研・細菌第一部
李 謙一 まで
leek@niid.go.jp

お願い②：EHEC患者のメタゲノム解析

研究費：文部科研（基盤C）2021-2024年

“メタゲノム解析による腸管出血性大腸菌の病態解明および高精度診断法の確立”

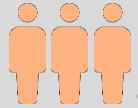
目的: 主にメタゲノム解析を用いて…

- ・EHEC/HUS事例に特異的な菌叢を特定する
- ・迅速・高精度なHUS診断法の確立

伊豫田さん・HUS
診断依頼検体の利用

1. 集団感染事例の解析

有症状者



無症状



比較



2. HUS事例の解析

- 2.1. 重症例菌叢の解明・原因特定
- 2.2. 小型シーケンサーによる迅速診断法の確立

3. 腸内細菌がEHECへ与える影響の検証

地方衛研から集団感染時の検体を収集

期待される成果:

- ・プレ/プロバイオティクス等EHEC制御法につながる知見
- ・EHEC、HUS診断の高精度化

協力いただける方は
感染研・細菌第一部
李 謙一 まで
leek@niid.go.jp

16. 百日咳・ボツリヌス

百日咳レファレンスセンター

- 1.活動報告と計画
- 2.百日咳菌の抗原検査
- 3.マクロライド耐性菌の検出状況

国立感染症研究所 細菌第二部 第一室

小出健太郎、後藤雅貴、大塚菜緒、蒲地一成

TEL: 042-848-7101（直通）

1. 活動報告と計画

百日咳レファレンスセンター



令和3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	0
マクロライド耐性菌遺伝子検出キット	0	0
計	0	0

- 百日咳に関する情報還元

1. 病原微生物検出情報（IASR）百日咳特集号 IASR Vol. 42. No.6, 2021年

2. 論文発表

- Wakimoto et al. The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection. Open Forum Infect Dis. 2022 Feb 7;9(3):ofac020.

令和4年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

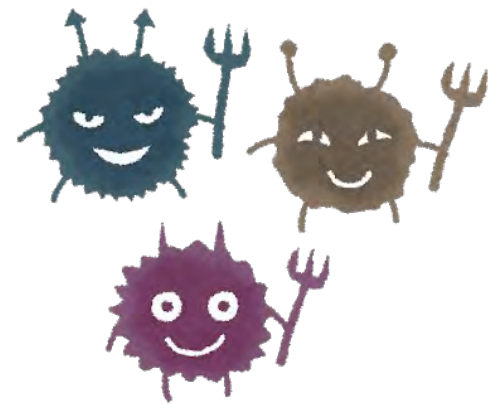
- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

今年度からマクロライド耐性菌遺伝子検出キットをレファレンスセンター以外の地研にも配布します。



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



2. 百日咳の抗原検査

リボテスト百日咳

2021年に抗原検査キット（イムノクロマト法）が新規承認され、新たに届出基準に追加された



（４） 届出のために必要な検査所見

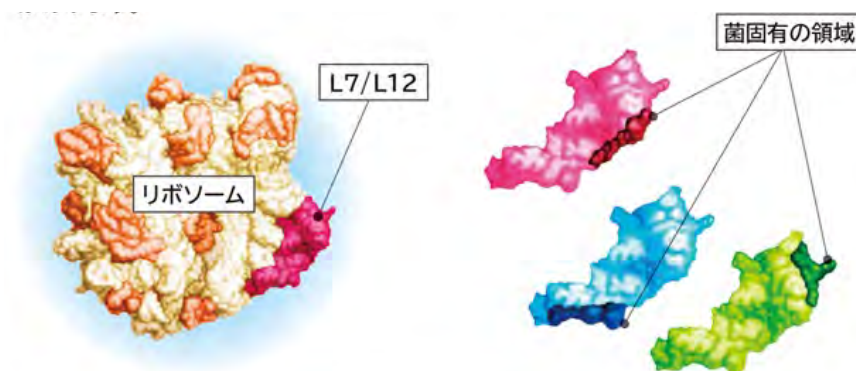
検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体
核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出 （PCR法・LAMP法・その他）	
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	鼻咽頭拭い液
抗体の検出 （ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値）	血清

*Bordetella hinzii*への交差反応が報告されたため、百日咳類縁菌6菌種に対する交差反応性を評価した（感染症疫学センター，厚労省）

リボテスト百日咳のBordetella属細菌に対する交差反応性

Bordetella species	Strain	Origin	CFU/10 μ L/assay			
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama	Human (vaccine strain)	+	+	–	–
	BP617	Human (clinical isolate)	+	+	–	–
<i>Bordetella parapertussis</i>	ATCC15311	Human (type strain)	+	+	–	–
<i>Bordetella holmesii</i>	ATCC51541	Human (type strain)	+	+	–	–
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	BB1	Human (clinical isolate)	+	+	–	–
<i>Bordetella trematum</i>	BT1	Human (clinical isolate)	+	+	+*	–
<i>Bordetella hinzii</i>	ATCC51730	Chicken (type strain)	+	+	–	–
<i>Bordetella avium</i>	ATCC35086	Turkey (type strain)	+	+	–	–

* Positive for two independent tests



百日咳菌と同じ感度で百日咳類縁菌を検出した

百日咳菌東浜株の培養日数とリボテスト百日咳の検出感度

培養日数	生菌率 (%)	CFU/10 μ L/assay					
		10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	<0.1
1 d	10.2-12.6	+	+	−	−		
3 d	1.6-5.6		+	+	−	−	
6 d	<0.01						+

- 供試菌の培養日数により検出感度が大きく変動した
生菌の最小検出感度： $10^5 \sim <0.1$ CFU/assay
- 生菌と同等な感度で死菌を検出した
菌数の最小検出感度： 10^6 cells/assay



百日咳抗原検査は死菌体も検出できる可能性が指摘された

まとめ

- リボテスト百日咳は百日咳菌と同じ感度で百日咳類縁菌を検出する
- 本法による検査診断では百日咳菌と百日咳類縁菌の感染を鑑別できない

図3. 年齢・予防接種歴別百日咳症例届出数* 2018年第1週～2020年第53週 (n=29,833)
(感染症発生動向調査: 2021年1月8日現在届出数)

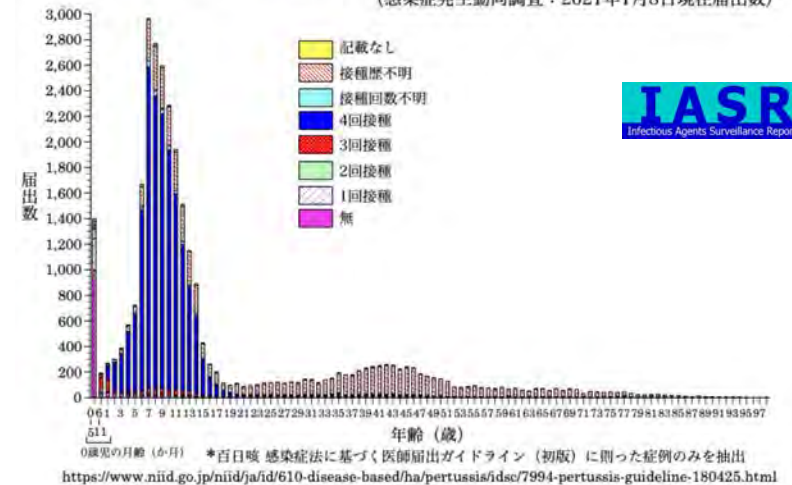
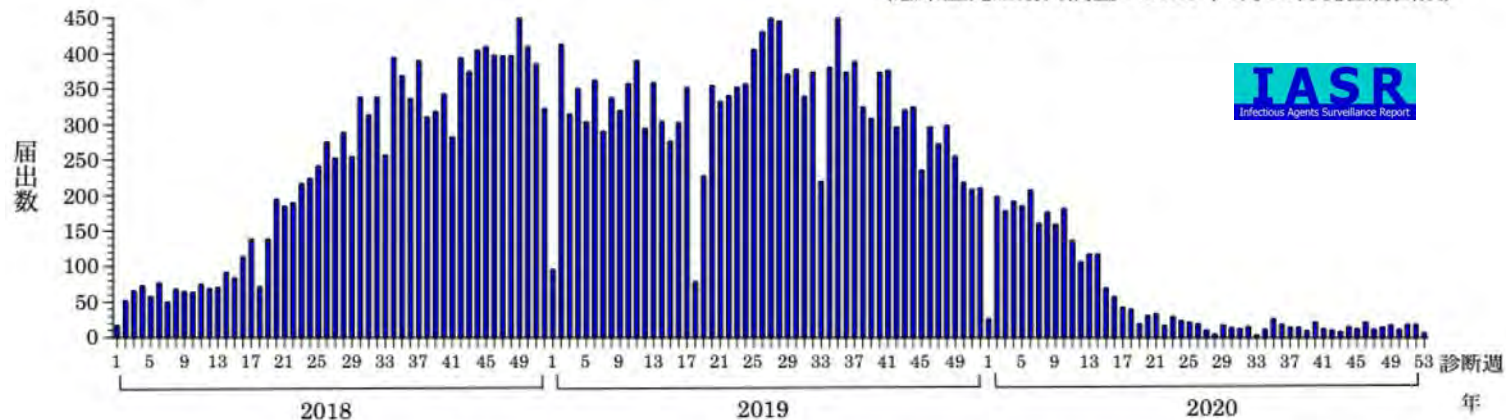


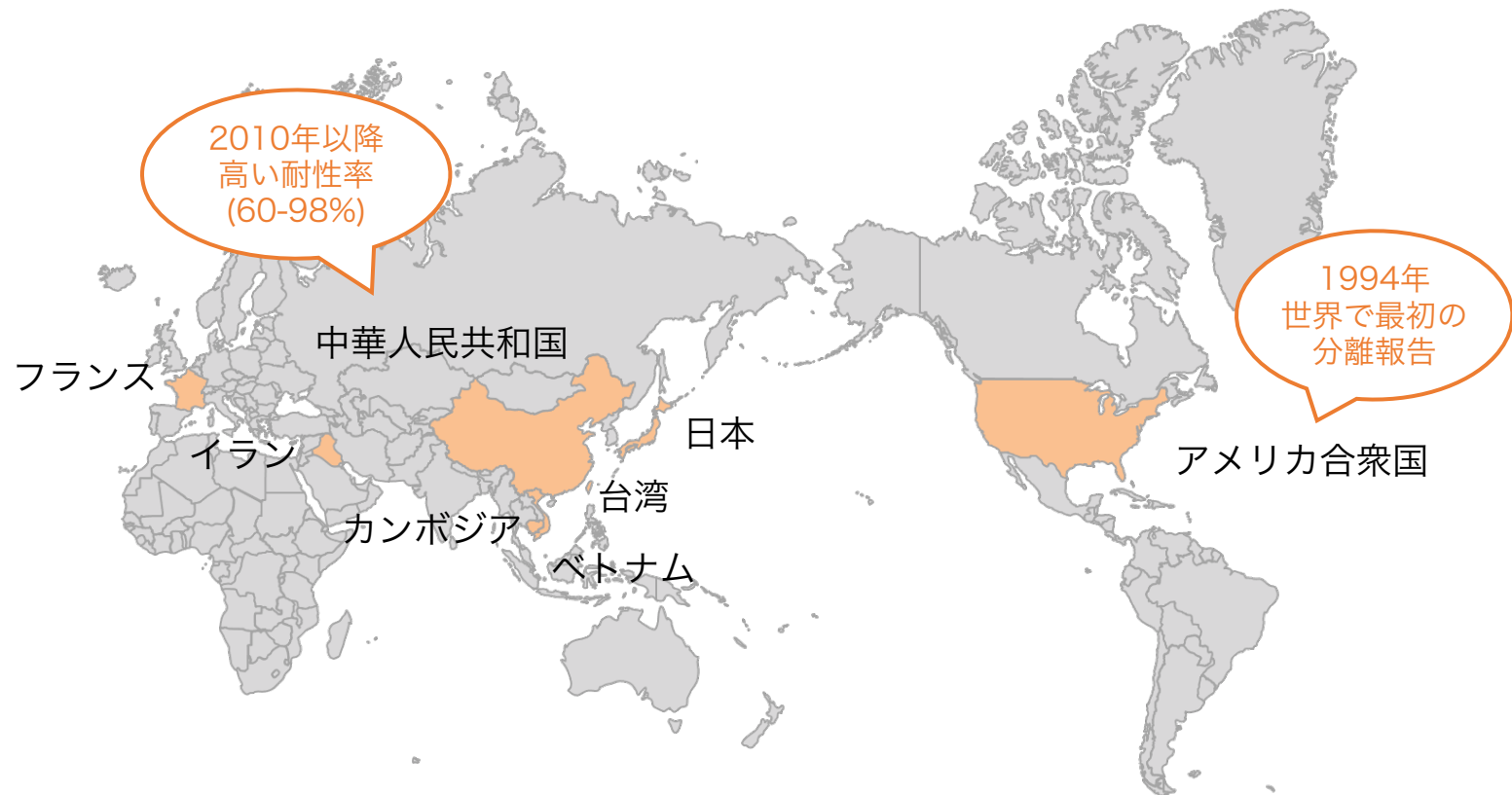
図1. 診断週別百日咳患者届出数, 2018年第1週～2020年第53週 (n=31,909)
(感染症発生動向調査: 2021年4月13日現在届出数)



3. マクロライド耐性菌の検出状況

マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) とは？

- 百日咳の治療薬であるマクロライド系抗菌薬（エリスロマイシンやアジスロマイシンなど）に対して耐性を示す百日咳菌
- 治療薬が効かないことで重症化や治療期間の延長等につながるため、耐性菌の出現は公衆衛生上重要な問題のひとつ



マクロライド耐性百日咳菌の出現が報告されている国や地域

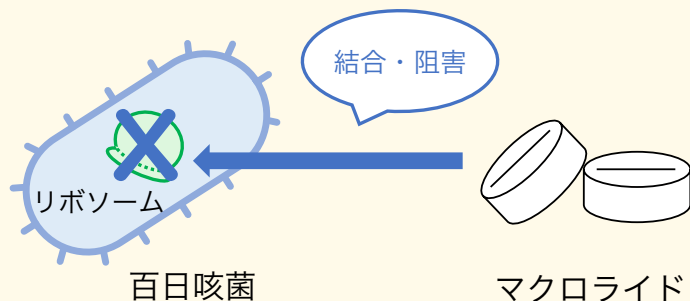
マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) の特徴

① A2047G変異

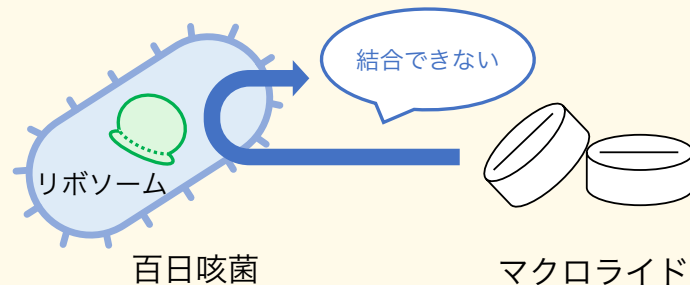
リボソームを構成する23S rRNA配列の2047番目の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)に置換することで耐性化

* 検出キットの標的

マクロライド感受性百日咳菌 (MSBP)

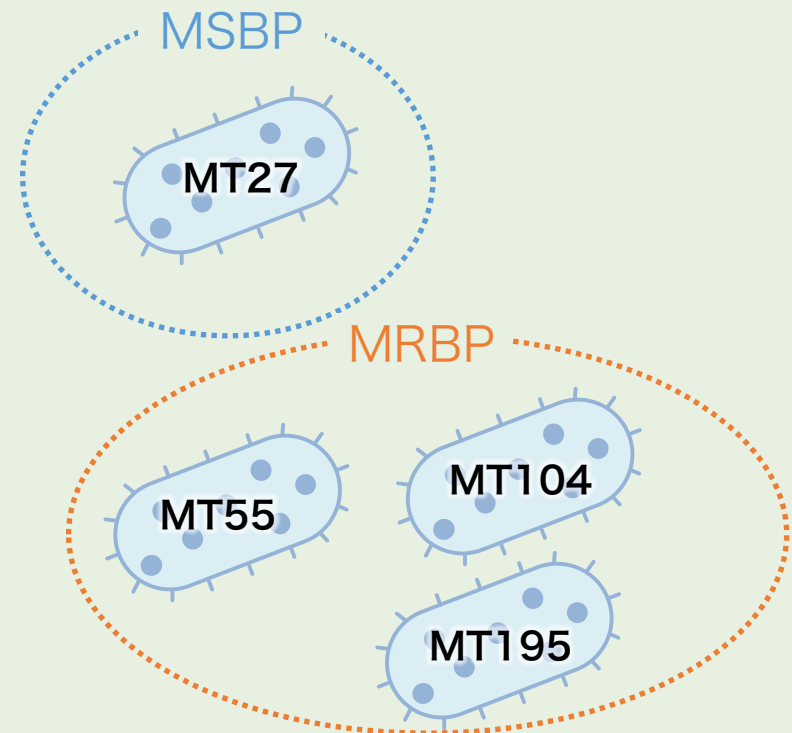


マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP)



② 3つのMLVAタイプ

MLVA法(菌株が同じか違うかを遺伝子レベルで調べる分子疫学解析手法) によって、3つのMLVAタイプがMRBPから高頻度で見つかっている



感受性菌、耐性菌で多いMLVAタイプ

日本国内で分離されたマクロライド耐性百日咳菌

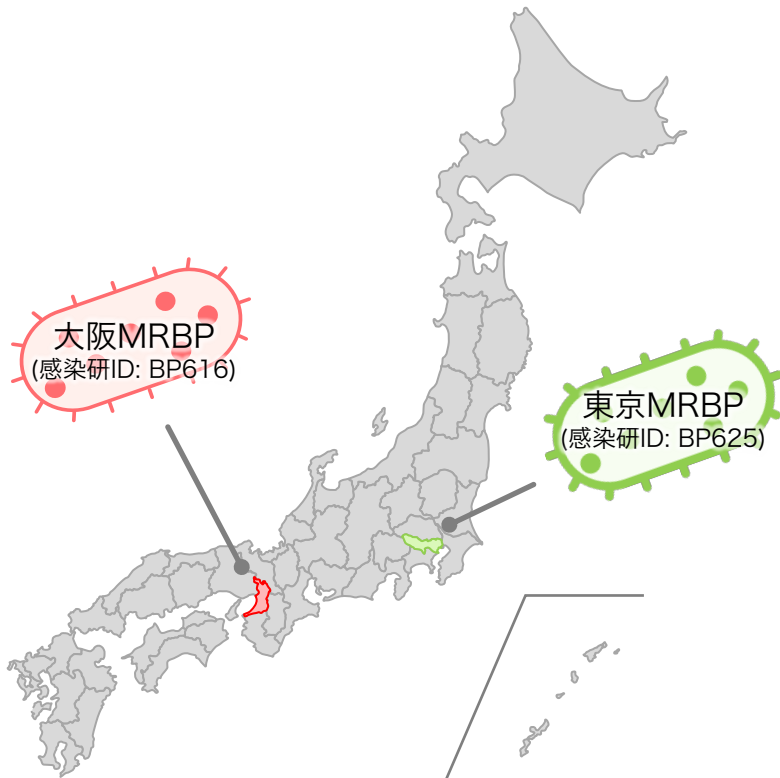


表. 日本で分離されたMRBP株の比較

	BP616	BP625
分離地域	大阪府	東京都
分離時期	2018年7月	2018年6月下旬
患者	男児 2ヶ月齢	男児 1カ月齢
エリスロマイシンの 最小発育阻止濃度	> 256 $\mu\text{g/mL}$	> 256 $\mu\text{g/mL}$
MLVAタイプ	MT195	MT195
遺伝子型	<i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i>	<i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i>

- 2018年まで日本国内でMRBPの分離報告なし
- 2株は同時期に分離された
- 2株のMLVAタイプ、遺伝子型が一致

} ➡ 同一感染源？

マクロライド耐性百日咳菌の全ゲノム解析 その1

分子系統解析

- BP616、BP625含む日本および中国の臨床分離株のゲノム情報を解析
- 遺伝子上の一塩基変異を基に分子系統樹を作成（右図）
- BP616およびBP625は日本よりも中国の臨床分離株と遺伝的に近縁であった

表. 解析に使用した菌株数

Isolation Year	Japan		China		Total
	Macrolide resistant	Macrolide susceptible	Macrolide resistant	Macrolide susceptible	
2013	0	3	4	1	8
2014	0	4	10	3	17
2015	0	10	10	10	30
2016	0	10	10	10	30
2017	0	2	7	0	9
2018	2	4	10	4	20
Total	2	33	51	28	114

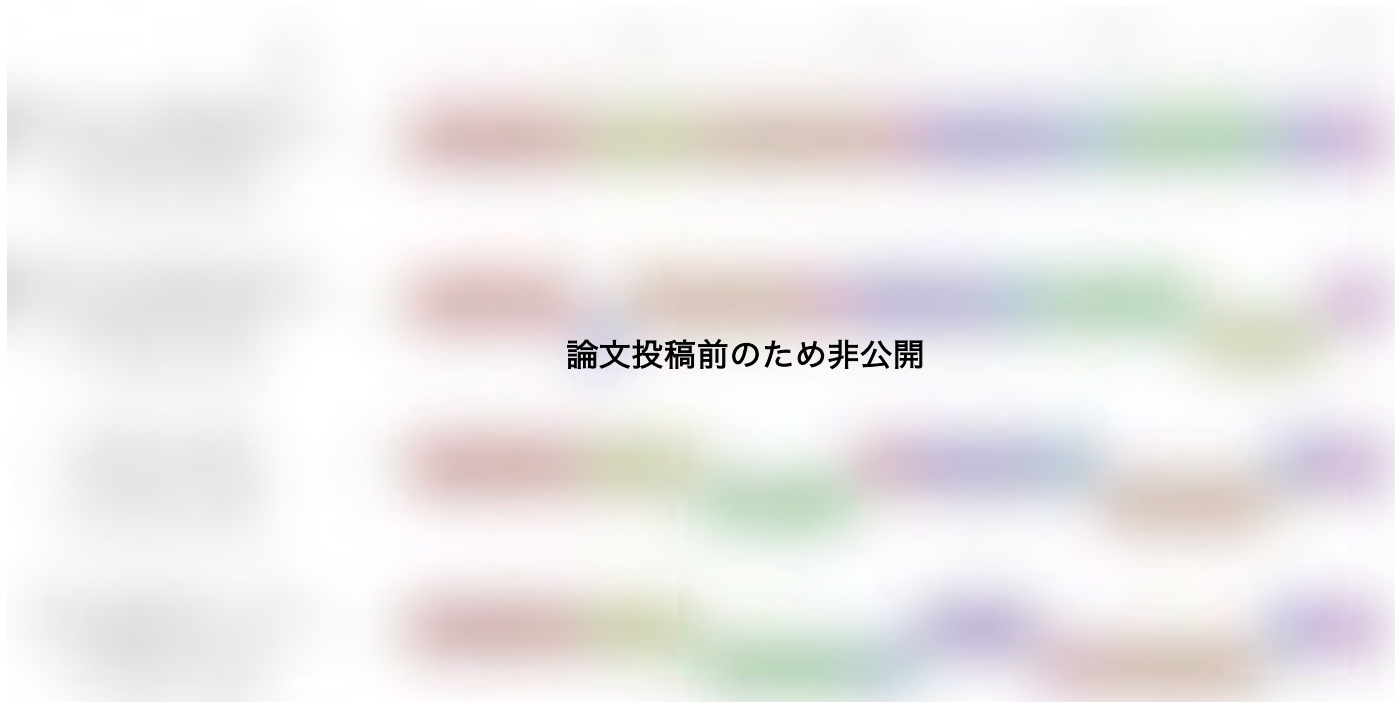
論文投稿前のため非公開



マクロライド耐性百日咳菌の全ゲノム解析 その2

完全長ゲノムの比較

- 4株のMRBP (BP616、BP625、中国およびUSAの百日咳菌) のゲノム全長を比較
- 全ての菌株でゲノム構造が異なった (下図)
- また、BP616とBP625を比較すると、全ての遺伝子を共通して持っていたが、9つの遺伝子上に一塩基変異が確認された



ゲノム構造の比較結果：Homologous regions (相同性の高い領域)は同じ色で示されている
中心線より下のブロックは逆向きの配列を示す

日本におけるマクロライド耐性百日咳菌の現状 (まとめ)

- 2018年に日本国内でマクロライド耐性百日咳菌が2株見つかった。
- 全ゲノム解析の結果から、2つの耐性菌はどちらも中国由来ではあるが、異なる菌株であることが明らかになった。(→ 同一感染源は否定された。)
- このことは、中国から侵入したマクロライド耐性百日咳菌が日本国内で広がっている可能性を示唆している。



百日咳担当室からのお願い

マクロライド耐性百日咳菌検査体制の強化・拡充

- 百日咳菌の収集およびマクロライド耐性菌遺伝子検出キットによるA2047G変異調査のご協力をお願いいたします。
- マクロライド耐性菌遺伝子検出キットをレファレンスセンター以外の地研にも配布します。
- 新規分離株だけでなく、過去(2010年以降)に分離・保存されている菌株も検査対象です。
- 検体（ボイル法によって抽出した細菌DNAや菌株等）をご送付いただければ、感染研で検査致します。



マクロライド耐性百日咳に関する問い合わせは下記までお願いいたします。

国立感染症研究所 細菌第二部・第一室

小出 健太郎 (kkoide@niid.go.jp)

百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議

2022.7.20

ボツリヌス症レファレンスセンター

**北海道立衛生研究所
千葉県衛生研究所
三重県保健環境研究所
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所**

**福島県衛生研究所
神奈川県衛生研究所
岡山県環境保健センター
福岡県保健環境研究所
国立医薬品食品衛生研究所**

**東京都健康安全研究センター
大阪健康安全基盤研究所
山口県環境保健センター
熊本県保健環境科学研究所
国立感染症研究所**

ボツリヌス症： **ボツリヌス神経毒素**によって起こる全身の神経麻痺を生じる神経中毒疾患である。

原因菌： *Clostridium botulinum* (A-F型毒素)
Clostridium argentinense (G型毒素)
Clostridium butyricum (E型類似毒素)
Clostridium baratii (F型類似毒素)

症状： ボツリヌス神経毒素はコリン作動性神経末端からのアセチルコリンの放出を抑制し、その結果、神経から筋肉への伝達が障害され、麻痺に至る。典型的な臨床症状は、**眼瞼下垂、複視、嚥下障害、構音障害、口内乾燥**等がある。意識は鮮明であり、感覚障害はなく、**通常発熱はない**。嘔吐、腹痛、下痢等があってもすぐに**便秘**になる。

病型：

- 1) **食餌性ボツリヌス症**
- 2) **乳児ボツリヌス症**
- 3) **創傷ボツリヌス症**
- 4) **成人腸管定着ボツリヌス症**
- 5) その他（医療行為による感染、実験室内感染、バイオテロによる感染）

治療： 乾燥ボツリヌスウマ抗毒素の投与。ただし、乳児ボツリヌス症の場合は対症療法を行い、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素は使用しない。

ヒトでボツリヌス症を引き起こすボツリヌス神経毒素は、主に**A型、B型、E型**、まれに**F型**である。

食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）

ボツリヌス食中毒は、食品内に混入したボツリヌス菌芽胞が、嫌気状態の食品内で発芽、増殖し、産生された**ボツリヌス毒素を食品とともに摂取**することにより発症する。ボツリヌス菌芽胞は、土壌、湖沼などに広く分布し、果物、野菜、肉、魚が汚染され得る。

原因食品：**真空パック詰め食品、缶詰、瓶詰め、発酵食品**

発生年	発生場所	患者数	原因食品	毒素型
1984	14都府県	36	カラシレンコン（真空パック）	A
1984	青森県	1	鰯のいずし	E
1984	足利市	1	不明	B
1984	釧路市	6	ハタハタ・鮭のいずし	E
1985	函館市	1	鰯のいずし	E
1988	備前市	1	不明	A
1988	札幌市	3	自家製鮭の調味乾燥品	E
1989	釧路市	1	ニシンのいずし	E
1989	滋賀県	3	ハスずし	E
1989	名寄市	2	カレイのいずし	E
1991	青森県	1	ウグイのいずし	E
1991	広島市	1	不明	A
1991	青森県	1	アユのいずし	E
1993	秋田県	4	里芋（缶詰）	A
1993	高槻市	1	不明	不明
1995	青森県	1	コハダのいずし	E

発生年	発生場所	患者数	原因食品	毒素型
1995	青森県	3	ウグイのいずし	E
1995	北海道	6	鮭のいずし	E
1996	茂原市	1	不明	A
1997	福島県	3	ハヤのいずし	E
1997	福島県	1	イワナのいずし	E
1998	東京都	18	グリーンオリーブ（瓶詰）	B
1999	大阪市	1	不明	A
1999	柏市	1	ハヤシライスの具（真空パック）	A
1999	東京都	1	不明	A
2007	岩手県	1	アユのいずし	E
2012	鳥取県	2	あずきばっとう（真空パック）	A
2016	奈良市	1	不明	A
2017	福山市	1	不明	B
2019	埼玉県	1	不明	A
2021	東京都	1	不明（真空パック食品）	F*
2021	熊本県	3	不明（白米もしくは市販の惣菜）	C

*F型毒素産生性*Clostridium baratii*による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後１年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の**消化管内で増殖した菌**により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：**蜂蜜の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取**

発生年	患者数	蜂蜜摂取歴			毒素型			
		あり	なし	不明	A	B	E	不明
1986	1	1			1			
1987	9	9			6			3
1989	2	2			2			
1990	1			1				1
1992	1			1	1			
1995	1		1			1		
1996	1		1		1			
1999	1		1		1			
2004	1		1				1*	
2005	2		2		1	1		
2006	2		2		1	1		

発生年	患者数	蜂蜜摂取歴			毒素型			
		あり	なし	不明	A	B	E	不明
2007	2		2		2			
2008	1		1		1			
2010	1		1		1			
2011	5		5		3	2		
2015	1		1				1*	
2016	3		2	1	1	2		
2017	3	1	2		3			
2018	1		1			1		
2019	1		1			1		
2020	2		2			2		
2021	1		1		1			

* 2例ともE型毒素産生性*Clostridium butyricum*による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因・経路の摂取 環境中のボツリヌス菌の摂取

成人腸管定着ボツリヌス症

成人や1歳以上の小児において、乳児ボツリヌス症と同様の病態で、ボツリヌス毒素産生菌が消化管内で増殖し産生されたボツリヌス毒素の作用により発症する。消化管に器質的あるいは機能的異常がある場合や、抗菌薬使用等による消化管で腸内細菌叢の攪乱が認められる場合が多い。

日本では、2016年から2020年までに計3例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、2例は、各々5歳および4歳の基礎疾患を持つ小児で、残る1例は臓器移植歴のある成人であった。3例ともA型ボツリヌス菌による感染であった。

1996	1		1		1				2017	3	1	2		3		
1999	1		1		1				2018	1		1			1	
2004	1		1				1*		2019	1		1			1	
2005	2		2		1	1			2020	2		2			2	
2006	2		2		1	1			2021	1		1		1		

* 2例ともE型毒素産生性 *Clostridium butyricum*による感染

ボツリヌスといえば**蜂蜜**ではない！

- 食餌性ボツリヌス症の原因に蜂蜜は含まれない。蜂蜜は乳児ボツリヌス症の明らかな原因食品であるが、蜂蜜を食べていない症例の方が多数のため、**蜂蜜を食べていない＝ボツリヌス症ではない**、とはならない。また、蜂蜜からボツリヌス菌が分離されても、その蜂蜜を市場から回収する必要はない。

患者が1歳以上の場合、まず**食中毒**を疑う！

- 第二、第三の症例を出さないため、食歴調査を行い、原因食品を突き止める必要がある。患者が食べた**食品の残りを廃棄せず、保管することが大事！**

乳児ボツリヌス症の患児は**回復後の排泄ケア**に注意！

- 乳児ボツリヌス症では、乳児の腸内でボツリヌス菌が増殖するため、乳児が回復したあとも、数週間から数ヶ月間、便とともにボツリヌス菌が排泄される。そのため、保育園など他に1歳未満の乳児がいる場では、**オムツ交換時に周囲の環境を便で汚さない**ようにする。ボツリヌス菌は、芽胞を作るため、アルコールなどの消毒薬が無効のため、石けんと流水での手洗いが必須。

「細菌学的検査」

検体： **血清（抗毒素投与前）**

糞便（便秘のため取り難いが、わずかでもいいのでなんとか取ってもらう）

試験：

＜マウス試験法＞

①処理した検体（血清、糞便）について、診断用抗毒素と混合したサンプル（中和サンプル）と混合していないサンプル（非中和サンプル）を調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。

②糞便を培地に播種し、30℃（もしくは37℃）で5日間静置培養した培養上清について中和サンプルと非中和サンプルを調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。



＜リパーゼ産性能の確認＞

糞便を培養した培地をブルセラHK卵黄寒天培地に播種し、嫌気的条件下で30℃（もしくは37℃）、48時間培養し、リパーゼ産性能を確認する。

＜毒素遺伝子の検出＞

ブルセラHK卵黄寒天培地上のコロニーのDNAを抽出し、毒素遺伝子の有無をPCRにて確認する。



ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

- ・ 稀少感染症であること、動物実験を必要とすることから、検査の技術継承が難しい
- ・ 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。
- ・ 2018年度より、参加者によるマウス接種実施開始。
- ・ 参加をご希望の場合は、細菌第二部第三室 妹尾(senoh@niid.go.jp)、油谷(yutanim@niid.go.jp) まで

第9回講習会
2022年11月開催予定
参加者募集中（実験室の都合上4名まで）

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

- **A、B、E、F型の診断用抗毒素**は、ご要望に応じて配布していますので、ご連絡ください。
- **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**場合はご連絡ください。
- **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。

問い合わせ先は、**細菌第二部第三室 妹尾(senoh@niid.go.jp)**
油谷(yutanim@niid.go.jp)です。

17. 動物由来感染症

令和4年度 動物由来感染症レファレンスセンター Webミーティング

「種々の動物群から感染する動物由来感染症について」

日時：令和4年11月18日(月) 13:00 – 15:15
場所：Zoom会議

- | | | |
|--|-----------------------|-------------|
| 1. 開会の挨拶と概要他 | 今岡 浩一 | 13:00-13:05 |
| 2. 演題（講演15分＋質疑応答5分） | （演者所属：国立感染症研究所 獣医科学部） | |
| 1) 野生動物由来感染症： | | 13:05-13:45 |
| * 野兔病 | 堀田明豊 | |
| * ヘニパウイルス感染症 | 加来義浩 | |
| 2) 愛玩動物由来感染症： | | 13:45-14:25 |
| * イヌブルセラ菌感染症 | 今岡浩一 | |
| * サル痘 | 朴ウンシル | |
| 3) 輸入愛玩動物・展示動物と感染症： | | 14:25-14:50 |
| * 輸入愛玩動物の死着事例や展示動物の
病性鑑定に見る動物由来感染症リスク | 宇根有美先生 | |
| 3. 総合討論等 | | 14:50-15:10 |
| 4. 閉会の挨拶 | 今岡 浩一 | 15:10-15:15 |
| | | 以上 |

参加者

地方衛生研究所等： 54施設 186名
県庁・保健所・動物愛護センター： 14施設 18名
そのほか(演者、感染研)： 若干名