

衛生微生物技術協議会第43回研究会（岐阜） レファレンスセンター等報告

日時：令和5年7月5日-7月6日

場所：岐阜県岐阜市 じゅうろくプラザ 現地開催 もしくは Zoom等のweb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
13. リケッチア
14. アデノウイルス
15. 大腸菌
16. 百日咳・ボツリヌス
17. 動物由来感染症

1. 麻疹・風疹

令和5年度 麻疹・風疹レファレンスセンター会議

国立感染症研究所ウイルス第三部

森 嘉生・大槻紀之

令和5年（2023年）9月12日(火) 13:00～ web開催
麻疹・風疹レファレンスセンター会議

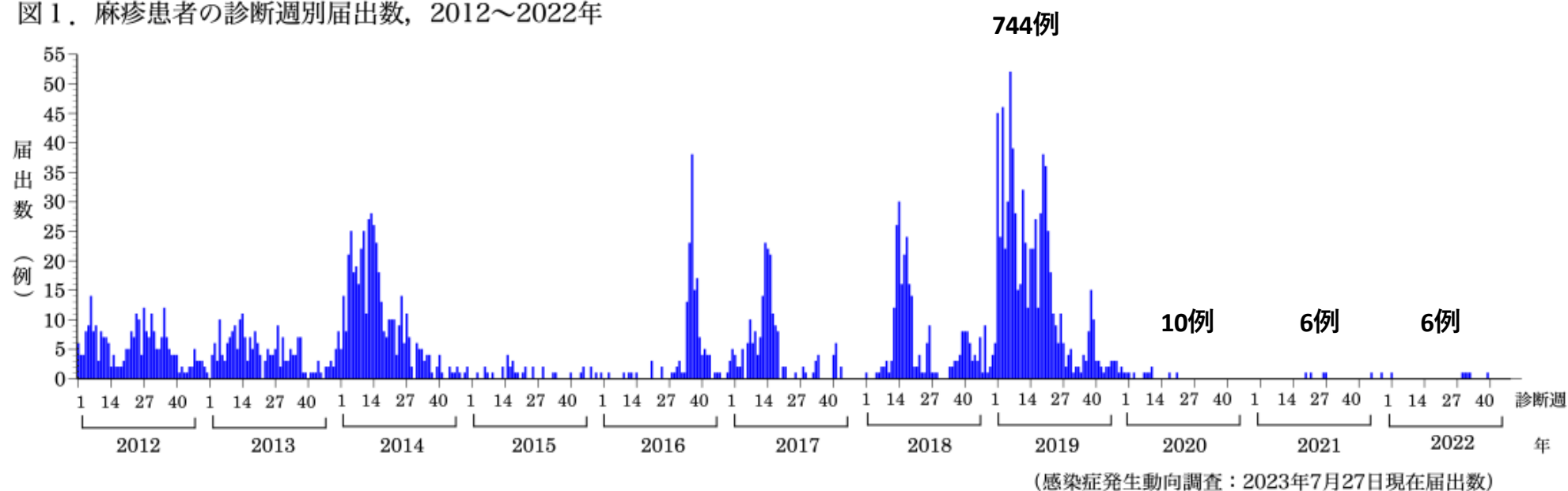
麻疹の国内外の状況

国立感染症研究所
ウイルス三部第一室
otsuki 【】 niid.go.jp

【】は@に変換してください

年別麻疹報告数（2012-2022年）

図1. 麻疹患者の診断週別届出数，2012～2022年



2023年は現時点で23症例の報告があります

海外での麻疹発生状況

南東アジア地域での報告数が多い

インドやインドネシアなど流行地域からの帰国者に注意が必要

麻疹ウイルス遺伝子型の分布

D8およびB3のみが検出されている：アジア地域はD8が主に検出されている

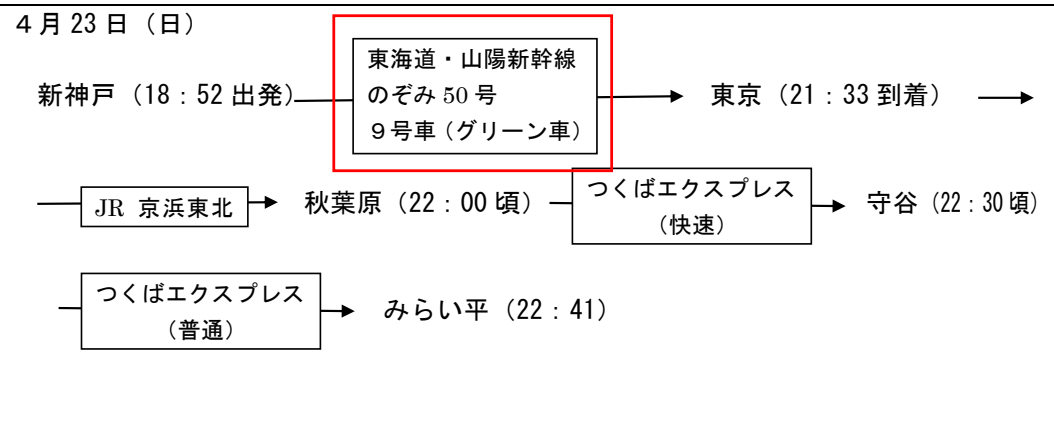
国内では輸入症例およびその関連症例が発生している

R5.4.28.茨城県報道発表資料 抜粋

3 経過等：

- 4月14日 インドから帰国
- 4月21日 発熱、咳嗽 神戸市に移動
- 4月23日 発疹が出現 神戸市から移動
- 4月24日 発疹継続のため、JA とりで総合医療センターを受診。
- 4月26日 同医療機関から竜ヶ崎保健所へ検査依頼あり。
- 4月27日 県衛生研究所の遺伝子検査で麻疹陽性と判明し、発生届あり。
症状軽快し、退院。

【感染性のある期間に患者が利用した公共交通機関と区間】



R5.5.12.東京都報道発表資料 抜粋

No.	性別	年齢	症状	ワクチン接種歴	発病年月日	発生届出年月日
1	女性	30代	発熱・発疹・咳	なし	5月3日	5月10日
2	男性	40代	発熱・発疹・咳	不明	5月3日	5月11日

共通して利用した公共交通機関

4月23日（日曜日）

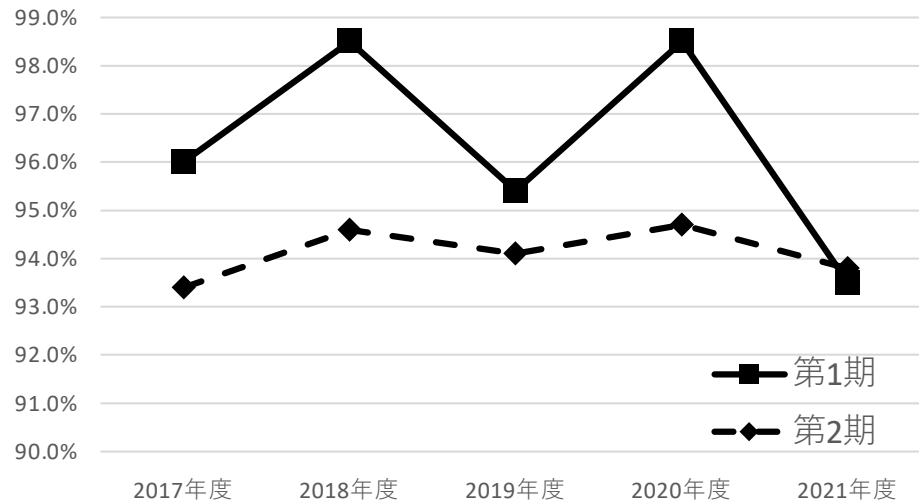
東海道・山陽新幹線 のぞみ50号 9号車（グリーン車）
（新神戸駅18時52分発⇒東京駅21時33分着）

茨城県の症例と東京都2症例は疫学的リンクから明らかに関連症例であった。

輸入症例→二次感染の症例にも注意が必要

その他 気になること

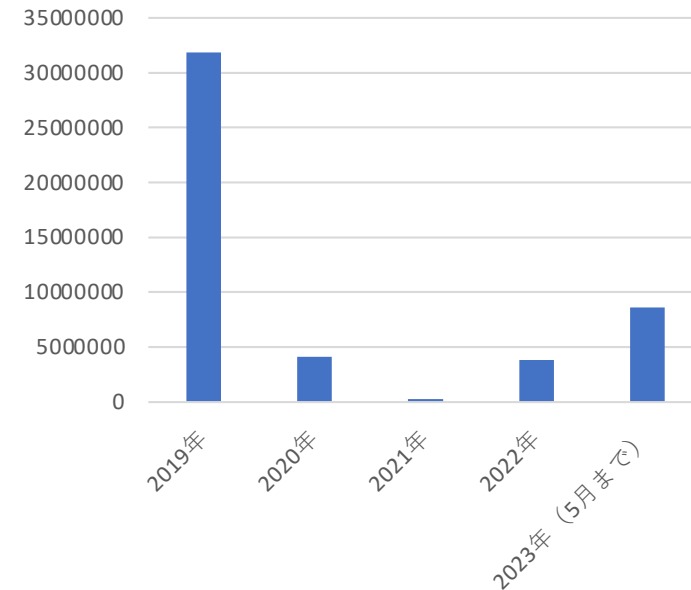
麻疹ワクチン接種率



厚生労働省HPを元に作成

2021年度の第1期定期接種率が95%を下回っている

訪日外客



出典

日本政府観光局 (JNTO) HP <https://statistics.jnto.go.jp/> を元に作成

2023年5月までの訪日外客数は2019年より-37.2%となっているが回復基調である

年少児輸入症例や年少児での麻疹発生に注意が必要かもしれない

<風疹について>

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。

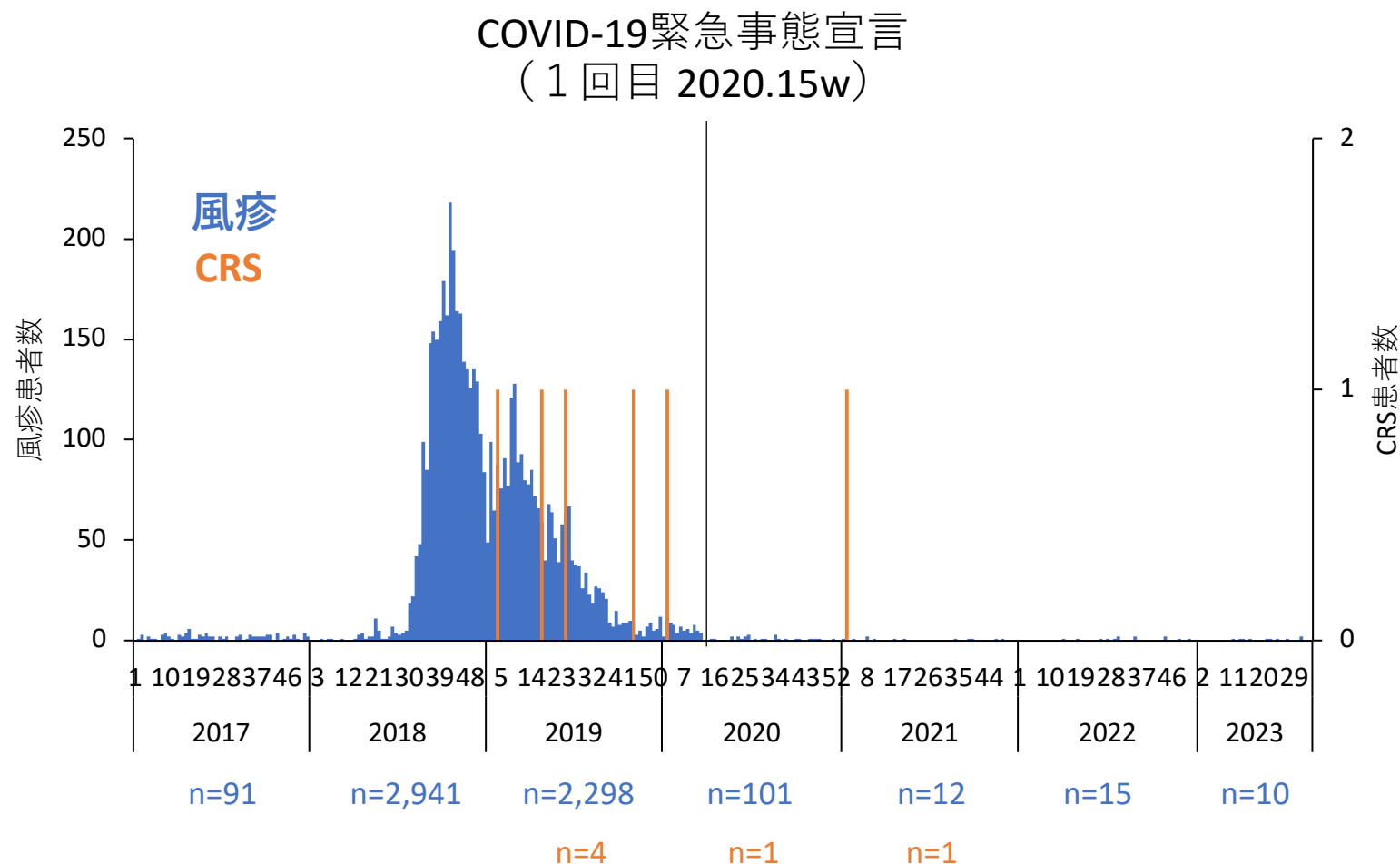
風しんの排除

適切なサーベイランス制度の下、土着株による伝播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

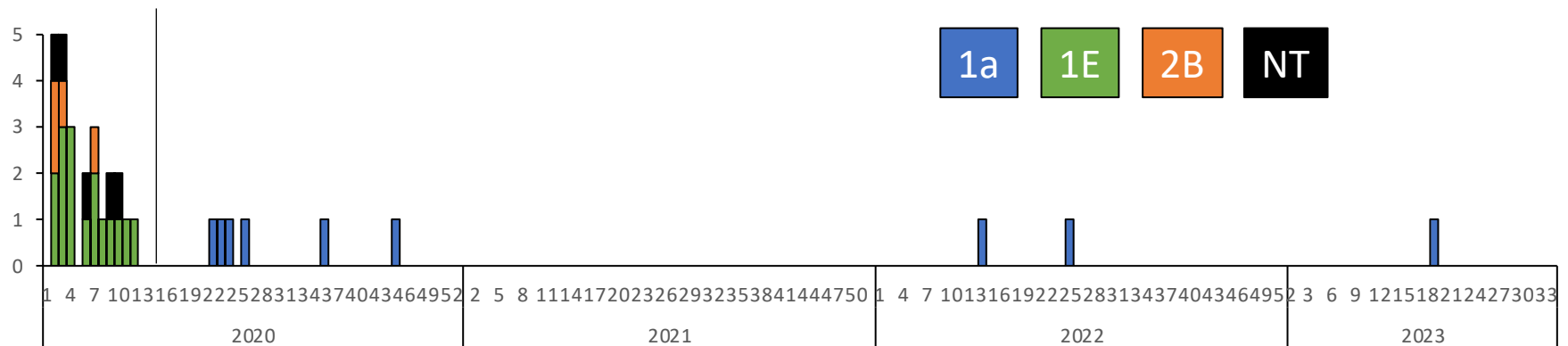
継続して3年間以上、土着株による伝播が遮断されていることを示す

週別風疹およびCRS患者報告数（2017-2023.34w）



NESID病原体検出情報への遺伝子型別ウイルス登録数 (2020.1w-2023.34w)

COVID-19緊急事態宣言
(1回目 15w)



1a n=6
1E n=16
2B n=4
NT n=5

1a n=2

1a n=1

WHO風疹ウイルスデータベース RubeNS2の 遺伝子型別ウイルス登録数

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	total
1a	2	2	1	1	0	0	0	0	6
1E	10	12	1232	2330	60	2	0	0	3646
1G	9	4	0	0	0	0	0	1	14
1H	1	1	0	0	0	0	0	0	2
2B	220	184	143	1202	55	10	2	0	1816
total	242	203	1376	3533	115	12	2	1	5484

2021

China (1E n=1; 2B n=9)
Germany (1E n=1)
USA (from Afghanistan) (2B n=1)

2022

Iran (2B n=2)

2023

Canada (from Nigeria) (1G n=1)

国内の風疹検査の課題

風疹患者 (n=140) の検査実施状況 (2020.1w-2023.34w)

		IgM		
		実施	未実施	
RT-PCR	実施	39 (27.9%) *	25 (17.9%)	64 (45.7%)
	未実施	71 (50.7%)	5 (3.6%)	76 (54.3%)
		110 (78.6%)	30 (21.4%)	140 (100%)

		IgM			
*RT-PCR/IgM両実施		陽性	陰性	判定保留	結果不明
RT-PCR	陽性	8 (20.5%)	1 (2.6%)	1 (2.6%)	10 (25.6%)
	陰性	27 (69.2%)		1 (2.6%)	1 (2.6%)
		35 (89.7%)	1 (2.6%)	2 (5.2%)	1 (2.6%)
					39 (100%)

- 風疹患者報告症例のうち、IgM検査とRT-PCR検査が両方実施されているのは**約28%**
→**両方の検査を実施できる様な体制**
- IgM検査とRT-PCR検査が両方実施されている症例のうち、PCR陽性は**約26%**
→**PCR検査用の検体の採取時期が不適、IgM偽陽性もしくは持続的陽性の可能性**

麻疹に関する今年度の活動予定等について

昨今の麻疹の発生状況より、今後も麻疹の発生は輸入例または輸入関連症例が主になると考えられる。

また輸入症例の場合は推定感染地域（国）がはっきりすることが多くまた、他の国内発生事例と疫学的リンクが明らかにならないと思われる。

ここ数年お願いしていますが、国内検出株での**MF-NCR**領域の遺伝子配列を確認し、**N450**領域で十分に分子疫学的にそのリンク等を確認が可能か調査するためにも、本領域の配列を解析したい。

臨床検体や抽出**RNA**などが分与可能な場合は是非お願いをしたい。

PCR陽性などの報告があった場合、実地疫学センターおよび**FETP**からコンタクトがあった後、当方より検体分与のお願いをする場合がありますので、よろしくお願いいたします。

また、各地衛研で実施したい場合は、手技等の支援も可能ですのでお気軽にご連絡ください

参照RNAの配布

- 2021年度 3件
- 2022年度 5件
- 2023年度 12件

参照RNAが必要な場合はウイルス3部 までご連絡ください。

分与に関しては分与依頼書等の文書手続きは不要です。

発送は乾燥状態のRNAの発送となり原則普通郵便でお送りいたします。

麻疹・風疹両方の参照RNAが必要な場合は、その旨ご連絡いただければ同梱して発送します。

風疹に関するレファレンス活動の報告

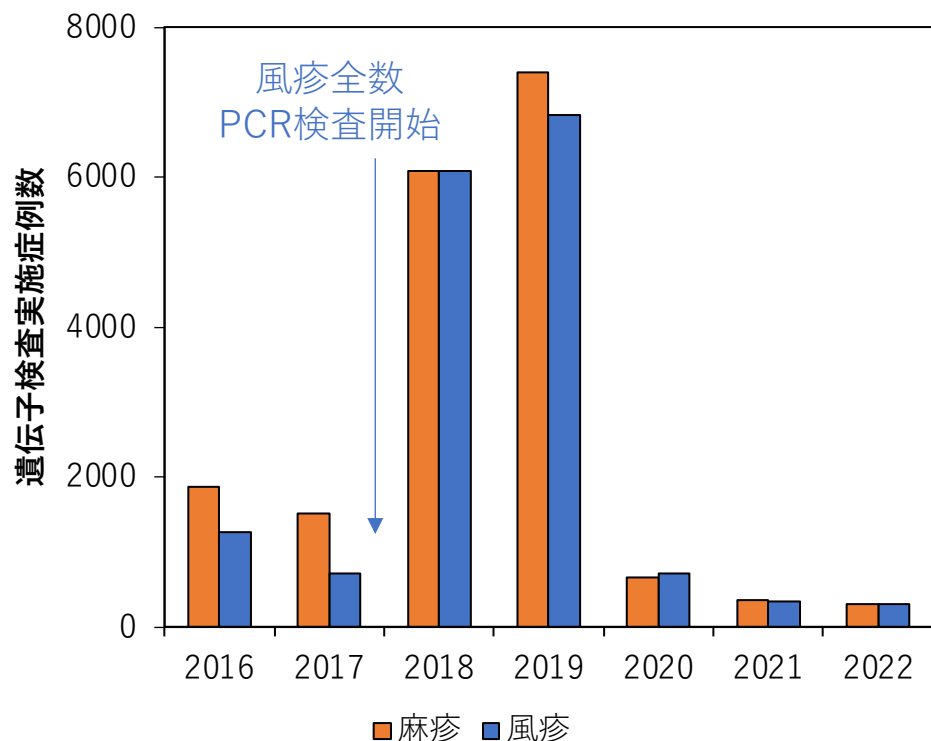
- 遺伝子検査用の風疹参照RNA（陽性コントロール）の配布
令和4年度 10ヶ所
令和5年度 13ヶ所
- 2022年 麻疹・風疹検査実績調査実施

地方衛生研究所における麻疹・風疹検査実施状況の調査

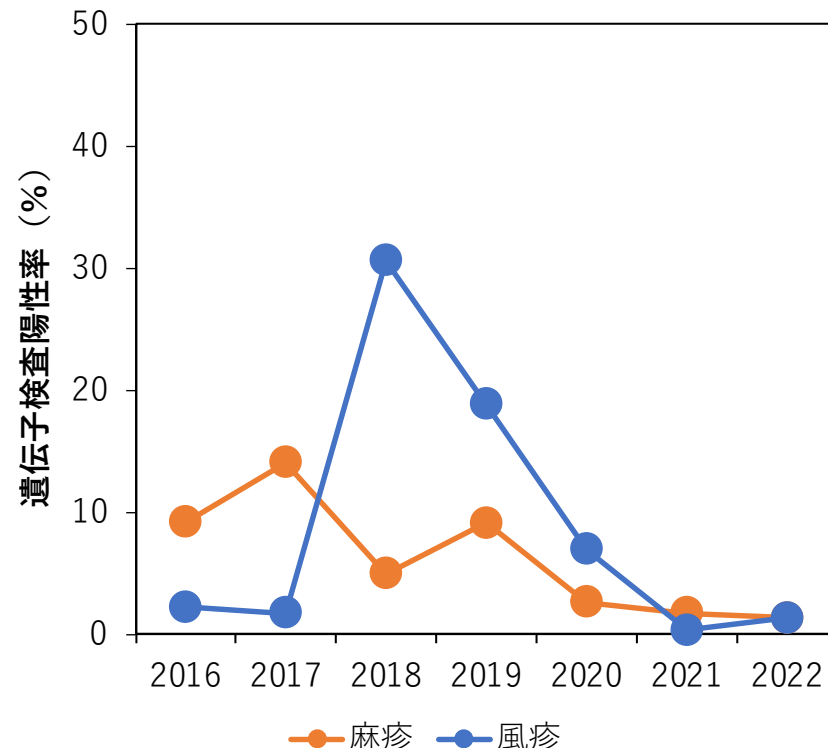
- 2016年から毎年、麻疹・風疹検査に関するアンケート調査を実施
- 目的： 地方衛生研究所での検査の実態を把握するとともに、**麻疹風疹排除証明に必要な情報の収集**を行う
- 対象： 麻疹・風疹検査を実施している地方衛生研究所
回答施設数：2016年n=73、2017年n=73、2018年n=76、2019年n=78、2020年n=78、2021年n=78、2022年n=81
- 内容：
 - 1. 検査全般**（検査症例数、標準搬入期間に検体が搬入された症例数、標準検査期間に検査された症例数、陽性症例数）
 - 2. ウイルス遺伝子検出検査**（検査症例数、陽性症例数、ワクチン株検出症例数）
 - 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）

ウイルス遺伝子検出検査数

ウイルス遺伝子検査実施症例数

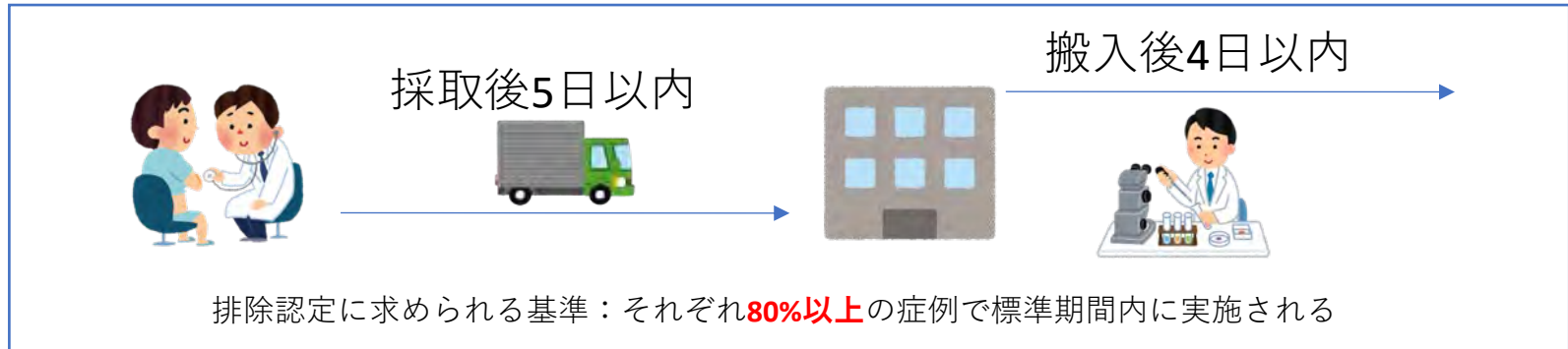


ウイルス遺伝子検査陽性割合

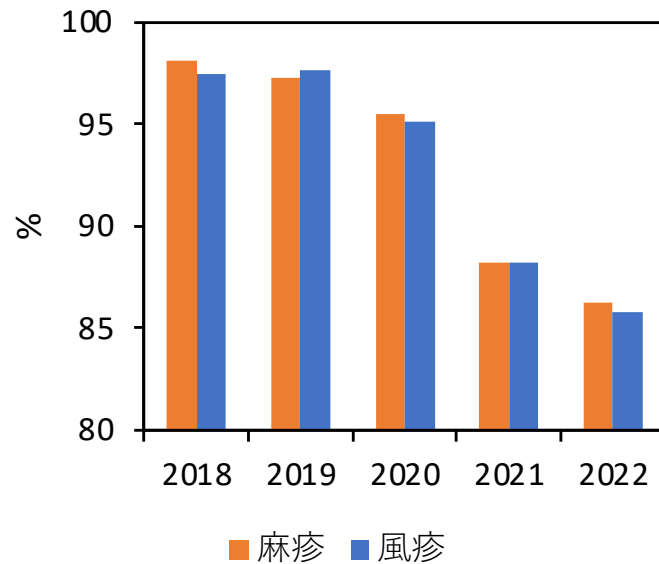


- 2020年以降、麻疹・風疹患者数の減少に伴い、検査実施数が激減した

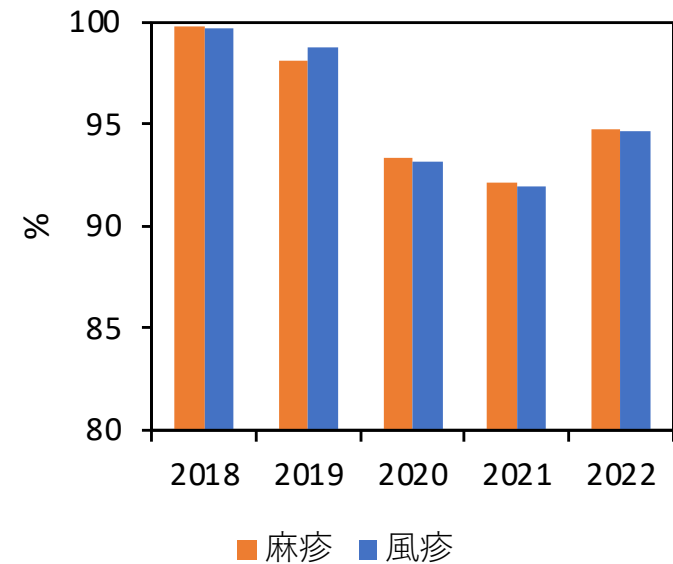
検査にかかった時間



採取後5日以内に検体が施設に搬入された割合



搬入後4日以内に検査された割合



2020年以降、輸送、検査が遅れ気味である。COVID-19の影響？

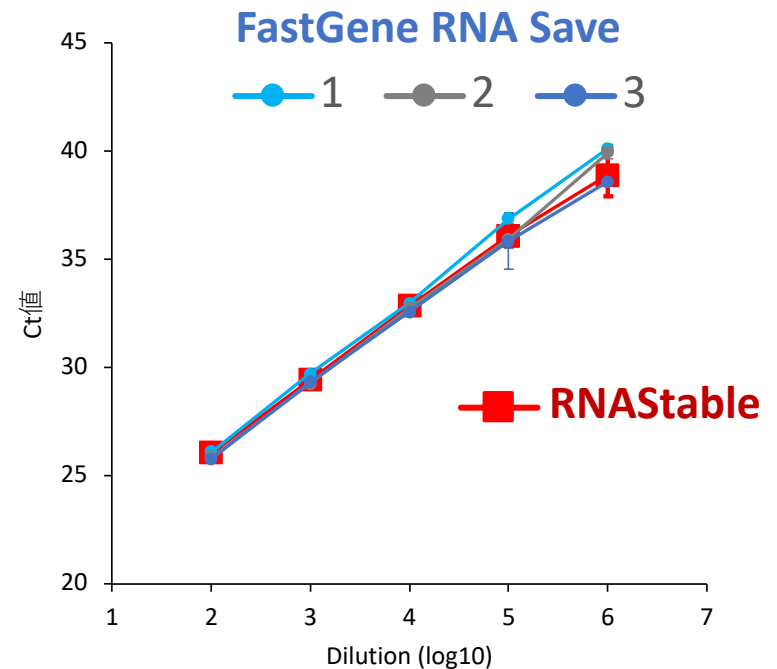
遺伝子検査用の参照RNA（陽性コントロール） の保存試薬の検討

- これまで使用していた参照RNAの保存試薬（RNAStable）が販売終了となったため、代替品としてFastGene RNA Save（日本ジェネティクス）が使用可能か検討した。

RNAStable
販売終了



FastGene RNA Save



乾燥状態4°Cで保存後、融解して測定

今後はFastGene RNA Saveを使用することとした（EQAにも使用する）

今後の予定

- ・ 2023年の地方衛生研究所における麻疹・風疹検査実績調査（2024年1月以降）

2. HIV関連

HIV関連感染症

1. HIV診断薬に関する情報

新規HIV診断薬に関する情報　　神奈川県衛生研究所　佐野貴子先生

HIV-2診断に関する情報　国立感染症研究所　草川茂先生

2. HIVに関連するSTIの疫学と検査体制

東京都の取り組み　東京都健康安全研究センター　長島真美先生

大阪府の取り組み　大阪健康安全基盤研究所　川畑拓也先生

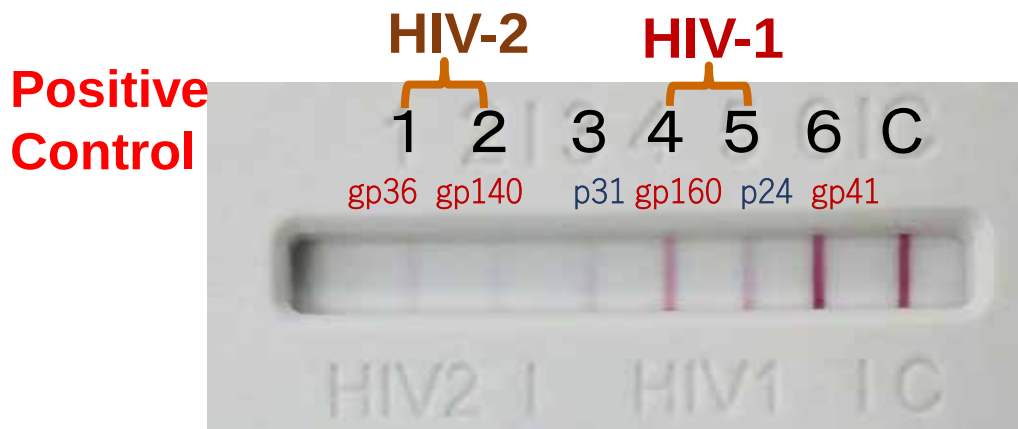
Geenius HIV-1/2に関する基礎情報

- HIV確認検査および鑑別検査のためのイムノクロマト（IC）法試薬（WB法の後継品）⇒**確認IC法**
- 抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体が1つのデバイスで判定可能
- 検体は血清、血漿（5 μ L）および全血（15 μ L）で測定可能
- 短時間（30分）で結果判定が可能
- Geenius専用リーダーおよびソフトウェアにより自動読み取り解析（目視判定も可能）
- 結果のデジタルデータの保管が可能

※スクリーニング検査での陽性検体の確認検査としてのみ使用可能



Geenius HIV1/2 キット 結果判定基準



HIV-2 判定基準

判 定	解 釈
HIV-2陽性	バンド1 (gp36) 、 バンド2 (gp140)の2本 すべてのバンドが出現
HIV-2 陰性	バンド1, 2のすべてが 出現なし
HIV-2 判定保留	バンド1, 2のどちらか1 本のみ出現

HIV-1 判定基準

判 定	解 釈
HIV-1 陽性	バンド3, 4, 5, 6のうち、4 (gp160)あるいは6 (gp41) のい ずれかを含む2本以上のバンドが出現
HIV-1 陰性	バンド3, 4, 5, 6のすべてが出現な し
HIV-1 判定保留	1本のENVバンド (バンド4 あるいは 6) 1本のGAGバンド (バンド5) 1本のPOLバンド (バンド3) 1本のGAGバンドと1本のPOLバンド

Geeniusリーダー 結果レポート(PDF)

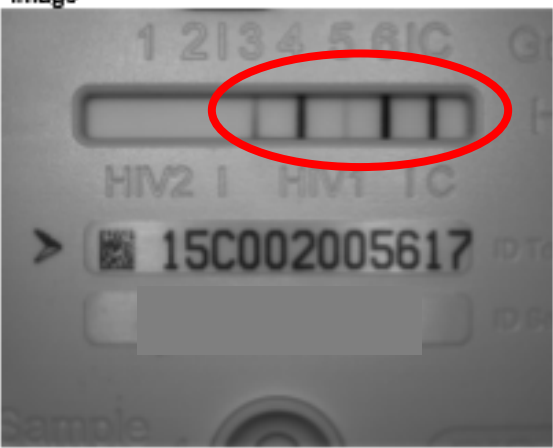
HIV-1陽性例

検査結果の
画像データ

Geenius HIV 1/2

Sample ID:		Reader S/N:	DP41004201
Cassette ID:	15C002005617	Geenius version:	1.2.201.001
Kit Lot - Exp. Date:	5C0020 - 7/31/2016	Last Calibration:	6/28/2016 13:07:50
Order date:	6/28/2016 14:24:02		
Analysis date:	6/28/2016 14:24:06	Controls	
Test run by:	Supervisor -	Lot number:	PC16C0024170330
Test version:	1.1-0U8	Last run on:	6/21/2016 11:07:25
Rule(s):	HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria	Lot number:	NC16C0024170330
		Last run on:	6/21/2016 11:07:51

Image



Interpretation

Interpretation type: Automatic

Band analysis:

#	Name	Result
1	gp38	Absent
2	gp140	Absent
3	p31	Present
4	gp160	Present
6	p24	Present
8	gp41	Present
7	CTRL	Present

Conclusion: HIV-1 POSITIVE

Status: Validated by: Supervisor -

最終判定結果

バンド出現
の有無

地方衛生研究所での確認ICの使用状況

【バイオ・ラッド ラボラトリーズ（株）からの情報提供、2023年6月時点】

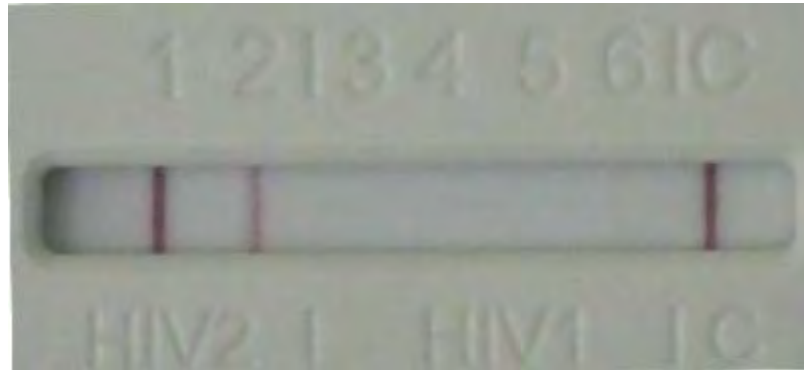
地方衛生研究所85か所中、

- WB法試薬（ラブブロット）を使用 52か所（保健所11か所+ α ＊）
- Geenius HIV 1/2 キットの購入実績あり 37か所（保健所4か所+ α ）
＊（+ α ）2社以上の代理店を経由して納品されている場合は数に含まれていない
- Geenius リーダーを導入したのは14か所（保健所0か所）

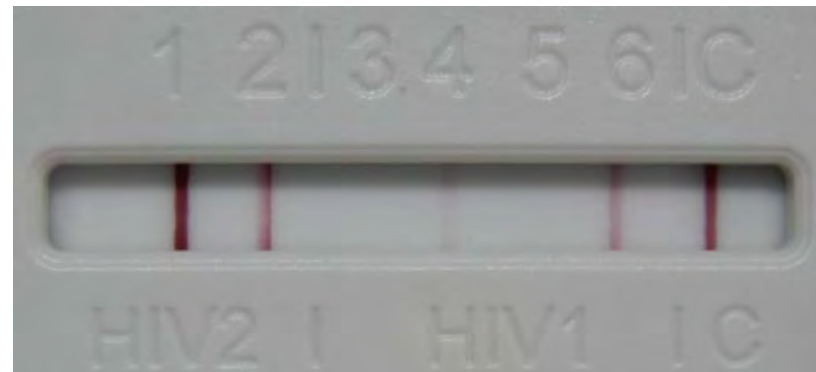
- ✓ WB法試薬の購入歴があるにも関わらず、Geenius試薬を購入していない自治体あり、自治体でのHIV確認検査実施施設が減少していることが示唆される。
- ✓ Geeniusリーダーを導入したのは3割程度、6割以上の施設では目視のみで判定していると考えられる。

抗HIV-2抗体はHIV-1判定ラインとの交差に関して

(A) 肉眼判定でHIV-2感染を同定できた例



(B) HIV-1判定ラインと交差反応があり
肉眼判定HIV-1/2鑑別不能となった例



HIV-1判定結果	HIV-2判定結果	総合解釈
陰性	陰性	HIV陰性
陰性	判定保留	HIV-2判定保留
判定保留	陰性	HIV-1判定保留
判定保留	判定保留	HIV判定保留
陽性	陰性	HIV-1陽性
陽性	判定保留	HIV-1陽性 ^①
陰性	陽性	HIV-2陽性
判定保留	陽性	HIV-2陽性 ^②
陽性 ケース1 gp160もしくはgp41のいずれか1本のバンドが認められ、かつ、GAG又はPOLのいずれかのバンドが認められる場合	陽性	ケース1 HIV-2陽性 ^③ (HIV-1との交差反応を伴う)
ケース2 gp160とgp41の2本のバンドが認められる場合。		ケース2 HIV陽性 ^④ (どちらのタイプか不明)

Geenius HIV 1/2キットを用いたHIV-2陽性検体の測定

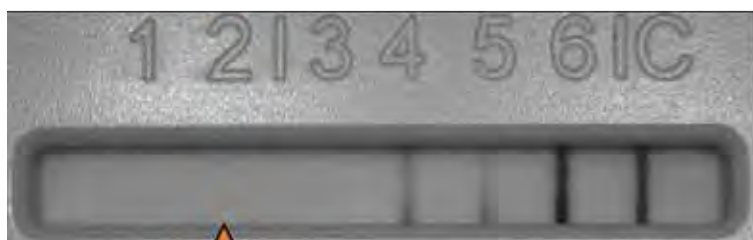
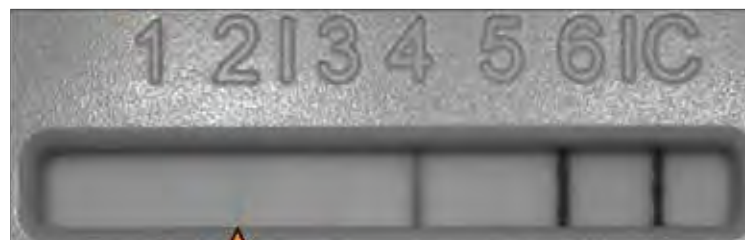
表: HIV-2陽性38検体をGeenius HIV 1/2キットを用いて測定、
肉眼判定およびGeenius Readerを用いて判定した結果

合計	Naked	Reader
HIV-2	22	37
HIV IND	16	1
Rate(%)	57.9	97.4



Kusagawa et al. BMC Infect Dis. 2021;21(1):569, 他

HIV-2判定ラインへの交差反応が見られた例



Geenius HIV 1/2キットの交差反応への対処

< HIV-2感染例の鑑別診断をより確実に行うために >

「Geeniusリーダー」の使用が望ましい

< HIV-1/2判定ラインの交差反応で悩まないために >

「Geenius HIV 1/2キット」をHIVスクリーニング検査目的で使用しない
追加スクリーニング検査の実施

< 結果の解釈に困った場合 >

結果の相談、行政検査（追加の検査実施が必要と判断された場合）は感染研にて随時受け付けております。担当者までご連絡下さい。

（担当：感染研エイズ研究センター 松岡・草川）

<追加連絡・In-house HIV-1核酸増幅検査について>

次の2点の検体セットを準備しております。配布をご希望される場合は担当者までご連絡下さい。

- In-house HIV-1核酸増幅検査用の標準物質(18-00)
- 教育訓練用として2018年度実施の外部精度管理調査研究で使用した検体

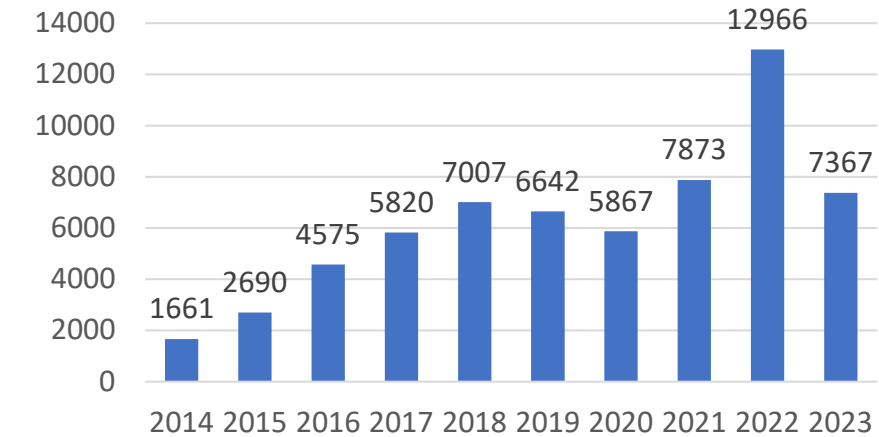
連絡先：感染研エイズ研究センター 松岡・草川

HIV以外のSTIの疫学と検査体制

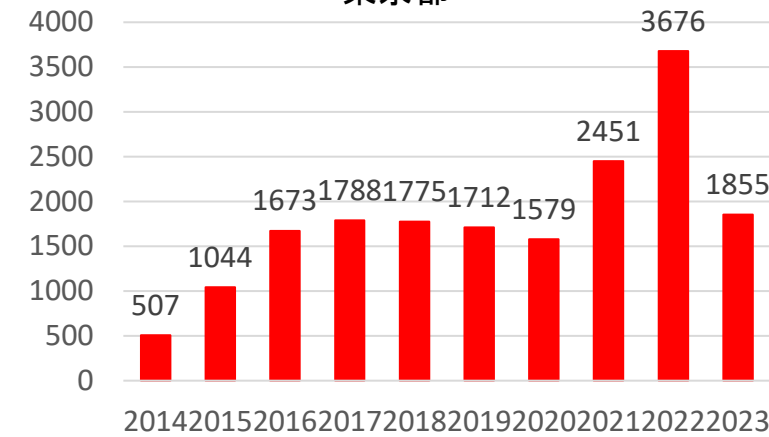
近年HIV以外の性感染症においても、HIV担当者が中心的な役割を担う場面が増えております。そこで令和5年度は近年日本国内で報告数が急増している梅毒、HIV受検者の大半を占めるMSMを中心に流行が懸念されるサル痘(M痘)について東京・大阪のSTIの疫学情報、検査の状況などを紹介していただきました。概要をまとめましたので、参考にして下さい。

梅毒届出数の推移

全国

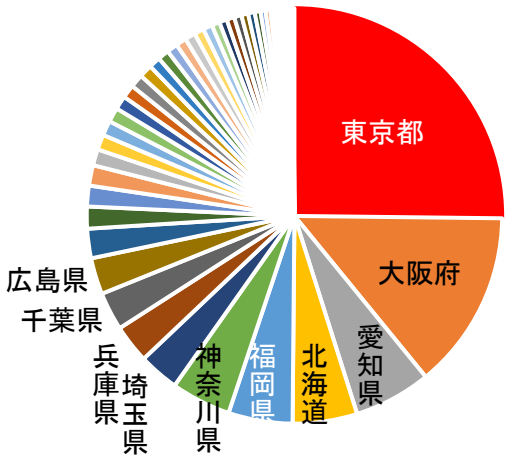


東京都

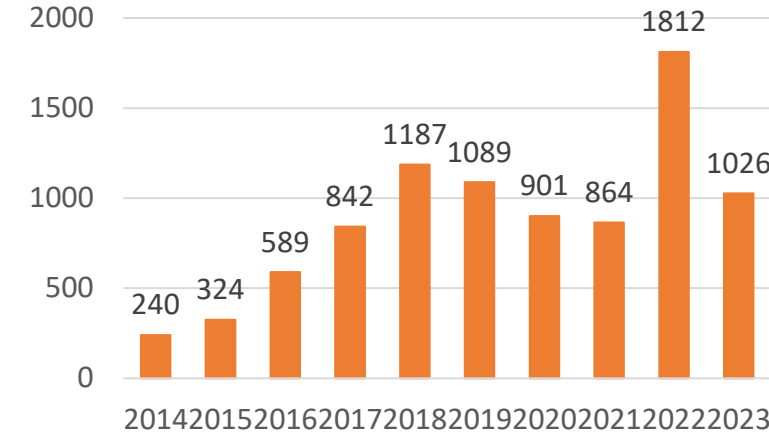


	都道府県	梅毒届出数
	全国	7367
1	東京都	1855
2	大阪府	1026
3	愛知県	443
4	北海道	370
5	福岡県	368
6	神奈川県	343
7	埼玉県	231
8	兵庫県	220
9	千葉県	219
10	広島県	209

梅毒届出数

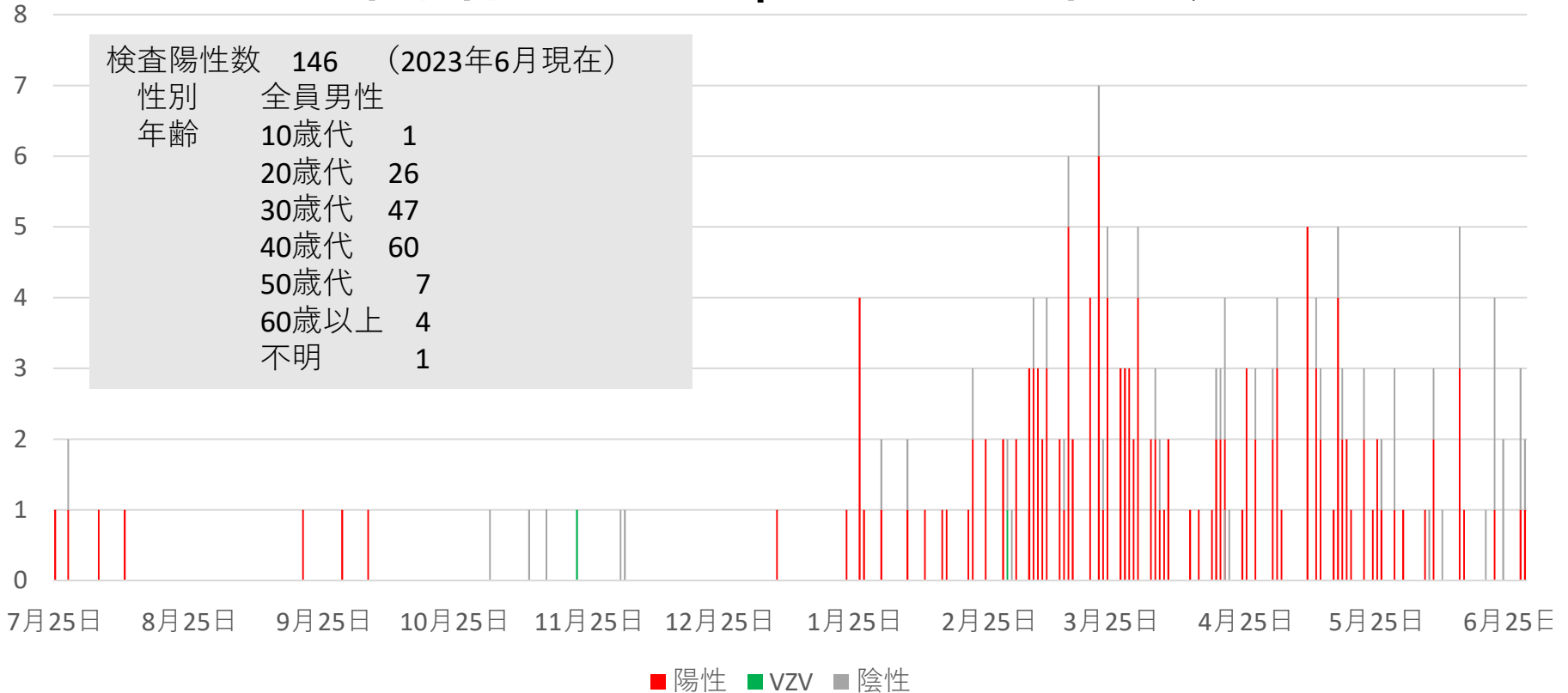


大阪府

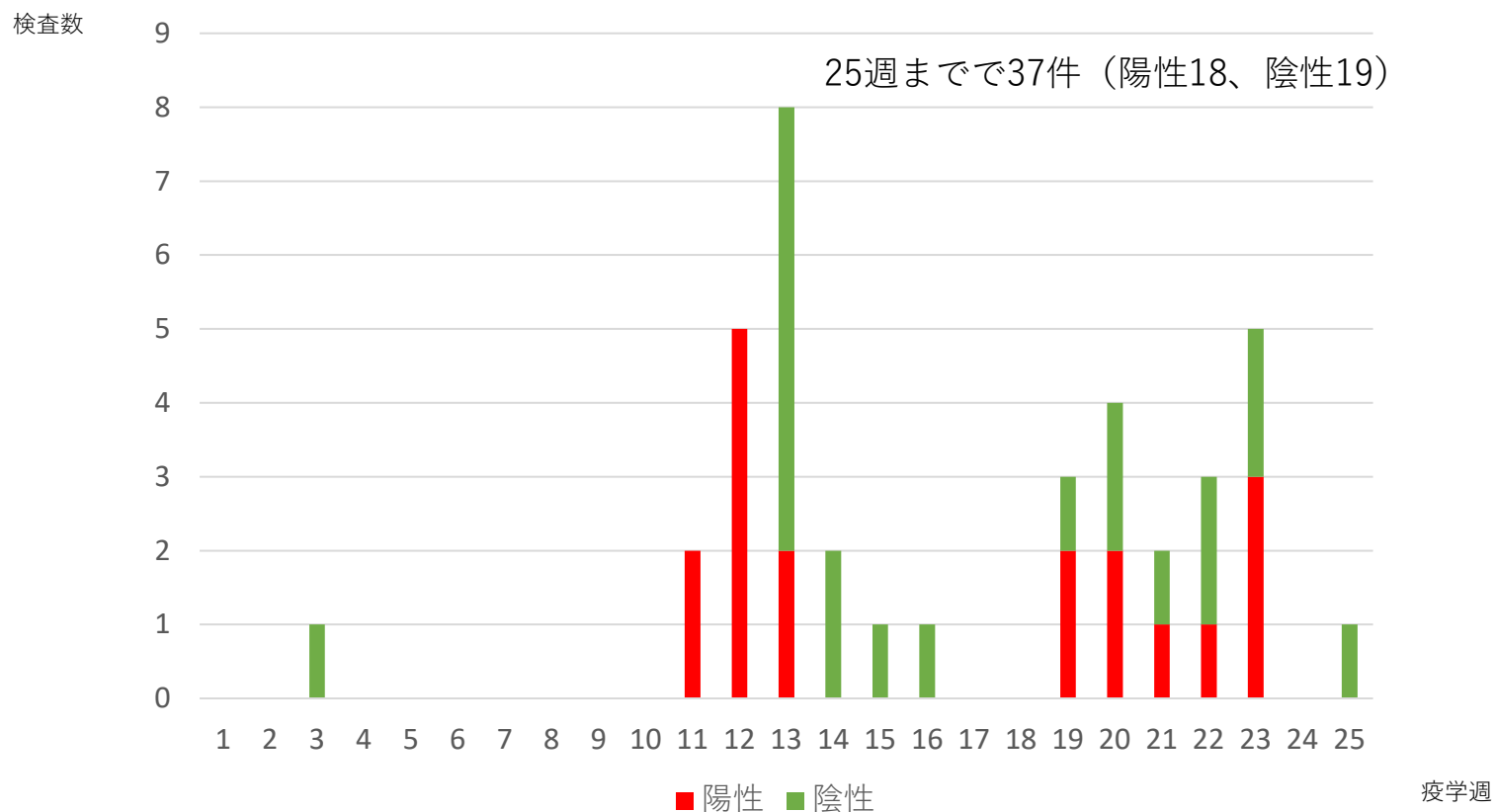


(感染症発生動向調査2023. 7. 4 取得データ)

東京都におけるMpox(サル痘)検査数



大阪府におけるMpox(サル痘)検査数（堺市検査分を除く）



Mpox(サル痘)の患者発生状況について

3 国内の発生状況

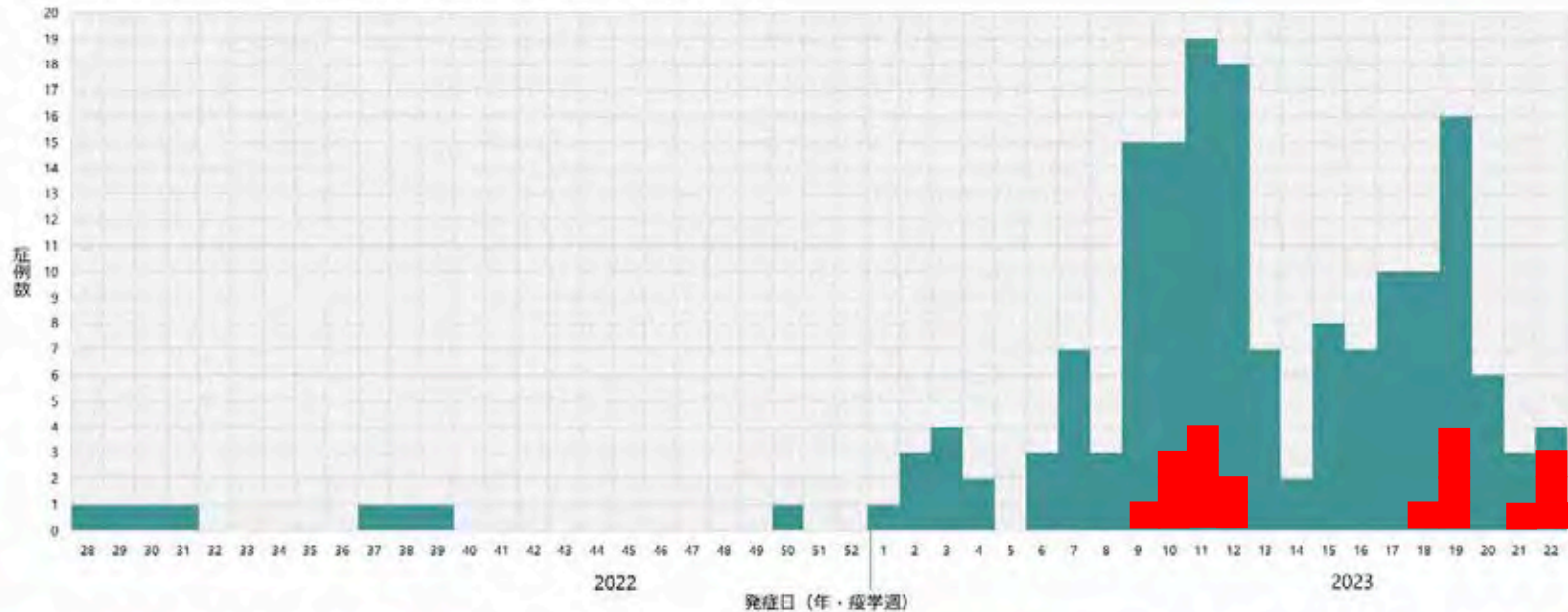
6月16日までで 19例

国内では、2022年7月25日に、国内1例目の患者が報告された。

2023年以降、患者の発生が増加しており、2023年6月16日公表時点で181例の症例が確認されている。

令和5年6月16日時点で公表されている症例（無症状病原体保有者及び発症日が不明な患者を除く）の発症日に基づく流行曲線は以下のとおり。

※縦軸は症例数、横軸は疫学週。直近の症例数は今後増加する可能性がある。



国内診断例のうち、大阪府症例を■で示した。

2023年6月時点では東京都を含む関東地域からの報告が過半数を占めている。

3. インフルエンザ

インフルエンザ・レファレンス等関連会議

2023年6月29／30日 オンライン開催

2023/24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

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

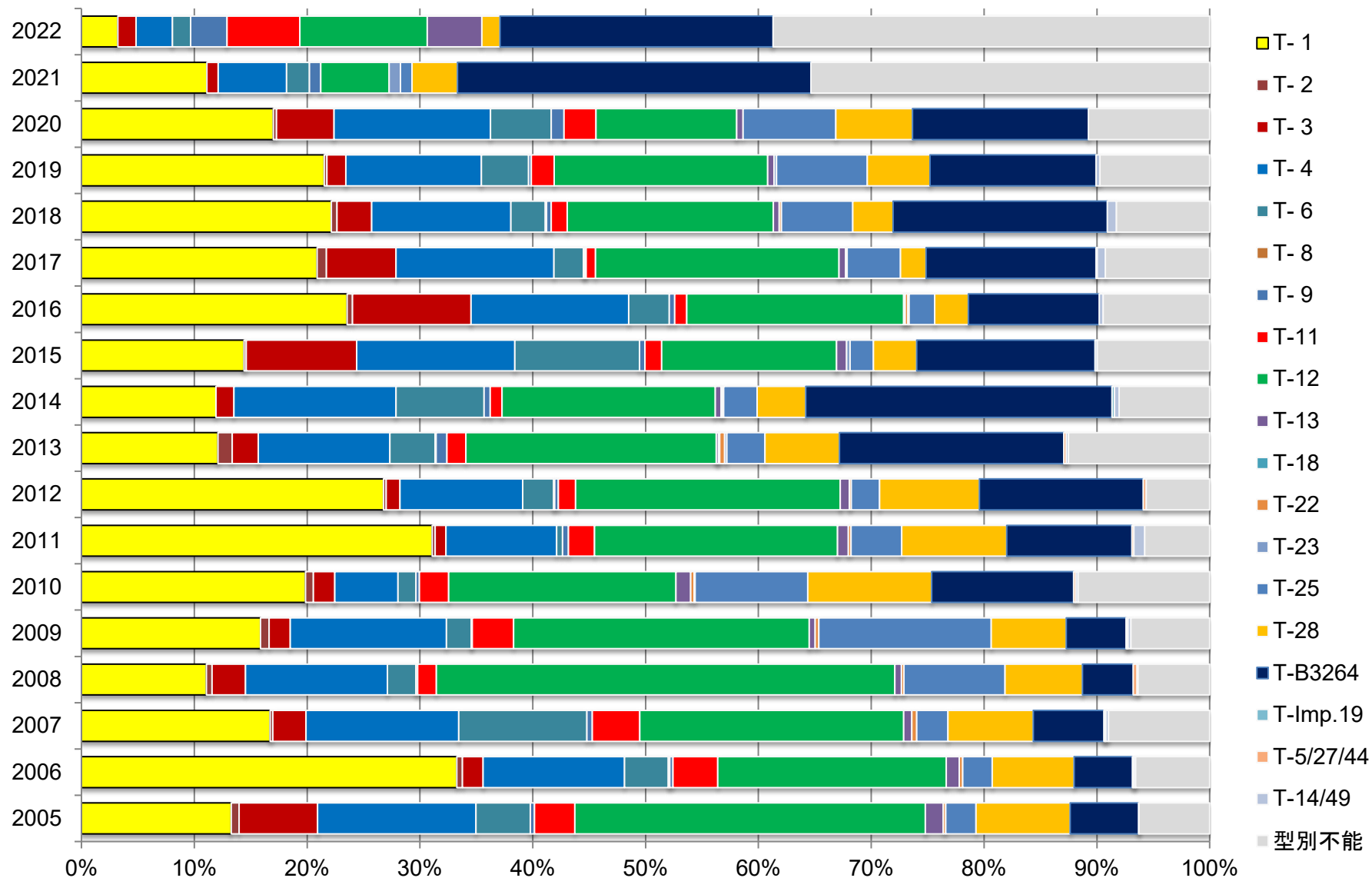
- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

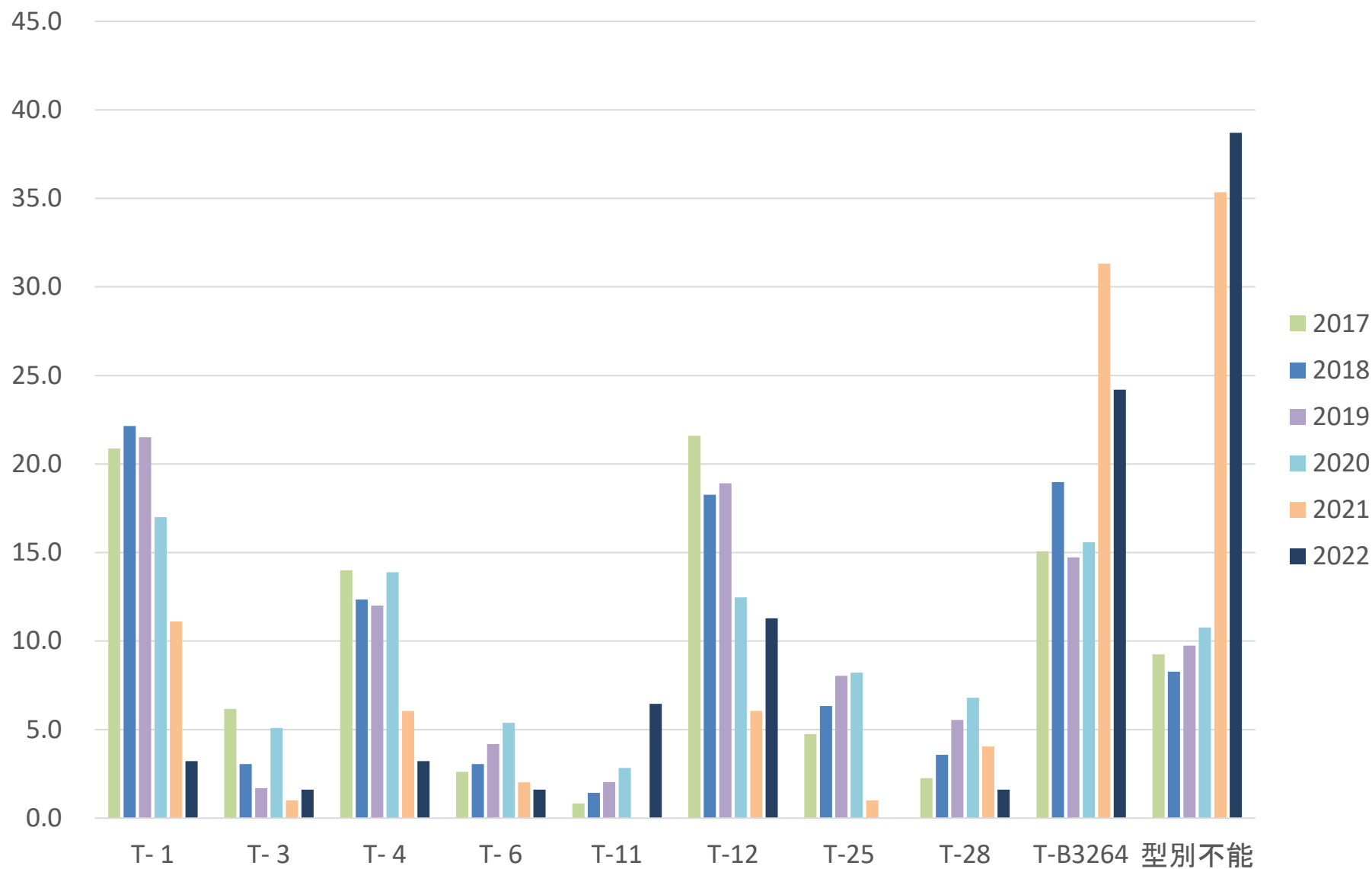
- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

咽頭炎由来全国集計(2005-2022)分離比率棒グラフ



全国集計(2017-2022)比率年変化棒グラフ



5. カンピロバクター

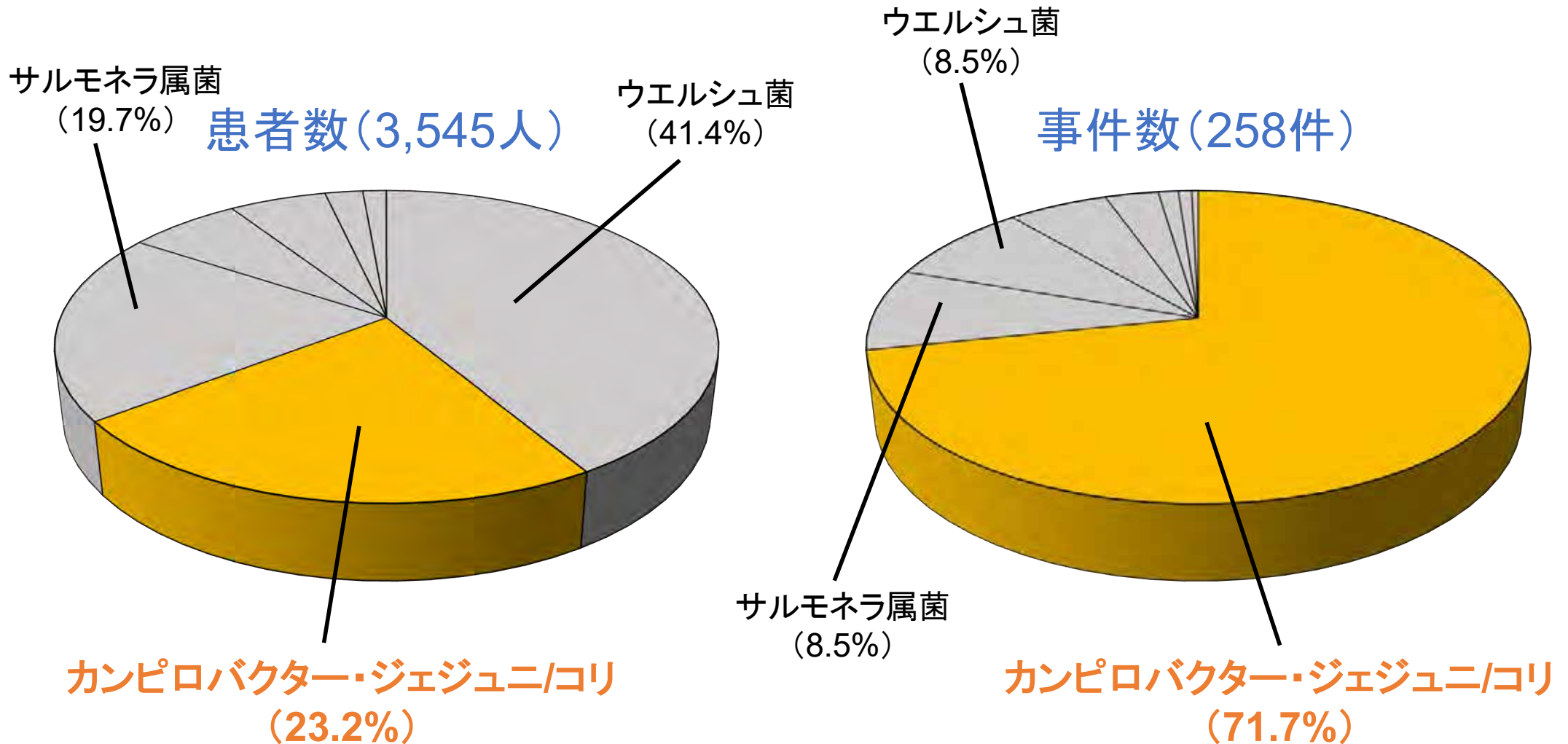
令和5年5月29日(月)10時~12時
Zoom Online

衛生微生物技術協議会
令和5年度リファレンスセンター会議
カンピロバクター

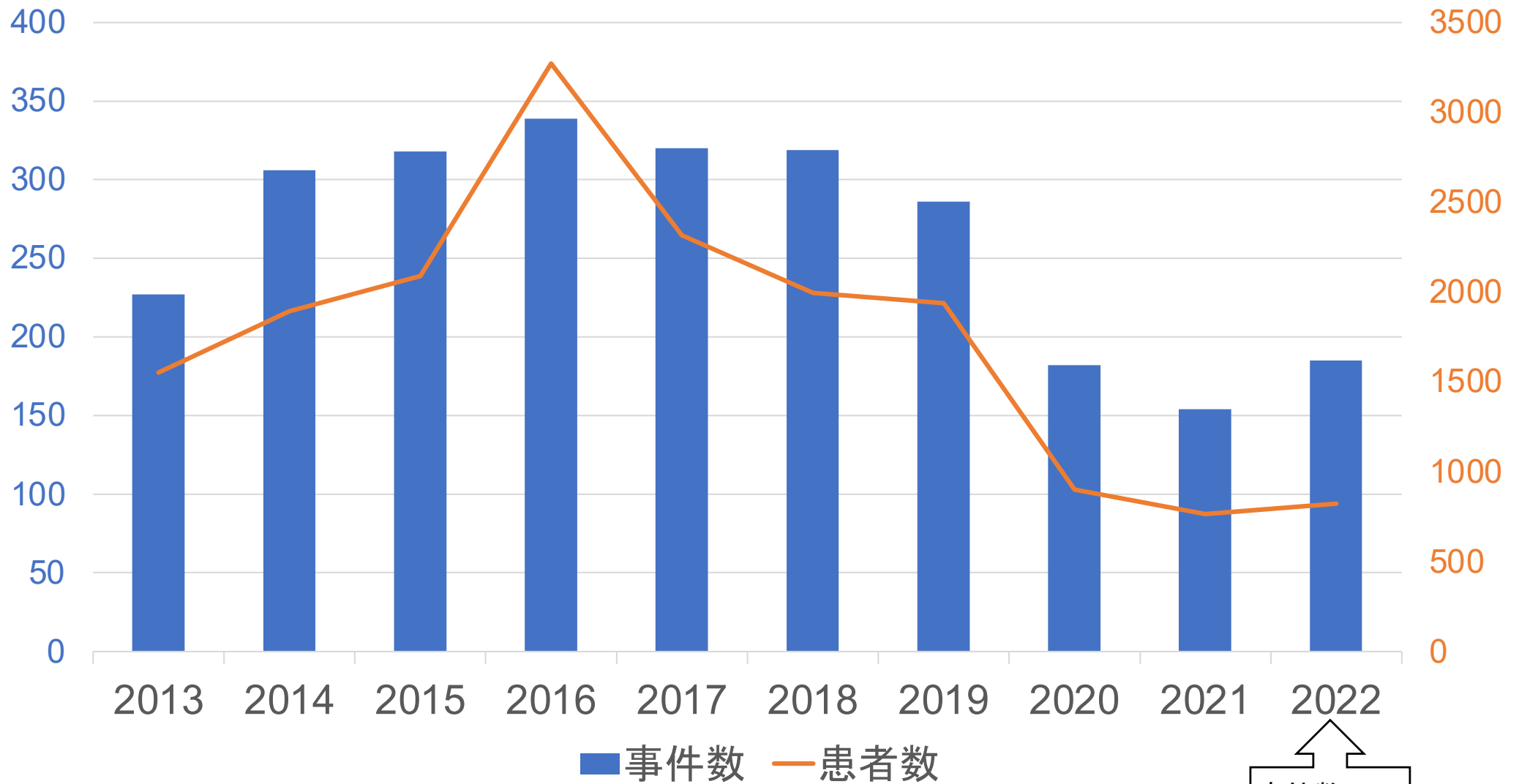
議題

- センター担当者の確認と紹介
- 前年の食中毒発生状況について(報告)
- 前年度の集計結果について(報告)
- 今後の課題について
- 本年度の計画案
- 各リファレンスセンターからの情報提供、
質疑応答

2022年 細菌性食中毒の発生状況



カンピロバクター食中毒の発生動向



事件数: 185
患者数: 822

データ出典: 厚生労働省食中毒統計資料

令和5年1月 三重県内飲食店
有症者42名(喫食者87名)

令和4年度の活動報告

①薬剤感受性試験: *C. jejuni* 散発事例由来の計124株を対象にしてEU-CAST(4機関)もしくはCLSI(2機関)の手法に基づき、5剤(EM、CAM、TC、CPFX、ABPC)について実施した。このうち判定基準が定められている3剤(EM、TC、CPFX)についての結果を示す。

☞シプロフロキサシン耐性は49株(39.5%)、テトラサイクリン耐性は31株(25%)となり、昨年と同様な結果を認めた。

☞エリスロマイシン耐性株は検出されなかった。

☞クラリスロマイシン耐性株は2株(1.6%)であった。

☞アンピシリン耐性株は18株(14.5%)であった。

種	EM	TC	CPFX	菌株数	頻度(%)
<i>C. jejuni</i>	S	S	S	64	51.6
計124株	R	S	S	0	0.0
	S	R	S	11	8.9
	S	S	R	29	23.4
	R	R	S	0	0.0
	S	R	R	20	16.1
	R	R	R	0	0.0
<i>C. coli</i>	S	S	S	2	33.3
計6株	R	S	S	0	0.0
	S	R	S	0	0.0
	S	S	R	2	33.3
	R	R	S	0	0.0
	S	R	R	0	0.0
	R	R	R	2	33.3

*C. coli*ではEM+CAMの二重耐性株が1株検出された

②Penner遺伝子型別: *C. jejuni* 散発事例由来の計124株を対象に実施した。

☞昨年度と同様にgB群が最も多く、gD群 > gG群 > gO群 > その他と続いていた。

Penner 遺伝子型	対応する HS抗原型	菌株数 (頻度)	薬剤耐性株数(頻度)			
			EM	TC	CPFX	TC + CPFX
gB 群	HS:2	28 (22.6%)	0	3 (10.7%)	4 (14.3%)	11 (39.3%)
gD 群	HS:4/13/16等	21 (16.9%)	0	1 (4.8%)	4 (19.0%)	1 (4.8%)
gG 群	HS:8/17	15 (12.1%)	0	0	2 (13.3%)	1 (6.7%)
gO 群	HS:19	9 (7.3%)	0	0	5 (55.6%)	1 (11.1%)
gC 群	HS:3	6 (4.8%)	0	1(16.7%)	1(16.7%)	1(16.7%)
gE 群	HS:5	6 (4.8%)	0	2 (33.3%)	3 (50%)	0
gI 群	HS:10	6 (4.8%)	0	0	4 (66.7%)	0
gY 群	HS:37	6 (4.8%)	0	0	1 (16.7%)	2 (33.3%)
gR 群	HS:23/36/53	5 (4%)	0	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)
gA 群	HS:1	4 (3.2%)	0	0	1 (25%)	0
gU 群	HS:31	3 (2.4%)	0	0	0	1 (33.3%)
gZ6 群	HS:55	3 (2.4%)	0	1(33.3%)	1 (33.3%)	0
gF 群	HS:6/7	2 (1.6%)	0	0	0	1 (50%)
gK 群	HS:12	1 (0.8%)	0	0	0	0
gS 群	HS:27	1 (0.8%)	0	0	1 (100%)	0
gZ7 群	HS:57	1 (0.8%)	0	0	0	0
型別不能	-	7 (5.6%)	0	2 (28.6%)	0	0
計		124	0	11 (8.9%)	29 (23.4%)	20 (16.1%)

■ GBS発症リスクが高い血清群: O群を筆頭に、A群、B群、D群、R群、Z2群(HS:41)

J Clin Microbiol 2005 43: 335-339; *Clin Microbiol Infect* 2015 21: 852 e1-852 e9

リファレンスセンター以外への陽性コントロールの配布、配布機関からのデータ提供。
 8機関のうち3機関:2019から2022年に分離された164株。

☞ 上位3遺伝子型はリファレンスセンターの結果と同じであった。

☞ その他は多少の違いが見られた。

Penner 遺伝子型	対応する HS抗原型	リファレンス 菌株数 (頻度)	配布機関 菌株数 (頻度)
gB 群	HS:2	28 (22.6%)	44 (26.8%)
gD 群	HS:4/13/16等	21 (16.9%)	23 (14%)
gG 群	HS:8/17	15 (12.1%)	14 (8.5%)
gO 群	HS:19	9 (7.3%)	↓8 (4.9%)
gC 群	HS:3	6 (4.8%)	↓2 (1.2%)
gE 群	HS:5	6 (4.8%)	↑7 (4.3%)
gI 群	HS:10	6 (4.8%)	↓3 (1.8%)
gY 群	HS:37	6 (4.8%)	↑12 (7.3%)
gR 群	HS:23/36/53	5 (4%)	↓1 (0.6%)
gA 群	HS:1	4 (3.2%)	↑8 (4.9%)
gU 群	HS:31	3 (2.4%)	↓1 (0.6%)
gZ6 群	HS:55	3 (2.4%)	↓1 (0.6%)
gF 群	HS:6/7	2 (1.6%)	↑3 (1.8%)
gK 群	HS:12	1 (0.8%)	↑3 (1.8%)
gS 群	HS:27	1 (0.8%)	↓0
gZ7 群	HS:57	1 (0.8%)	↑4 (2.4%)
型別不能	-	7 (5.6%)	↑20 (12.2%)
計		124	164

問い合わせの例

Q:複数の増幅産物が検出された場合は
 どう判定すれば良いか？

A:型別不能と判定する。余裕があれば、
 血清型別を行うか、増幅産物をゲルから
 切り出し・精製してシーケンシングする。

③mP-BIT法:20個の遺伝子の有無をPCR判定することによる型別法(理論的には $2^{20}=10^{6.02}$ の型が存在)。
昨年度から全センターで*C. jejuni*散発事例由来の計124株を対象に実施した。このうち、主要なPenner遺伝子型を有する株の結果のみを示す。

☞同一のPenner遺伝子型を有する株が細分化された。

Penner遺伝子型	菌株数	mP-BIT型	菌株数(頻度)	分離センター数
gB 群	28	15-55	9(32.1%)	2
		79-311	7(25%)	2
		62-255	3(10.7%)	1
		138-181	2(7.1%)	1
		その他7型	7	4
gD 群	21	4-288	6(28.6%)	3
		11-55	5(23.8%)	4
		10-53	2(9.5%)	1
		139-23	2(9.5%)	1
		その他6型	6	4
gG 群	15	56-53	13(86.7%)	4
		10-55	1(6.7%)	1
		11-55	1(6.7%)	1
gO 群	9	0-260	4(44.1%)	4
		0-388	2(22.2%)	2
		64-4	2(22.2%)	1
		8-260	1	1
gC 群	6	10-53	2(33.3%)	1
		11-55	2(33.3%)	1
		10-21	1(16.7%)	1
		75-55	1(16.7%)	1

薬剤耐性	菌株数	mP-BIT型	菌株数(頻度)	分離センター数	
TC	11	15-55	2(18.1%)	1	全てgB群
		その他9型	9	5	
CPFX	26	4-288	4(15.4%)	1	全てgD群
		0-260	3(11.5%)	1	全てgO群
		62-255	3(11.5%)	1	全てgB群
		0-388	2(11.5%)	1	全てgO群
		58-63	2(7.7%)	1	全てgI群
		62-63	2(7.7%)	1	全てgG群
		その他10型	10	5	
TC + CPFX	26	79-311	7(26.9%)	2	全てgB群
		その他19型	19	4	

今後の課題と対策

試験項目	目的	課題	対策
薬剤感受性	薬剤耐性プロファイル を把握するとともに、 情報提供する	<u>試験法が統一されていない</u> - CLSI: 既製の培地を使用可能、プロトコール有料公開 - EU-CAST: 培地を調製する必要あり、プロトコール無料公開	CLSIもしくはEU-CASTのどちらか簡易な方に統一する(CLSIの方がベター?)
		<u>推奨される治療薬に対する感受性試験が不足している</u> - 世界的にキノロン耐性が進行 - 第一選択薬であるマクロライドに対する耐性も増加傾向	- マクロライド試験を追加する - 必要に応じて他の試験を取りやめる(APBCは必要か?)
Penner遺伝子型	Penner血清型とGBS リスクを簡易的に把握する	<u>5~10%程度の型別不能株が出現</u>	- 血清型別を実施 - 増幅産物をシーケンシング - ゲノム解析(既知cps遺伝子領域との比較)
mP-BIT型	20個の遺伝子の有無 を判定することにより、 菌株を簡易的に識別する	<u>ゲノムレベルの解析に比べて識別能が低い+α?</u>	MLSTもしくはcgMLST/SNP解析を実施

令和5年度の計画(案)

- CLSI最新版の入手(感染研)と日本語プロトコルの作成(感染研、全センター)
- マクロライド感受性・耐性対照株の取得(感染研)、表現型の確認(全センター)
- 試験薬剤の決定(感染研、全センター):EM、TC、CPFXIに加え、AZMとCAMを試行
→マクロライド試験はEMの判定基準に準じて実施

散発事例由来 *C. jejuni* 30株 + *C. coli* ? 株(株数は目安、分離数に応じて調整)



全センター

薬剤感受性試験

全センター

Penner遺伝子型(識別度低・一次スクリーニング)

全センター

mP-BIT型(識別度中・二次スクリーニング)

実施可能なセンター + 感染研

MLST型(識別度中・国際的基準)

感染研(広域で優勢な型、要警戒の耐性株等)

ゲノム解析(識別度高)

優勢株および薬剤耐性株の
特性把握

6. 結核

2022年度 結核レファレンスセンター会議

公益財団法人 結核予防会結核研究所
村瀬 良朗、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」

本プレゼンテーションのトピック

昨年度の活動報告

- 結核菌VNTR検査の外部精度評価
- 結核菌ゲノム解析の外部精度評価

本年度の活動案

- 研修
- EQA

2022年度VNTR分析外部精度評価の概要

- 2022.11.4に地方衛生研究所へ開催の案内
- 58施設より参加の回答（2021年度 [n=61]）
- 2022.11.21に検体DNAを参加施設へ送付
- 報告期限(2023.1.31)までに57施設から報告、その後、1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(2023.3.30)

外部精度評価で使用した報告シート

結核菌遺伝子型別外部精度評価(2022年度)_分析結果シート																								
施設名			担当者			分析方法 (アガロースゲル電気泳動、自動シーケンサー、チップ電気泳動[QIAxcel,Multina]、その他具体的な方法を記載ください)																		
JATA No.															HV			Supply						
ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	0424	MIRU 10	1955	2074	2163b	2372	MIRU 26	3155 (QUB 15)	MIRU 31	3336	4052 (QUB2 6)	4156	1982 (QUB 18)	2163a	ETR-A	3232	3820	4120	3690 (Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 (Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
入力	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2	5	1	3' (353bp)	2	2	4
内部精度管理株 A	4	5	3	3	2	4	10	4	5	10	8	5	10	9	4	9	5	8	3	3	2	2	4	2
内部精度管理株 B	2	2	0	3	4	2	5	4	3	20	8	3	0	5	2	15	3	3	1	2	4	2	3	3
外部精度評価株 1																								
外部精度評価株 2																								
外部精度評価株 3																								

1. 報告はこのシートを使用してください。マクロで集計するため、入力場所等を変更しないで下さい。H37Rv、内部精度管理株の行は消去しないで下さい。
2. VNTR分析結果を半角英数字で入力してください。施設名、担当者、分析方法を記入して下さい。
3. 本エクセルファイルのファイル名を次の書式へ変更して下さい: VNTR外部精度評価用エクセルシート2022_施設名_自治体名.xlsx
4. 報告メールの題名を次の書式として下さい : 施設名_自治体名_VNTR-EQA_2022分析結果
5. vntr_eqa_2022@jata.or.jpまで送付ください(※切:2023年1月31日(火)17:00)

2022年度 VNTR外部精度評価の結果

各施設で用いられていたDNA分子量の測定法 (2022年度, 58施設)



QIAxcel,
n=3 (5.2%)
1↑@2021

TapeStation,
n=1 (1.7%),

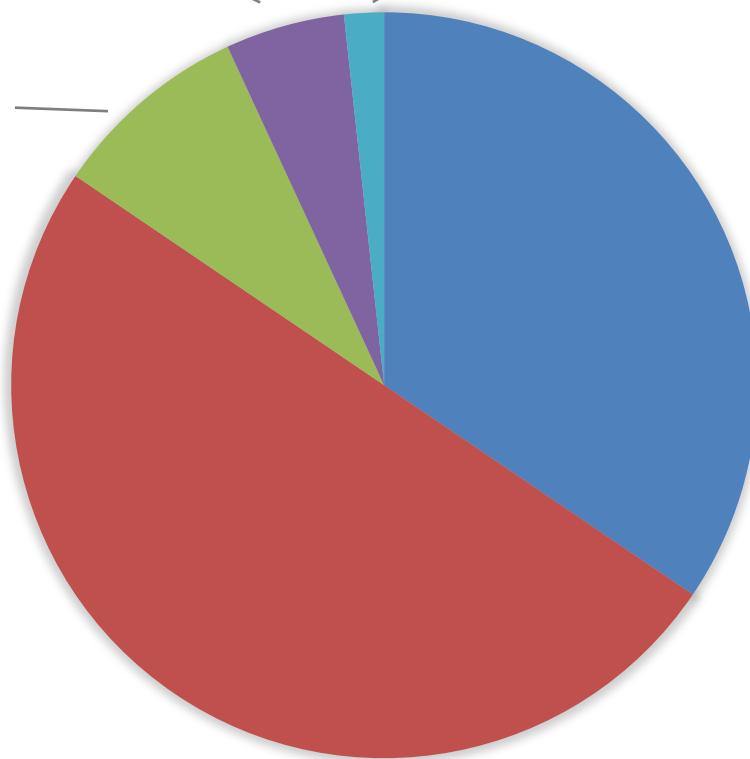


MultiNA,
n=5 (8.6%)

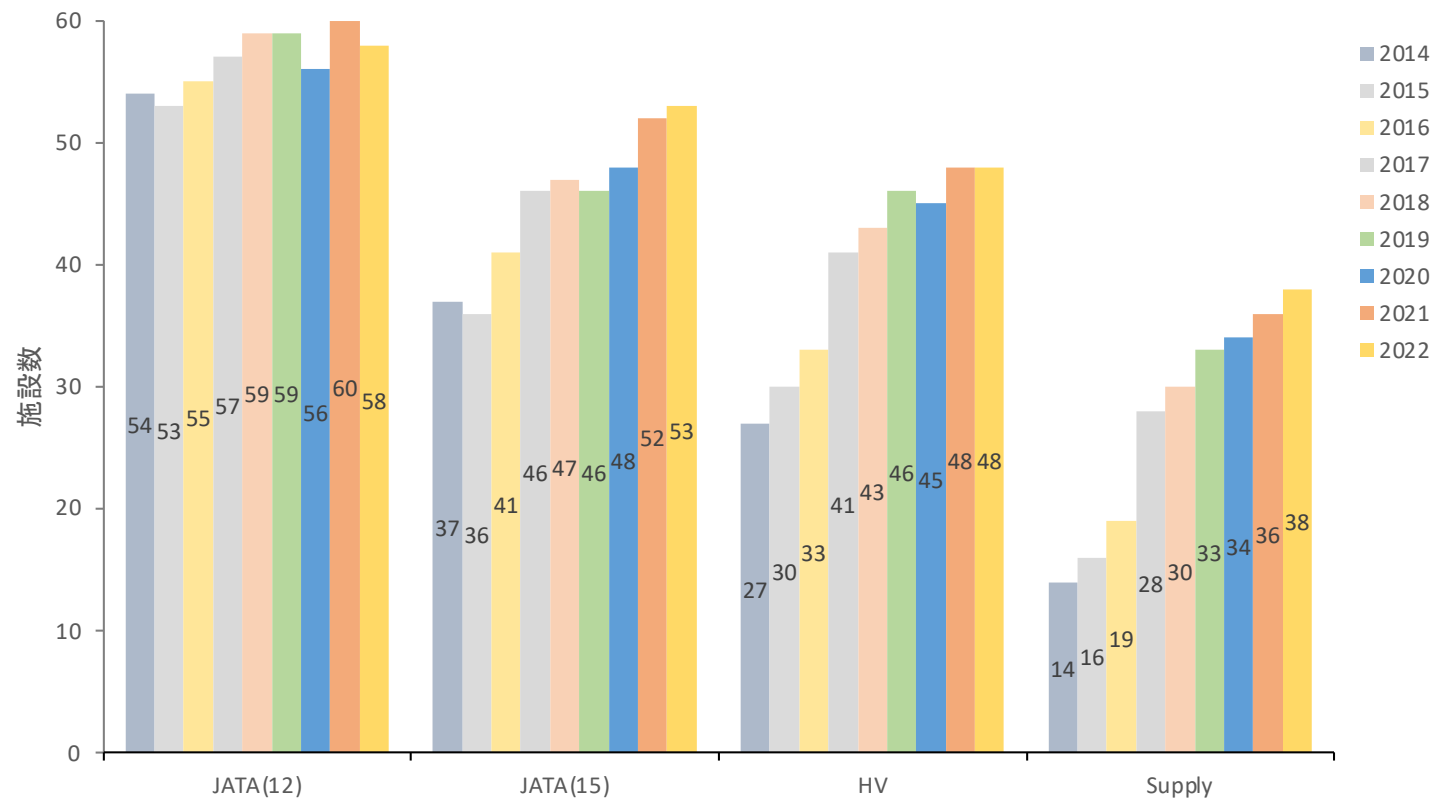
アガロースゲル,
n=20 (35%), 6↓@2021



シーケンサー,
n=29 (50%), 4↑ @2021



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

2022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)	2022 (58施設)
完全一致 (n, [%])	36 (67%)	49 (92%)	48 (87%)	40 (70%)	55 (93%)	53 (90%)	49 (88%)	54 (90%)	53 (91%)
1 locus違い (n, [%])	7 (13%)	1 (2%)	5 (9%)	12 (21%)	3 (5%)	2 (3%)	3 (5%)	6 (10%)	2 (3%)
2 loci以上の 違い (n, [%])	11 (20%)	3 (6%)	2 (4%)	5 (9%)	1 (2%)	4 (7%)	4 (7%)	0 (0%)	3 (5%)

- 2022年度は91%の施設が完全一致、3%が1 locus違い、2 loci以上異なった施設は5%
- 2022年度は例年と同様の良好な結果であったが、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

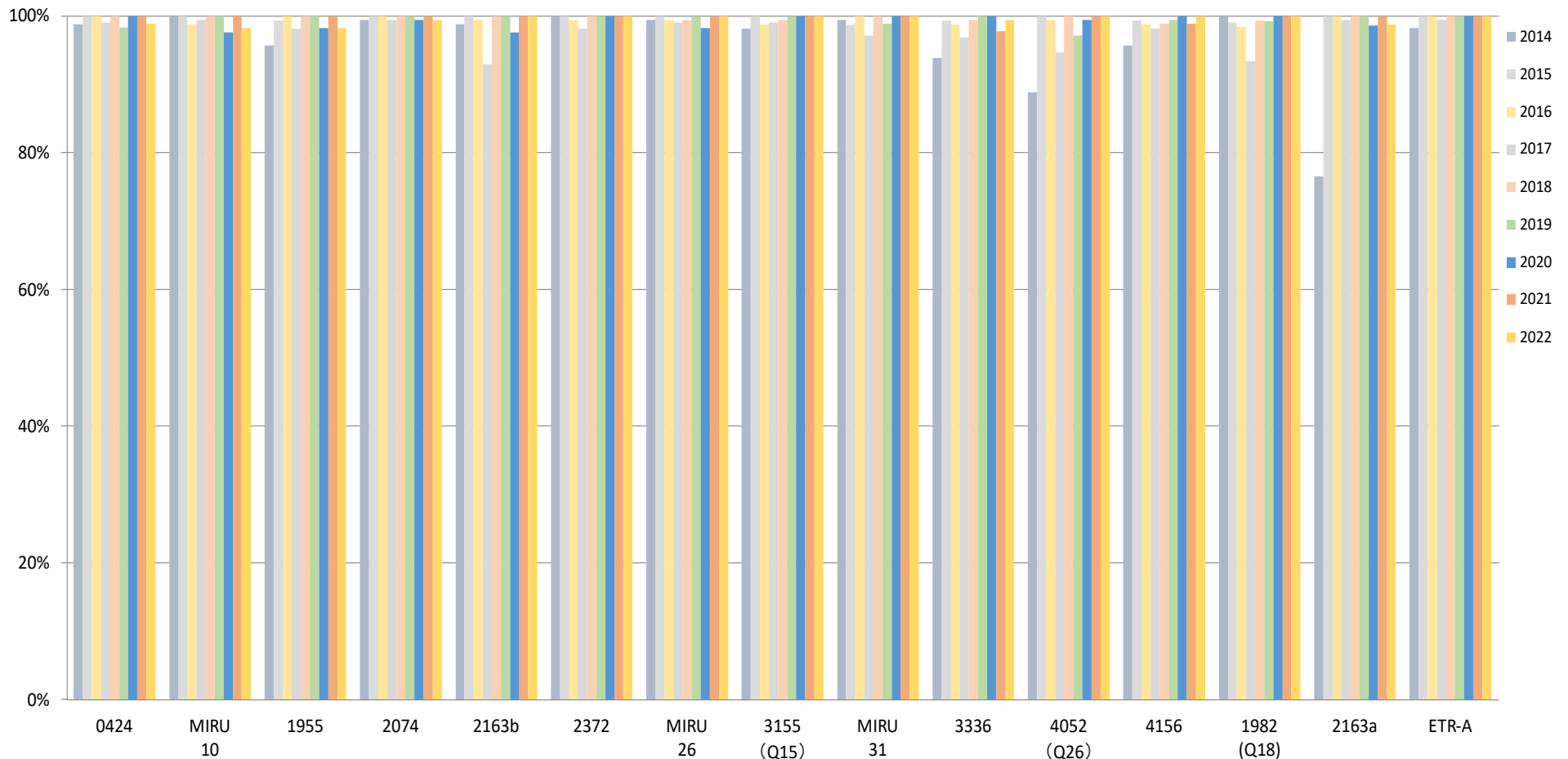
分子量測定法とローカスセットの正答率(2022)

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(%)
Agarose	20	99.6	16	99.3	13	95.7	7	100
Sanger	29	99.7	29	100	28	98.4	27	100
MultiNA	5	98.3	4	100	3	100	2	100
QIAxcel	3	100	3	96.3	3	96.3	1	100
TapeStation	1	97.2	1	100	1	100	1	100

- 最も主要なSangerとAgaroseは、大半のローカスセットで良好な成績。高分子領域が多いHVについてはSangerの成績が良好。
- MultiNA、QIAxcel、LabChipの成績は近年改善している。一部のローカスセットで正答率が低下する傾向。(複数の方法を併用しているため)

各locusにおける正答率(%)



2022年度における1 locusあたりの正答率は98.3-100%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

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)
- 自動シーケンサー設定用ファイルの配布

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

その他

- VNTR法、ゲノム解析に関する問い合わせ対応
- コントロール検体DNAの配布

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌培養科 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_{loci}-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_{loci}-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_{loci}-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。

まとめと展望

- 2022年度は58施設に対して外部精度評価を実施(9回目)
- 2022年度の結果では、3株のJATA 12プロファイルが完全一致した正答施設は53施設(91%)
- 手法別では、昨年度、初めてSanger採用施設数が最も多くなった(50%)
- 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

本プレゼンテーションのトピック

昨年度の活動報告

- 結核菌VNTR検査の外部精度評価
- 結核菌ゲノム解析の外部精度評価

本年度の活動案

- 研修
- EQA
- その他

2022年度 結核菌ゲノムEQAの概要

- 結核レファレンスセンター関連会議にて、ブロック代表6施設を対象としたゲノムEQAの実施を提案し、了承していただく (2022.6.15)
- 3日間のゲノム研修会を実施 (2022年10月)
- EQA用のiSeqカートリッジ試薬等を送付 (2023.1月)
- EQA用の結核菌8株を送付 (2023.1.30)
- 報告期限(2023.3.15)までに3施設から報告、2023.4.5までに全ての施設から報告があった

ゲノムEQAへの参加協力をお願いした施設

- 北海道東北新潟：山形県衛生研究所
- 関東甲信静：神奈川県衛生研究所
- 東海北陸：富山県衛生研究所
- 近畿：大阪健康安全基盤研究所
- 中国四国：岡山県環境保健センター
- 九州：大分県衛生環境研究センター

参加施設へ結核研究所より提供した研究材料

- 外部精度評価用検体 結核菌8株
- 内部精度管理用 ウシ型結核菌BCG Tokyo 1株
- ゲノム抽出用試薬
 - ガラスビーズ、PCIAA、phase lockゲル、etc
- ゲノム解読用試薬
 - QIAseq FX UDI (24)、iSeqカートリッジ
- SOPドラフト版等の手順書

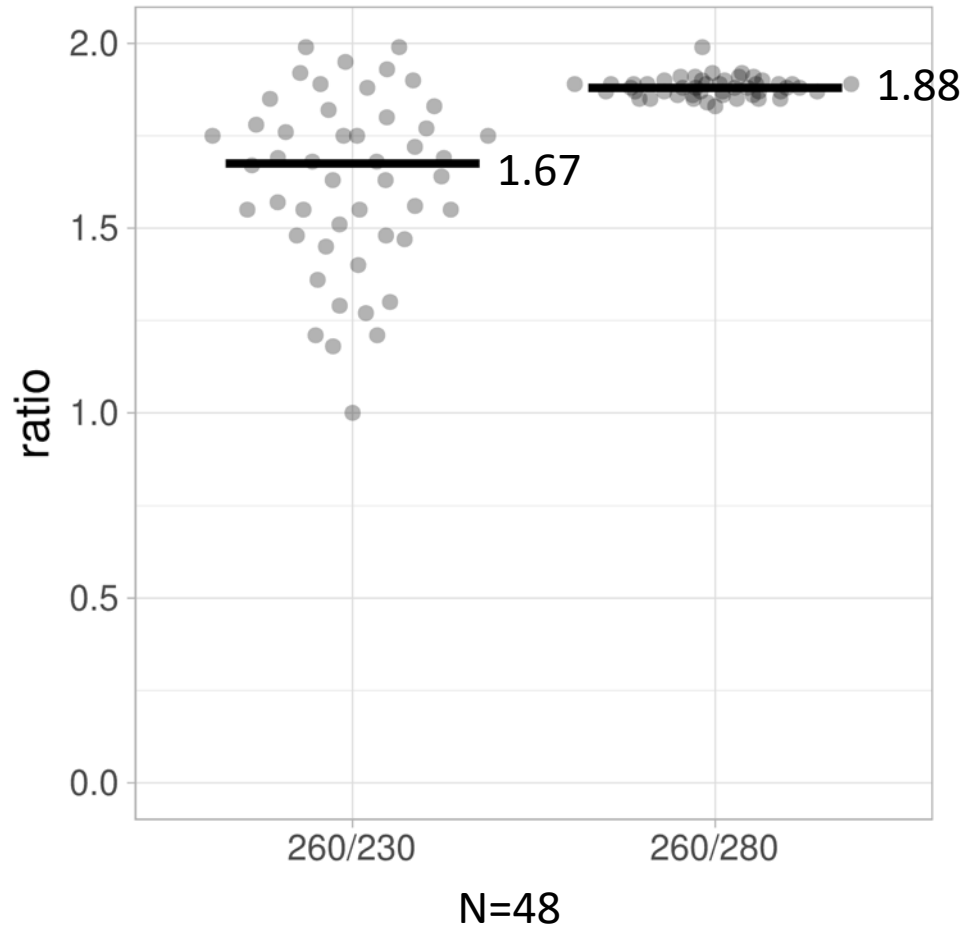
ゲノムEQAのワークフロー

検査工程		所要時間 目安	参照	備考
1	クロロホルムビーズ 破 砕法	0:40	SOP 5.1ゲノムDNAの調製	
2	PCIAA抽出	1:30	SOP 5.1ゲノムDNAの調製	
3	精製後DNA濃度測定	0:20	SOP 5.1ゲノムDNAの調製	
4	QIAseq FX ライブラリー調 製	3:00	SOP 5.2.1 ゲノムの断片化、から 5.2.4 ライブラリーの増幅	
5	ライブラリー収集	0:10	SOP 5.2.5 ライブラリーのpooling	
6	ゲル電気泳動精製	1:30	SOP 5.2.6 ライブラリーのサイズ分画	
7	カラム精製	1:00	SOP 5.2.7 ライブラリーのアガロースゲル精製	
8	ライブラリー濃度測定	0:30	SOP 5.3 ライブラリーの定量	
9	RUN	1 – 2 days	SOP 5.5 illumina シーケンサーのラン	iSeqの場合は18時間 程度
10	AMiGA解析によるコンタミ チェック	サーバーの込み 具合による	結核菌ゲノム解析フローチャート 結核菌比較ゲノム解析の手引き TB-profilerの使用法	TGS-TB comparison に数日程度かかる場 合がある
11	TGS-TB解析			
12	TB-profiler解析			
13	結果報告と抽出DNAの送 付		返送リスト参照	

EQAで評価対象とした項目

- ゲノムDNAの収量、品質、分子量
- 8件体の解析に要したiSeqラン数、ランクオリティ
- *M.tuberculosis*/*M.avium*混在の検知
- Species, Lineage, sub-lineageの同定
- 薬剤感受性予測と変異遺伝子の同定
- 株間の遺伝学的関係性の可視化(ハプロタイプ・ネットワーク)

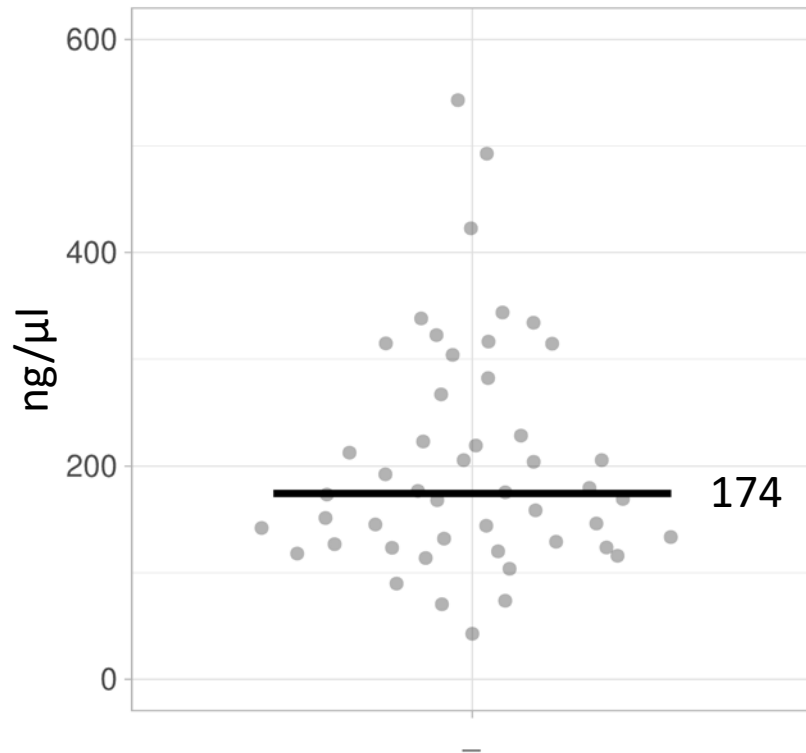
gDNAのQC (1)



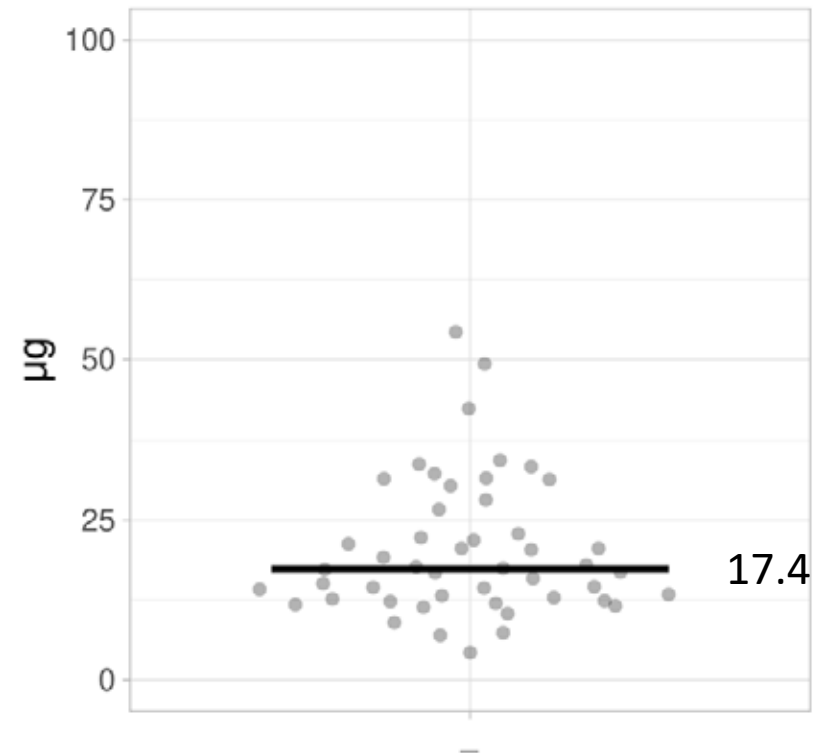
- SOPに記載されているガラスビーズ・クロロホルム抽出法を用いて8検体よりゲノムDNAを精製
- 260/280は良好な値でありばらつきが少ない
- 260/230は半数程度が1.7を下回る
→フェノールの混入が疑われるので、クロロホルム処理を念入りに実施するか、クロロホルム処理を追加すると良い
(実際にはイルミナ・シーケンスに問題ない)

gDNAのQC (2)

濃度



収量



QIAseq FX DNA library preparation kitを用いたライブラリ調製に必要なとされる十分な濃度、収量が得られている

参加施設におけるiSeqラン結果の概要

Lab_ID	A		B		C		D			E			F			
RUN回数	2		2		2		3			3			4			
Ru名	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2	D-1	D-2	D-3	E-1	E-2	E-3	F-1	F-2	F-3	F-4
%Q30 Read1	92.8	92.6	94.1	93.8	93.6	93	88.8	91.2	91.9	92.8	94.1	93.7	88.6	92.5	91.4	92.1
%Q30 Read2	90.3	89.7	92.7	91.4	92.5	91.3	84.9	88	89.7	91.8	92.7	92.4	84.3	88.2	88.9	89.5
%Clusters PF	68.5	72.9	73.9	70.4	72.2	72.1	56.5	70.2	72.2	70.8	69.3	71.8	63.7	69.1	66.4	68.7
%Occupancy	87.8	91.5	87.7	88.3	86.4	88.2	88.4	93.4	88.5	85.2	81.5	86.8	90.8	89.7	90.1	88.2
Projected Total Yield	1.7	1.8	1.8	1.7	1.8	1.8	1.4	1.7	1.8	1.7	1.7	1.8	1.6	1.7	1.6	1.7

- カバレッジx40以上を目標とした場合、結核菌8株の分析に要するラン数は2から4。手技が安定すれば1ランあたり解析可能株数は4株(or5株)が期待できる
- イルミナが保証するデータ出力量(>1.2Gb)とクオリティ(Q30が80%以上)を上回っている
- 1株当たりのデータ量： 中央値751万塩基、範囲189万-1553万塩基 （全てx40以上）

ゲノム解析の結果

Sample name	EQA2022-01	EQA2022-02	EQA2022-03	EQA2022-06	EQA2022-07	EQA2022-09	EQA2022-10	EQA2022-12
Species	M.tb	M.tb	M.tb	M.tb	M.tb	M.tb	M.tb	M.tb/M.avium
Lineage (Coll)	2.2.1	2.2.1	2.2.1	2.2.2	2.2.2	4.9	2.2.1	
spoligo	000000000003771	000000000003771	000000000003771	000000000003771	000000000003771	777777603760771	000000000003771	
Rifampicin						rpoB p.His445Arg	rpoB p.Ser450Leu	
Isoniazid	fabG1 c.-15C>T	fabG1 c.-15C>T	fabG1 c.-15C>T	inhA c.-154G>A	inhA c.-154G>A			
Ethambutol						embA p.Asp4Asn	embB p.Met306Val	
Pyrazinamide						pncA p.Trp68Arg	pncA c.452delT	
Streptomycin							rpsL p.Lys88Arg	
Fluoroquinolones							gyrA p.Asp94Gly	
Moxifloxacin							gyrA p.Asp94Gly	
Ofloxacin							gyrA p.Asp94Gly	
Levofloxacin							gyrA p.Asp94Gly	
Ciprofloxacin							gyrA p.Asp94Gly	
Aminoglycosides						rrs n.1401A>G		
Amikacin						rrs n.1401A>G		
Capreomycin						rrs n.1401A>G		
Kanamycin						rrs n.1401A>G		
Cycloserine								
Ethionamide	fabG1 c.-15C>T	fabG1 c.-15C>T	fabG1 c.-15C>T	inhA c.-154G>A	inhA c.-154G>A	ethA p.Arg279*	ethA c.1290dupC	
Clofazimine								
Para-aminosalicylic_acid							thyX c.-16C>T	
Delamanid								
Bedaquiline								
Linezolid								

- 全ての施設において、模擬M.avium混在検体よりM.aviumが検出 (AMiGA)
- TB-profilerによる解析結果についても大部分の項目で一致した結果が報告
 - Species, sub-lineage, 薬剤感受性プロファイルの予測は全て一致
 - spoligotypingとEthionamideのみ一部の施設より異なる結果が報告された

施設間で不一致が見られた項目の詳細

(1) spoligotyping profile (TB-profiler)

	Lab-A	Lab-B	Lab-C	Lab-D	Lab-E	Lab-F
EQA2022-01	0000000000003771	0000000000003771	0000000000003771	0000000000003771	000000000000 1771	0000000000003771
EQA2022-07	0000000000003771	0000000000003771	0000000000003771	000000000000 1771	0000000000003771	0000000000003771
EQA2022-10	0000000000003771	0000000000003771	0000000000003771	000000000000 1771	0000000000003771	0000000000003771

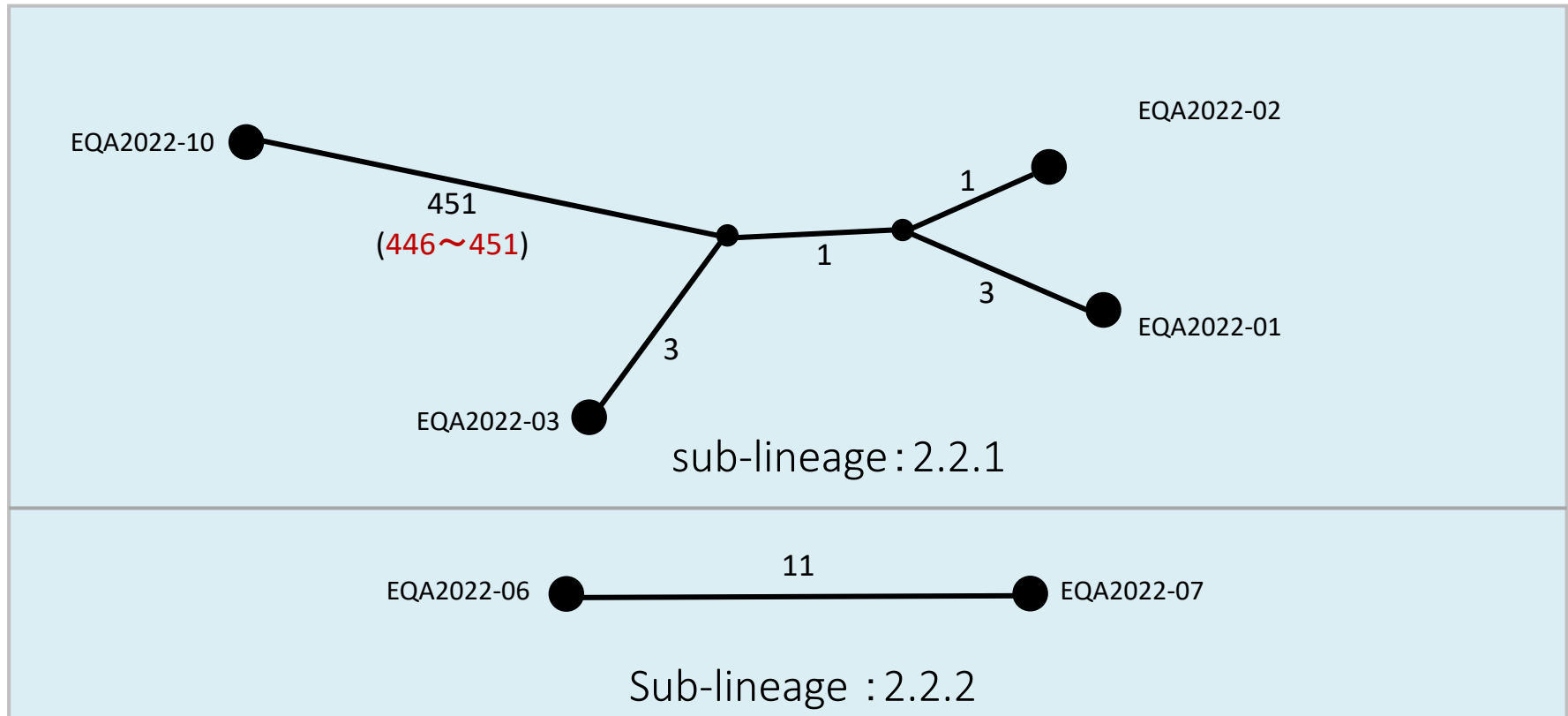
- 7株中3株において、1施設の結果が不一致
- 一部のsp配列の検出に失敗している

(2) EB の薬剤耐性変異 (TB-profiler)

	Lab-A	Lab-B	Lab-C	Lab-D	Lab-E	Lab-F
EQA2022-10	embA p.Asp4Asn	embA p.Asp4Asn	embA p.Asp4Asn	embA p.Asp4Asn	embA p.Asp4Asn	embA p.Asp4Asn / embB p.Asp328Tyr

- 7株中1株において、1施設の結果が不一致
- Lab-FではembA/embBのダブルミュートーションが検出されている

TGS-TB comparisonを用いた株間のゲノム比較解析



- Sub-lineageが一致した菌株について、TGS-TBを用いて株間の系統関係とゲノム差異(SNPs数)をネットワーク図として描画
- 評価対象となった6箇所の株間距離のうち、5箇所は施設間で完全一致、1箇所は446から451まで若干異なった→数SNPs程度であれば施設間の再現性は高い
- 尚、1施設はGenEpid-Jの機能不具合が発生したため、分析を実施できなかった

まとめ

- 6施設を対象にゲノムEQAを実施
- 全ての施設において十分な品質・量のゲノムDNAが得られた
- iSeqを用いた場合の解析株数は4株/ラン程度
- TGS-TBとTB-profilerによるゲノム解析の施設間再現性は高い
- 経験がなくても結核菌のゲノム解析は可能

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・溝腰朗人←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

2023年度の活動案(1)

VNTRとゲノム解析に関する研修を実施予定

2023 年度 抗酸菌検査個別研修 案内

研修の対象者

地方衛生研究所等において抗酸菌検査の研修を希望する者

受講定員

6 名

実施日程

2023 年 6 月 22 日（木）、23 日（金）

研修内容

- ・安全キャビネットの使い方、結核菌の取り扱い、保管、DNA 抽出
- ・結核菌の同定検査
- ・結核菌 VNTR 検査（PCR 反応、キャピラリーシーケンサーと GeneMapper を用いたコピー数の同定） 等

研修費用

33,000 円（税込）

宿泊

前日より結核研究所隣接の研修宿舎の利用が可能です。
研修宿舎利用料は 1,450 円 / 泊（税込）です。
研修宿舎を希望されない場合は、各自にて周辺宿泊施設を手配下さい。

申込み締切日

2023 年 5 月 24 日（水）

※応募者多数の場合は、申込内容等を考慮した選考を実施し、受講の可否をご連絡致します。

お問合せ
(公財)結核予防会結核研究所 抗酸菌部研修担当
TEL:042-493-5711、FAX: 042-492-4600
E-mail: mrc@jata.or.jp

2023 年度 結核菌ゲノム解析研修 案内

研修の対象者

地方衛生研究所等において結核菌ゲノム解析研修を希望する者

受講定員

6 名

実施日程

2023 年 9 月 13 日（水）14 日（木）、15 日（金）

研修内容

- (1) 講義
 - ・NGS 用ライブラリーの調製
 - ・イルミナシーケンサーの概要
 - ・結核菌比較ゲノム解析
- (2) 実習
 - ・結核菌からのゲノム DNA の精製と定量
 - ・NGS 用ライブラリーの調製
 - ・イルミナシーケンサーによる結核菌ゲノム解読
 - ・ゲノムデータの解析 (TGS-TB)

研修費用

55,000 円（税込）

宿泊

結核研究所隣の研修宿舎は利用できません。各自にて周辺の宿泊施設を手配下さい。

申込み締切日

2023 年 5 月 24 日（水）

※応募者多数の場合は、申込内容等を考慮した選考を実施し、受講の可否をご連絡致します。

お問合せ
(公財)結核予防会結核研究所 抗酸菌部研修担当
TEL:042-493-5711、FAX: 042-492-4600
E-mail: mrc@jata.or.jp

2023年度の活動案(2)

- VNTR-EQA
 - 予算的には実施可能
- ゲノム-EQA
 - 予算的には実施形式を変更することで実施可能（イルミナ試薬を結核研究所が負担して実施することは難しい）

7. アルボウイルス

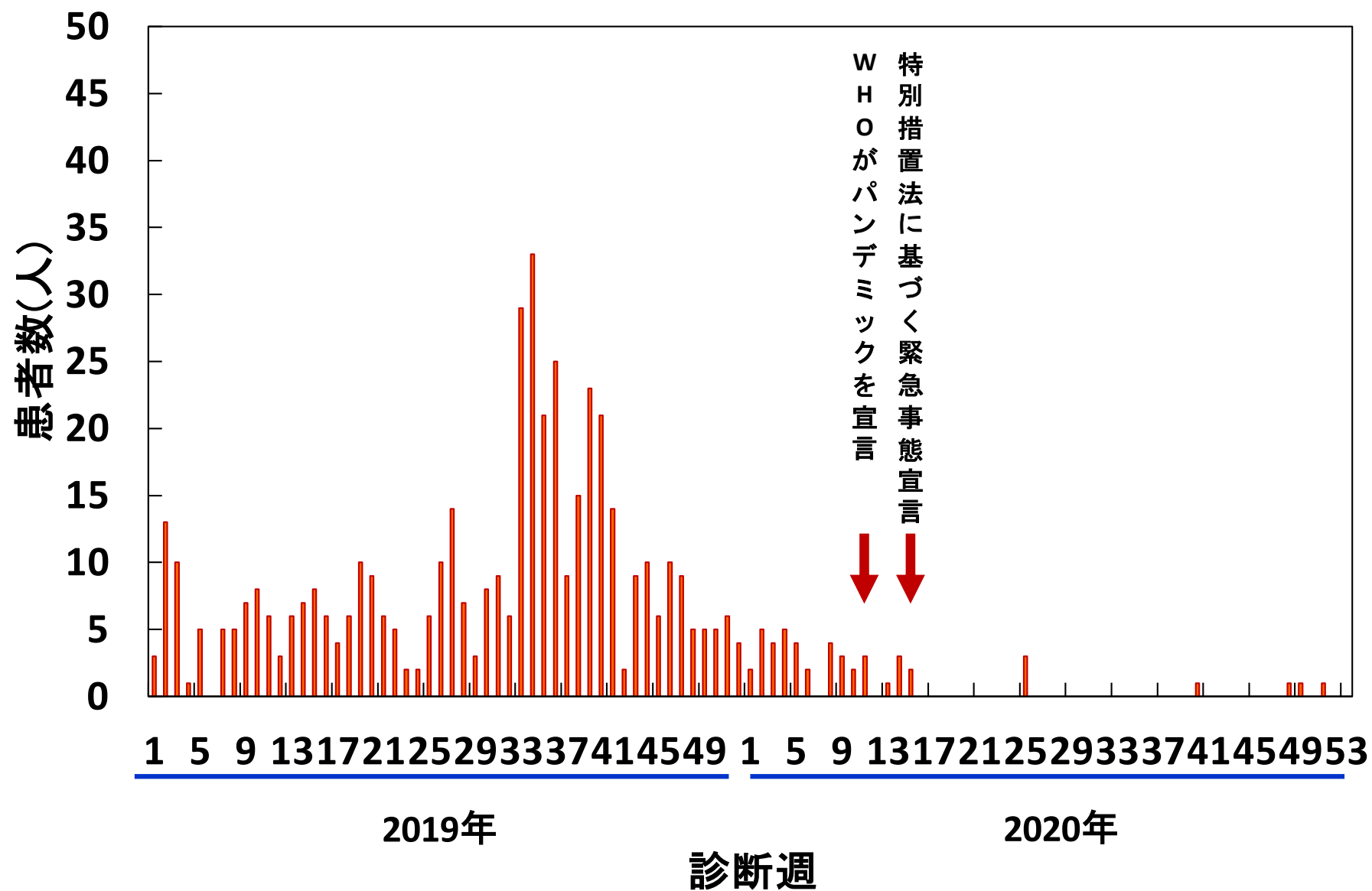
アルボウイルスレファレンスセンター関連会議

2023年12月6日(水)

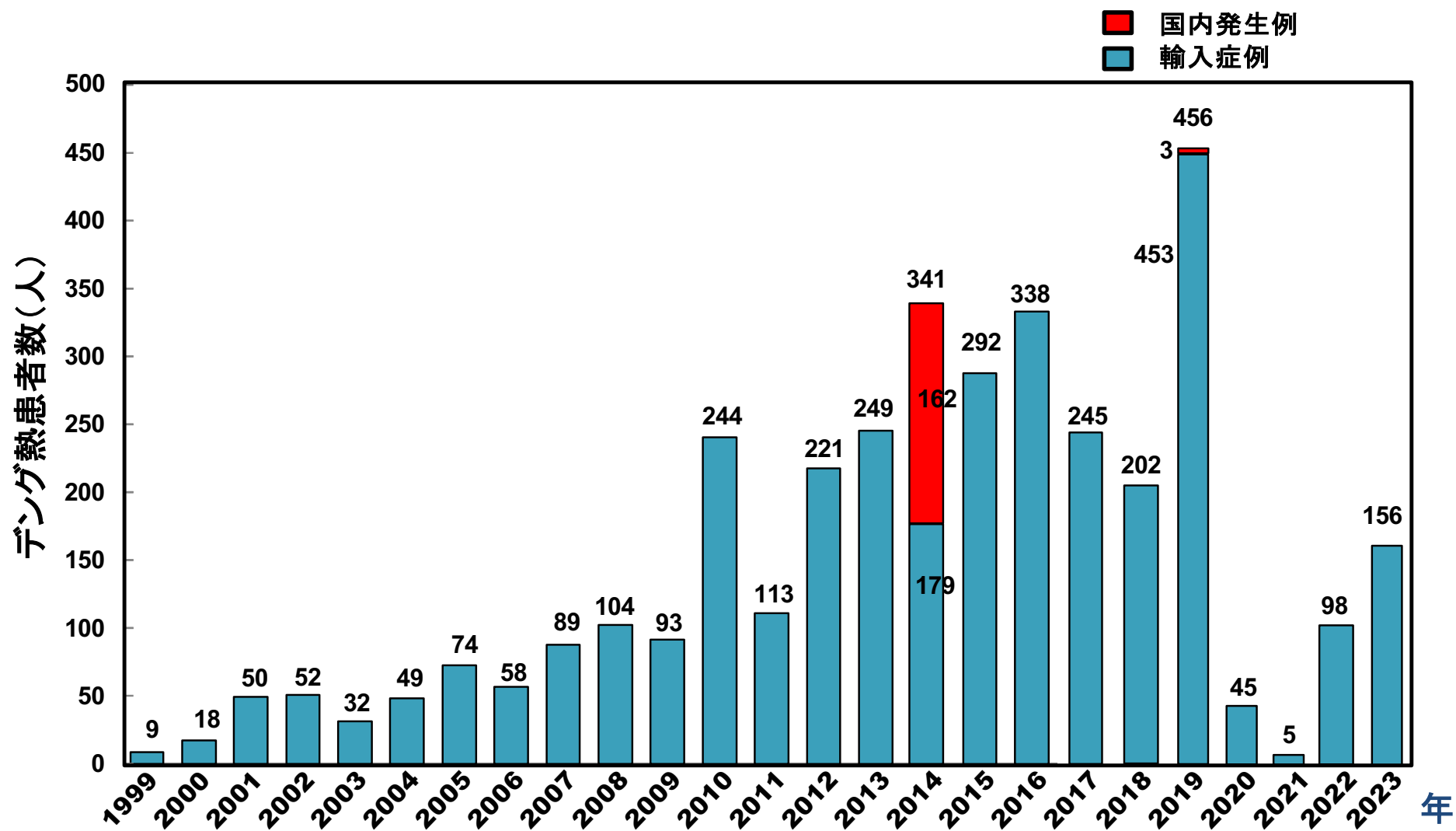
国立感染症研究所 ウイルス第一部

イム チャンガン
林 昌 宏

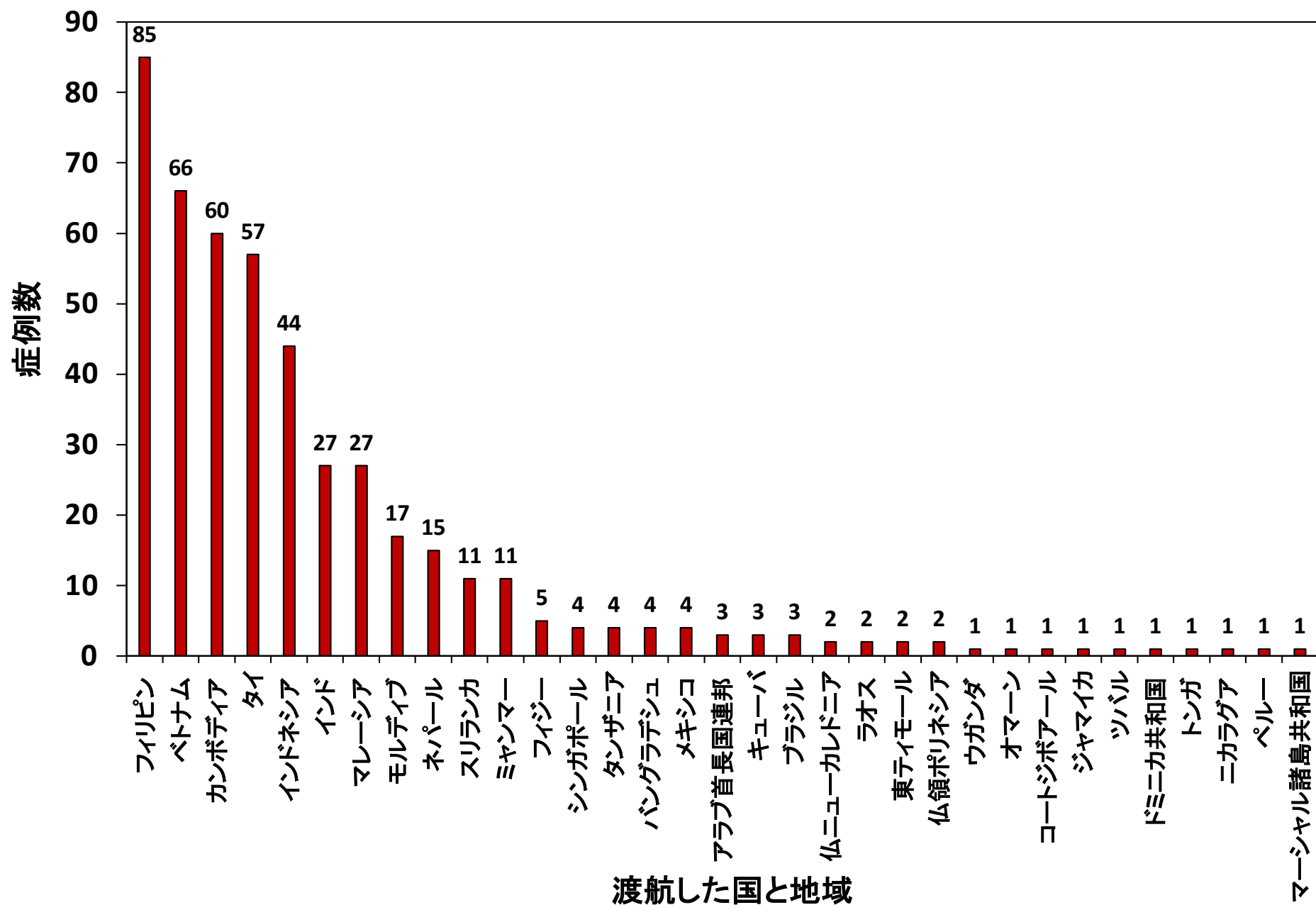
2019年～2020年における診断週別デング熱症例数の推移(n=508)



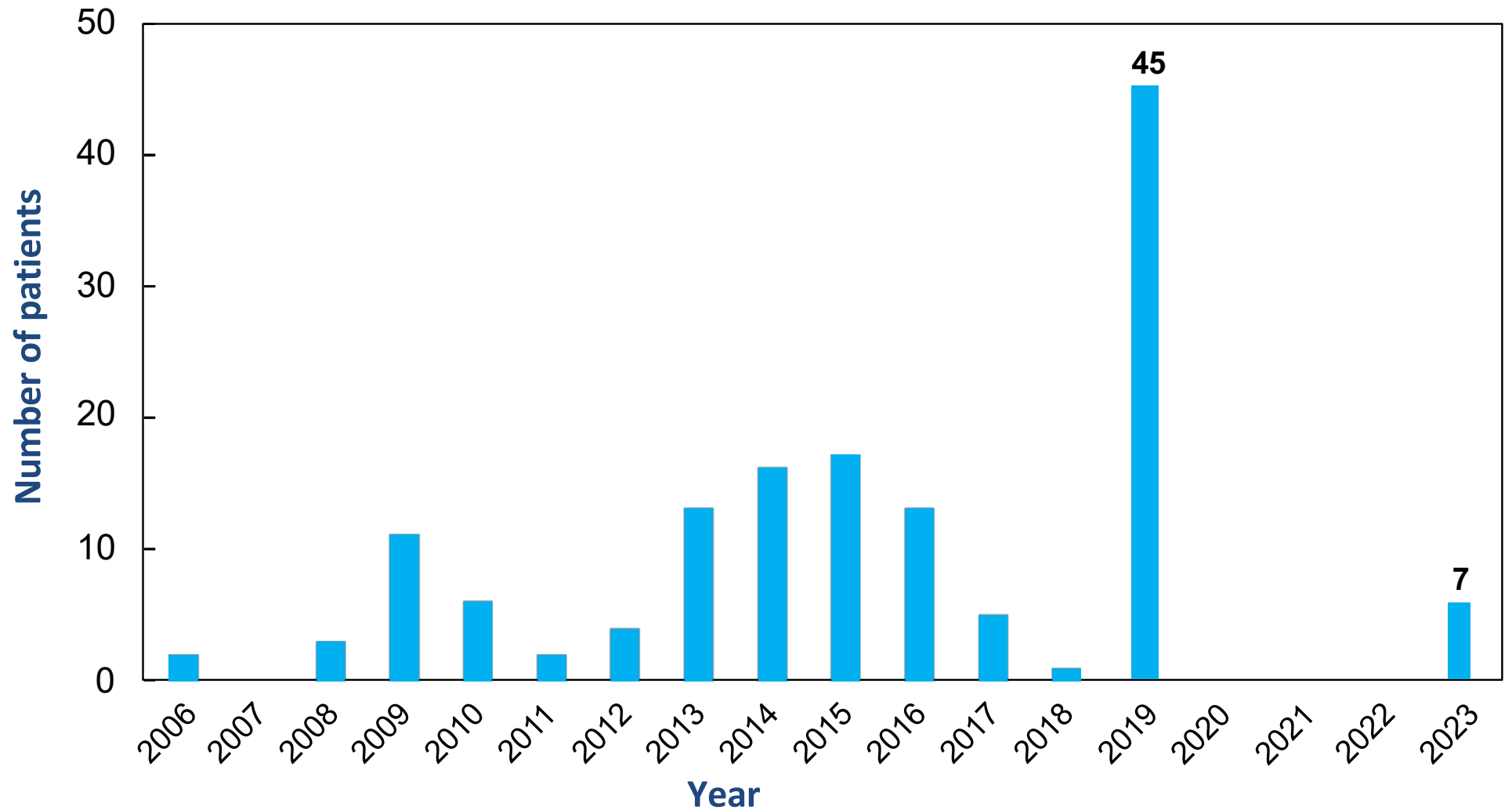
国内の1999年4月-2023年10月におけるデング熱症例の推移



2019年における渡航先別デング熱輸入症例数



The chikungunya fever cases in Japan, 2006-Oct. 2023



Human Japanese encephalitis cases in Japan, 1991-2022

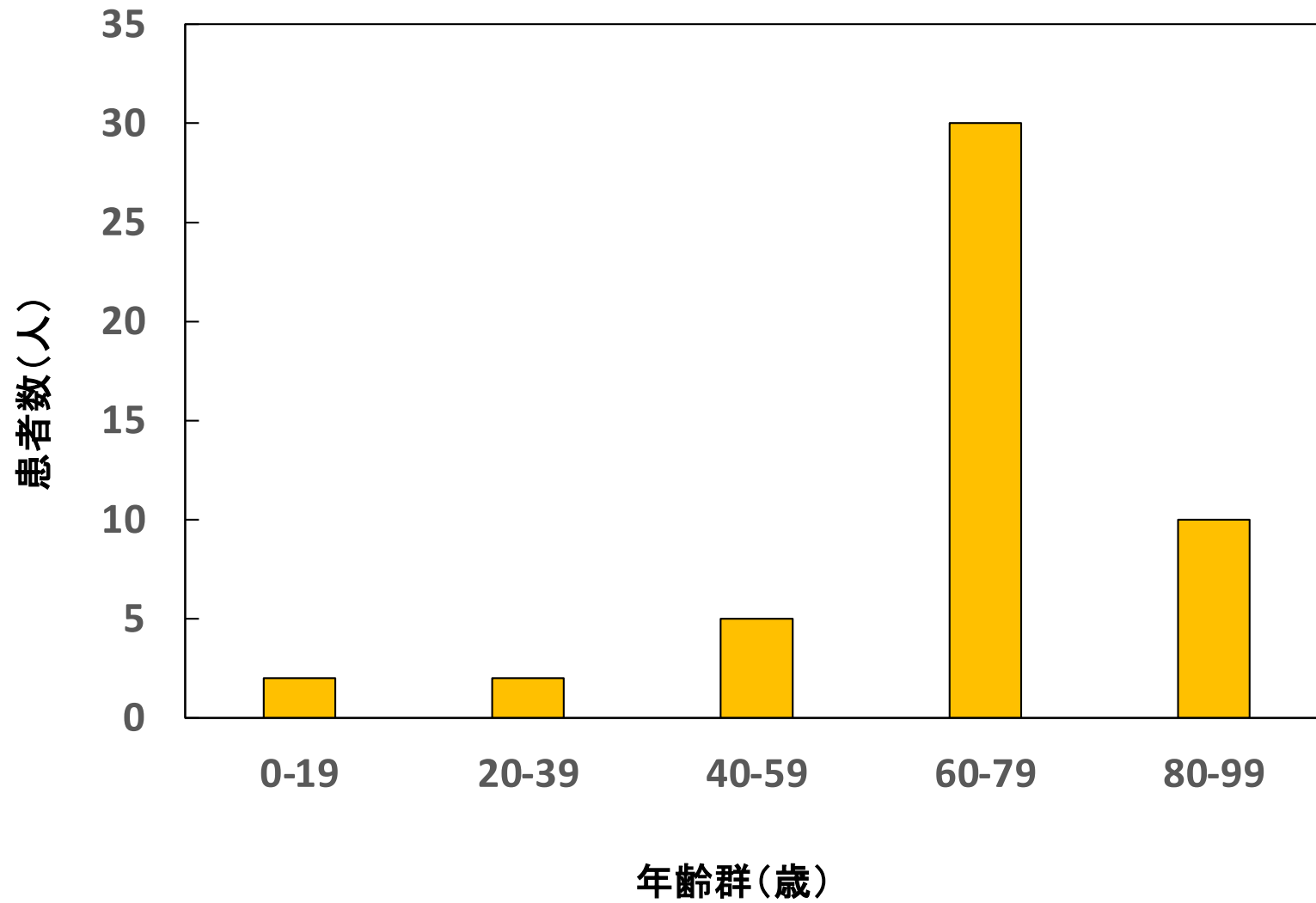
year	total	under 14	under 7
1991	14	1	0
1992	4	0	0
1993	8	0	0
1994	4	0	0
1995	2	1	1
1996	4	0	0
1997	4	0	0
1998	2	0	0
1999	5	0	0
2000	7	0	0
2001	5	1	0
2002	8	0	0
2003	2	1	0
2004	4	0	0
2005	7	0	0
2006	8	1	1

year	total	under 14	under 7
2007	9	0	0
2008	3	0	0
2009	3	2	2
2010	4	1	1
2011	9	2	1
2012	2	0	0
2013	9	0	0
2014	2	1	1
2015	2	1	1
2016	11	0	0
2017	3	0	0
2018	0	0	0
2019	10	0	0
2020	5	0	0
2021	3	0	0
2022	4	0	0
2023	6	0	0

2023年日本脳炎発生状況

発生県	性別	年齢	発症年月
茨城県	男	54	2023/08/09
茨城県	男	65	2023/09/15
静岡県	男	72	2023/08/28
熊本県	男	79	2023/09/04
大阪府	男	82	2023/10/11
熊本県	男	69	2023/10/23

2013-2022年における日本脳炎患者の年齢分布



キャサヌル森林病ウイルスおよびオムスク出血熱ウイルスの ゲノム検出法(ウイルス遺伝子検査法)の整備

DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用
陽性コントロールについて(おさらいと変更点)

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
2023年12月6日

キャサヌル森林病(三種):

Kyasanur forest disease virus (KFDV) が原因ウイルス (BSL3)。

南アジア(インド)を中心に蔓延。自然界ではマダニとげっ歯類の間に感染環が維持。ヒトが感染した場合、潜伏期間は3～12日。症状は発熱、頭痛、筋肉痛、消化器症状、出血。約40%に出血性肺水腫がみられ、ときに腎不全も生じる。患者の15～50%は1～3週間寛解後再度発熱を呈し、髄膜炎や脳炎発症する。致死率は3～5%であり、後遺症を残すことはない。

オムスク出血熱ウイルス(三種):

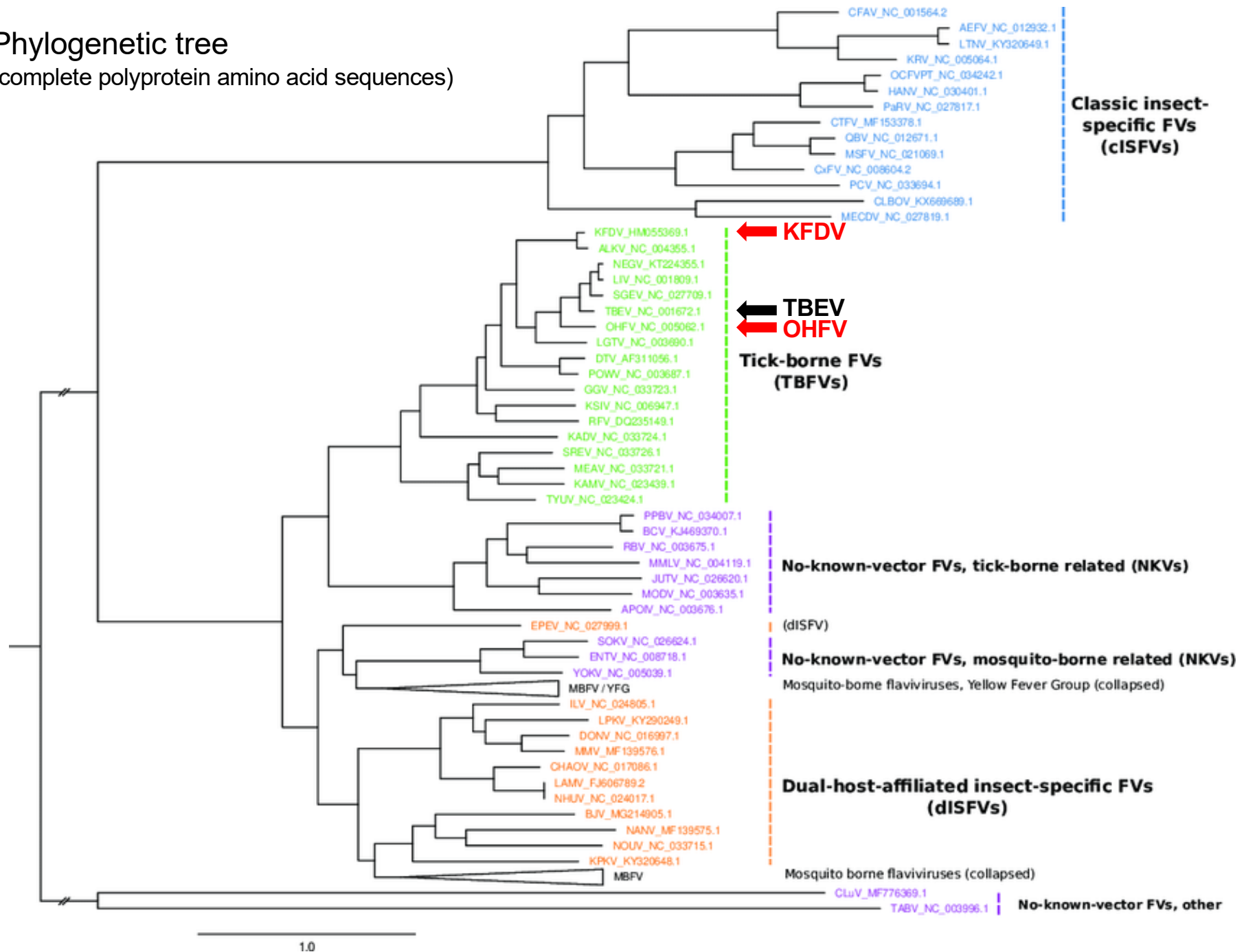
Omsk Hemorrhagic fever virus (OHFV) が原因ウイルス (BSL3)。

西シベリアを中心に蔓延。自然界ではマダニとげっ歯類の間に感染環が維持。ヒトが感染した場合、潜伏期間は3～9日。症状は発熱、頭痛、筋肉痛等、まれに出血熱となる。患者の30～50%は二相性の発熱を呈し、後期には髄膜炎や腎機能障害等がみられる。致死率は0.5～3%。神経精神障害などの後遺症を残すことがある。

(厚生労働省ホームページを改変)

ともに、**ダニ媒介性フラビウイルス**感染症である。

Phylogenetic tree (complete polyprotein amino acid sequences)



TaqMan primers and probe

Kyasanur Forest Diseases Virus

Name	Sequence	Region in MG720077	Ref.
KFDNS 5F	TGG AAG CCT GGC TGA AAG AG	9573-9592	Journal of Virological Methods 186 (2012) 49– 54
KFDNS 5R	TCA TCC CCA CTG ACC AGC AT	9636-9617	
KFDNS 5P	FAM-ATG GAG AGG AGC GCC TGA CCC G-BHQ	9594-9615	

Omsk hemorrhagic fever virus

Name	Sequence	Region in MT354629	Ref.
OHF-d1F	GGC ACA RAC CGT TGT TCT TGA GCT	1554-1577	Viruses 2022, 14, 754.
OHF-d2R	GCG TTC WGC ATT GTT CCA WCC CAC CAT	1692-1666	
OHF-d12Probe	HEX*-AGG TGT TCT GCT GTC TTG TCG AGC-BQH1	1598-1575	

*: 論文ではJOE。今回の合成ではHEX。QS5ではVIC指定。

Positive Control RNA合成用配列(300ヌクレオチド)

Name	Sequence	Region in MG720077
KFDV synRNA用	TCGGGAGGCTGCGTCATGGACATCATAACCAGAAGAGACCAACGTGGTTCAGGCCAGGTGGT GACCTACGCTCTAAACACCCTCACGAACATCAAGGTGCAGCTTATCCGCATGATGGAGGGAGA GGGCGTGATCGGGCCATCTGACTCACAGGACCCGCGACTCCTACGTGTGGAAGCCTGGCTGA AAGAGCATGGAGAGGAGCGCCTGACCCGCATGCTGGTCAGTGGGGATGATTGCGTTGTGAGA CCAATTGACGACCGCTTCGGGAAGGCCCTCTACTTCCTAAATGACATGGCC	9401-9700 (NS5)

Name	Sequence	Region in MT354629
OHFV synRNA用	GGCGAATACGGAGACGTGTGCTGATGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTCGATCTGGCACAAC CGTTGTTCTTGAGCTCGACAAGACAGCAGAACACCTCCCCACGGCATGGCAGGTTACAGAGA TTGGTTTAACGATCTAGCTCTGCCTTGAAACATGAGGGAATGGTGGGTTGGAACAATGCTGAA CGCCTGGTTGAGTTTGGAGTTCCTCACGCCGTGAAGATGGATGTTTACAACCTTGGGGACCAG ACTGGGGTGCTATTAAATCACTCGCCGGAGCCCCACTGGCGCACATC	1501-1800 (E)

* In vitro transcription により、1本鎖RNAを合成し、陽性コントロールとして使用した。

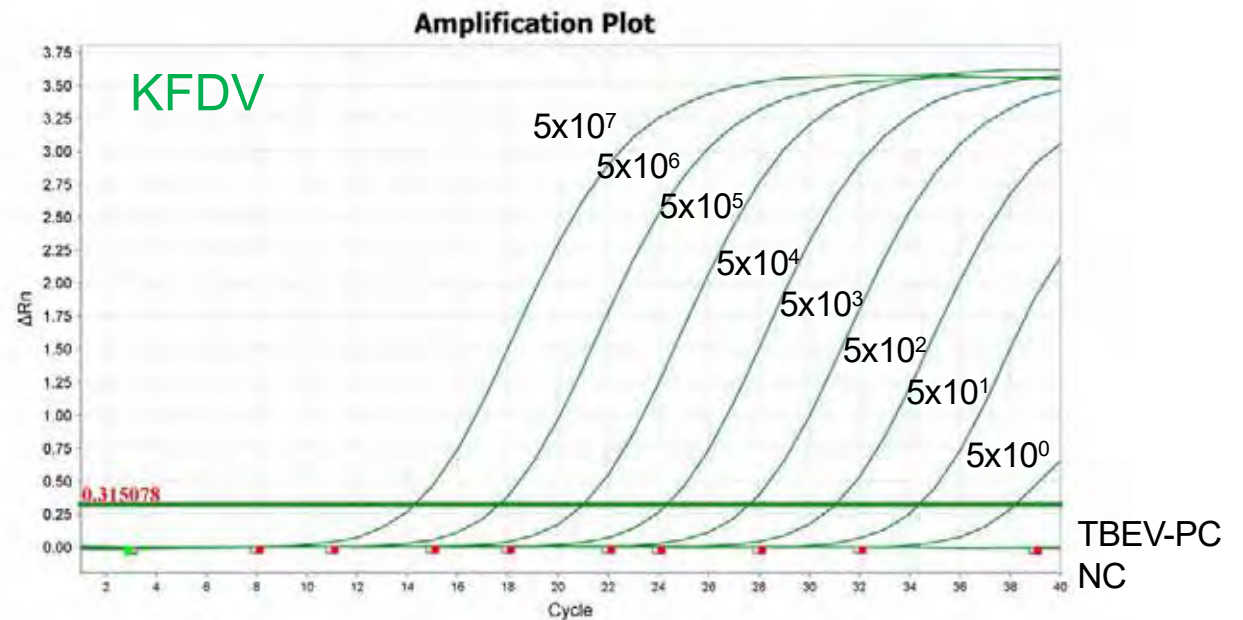
Realtime PCR

Reagent	Volume (uL)
DW	7.6
4xFast Virus M	5
Primer F (10uM)	1
Primer R (10uM)	1
Probe (10uM)	0.4
RNA soln	5

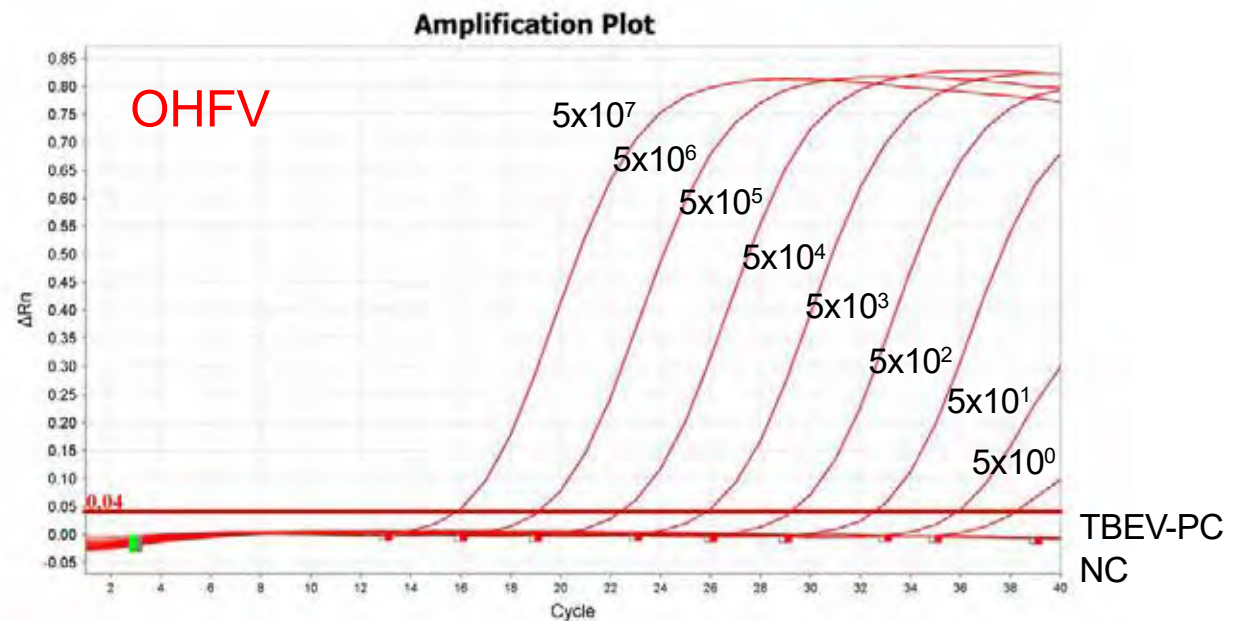


	48°C	5 min
	95°C	20 sec
40 cycles	95°C	3 sec
	57°C	30 sec

QS5, Fast, 40 min



■ KFDV



■ OHFV

キャサヌル森林病ウイルスおよびオムスク出血熱ウイルスの
ゲノム検出法(ウイルス遺伝子検査法)の整備

DENV-CHIKV-ZIKV TaqMan real-time RT-PCR用
陽性コントロールについて(おさらいと変更点)

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
2023年12月6日

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)

ContAmplicon_DCZ Realtime RT-PCRの反応系

(FV1step DCZ-CA)

TaqMan mix prep.				Duplex(V-CA)		
				Volume (uL)	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/uL 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		

*10pmol/uLを1uLずつ加えるのと同義

	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	CHIKV
Primer F	D1MGBEn469s	D2MGBEn493s	D3MGBEn1s.v2	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

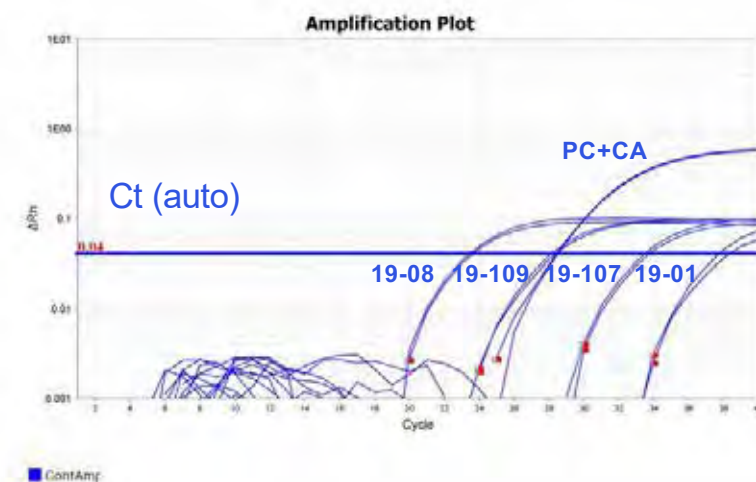
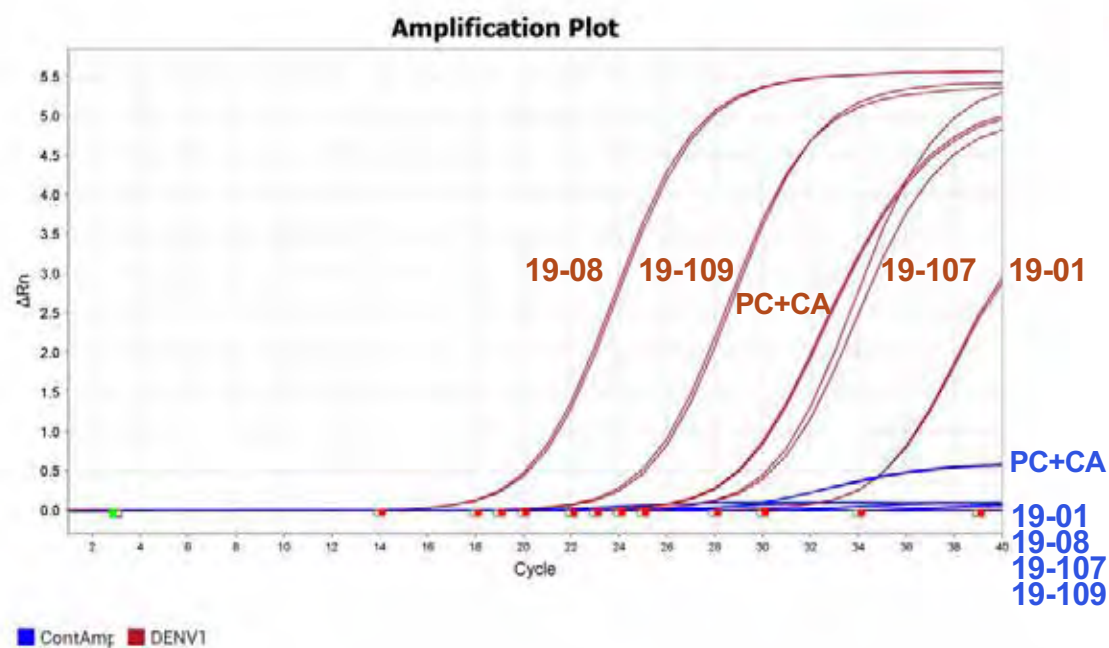
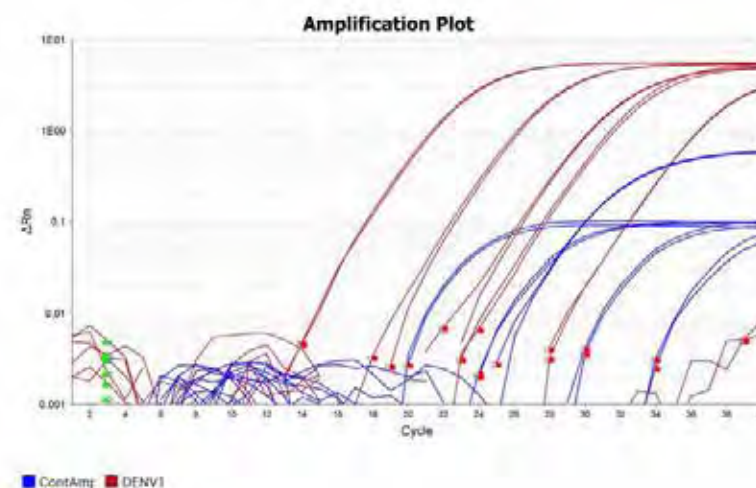
RT	48°C	5 min
Denature	95°C	20 sec
Amplify	95°C	3 sec
40cycle	57°C	30 sec
(fast)		

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(10⁹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、10³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。
- ✓ 今回配布予定のプローブはSigma-Aldrich (色素:HEX-BHQ1)で合成したのですが、ユーロフィン等(色素:VIC-none)で合成したものでも問題ありません(今回の検討ではVIC-noneを使っています)
- ✓ 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)

日本脳炎患者の剖検脳組織から分離された 日本脳炎ウイルスI型株の性状解析

令和5年12月6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
- 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

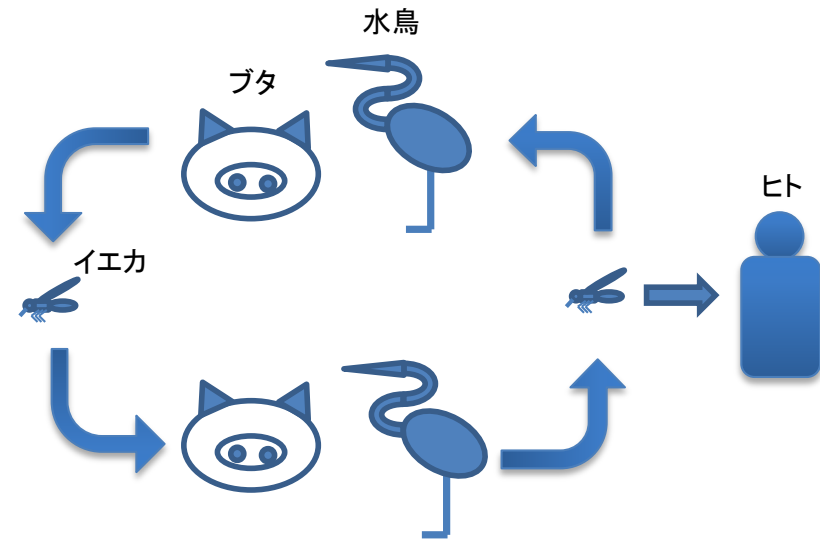
2013年から2022年のJE患者報告数

10年間で47人 → 4.7人/年

年	JE患者報告数
2022	5
2021	2
2020	5
2019	8
2018	0
2017	3
2016	11
2015	2
2014	2
2013	9

JEV

- 分類:フラビウイルス科オルソフラビウイルス属
- 遺伝子構造
 - 構造領域
 - C (capsid), prM (pre membranane), E (envelope)
 - 非構造領域
 - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5
- 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~: 主にI型



▲ JEVの感染環

JE患者検体からのJEV分離の既報

- JE患者から採取された血液や髄液からJEVが分離されるのは極めて稀である。
- 近年のJE患者検体から分離されたJEVの性状が解析されていない報告が多い。

近年のJE患者から分離されたJEVの性状は不明な点が多い

▼ 2000年以降のJE患者検体からのJEV分離の既報

患者発症年	国	遺伝子型	JEVの塩基配列の登録	JEVの性状解析
2002	日本	III型	なし	記載なし
2006	中国	I型	全配列	記載なし
2009	中国	I型	部分配列	記載なし
2009	中国	I型	部分配列	記載なし
2009	中国	I型	部分配列	記載なし
2013	カンボジア	I型	全配列	記載なし
2015	カンボジア	I型	全配列	記載なし
2015	韓国	V型	全配列	記載なし

8. エンテロウイルス

令和5年度 エンテロウイルスレファレンスセンター会議議事録

日時:2023年5月30日(火)

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)

古谷 貴志 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

有田 峰太郎

西村 順裕

喜多村 晃一

上野 みなみ

会議の概要

議題1: ポリオウイルス検査の依頼方法

総括1: 有田から、ポリオウイルス検査の依頼をウイルス第二部第二室にメール連絡する際に、宛先を第二室共通アドレスにして頂きたいと提案した。

議題2: エンテロ流行状況の情報共有（必要に応じて）

総括2: 特筆すべき事項なし。

議題3: 手足口病の病原体検出マニュアル改訂案について

総括3: 手足口病病原体検出マニュアル改訂作業に関して、感染研で確認した検査感度の測定結果と地方衛生研究所での臨床株の検査結果例について追加することを確認した。

議題4: ヘルパンギーナと無菌性髄膜炎の病原体検出マニュアルの改訂について

総括4: ヘルパンギーナと無菌性髄膜炎の病原体検出マニュアルについても、手足口病と同様の改訂が必要である旨、提案があった。手法が共通しているエンテロウイルス核酸検出法についてそれぞれのマニュアルで改訂を進める。

議題5: パレコウイルスの病原体検出マニュアルの作成について

総括5: 現在多くの地方衛生研究所でパレコウイルスの検査が行われているが、病原体検出マニュアルは作成されていない。複数の手法があるので、まとめる必要がある。

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

世話人：染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部

令和5（2023）年 7月24日（月） 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。

ノロウイルス検査用

標準プラスミド（陽性コントロール）請求方法

- 従来通り、各ブロック担当者（下表、敬称略）にご請求ください

ブロック	担当施設	担当者
北海道	北海道立衛生研究所 感染症部ウイルスグループ	長野 秀樹
東北	宮城県保健環境センター 微生物部	坂上 亜希恵 茂庭 光
関東	東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科	長島 真美
中部	富山県衛生研究所 ウイルス部	稲崎 倫子
近畿	大阪健康安全基盤研究所 微生物部 ウイルス課	左近 直美
中国・四国	広島県立総合技術研究所 保健環境センター 保健研究部	重本 直樹
九州	福岡県保健環境研究所	濱崎 光宏

サポウイルス、ロタウイルス検査用 標準プラスミド（陽性コントロール）請求方法

1. 請求依頼：地衛研担当者 → To: novrefctr@nih.go.jp

件名（例）「〇〇ウイルス陽性コントロール請求」

2. 返信：感染研担当者 → To: 地衛研担当者、Cc: novrefctr@nih.go.jp

配布の可否、送付日時の通知など

3. 送付

メーリングリスト novrefctr@nih.go.jp について

- 各下痢症ウイルス担当者を含む感染研職員メーリングリスト
ウイルス第二部 染谷 雄一、岡 智一郎、藤井 克樹、林 豪士
感染症危機管理研究センター 岡本 貴世子、村上 耕介
 - サポウイルス、ロタウイルス検査用標準プラスミド（陽性コントロール）の請求にご使用ください
 - 下痢症ウイルス検査法に関するご意見やご要望を承ります
- ★ **@nih.go.jp** です。感染研職員等の個人のアドレス（@niid.go.jp）とは異なりますので、ご注意ください。

話題提供

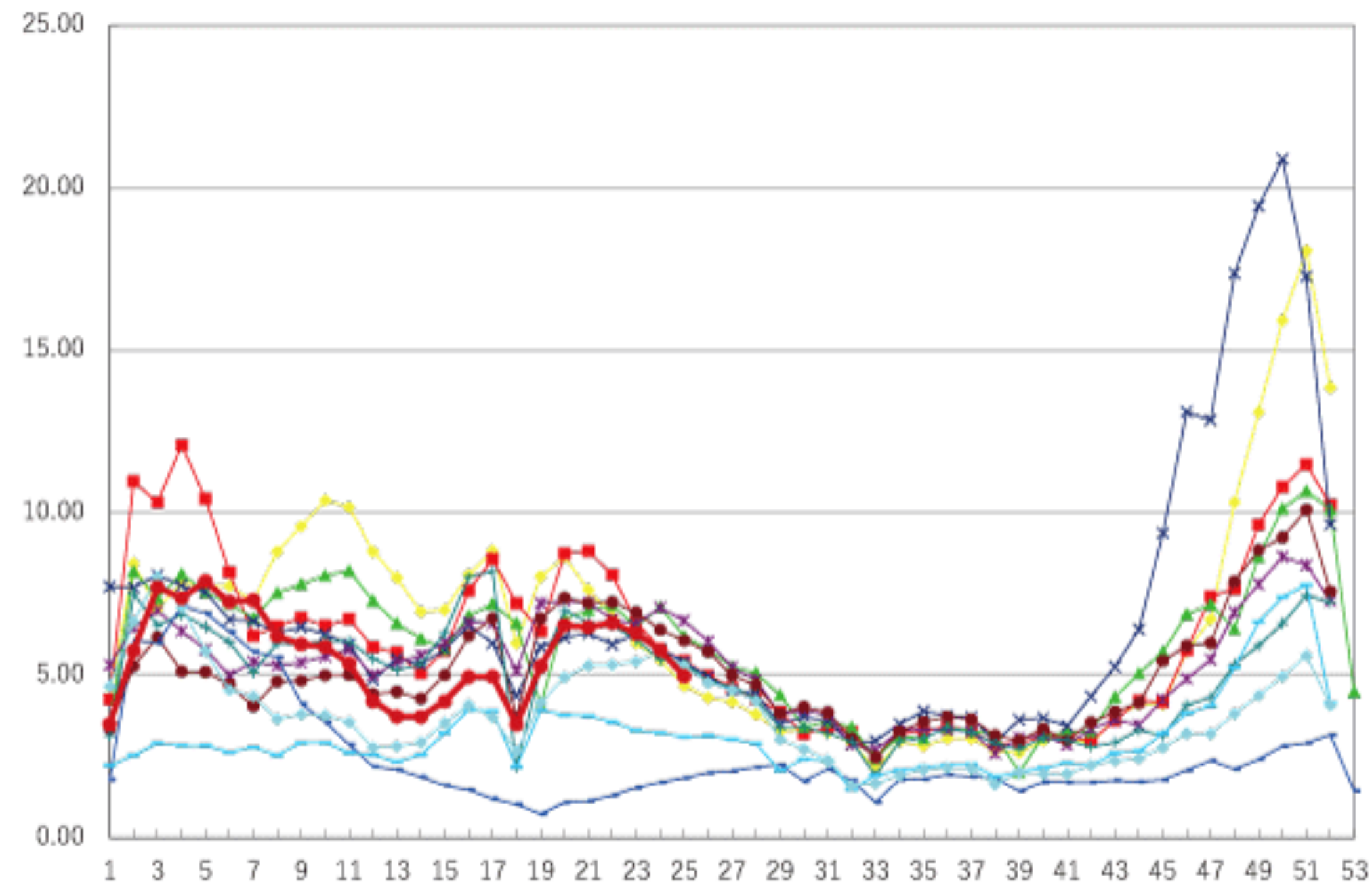
- ノロウイルスの流行状況について（感染研 染谷）
- ロタウイルス、サポウイルスのリアルタイムPCRの条件検討（大阪府 白井先生）
- ノロウイルスのone-stepリアルタイムRT-PCRの検討（山口県 岡本先生）

ノロウイルスの流行状況について

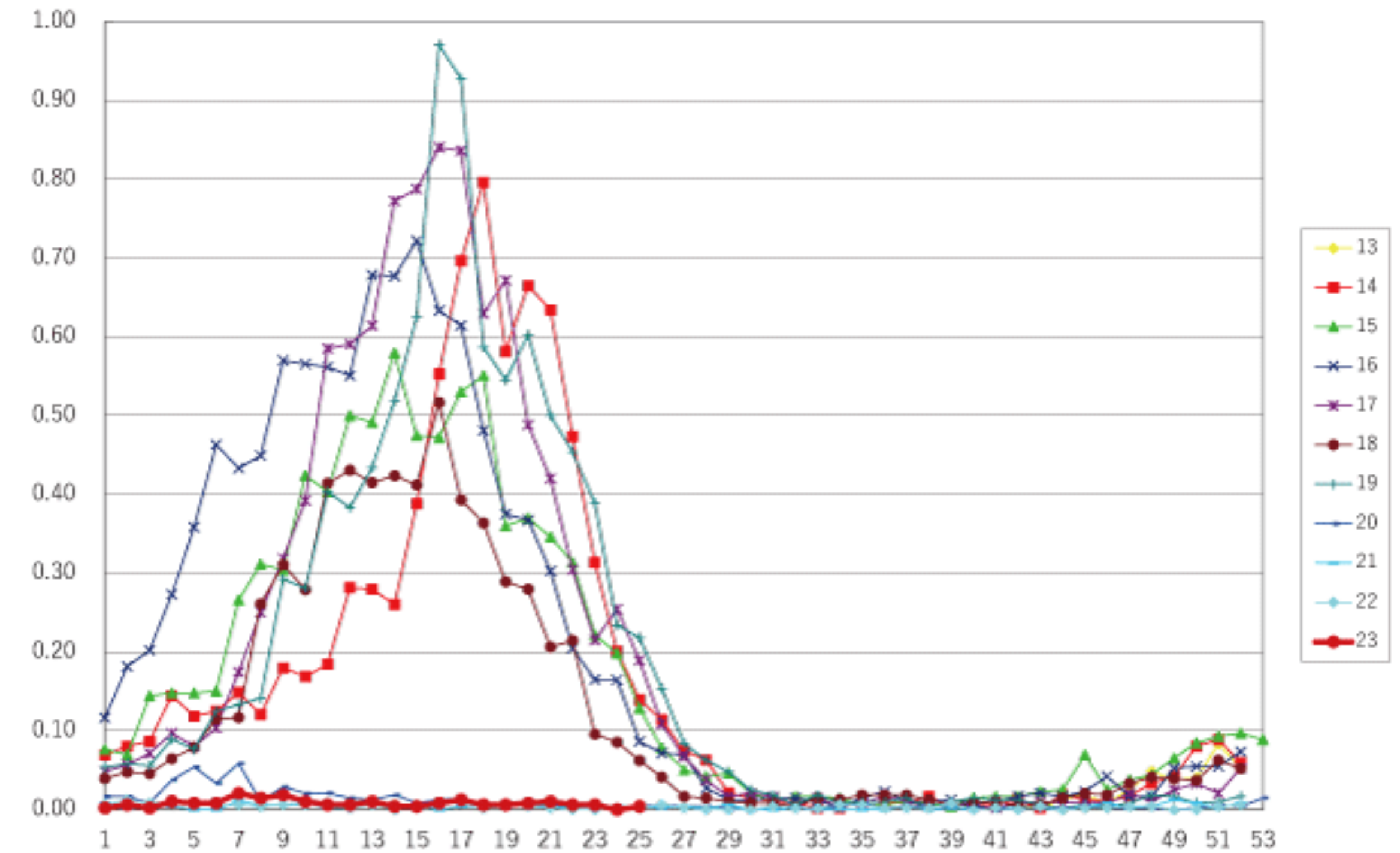
感染性胃腸炎～感染症発生動向調査 週報

Data from Infectious Diseases Weekly Report (IDWR)

感染性胃腸炎
Infectious gastroenteritis

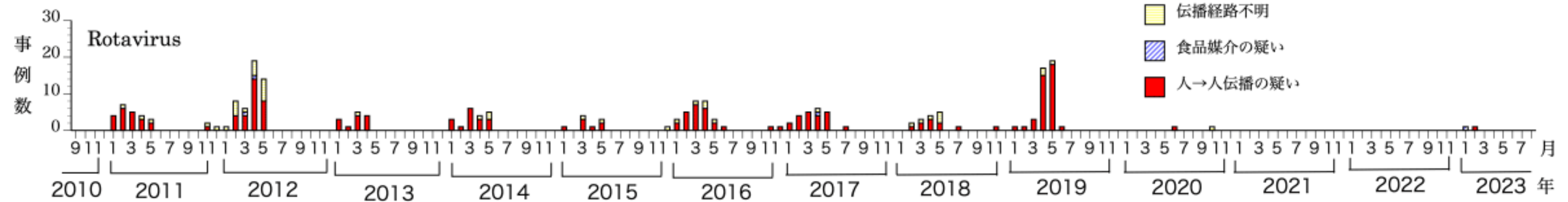
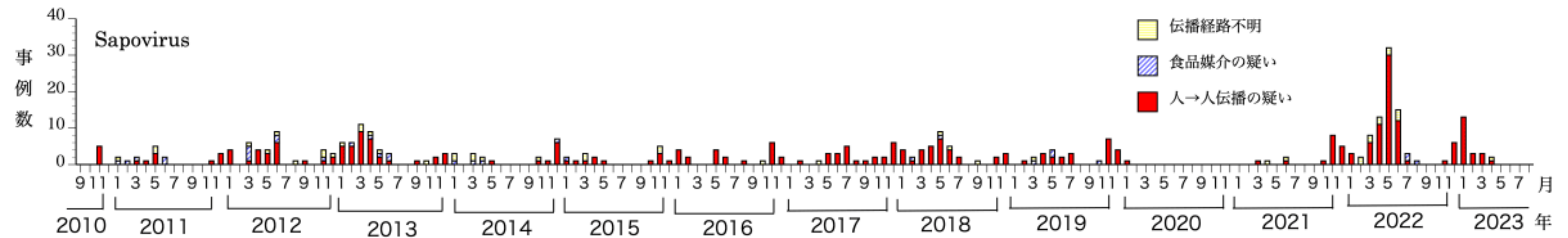
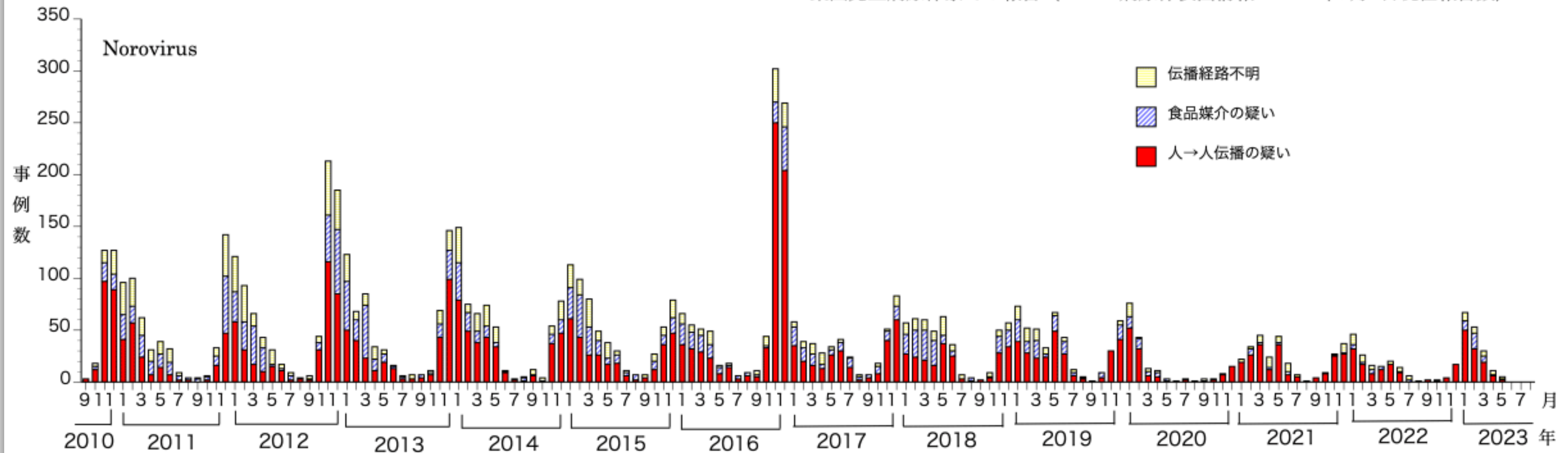


感染性胃腸炎（病原体がロタウイルスであるものに限る）
Infectious gastroenteritis (only by Rotavirus)



推定伝播経路別ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス感染集団発生月の別推移、2010/11～2022/23シーズン

集団発生病原体票での報告（NESID病原体検出情報：2023年7月9日現在報告数）



Genogroup I ノロウイルスの検出状況



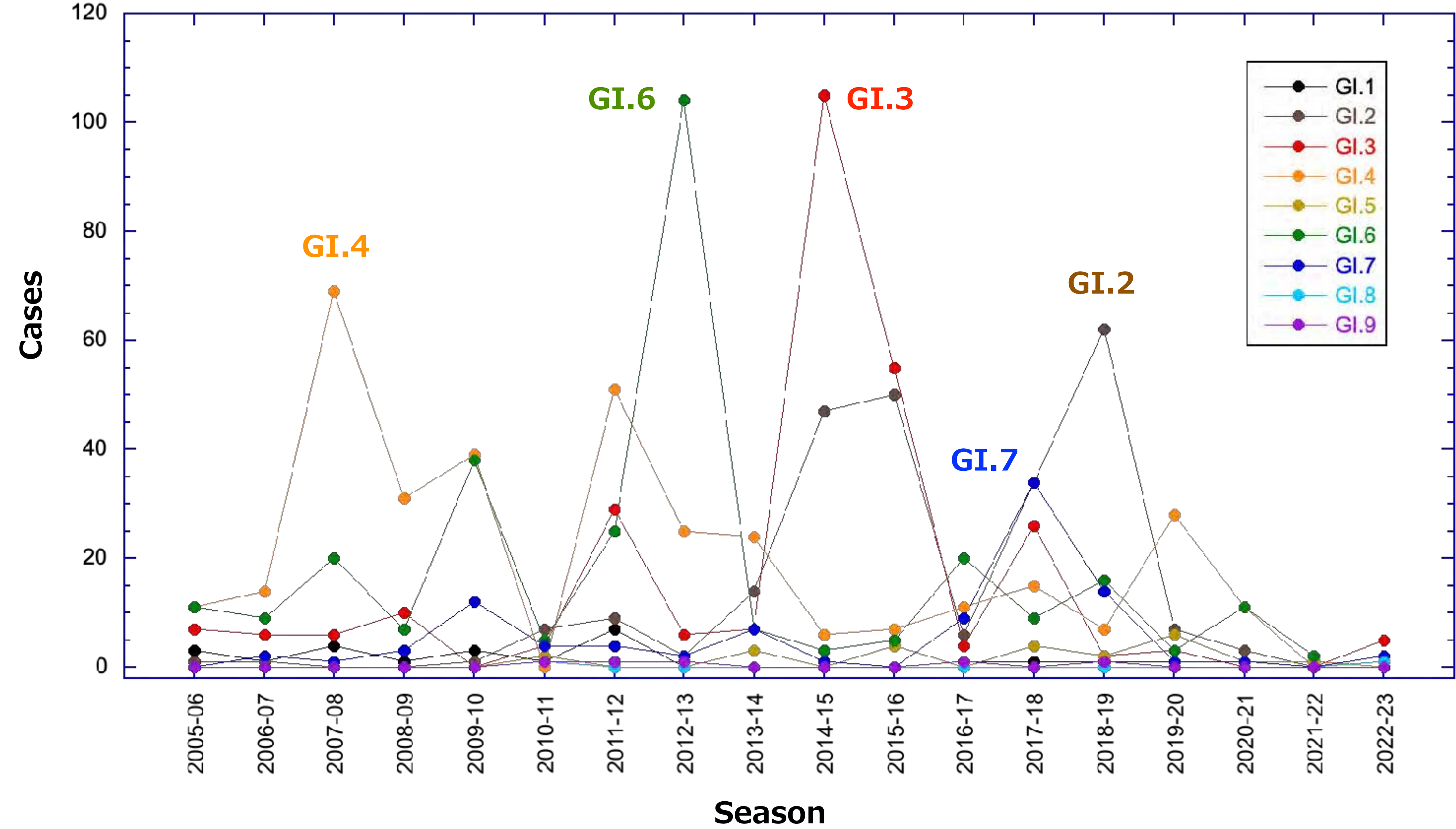
Genotype	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2020-2021	2021-2022	2022-2023	合計
GI.1	-	3	1	4	1	3	1	7	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	26
GI.2	-	1	1	-	-	1	7	9	2	14	47	50	6	34	62	7	3	-	-	244
GI.3	1	7	6	6	10	-	4	29	6	7	105	55	4	26	2	3	-	-	5	276
GI.4	-	11	14	69	31	39	-	51	25	24	6	7	11	15	7	28	11	-	-	349
GI.5	-	-	-	-	-	-	2	-	-	3	-	4	-	4	2	6	1	1	-	23
GI.6	-	11	9	20	7	38	5	25	104	7	3	5	20	9	16	3	11	2	2	297
GI.7	-	-	2	1	3	12	4	4	2	7	1	-	9	34	14	1	1	-	2	97
GI.8	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
GI.9	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	5
Untyped GI	228	199	81	184	130	185	57	155	137	106	384	76	75	29	80	18	10	14	5	2153
Total	229	232	114	284	182	278	82	281	277	168	546	197	127	152	185	67	38	18	15	3472

シーズン：9月～翌年8月

2023年（令和5年）7月21日現在

国立感染症研究所 病原体検出情報（IASR）<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html> 掲載のデータを一部改変
地方衛生研究所からNESID病原体検出情報に報告された情報に基づく。
感染症発生動向調査の定点およびその他の医療機関、保健所等で採取された検体から検出された病原体の情報が含まれる。

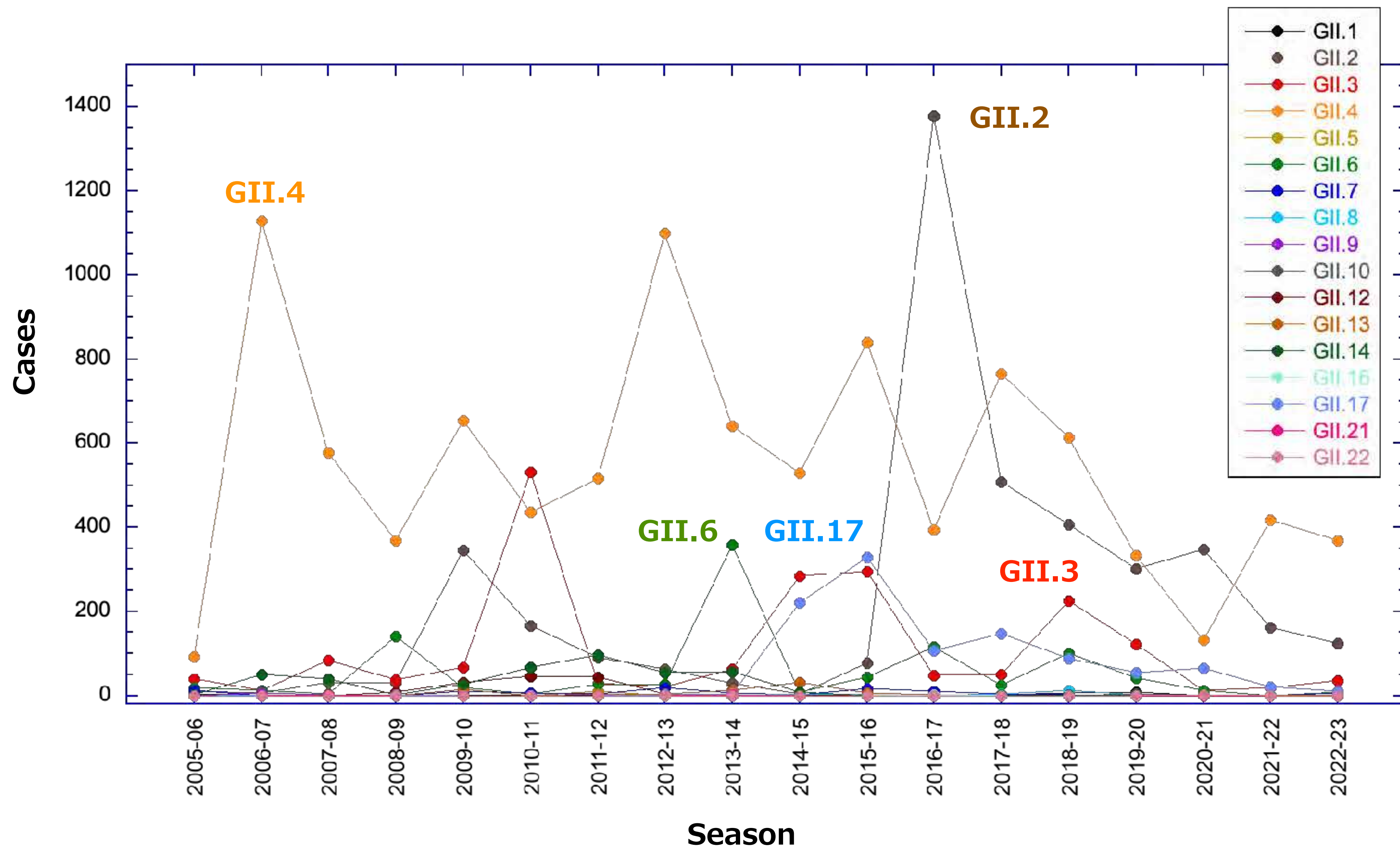
Genogroup I ノロウイルスの検出状況



Genogroup II ノロウイルスの検出状況

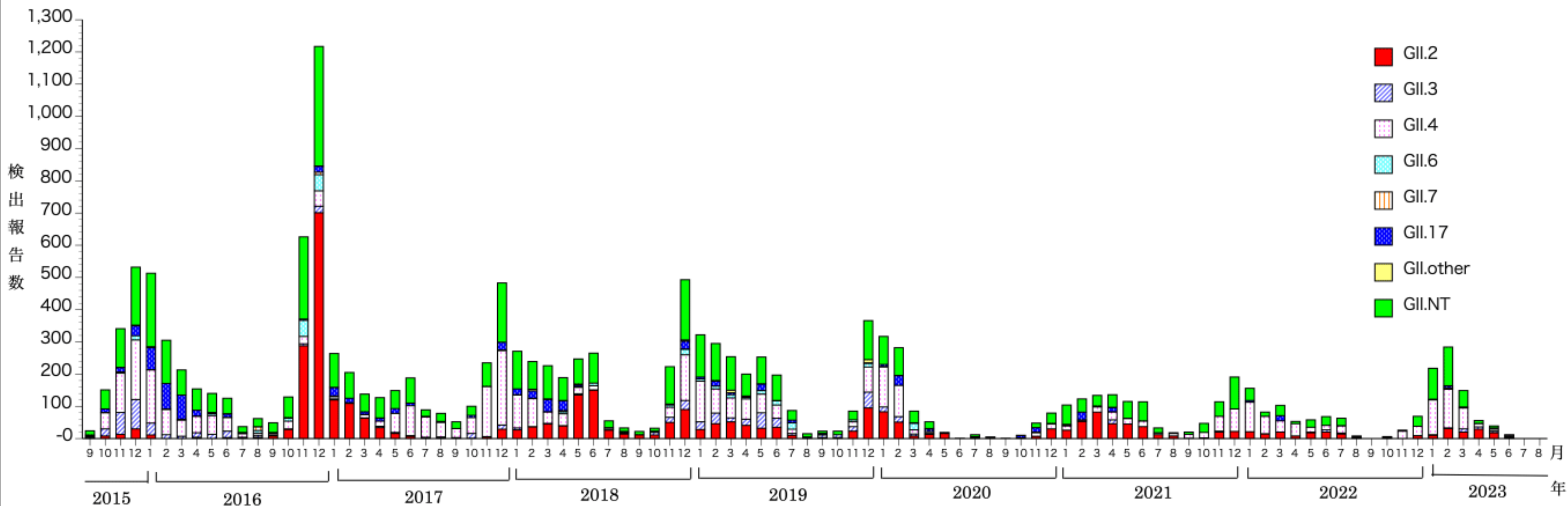
Genotype	2004- 2005	2005- 2006	2006- 2007	2007- 2008	2008- 2009	2009- 2010	2010- 2011	2011- 2012	2012- 2013	2013- 2014	2014- 2015	2015- 2016	2016- 2017	2017- 2018	2018- 2019	2019- 2020	2020- 2021	2021- 2022	2022- 2023	合計
GII.1	-	4	-	2	-	2	-	1	1	1	-	1	-	1	5	7	-	-	-	25
GII.2	1	10	5	30	30	345	165	89	63	29	3	78	1378	508	406	301	347	161	124	4073
GII.3	1	39	12	83	37	67	531	29	20	63	283	295	47	50	224	122	12	17	34	1966
GII.4	7	91	1129	577	369	654	437	517	1099	641	528	839	393	765	614	333	131	418	369	9911
GII.5	-	-	-	1	-	-	-	9	-	-	2	1	2	2	-	-	-	-	-	17
GII.6	2	18	11	3	141	19	4	27	27	357	8	43	116	24	100	42	11	-	7	960
GII.7	-	11	-	1	-	10	5	4	19	5	1	15	9	4	2	-	-	-	5	91
GII.8	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	3	11	1	-	1	-	23
GII.9	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
GII.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	4
GII.12	-	-	-	-	8	31	45	44	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	134
GII.13	-	-	-	-	-	14	-	3	3	12	30	6	1	2	-	1	-	-	1	73
GII.14	-	1	50	40	1	26	66	97	53	56	7	-	-	1	2	2	-	-	-	402
GII.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
GII.17	-	-	-	-	1	-	-	-	2	4	220	329	106	146	87	53	65	21	9	1043
GII.21	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
GII.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Untyped GII	1988	2492	3289	1953	1767	1776	1936	1645	2013	2015	1581	1059	1205	885	942	404	348	345	322	27965
Total	1999	2668	4502	2692	2354	2944	3189	2465	3304	3184	2668	2667	3258	2391	2393	1270	915	963	871	46697

Genogroup II ノロウイルスの検出状況



月別ノロウイルスGII検出報告数

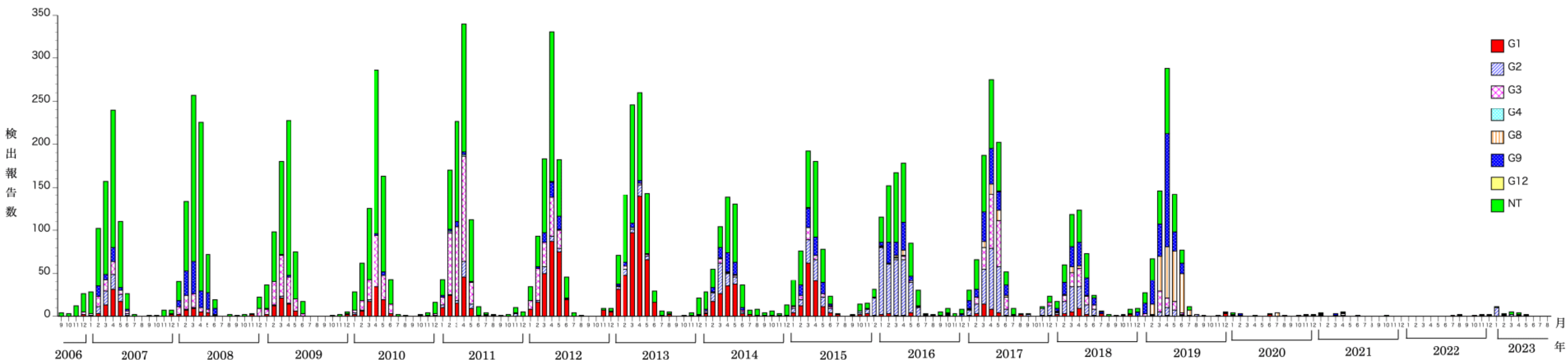
月別ノロウイルスGII遺伝子型検出報告数, 2015/16-2022/23シーズン



(NESID病原体検出情報：2023年7月9日現在報告数)

月別A群ロタウイルスウイルス検出報告数

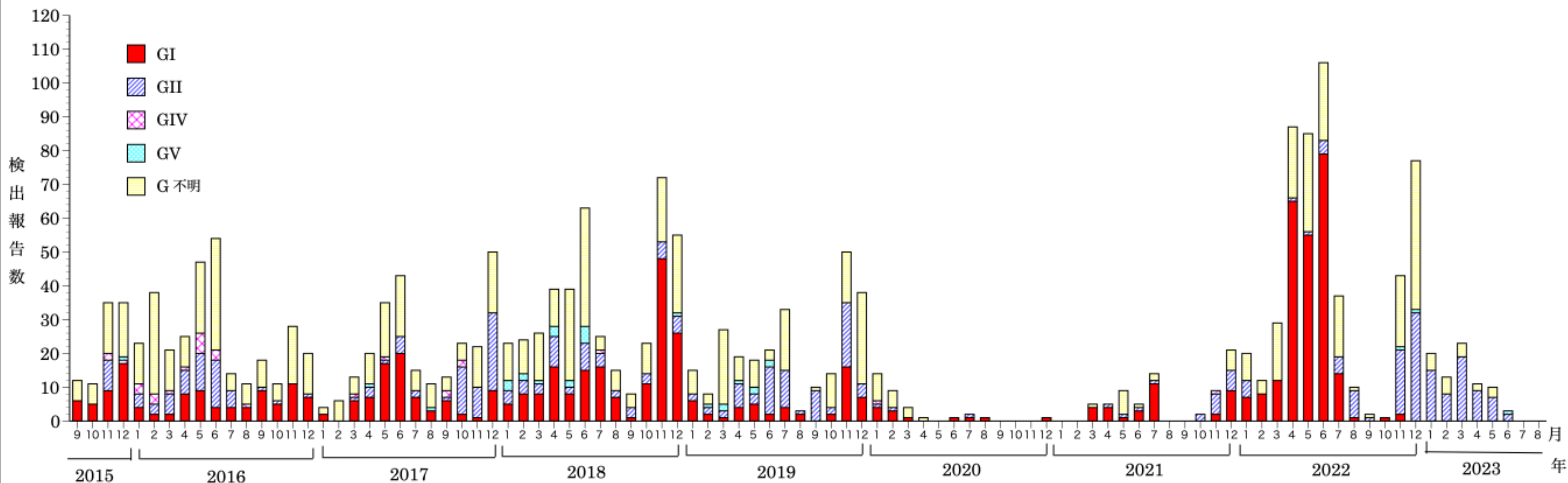
月別Rotavirus group A 遺伝子型検出報告数, 2006/07～2022/23シーズン



(NESID病原体検出情報：2023年7月9日現在報告数)

月別サポウイルス検出報告数

月別サポウイルス遺伝子群別検出報告数, 2015/16-2022/23シーズン



(NESID病原体検出情報：2023年7月9日現在報告数)

ノロウイルス等下痢症ウイルスの流行状況

- 感染研IASRの集計によると、本邦では2020年に始まる新型コロナウイルスの流行に伴い、当初ノロウイルスの流行はやや抑えられていたが、旧に復する傾向にある。
- ノロウイルスの流行株に目立った変化はなく、GII遺伝子型では、GII.4のほか、GII.2、GII.3、GII.17が近年の主流株である。
- サポウイルスは2022年以降頻繁に検出される。2022年はGI遺伝子型が主流であったのに対し、2023年はGII遺伝子型が多く検出されるようになった。
- ロタウイルスは新型コロナウイルスの流行以降、現在に至るまで流行が抑制されている。

話題提供

1. 大阪健康安全基盤研究所 白井先生より

ロタウイルス、サポウイルスのリアルタイムPCRの条件検討

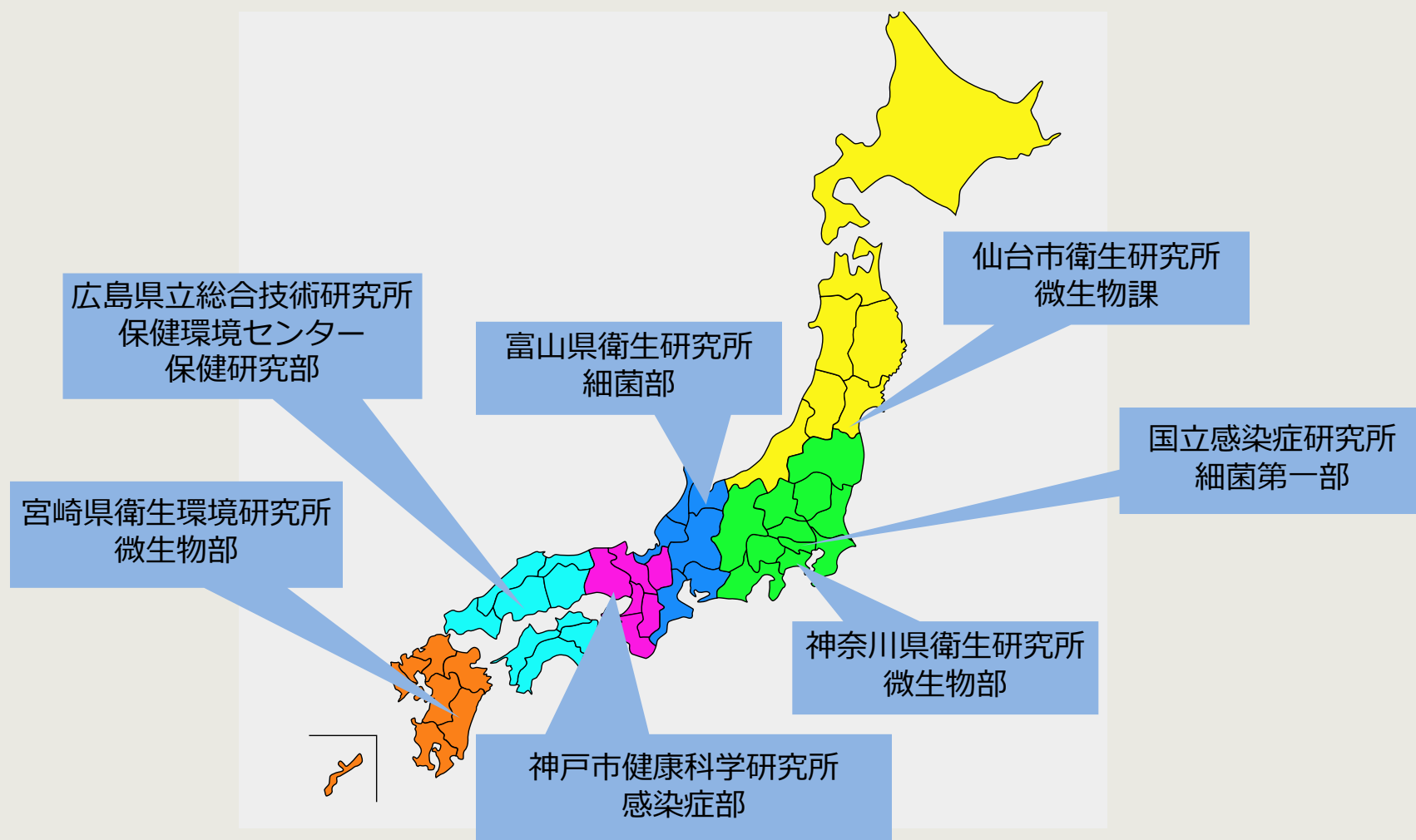
2. 山口県環境保健センター 岡本先生より

ノロウイルスのone-stepリアルタイムRT-PCRの検討

について、それぞれ経過報告があった。今後の検査法のあり方、検査マニュアルの改訂に重要な知見を提供して頂いた。

10. レジオネラ

レジオネラ・レファレンスセンター会議



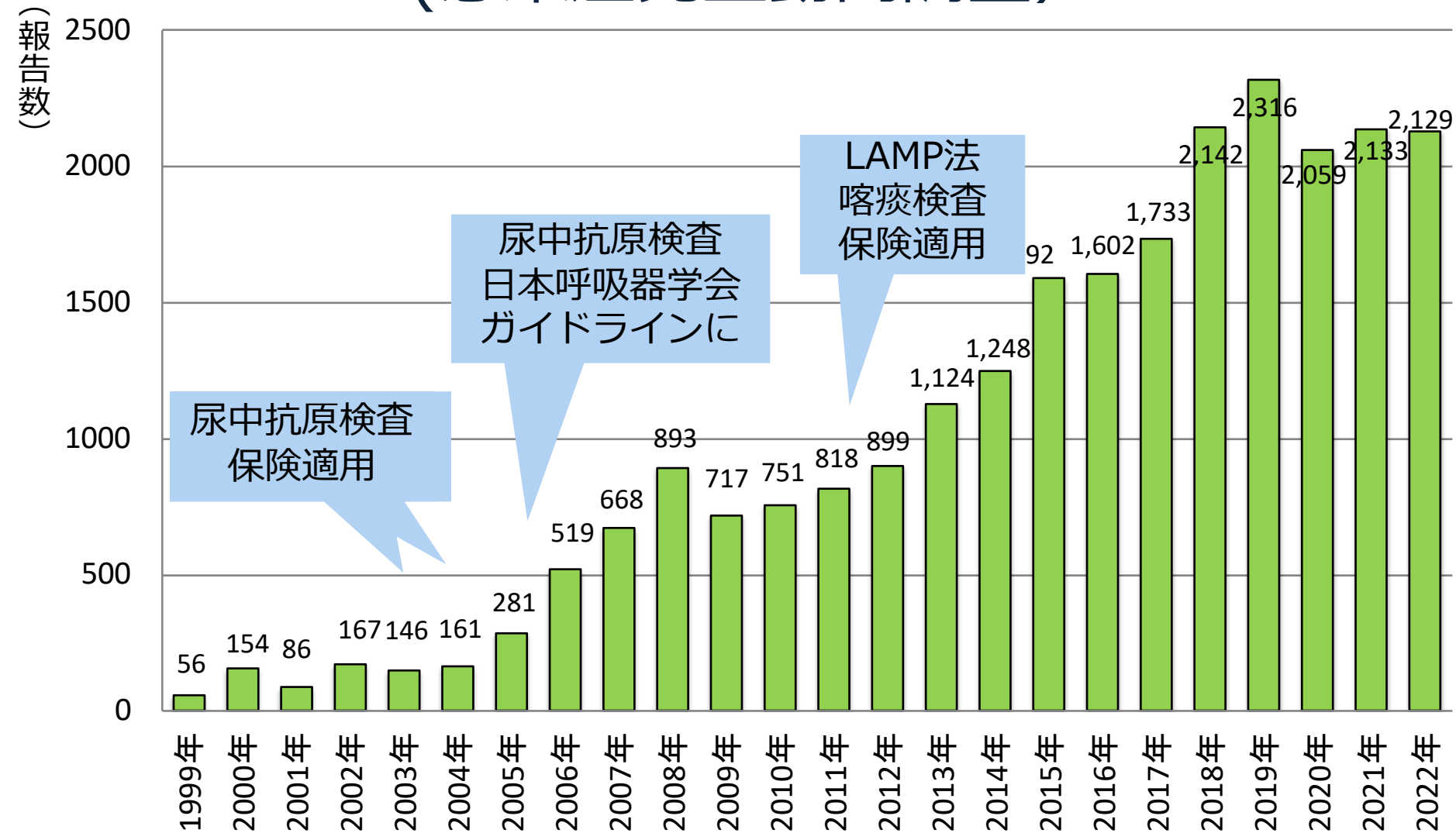
衛生微生物技術協議会第43回研究会
Zoom Meeting 2023.7.20. 14:00-

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
- トピックス

年別レジオネラ症報告数

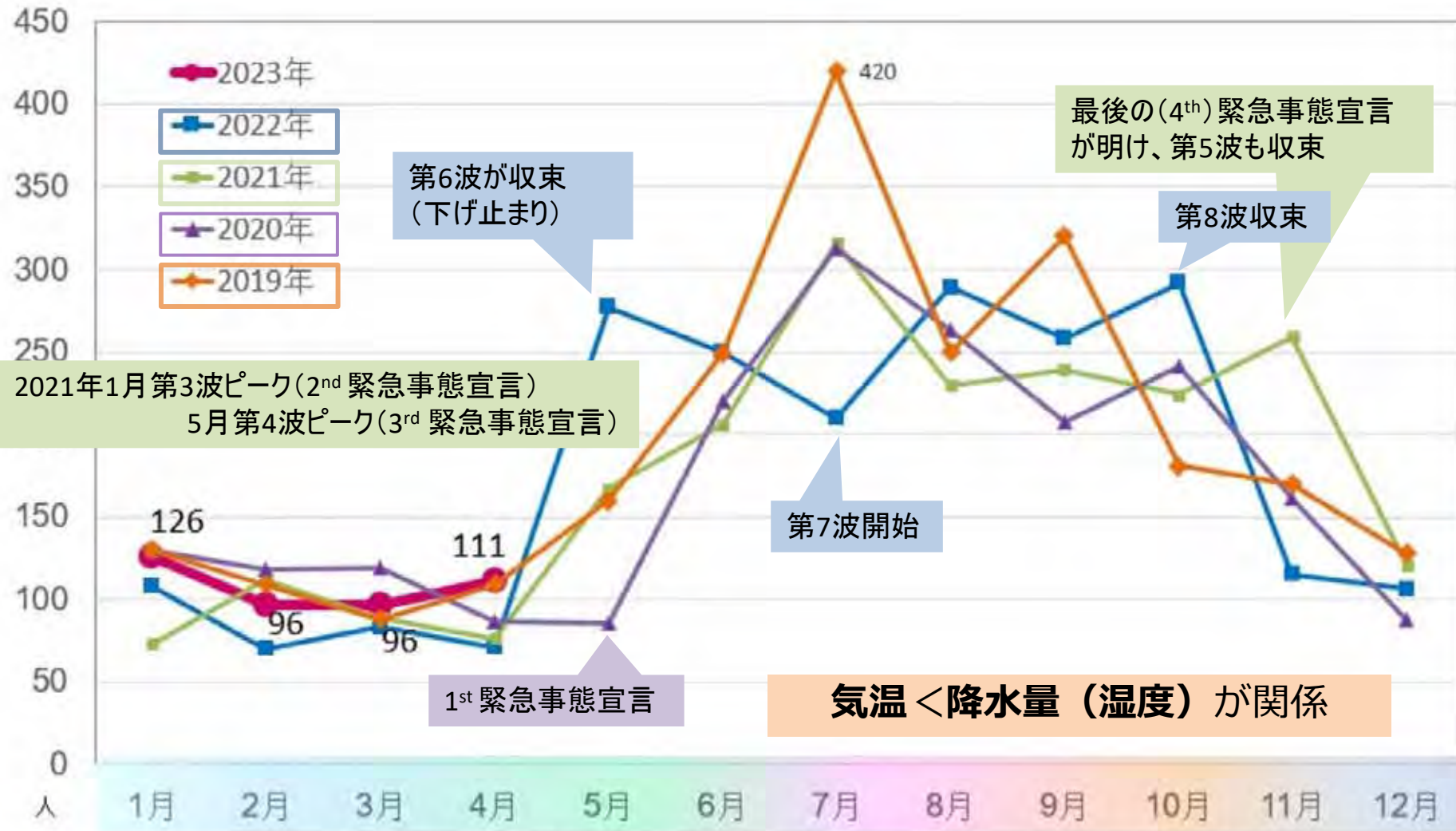
(感染症発生動向調査)



※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

報告数



※本グラフは国立感染症研究所発行 感染症発生動向調査・感染症週報をもとに、協会が作成したものです

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

2023年6月現在

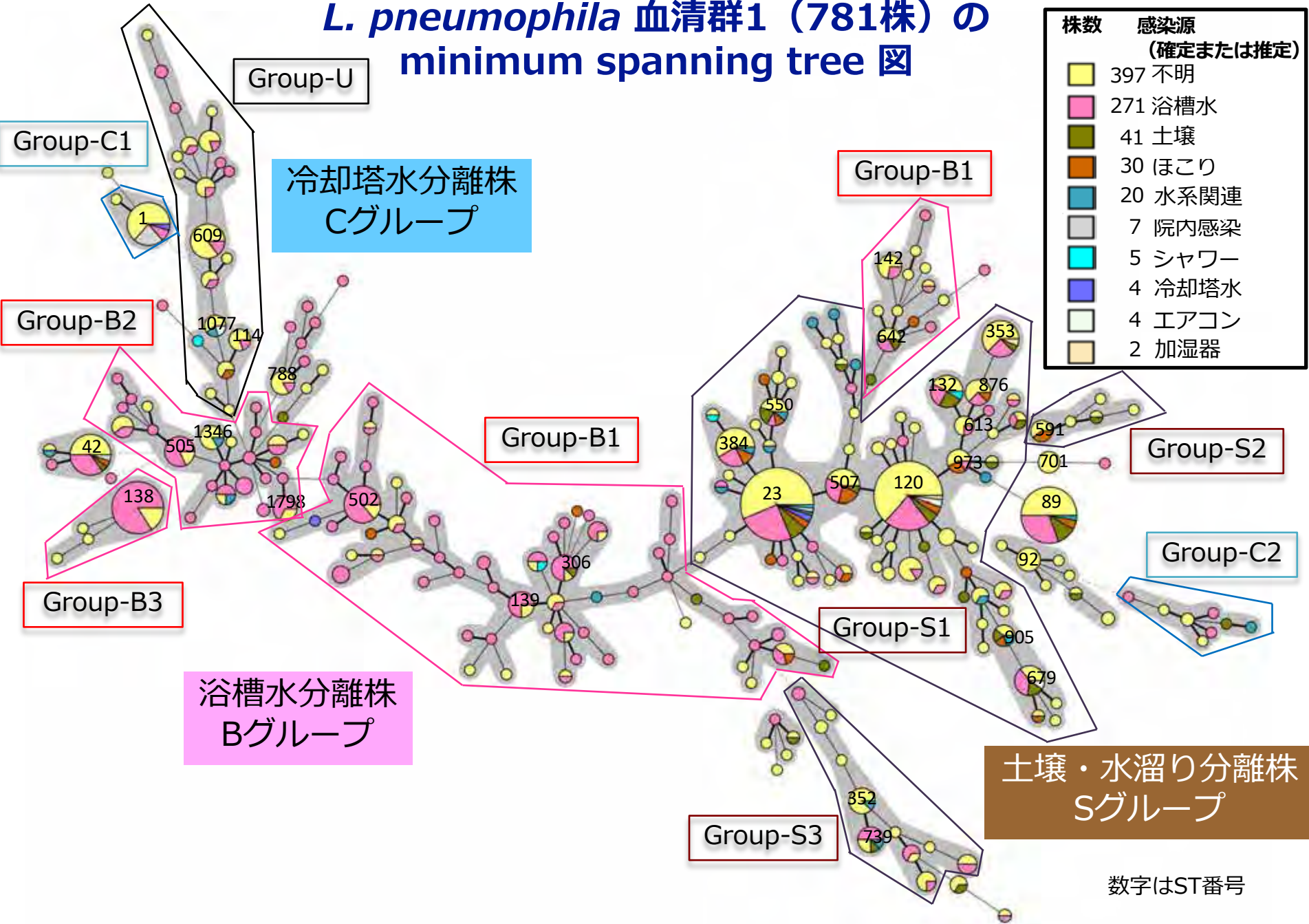
L. pneumophila 940株 (98.3%)		L. anisa	1株 (0.1%)
SG1 839株 (87.8%)	SG9 9株 (0.9%)	L. bozemanae	1株 (0.1%)
SG2 24株 (2.5%)	SG10 6株 (0.7%)	L. dumoffii	1株 (0.1%)
SG3 21株 (2.2%)	SG12 2株 (0.2%)	L. feeleii	2株 (0.2%)
SG4 4株 (0.4%)	SG13 2株 (0.2%)	L. londiniensis	1株 (0.1%)
SG5 13株 (1.4%)	SG14 1株 (0.1%)	L. longbeachae	9株 (0.9%)
SG6 13株 (1.4%)	SG15 1株 (0.1%)	L. rubrilucens	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956株 (100%)

SBTによる遺伝子型別結果は個別に報告

2023年3月までに国内で臨床から分離された *L. pneumophila* 血清群1 (781株) の minimum spanning tree 図



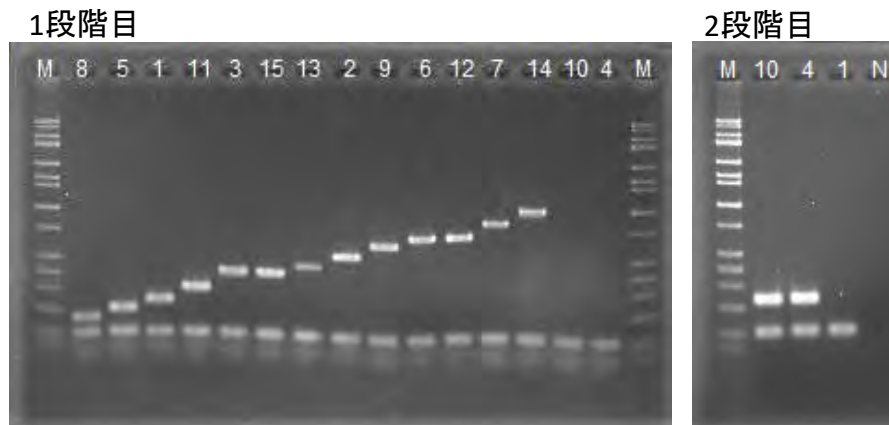
2022年度活動実績

- 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）**
ロングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジオルダニス
ロンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハックリー（1,2群混合）
- L. pneumophila*血清型別M-PCR用プライマー
セットの配布
- レジオネラ属菌検査外部精度管理
70地衛研等が参加

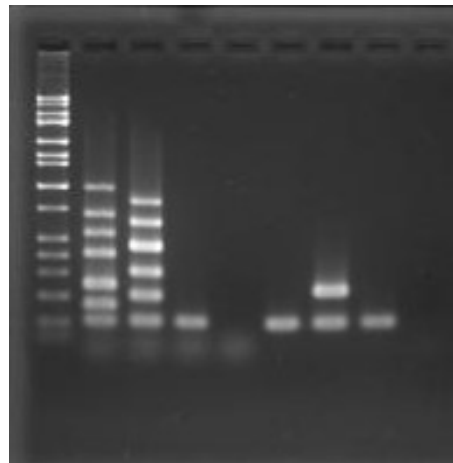
マルチプレックスPCRによる血清型別法

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



M: Marker, 数字: 血清群, N: No Template Control



Lane 1 Marker : Wide-Range DNA Ladder (TaKaRa bio, 3415A)
Lane 2 Primer set1/PTC1 (下から5SrRNA, SG8, SG1, SG3/15, SG2, SG6/12, SG14)
Lane 3 Primer set1/PTC2 (下から5SrRNA, SG5, SG11, SG13, SG9, SG7)
Lane 4 Primer set1/SG4 (5SrRNAのみ)
Lane 5 Primer set1/NTC
Lane 6 Primer set2/PTC1 (5SrRNAのみ)
Lane 7 Primer set2/PTC2 (5SrRNA、SG4/10)
Lane 8 Primer set2/SG1 (5SrRNAのみ)
Lane 9 Primer set2/NTC

ファスマックのキット
プライマー&コントロールDNA

6月より販売開始

図：(株) ファスマック提供

2023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
レジオネラ・ニューモフィラ混合血清
（混合1, 2, 3, 2-15群）
ロングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジオルダニス
ロンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハックリー（1,2群混合）
- L. pneumophila*血清型別M-PCR用プライマー
セットの配布 プライマー&コントロールDNA
- レジオネラ属菌検査外部精度管理

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4年12月に希望する9地研(北海道2・青森県・岩手県・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4年6月・12月にweb開催された、厚生労働科学研究「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」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免疫血清及び *L.pneumophila* の血清型別M-PCRプライマーセット及びコントロールをブロック内で希望する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(R4年)

	R4年
北海道(札幌市・函館市除く)	30
札幌市	15
函館市	5
青森県	11
秋田県	24
岩手県	26
宮城県(仙台市除く)	28
仙台市	39
山形県	25
福島県	35
新潟県	35
新潟市	12
合計	285

表2 感染研への菌株送付状況(R4年)

No	患者年齢	性別	菌種	血清群	その他
1	71歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
2	48歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
3	76歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
4	85歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
5	56歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
6	77歳	男	<i>L.pneumophila</i>	2	
7	47歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
8	62歳	女	<i>L.pneumophila</i>	1	
9	62歳	女	<i>L.pneumophila</i>	3	
10	62歳	女	<i>L.pneumophila</i>	10	
合計 株(No.1～3 新潟市、No.4～10 山形県)					

4) 各地研における検査状況について (詳細は、表3「R4年度 検査状況」参照)

5) 質問事項について

(1) 浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として、LC EMA-qPCR法の導入を検討していますが、GVPC寒天培地を用いた培養検査法と比較して、定量値が低い傾向にあります。LC EMA-qPCR法を導入されている場合の定量値の取り扱いや、検査上の注意点などについて、知見がありましたらご教示をお願いしたい(新潟市)。

(2) 感染症事例への対応時に、「遺伝子検査陽性、培養検査陰性」という結果が出た場合、試験成績書でどのように報告しておられますか。(環境検体と臨床検体で報告方法が異なる場合は、それぞれお答えいただけると幸いです。)なお、当所の場合は、環境検体・臨床検体にかかわらず、遺伝子検査と培養検査の結果をそれぞれ記載し、総合的な判断は、依頼元の保健所に委ねています(北海道)。

表3 R4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	22											2/4(確定例) 0/9(疑い例) (陽性検体数 は培養検査陽 性の数)	0/9				・喀 痰(診断確定例)から <i>L.p</i> SG1(2検体) 診断確定例:他2検体が遺伝子検査陽性・培養陰性 疑い例:3検体は遺伝子検査陽性・培養陰性、6検体は遺伝子検査陰性(培養検査未実施) ・鼻咽頭ぬぐい液1検体は遺伝子検査陽性・培養陰性、8検体は遺伝子検査陰性(培養検査未実施) ※遺伝子検査はCycleavePCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)使用
札幌市	10	1/6	0/3 シャワー・ カラン水						0/2								浴槽水 菌種・血清型不明
函館市	1	0/1															
青森県	2	0/2															
秋田県	68	8/64				1/2						0/2					浴槽水から <i>L.p</i> SG 1, <i>Legionella sp.</i> 冷却塔水から <i>L.p</i> SG 1
岩手県	30	2/29										0/1					浴槽水から <i>L.p</i> SG 3,6,8
宮城県	129	28/109			2/18							2/2					浴槽水から <i>L.p</i> SG1,2,3,4,5,6,7,8,9,12, UT、 <i>L.londiniensis</i> SG1、 <i>Legionella sp.</i> 喀 痰から <i>L.p</i> SG1 上がり用湯から <i>L.p</i> SG6,9
仙台市	14	1/2			0/5	4/5		0/1 噴水			0/1 原湯						浴槽水から <i>L.p</i> SGg8 冷却塔水から <i>L.p</i> SG1 、 <i>L.p</i> SGg1
山形県	12											5/12					喀 痰から <i>L.p</i> SG1、SG2、SG3、SG10
福島県	100	14/100															浴槽水から <i>L.p</i> SG 2, 3, 5, 6, 9
新潟県	17	3/3					8/14										浴槽水から <i>L.p</i> SG1, <i>L.p</i> 給湯水から <i>L.p</i>
新潟市	69	11/50				4/11						5/6				2/2	浴槽水から <i>L.p</i> SG1,3,5,6,12、 <i>L.Dumoffii</i> 、 <i>L.micdadei</i> 、 <i>Legionella sp.</i> 冷却塔水から <i>L.p</i> SG1,6,7 喀痰から <i>L.p</i> SG1 菌株から <i>L.p</i> SG1
合計	474	68/366	0/3		2/23	9/18	8/14	0/1	0/2		0/1	14/36	0/9			2/2	

R4(2022)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
- 24機関にレジオネラ血清等試薬を配布
- 20機関にレジオネラ血清型別PCRプライマーセットを配布
- 現在、SBT検索ツールのデータベースを更新中。完了次第配布予定

令和 5 年度レファレンスセンター報告 東海北陸支部

富山県衛生研究所

人口10万人あたり報告数(2022年)

県	報告数	順位
富山	4.25	1
石川	4.15	2
福井	1.56	30
岐阜	2.53	8
愛知	2.17	22
三重	1.98	13

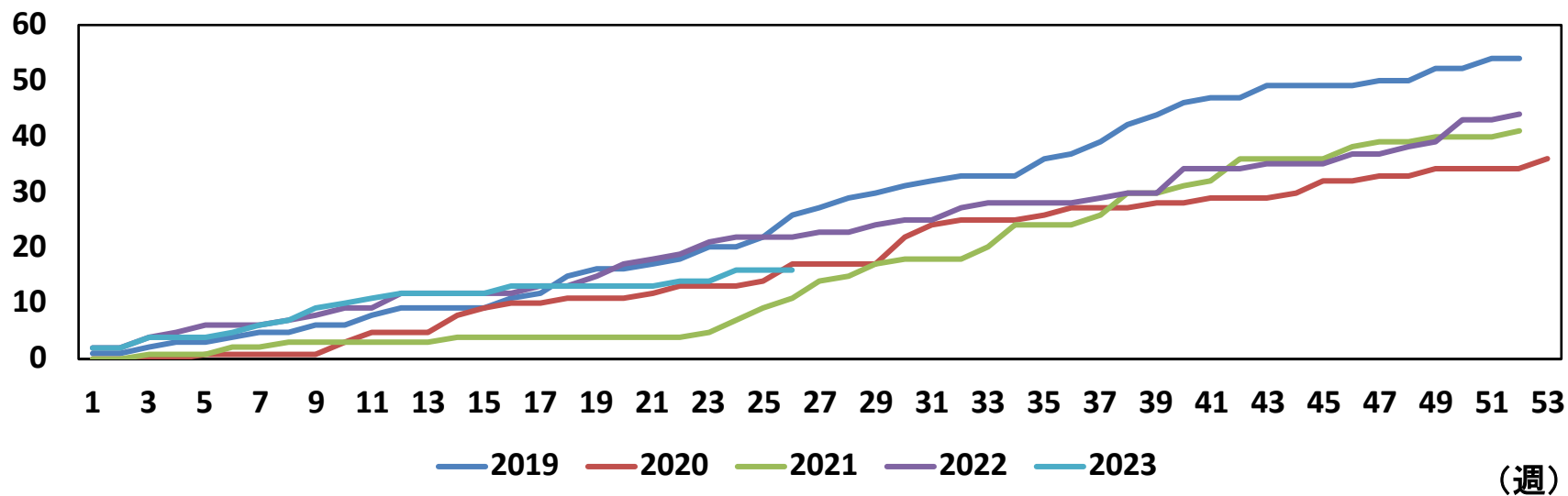
全国平均 1.70

人口10万人あたり報告数(過去5年間)

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	富山	石川	茨城	1.70
	4.25	4.15	3.24	

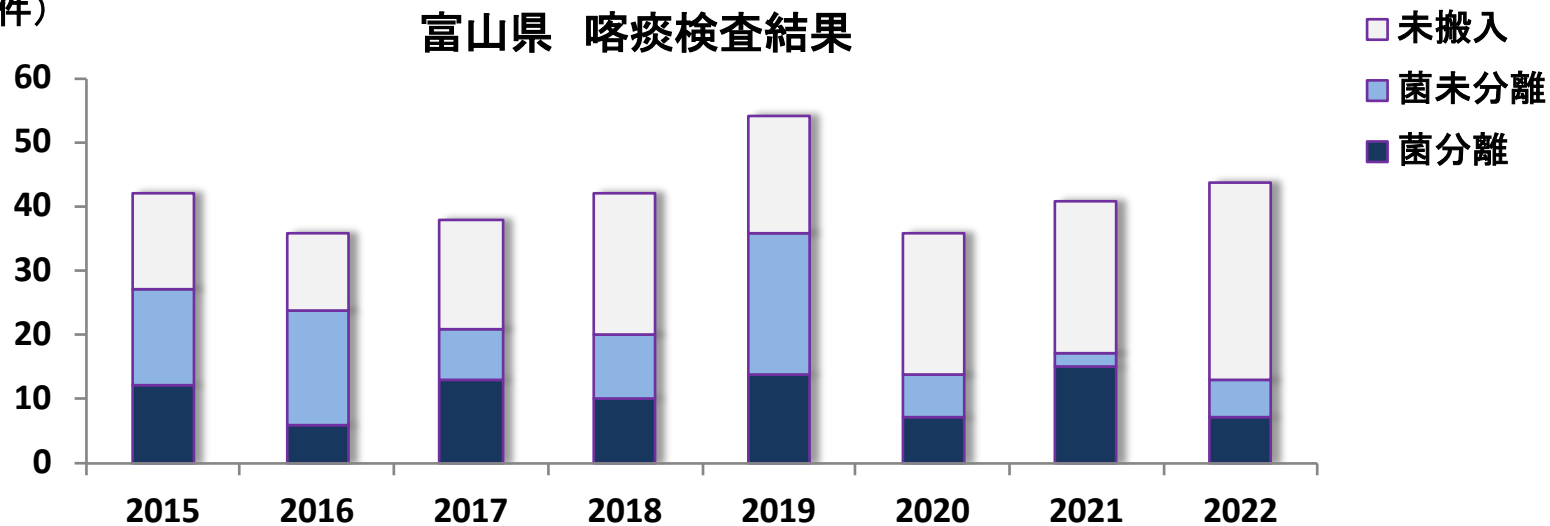
(件)

富山県 累積報告数



(件)

富山県 喀痰検査結果



感染研への菌株送付(富山県)

2022 年 10 株

No.	SG	Year	Month	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST	Group
1	SG1	2021	Dec	7	6	17	10	13	11	6	1273	B2
2	SG1	2022	Jan	2	3	6	10	2	1	6	22	S1
3	SG1	2022	Jan	4	10	11	15	29	1	6	89	(S1)
4	SG1	2022	May	2	3	5	11	2	1	6	120	S1
5	SG1	2022	Jun	2	3	5	3	2	1	9	1186	S1
6	SG1	2022	May	7	6	17	3	11	11	9	505	B2
7	SG1	2022	Jul	12	8	11	21	40	12	9	1694	S3
8	SG1	2022	Sep	12	8	11	2	10	12	2	739	S3
9	SG1	2022	Nov	4	8	11	16	42	12	2	224	S3
10	SG1	2021	Oct	6	10	14	5	21	62	9	3177	B1

近畿ブロックの活動報告

1、レジオネラ属菌外部精度管理について

令和4年度12月に希望する11機地研が参加した。

和歌山市衛生研究所
奈良県保健研究センター
滋賀県衛生科学センター
姫路市環境衛生研究所
東大阪市環境衛生検査センター
京都市衛生環境研究所
和歌山県環境衛生研究センター
京都府保健環境研究所
堺市衛生研究所
神戸市健康科学研究所
尼崎市立衛生研究所

2、レジオネラ混合血清を11機関に配布

3、*L. pneumophila*の血清型別M-PCR試薬の案内

4、レジオネラ検査におけるフィルターの件

アドバンテック製のポリカーボネートフィルターが製造中止の連絡

メルクミリポア製への切替 4地研

5、近畿衛研ブロックのレジオネラ症届出数と検査状況 2022年

	滋賀県	京都市	大安研	堺市	東大阪市
届出数	33	24	110	11	7
喀痰等臨床検体または菌株の検査数	0	0	臨床検体：7 菌株：3	0	0
臨床検体からの分離数、()は菌株数	0	0	3(3)	0	—
関連調査としての検査等	2事例13検体	8	感染源疑い浴槽水検査：8件	0	1施設で2事例、19検体 <i>Legionella pneumophila</i> 1群、3・6群、5群、6群を検出
	神戸市	姫路市	奈良県	和歌山県	和歌山市
届出数	36	6	29 2022年第1週～第52週：7名（和歌山市除く） 2022年度：6名（和歌山市除く）		10
喀痰等臨床検体または菌株の検査数	9	0	1	0	5
臨床検体からの分離数、()は菌株数	7（4）	0	0	0	0(1)
関連調査としての検査等	1事例60件	0	関連調査として浴槽水等11検体を検査し、6検体からレジオネラ属菌を検出	44	3

6、感染研への菌株送付（神戸市）

2022年 7株

- ・ *L. pneumophila* 血清群1 3株
- ・ *L. pneumophila* 血清群2 2株
- ・ *L. pneumophila* 血清群6 1株
- ・ *L. longbeachae* 血清群1 1株

菌株No.	性別	年齢	菌種	血清型	遺伝子型
KL2216	男	88	<i>L. pneumophila</i>	SG6	ST1994
KL2239	男	72	<i>L. pneumophila</i>	SG1	ST138
KL2335	男	52	<i>L. pneumophila</i>	SG2	ST354
KL2345	男	73	<i>L. pneumophila</i>	SG1	ST591
KL2346	男	67	<i>L. pneumophila</i>	SG1	ST736
KL2358	男	85	<i>L. longbeachae</i>	SG1	
KL2436	男	67	<i>L. pneumophila</i>	SG2	ST354

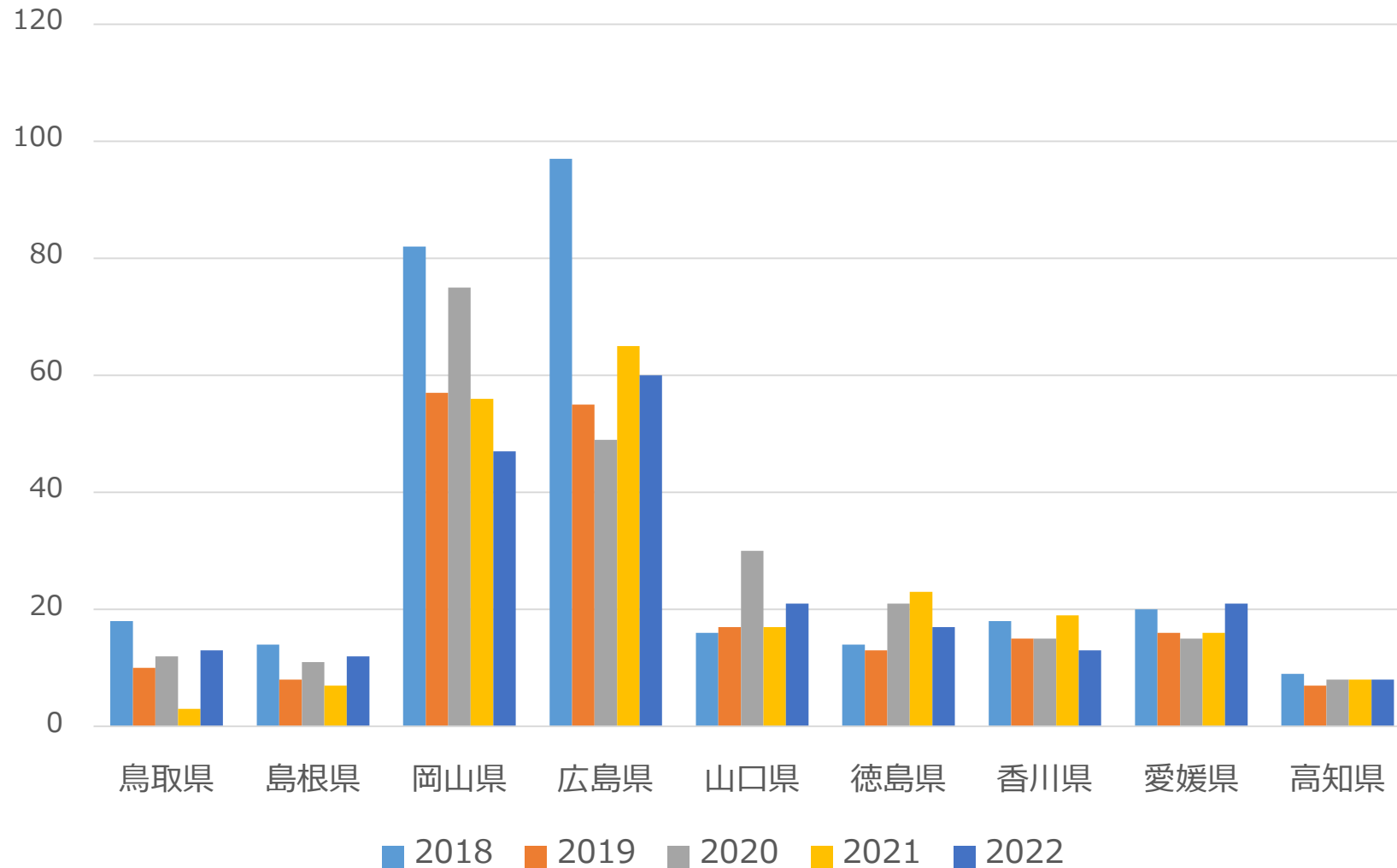
中四国支部報告

広島県立総合技術研究所保健環境センター

令和4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の配布
- 血清群型別用マルチプレックスPCR試薬の配布
- 一部施設にSBT解析ツールの再配布

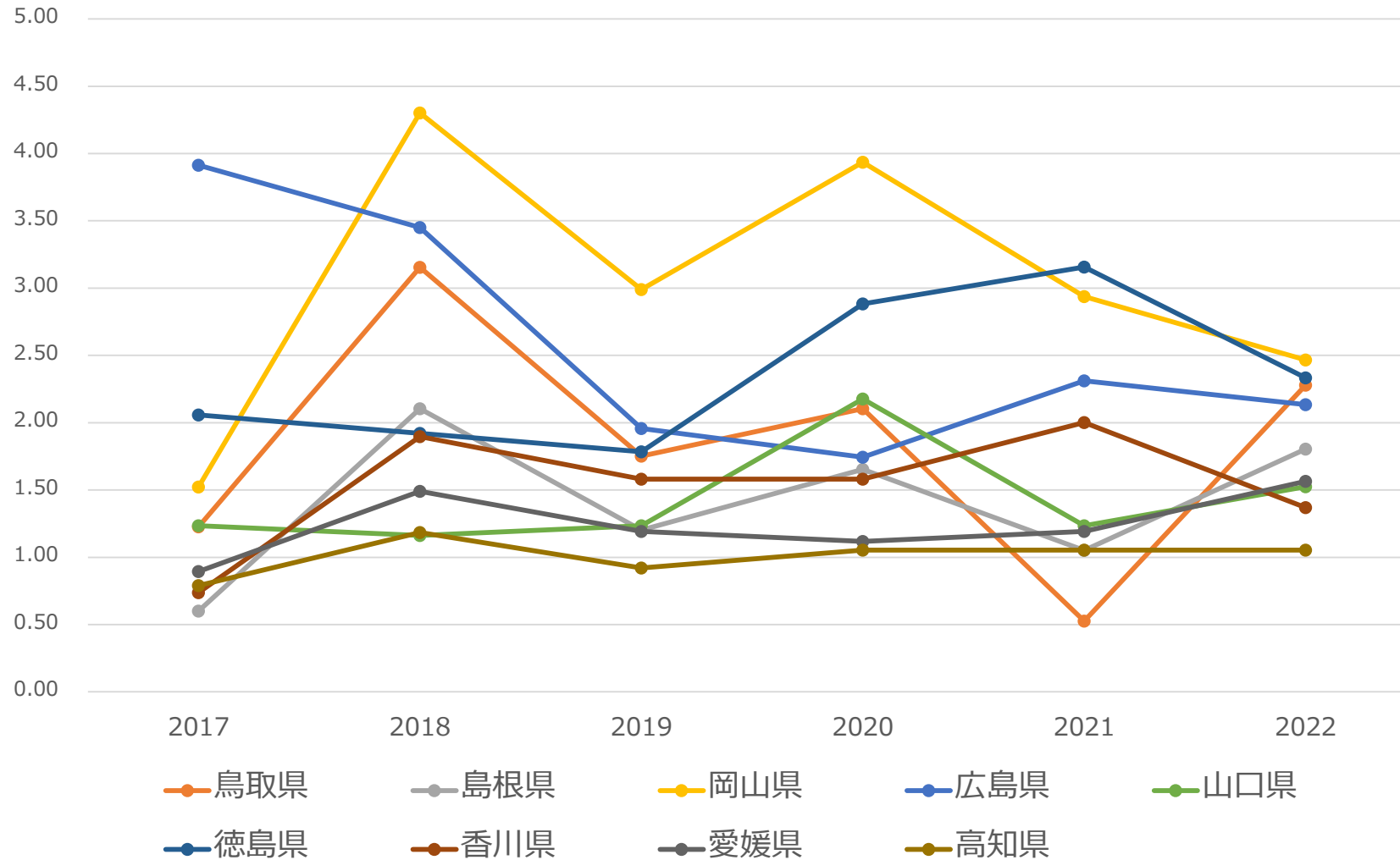
中四国地方のレジオネラ症届出数（実数）



2021年報告数(52週時点)

	報告数	全国順位
鳥取県	13	39
島根県	12	43
岡山県	47	20
広島県	60	13
山口県	21	33
徳島県	17	36
香川県	13	40
愛媛県	21	34
高知県	8	46

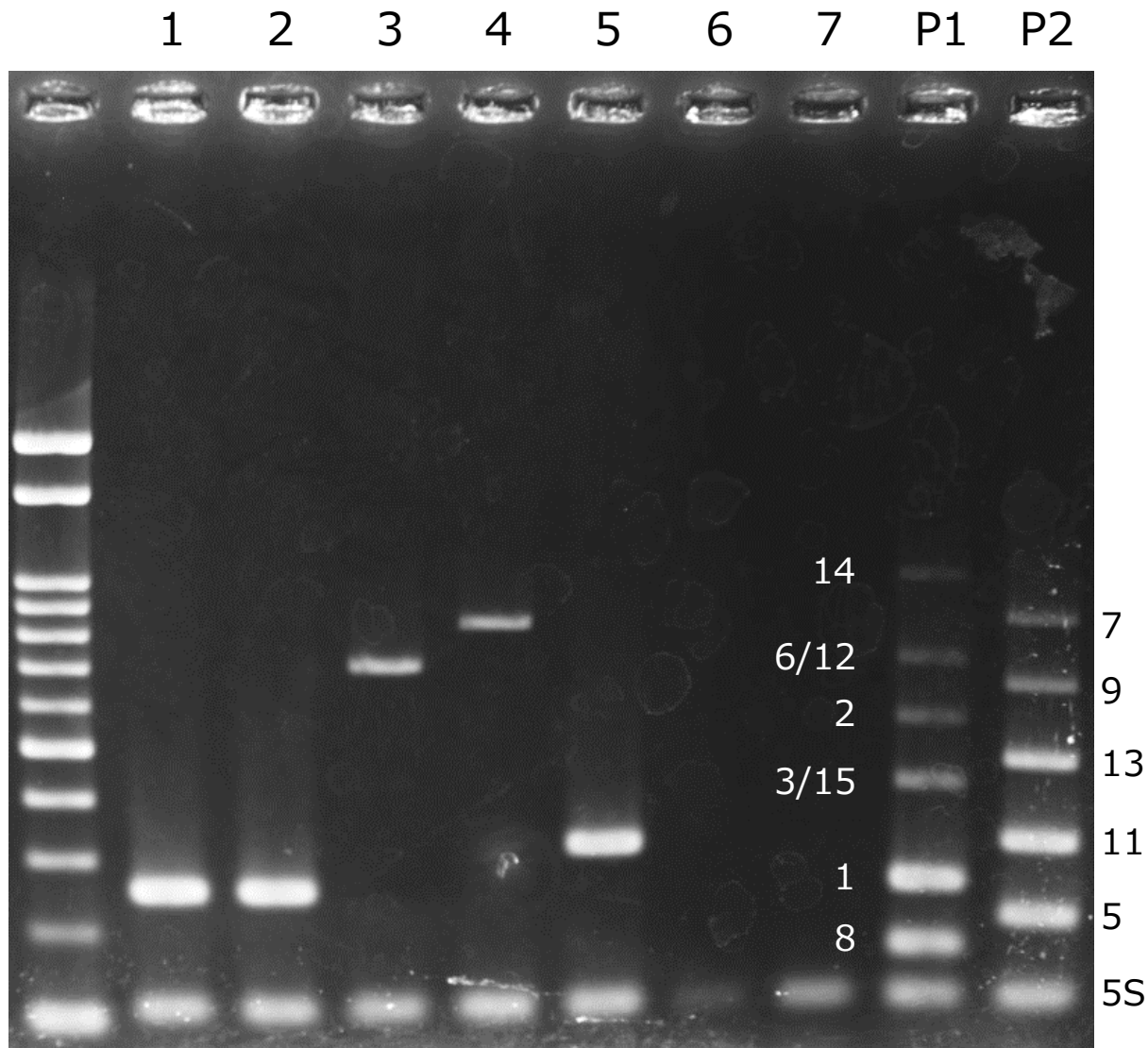
中四国地方のレジオネラ症届出数（10万人対）



2021年報告数(10万人対)

	報告数	全国順位
鳥取県	2.28	11
島根県	1.80	25
岡山県	2.47	8
広島県	2.13	15
山口県	1.52	32
徳島県	2.33	12
香川県	1.37	38
愛媛県	1.56	30
高知県	1.05	43
全国平均	1.69	

血清群型別用マルチプレックスPCRの検討



1: *L. pneumophila* SG1
2: *L. pneumophila* SG1
3: *L. pneumophila* SG6
4: *L. pneumophila* SG7
5: *L. pneumophila* SG11
6: *L. quinlivanii*
7: *L. busanensis*
P1: PTC1
P2: PTC2

- 種・血清群が明らかな株を使用
※1段階目のPCRのみ実施
- すべての株で免疫血清の結果と一致
- 他のレジオネラ属菌では5Sのみ検出

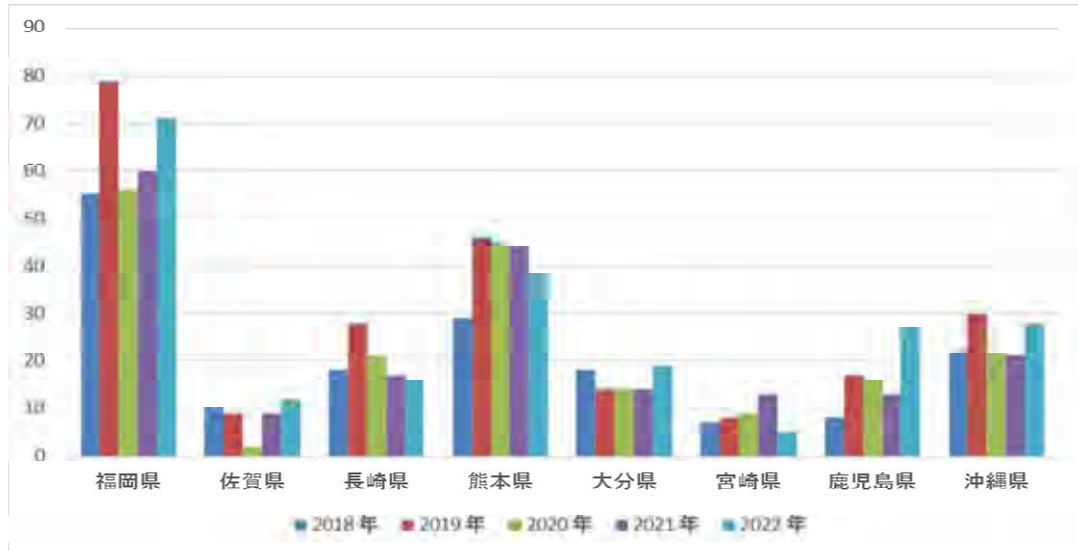


すべての検体で想定通りの結果を示した

血清群別用マルチプレックスPCRの使用感

- 非特異バンドがみられず判定が容易
- 一度のPCRでSG 4/10以外の血清群を判定可能
- 免疫血清と比較して多検体の型別を行いやすい
- バンドの位置が近く、判定が困難な場合がある
 - ┌ ポジコンは2つとも必ず泳動
 - └ 両端にラダーを添加
 - └ 普段よりも長めに泳動

1.九州ブロックにおけるレジオネラ患者発生状況(年)



	2018	2019	2020	2021	2022
福岡県	55	79	56	60	71
佐賀県	10	9	2	9	12
長崎県	18	28	21	17	16
熊本県	29	46	45	44	38
大分県	18	14	14	14	19
宮崎県	7	8	9	13	5
鹿児島県	8	17	16	13	27
沖縄県	22	30	22	21	28
九州計	167	231	185	191	216
全国	2142	2316	2058	2131	2144

2.令和4年度の活動状況

- ・「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
- ・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
- ・免疫血清の配布
本県を除く 8 地衛研へ配布した。
- ・血清型別 Mutiplex-PCR 用プライマーキットの配布
本県を除く 9 地衛研へ配布した。

レジオネラ属菌培養検査 精度管理について



地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部 生活環境課
枝川 亜希子

はじめに

- 精度管理とは QC : Quality Control

検査機関等による、試料の採取から目的物質の測定結果の報告までの一連の作業（検査）について、「一定の水準が維持されているか」、「他の施設との互換性があるか」を担保するための管理・判断の仕組みのこと

その施設内部で行う**内部精度管理**と第三者機関がチェックを行う**外部精度管理**がある

2022年度外部精度管理 レジオネラ培養検査

厚生労働科学研究「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」の一環で、日水製薬株式会社が実施する「2022年度 レジオネラ属菌検査 精度管理サーベイ」に参加

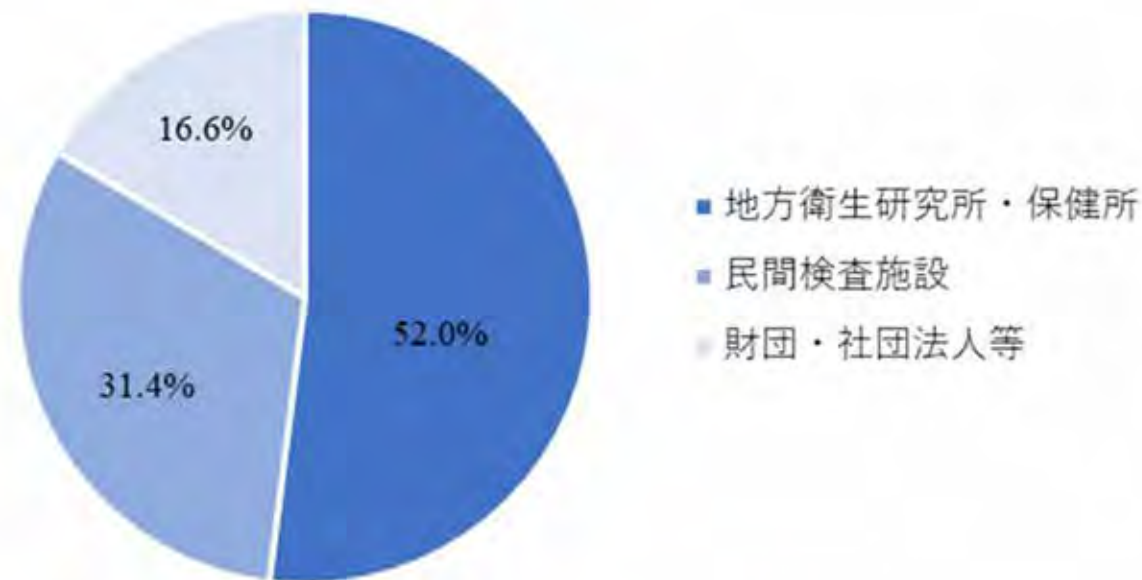
- 募集参加機関：地方衛生研究所等70施設
- 試料発送：2022年11月28日
- 回答期限：2022年12月27日



参加施設内訳

日水製薬サーベイ参加全体 175施設181名

地方衛生研究所・保健所	91施設 (52.0 %)
民間検査施設	55施設 (31.4 %)
財団・社団法人等	29施設 (16.6 %)



(3)濃縮検体 ろ過濃縮法のZスコア傾向※

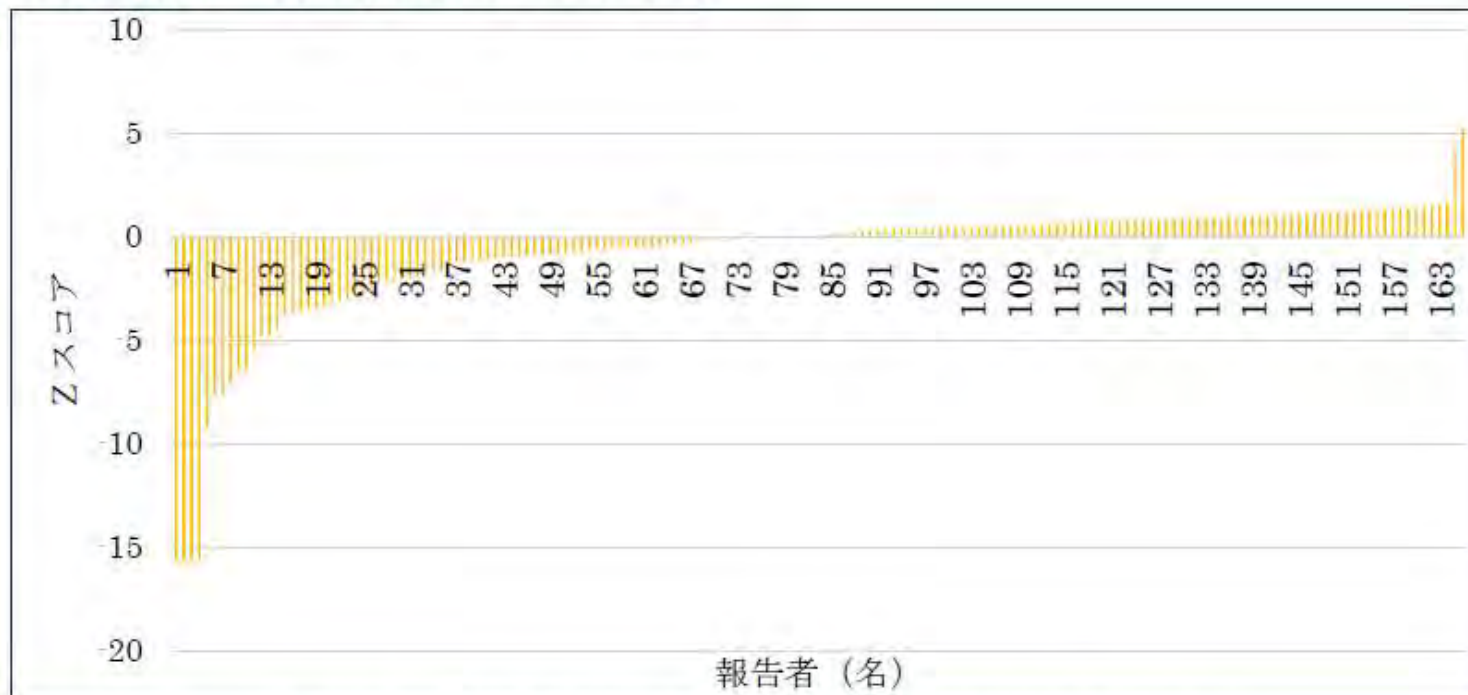


図 13 濃縮検体 ろ過濃縮法のZスコアバーチャート

最終報告値の平均値：10200cfu/100mL(対数値 4.01)

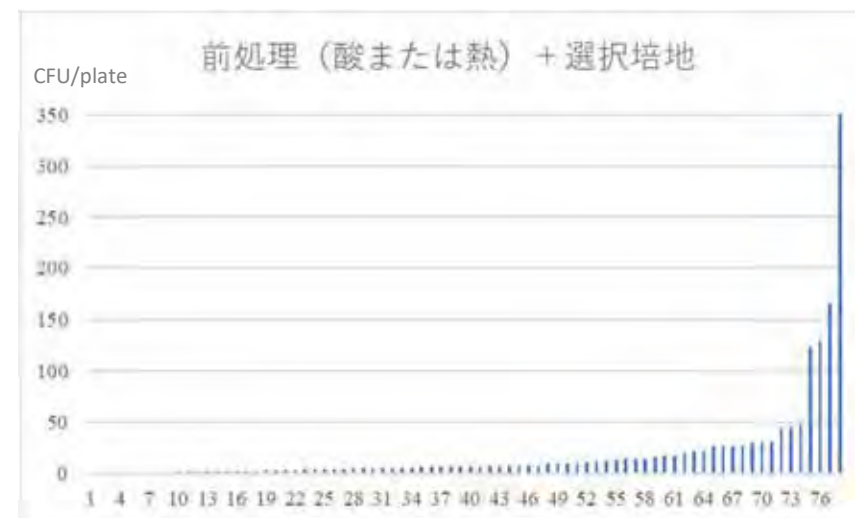
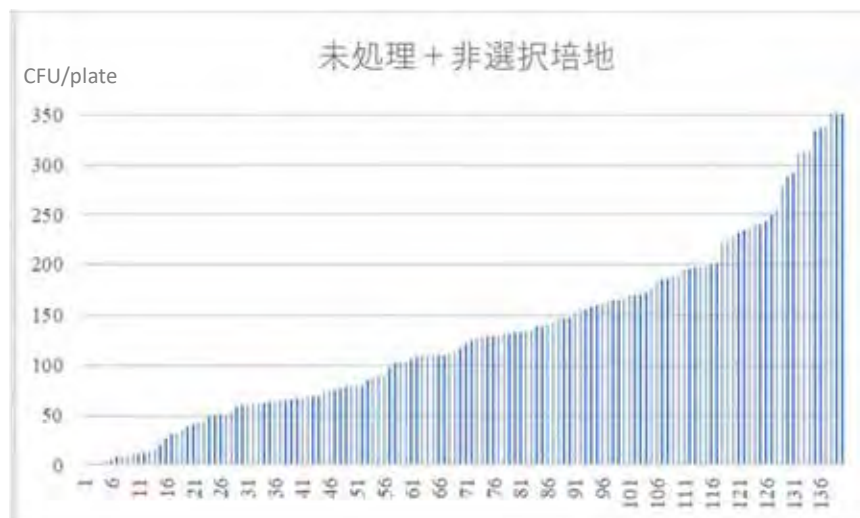
参加者数		Z-score	
		-2<Z<2	範囲外
地衛研等	68	56 (82.4 %)	12 (17.6 %)
その他	98	73 (74.5 %)	25 (25.5 %)
全体	166	129 (77.7 %)	37 (22.3 %)

年度別Zスコア±2以内の割合 (%)



地衛研参加分 (2021年度・2022年度)

菌数 CFU/plate	未処理 非選択培地 (n=140)	前処理 (酸または熱) 選択培地 (n=97)
0	2	19
1-29	14	61
30-99	41	13
100-199	58	3
200-299	16	0
300-500	9	1



レファレンスセンター募集の外部精度管理

これまで、厚生労働科学研究の一環で参加機関を募集（無償）
データの蓄積・各機関での検査技術維持向上に活用

研究班の研究期間は3年のため、3年毎に見直しあり
できるだけ、外部精度管理募集を継続させたい方針
地衛研全体の検査技術の維持向上に繋げる

各機関が希望に合った外部精度管理を選ぶように
選択肢の整備が必要 → 現在進めているところ

日本から参加可能な外部精度管理 3種

- レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ
(島津ダイアグノスティクス株式会社 旧日水製薬)
- FAPAS Food Analysis Performance Assessment Scheme
(英国食料環境研究庁 Fera : The Food and Environment Research Agency)
- EQA The external quality assessment (EQA) legionella isolation scheme
(英国健康安全保障庁 UKHSA : UK Health Security Agency)

内部精度管理の手引き

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令和3(2021)年度 <https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/159647>

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き

別添資料1

環境水中のレジオネラ属菌を計測する方法として、令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知の別添「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」が示された。その中に、検査には「信頼性確保のため、精度管理を実施することが求められている」と記載されている。また、内部精度管理の一例として回収率の確認方法について示されている。この手引きではその確認方法を具体的に示した。この手引きを参考にして、自施設で内部精度管理標準作業書等を作成し、精度管理を遂行することが望ましい。

1. 目的

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的とする。

2. 概要

レジオネラ属菌を添加した内部精度管理用試料水（以下、試料水）について、レジオネラ属菌検査（培養定量）を自施設の検査標準作業書に従って行い、検査結果と添加菌数から回収率を算出して評価する。合わせて、検査手技の安定性を確認する。

11. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成
○磯部順子（富山県衛生研究所）他

1 1. 薬剤耐性菌

令和5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5年6月2日（金）10:00-11:30 @Zoom

○参加者 各ブロック 薬剤耐性菌レファレンス担当施設
（秋田県、横浜市、岐阜県、大阪府、広島県、愛媛県、熊本県）

*会議要旨は、薬剤耐性菌レファレンス担当施設を通して全国地方衛生研究所へ提供済

○議題

1. 令和5年度 薬剤耐性菌検査に関する研修計画
2. 陽性コントロールDNA等配布
3. カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)病原体サーベイランス
4. 令和5年度 衛生微生物協議会関連の連絡事項
5. その他要望、意見など

資料にて報告：令和4年度薬剤耐性菌検査に関する研修実施報告

以降のスライドの赤字は、レファレンスセンター会議での了承事項、今後の動きなどを示す

1. 令和5年度 薬剤耐性菌検査に関する研修計画

	①基本コース（初心者向け）	②アップデートコース（経験者向け）
日時	2023年9月26日（火） 9:00-18:00 27日（水） 9:00-18:00 28日（木） 9:00-12:00	2023年9月28日（木） 14:00-17:00
場所	国立感染症研究所 村山庁舎 （講義のみZoom聴講可）	Zoomウェビナー （国立感染症研究所 村山庁舎からも参加可）
コース 概要	・ 講義及び実習 ・ 健感発0328第4号（平成29年3月28日）別添1～3の検査項目を実施 ・ 薬剤耐性菌検査及び薬剤感受性試験の基本、国内で分離が多い遺伝子型株・典型的な表現型の株の検査と判定	・ 薬剤耐性菌検査に関する情報アップデート ・ 講義のみ
対象者	原則、令和元年度までの基本コース参加経験のない方	薬剤耐性菌検査実施経験のある方
人数	30名まで	100名程度まで

→ 日程及び概要についておおむね了承された。感染研にて募集要項を作成する。
レファレンス担当地研は、募集要項を各ブロック内に連絡し、参加希望者をまとめる。
可能な限り希望者全員参加できるようにしたいが、基本コースの希望者数があまりに多い場合の対応は要検討。

2. 陽性コントロールDNA等配布

- ・ 2023年8月下旬頃にDNAセットを一斉配布。DNAの種類は、昨年度（令和4年度）のものにFRI型を追加する予定。
- ・ DNAの追加送付希望があれば感染研へ個別に連絡。年度途中でも対応可。
- ・ 試験手順動画の新規作成予定なし。研修資料及び昨年度までに作成した動画DVDを冬頃に送付することを検討中。

→ 感染研にてDNA配布案内を作成する。レファレンス担当地研は、各ブロック内に連絡して送付希望をとりまとめる。

3. カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）病原体サーベイランス

- ・ CRE 2021年検体採取分の集計結果は、IASR掲載準備中。
- ・ CRE 2022年検体採取分 集計時期について
- ・ NESID病原体検出情報システム更改後（2023/3/13～）の入力について

→ CRE2022年検体採取分の集計時期は改めて案内するが、検査が終了したら順次入力をお願いしたい。なお、NESIDシステム更改後のCRE検査結果入力に関して、現時点では特段のトラブルや問い合わせは受けていない。

4. 令和5年度 衛生微生物協議会関連の連絡事項

→ 岐阜県にて開催。協議会当日に、薬剤耐性菌レファレンスセンター会議は開催しない。

5. その他要望、意見など

→ 研修後に資料を共有してほしいとの意見があった

資料 令和4年度 薬剤耐性菌検査に関する研修実施報告

日程：令和4年10月5日（水）及び6日（木）

方法：ハイブリッド開催（実技は自施設で実施、講義はZoom Webinarで受講）

参加者：64施設121名

内訳 ハイブリッド参加 44施設56名

現地参加 1施設1名

聴講のみ 37施設64名

講師 4施設4名

（敬称略：秋田県健康環境センター 高橋志保、横浜市衛生研究所 小泉充正、
岐阜県保健環境研究所 野田万希子、大阪健康安全基盤研究所 河原隆二）

研修参加者アンケート抜粋

1. 今後の研修方法について、ハイブリッド開催・現地開催のどちらをより希望するか5段階で質問（回答 n=93）

ハイブリッド開催（強く希望・どちらかといえば希望）	38%
現地開催（強く希望・どちらかといえば希望）	34%
どちらともいえない	27%

資料 令和4年度 薬剤耐性菌検査に関する研修実施報告

研修参加者アンケート抜粋

2. 薬剤耐性菌のNGS解析について

Q1. 自施設にNGS装置はありますか？

ある場合は使用経験を、ない場合は装置の設置予定があれば教えてください。（回答者n=93）

	n	%*
ある、使用したことがある	19	20
ある、使用したことはない	56	60
ない、年度内設置予定	2	2
ない、次年度以降設置予定	4	4
ない、設置予定未定・不明	11	12
あるかどうか不明	1	1

Q2. 自施設にNGSがある場合、機種を教えてください（回答者n=75、複数回答可）

	n	%*
iSeq (illumina)	49	53
MiSeq (illumina)	30	32
MinION (Oxford Nanopore)	7	8
MiniSeq (illumina)	1	1
その他	1	1
機種名は不明	4	4

Q3. NGS使用経験がある場合、解読した病原体を教えてください（回答者n=21、複数回答可）

	n	%*
ウイルス	17	18
薬剤耐性菌	7	8
薬剤耐性菌以外の細菌	7	8
その他	1	1
Q1で「使用したことはない」と回答があったが、病原体名の回答有(ウイルス、薬剤耐性菌以外の細菌 各1)	2	2

Q4. 今後、薬剤耐性菌のNGS解析に関する研修があれば参加を希望しますか？（回答者n=92）

	n	%*
強く希望する	57	61
どちらかといえば希望する	16	17
どちらともいえない	11	12
あまり希望しない	5	5
希望しない	3	3

*表中の%は、アンケート全回答者n=93に占める割合を示す。

12. 寄生虫

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人：永宗喜三郎(感染研・寄生動物)

レファレンスセンター活動・寄生虫

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

・課題の寄生虫

(1) 4類 マラリア, エキノコックス **(感染症法)**

(2) 5類 クリプトスポリジウム, ジアルジア, 赤痢アメーバ

(3) 食品媒介寄生虫 **(食品衛生法)**

クドア, サルコシスティス, アニサキス等

食中毒事件票・病因物質の種別

レファレンスセンター等関連会議：寄生虫

話題の提供と情報交換（演者・所属：敬称略）.

A.マラリア

「マラリア：総論、世界と本邦の状況、診断、最新情報など」

（案浦 健・感染研）

B.腸管寄生原虫

「消化管寄生原虫類の実践的検査法の普及による検査体制の強化」

（八木田健司・感染研）

マラリア（コロナ禍で悪化した感染症）

総論、世界と本邦の状況、診断、最新情報など

本発表では、以下の項目について説明した

- マラリア概論
- コロナ禍におけるマラリアへの影響
- マラリアの種類、症状・リスク
- 日本におけるマラリア
- マラリア原虫種の鑑別方法
(ギムザ染色による鑑別診断、RDTsなど)
- 人獣共通感染症としてのサルマラリア最新情報

熱帯熱



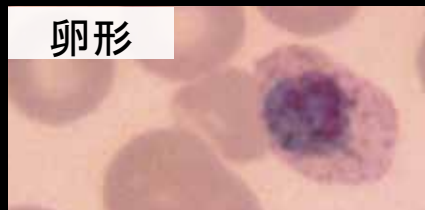
三日熱



四日熱



卵形



発表者、およびマラリアに関する問合せ：
案浦 健 (あんのうら たけし)

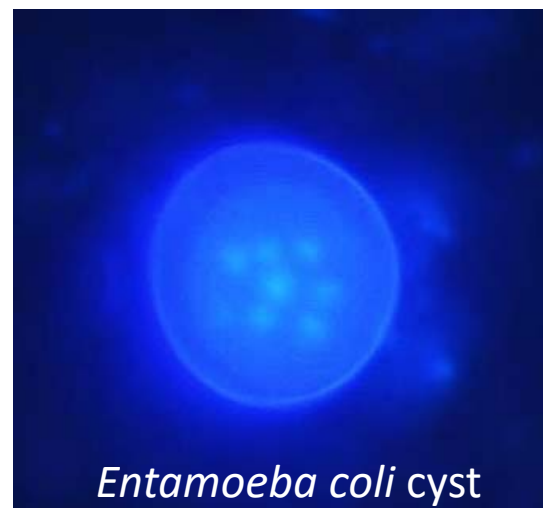
国立感染症研究所・寄生動物部・第3室
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
TEL: 03-5285-1111 内2735
email: annoura@niid.go.jp

消化管寄生原虫類の実践的検査法の普及による検査体制の強化

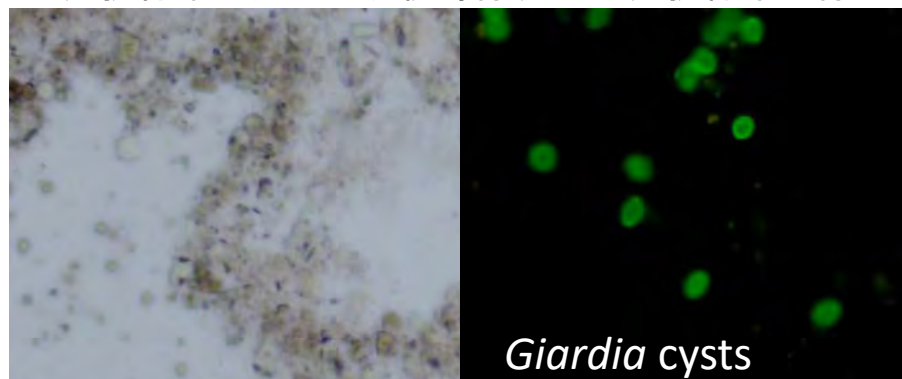
国立感染症研究所 寄生動物部
八木田健司

- 蛍光を利用した原虫検査の有用性を解説
- **蛍光抗体** (クリプトスポリジウムとジアルジア)、**蛍光色素** (赤痢アメーバなど)、また **自家蛍光** (サイクロスポラなど) が利用できる
- “必要な時、すぐできて、結果は明解”な**実践的検査法**として地研での導入を推進。地研の原虫検査機能の強化を図る

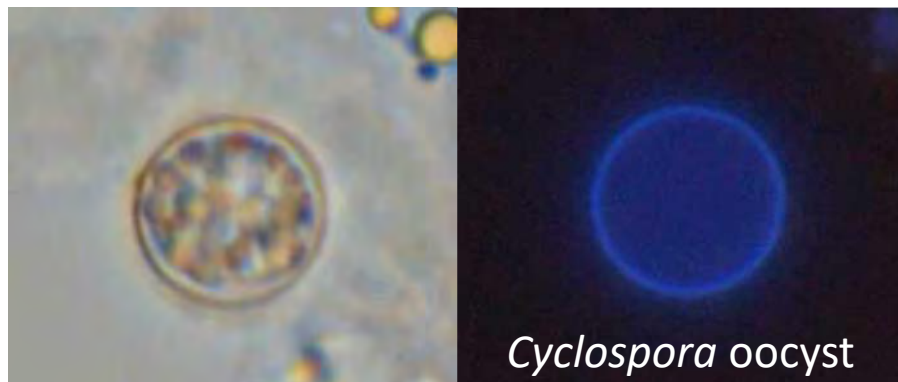
蛍光色素染色法 (CFW+DAPI)



蛍光抗体染色法 (左: 明視野像、右: 蛍光抗体染色像)



自家蛍光検出 (左: 明視野像、右: 自家蛍光像)



レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人: 永宗喜三郎(感染研・寄生動物)

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

13. リケツチア

リケッチア・レファレンスセンター 会議2023

国立感染症研究所
安藤 秀二

令和5年7月5日

本日の予定

- 全国のリケッチア症 発生情報の共有
- R5年度レファレンスセンターの予定
- その他

リケッチア・レファレンスセンターの目的と役割

必要性

1. 国内のリケッチア症(つづが虫病と日本紅斑熱)は、近年においても患者数が多数報告され、死亡例、重症化例もいまだ報告される。地域によって発生時期が異なり、地域状況に即した症例対応が必要となる。しかしながら、報告に必須とされる実験室的診断技術の大部分がイン・ハウスの検査法である。衛研と密に協議し、その技術の標準化に必要な情報分析、技術支援を行う。

2. リケッチア症は、患者発生地域に固有のベクターの消長に関する情報の把握や感染推定地域における感染源(ベクター、動物)の調査が重要であり、その調査技術の伝承・伝達や維持を行う。また、レファレンスセンター組織を機軸とした情報共有や新規リケッチア株、輸入リケッチア症病原体の検出法、検査診断法の構築を検討する。

目的

リケッチア症の病原体サーベイランスに必要となる疫学情報、リケッチア標準株、分離株の共有等、相互信頼と連携、機能強化。

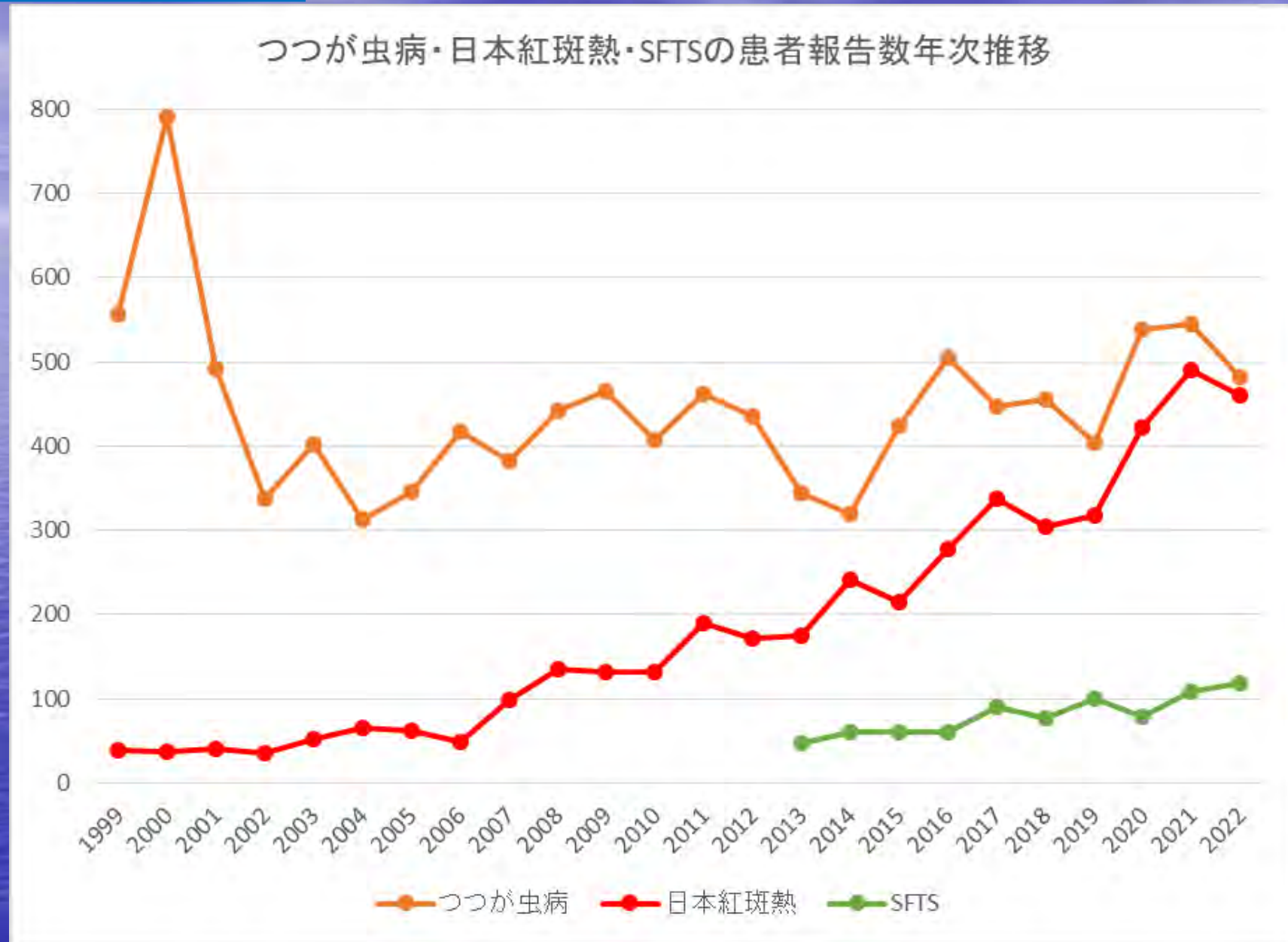
役割

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

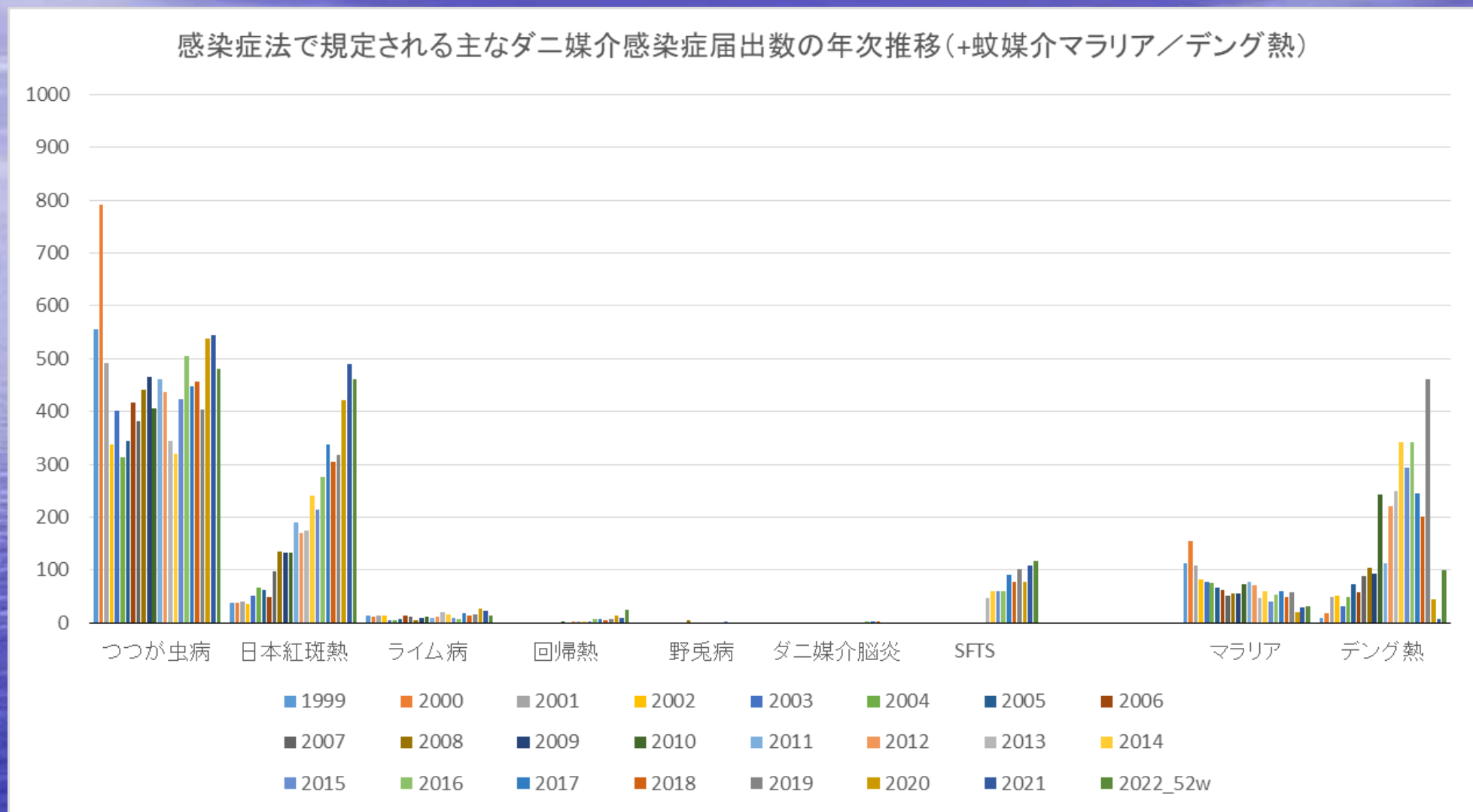
活動状況(役割)

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

全国のリケッチア症 発生情報の共有



全国のリケッチア症 発生情報の共有



つつが虫病

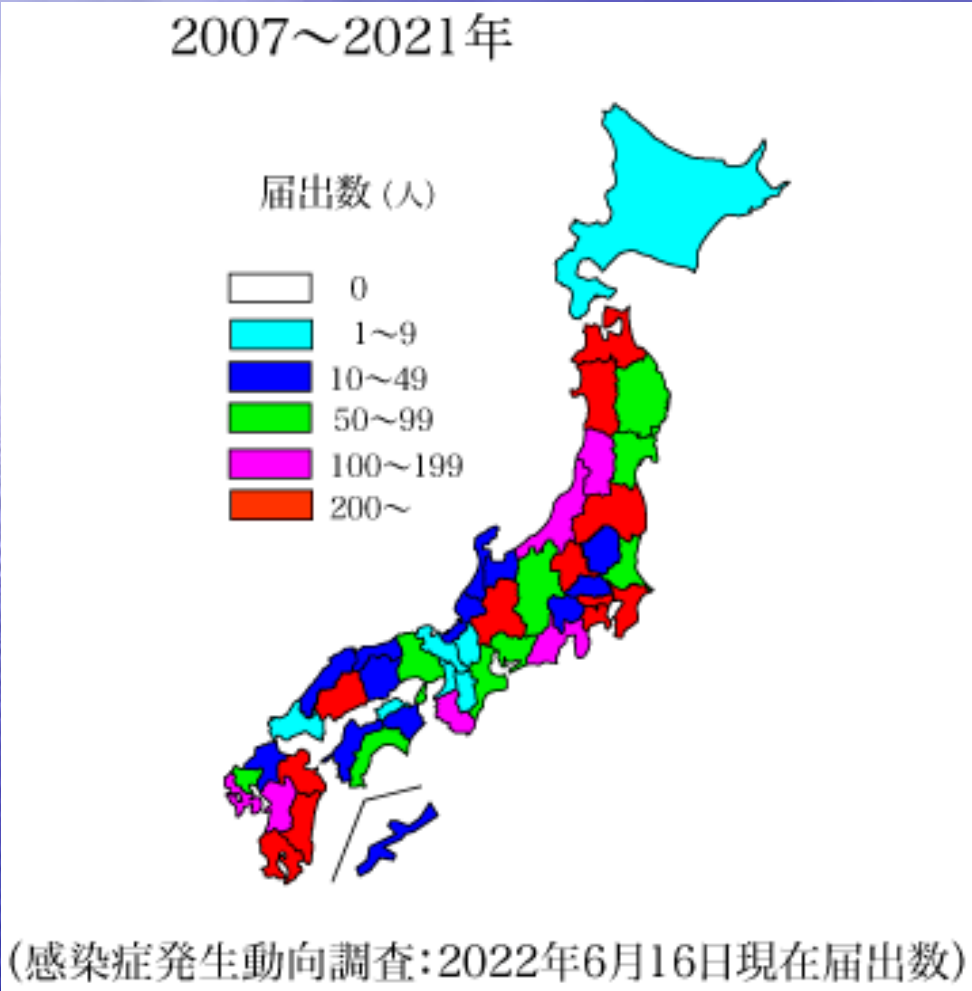
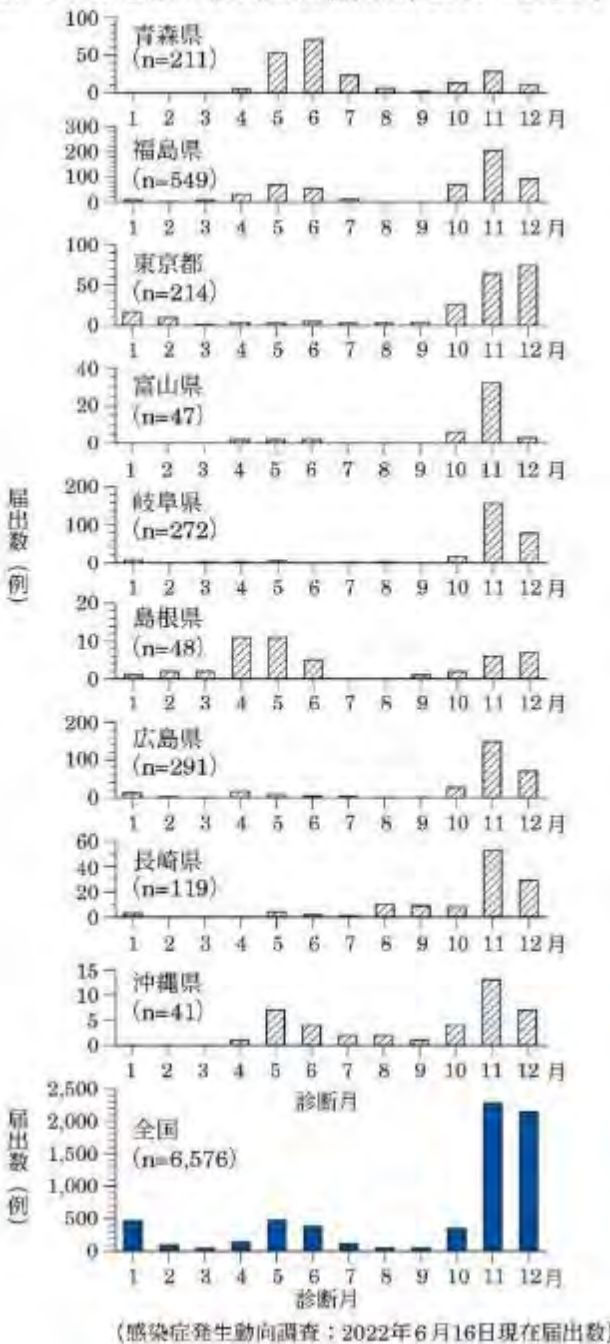
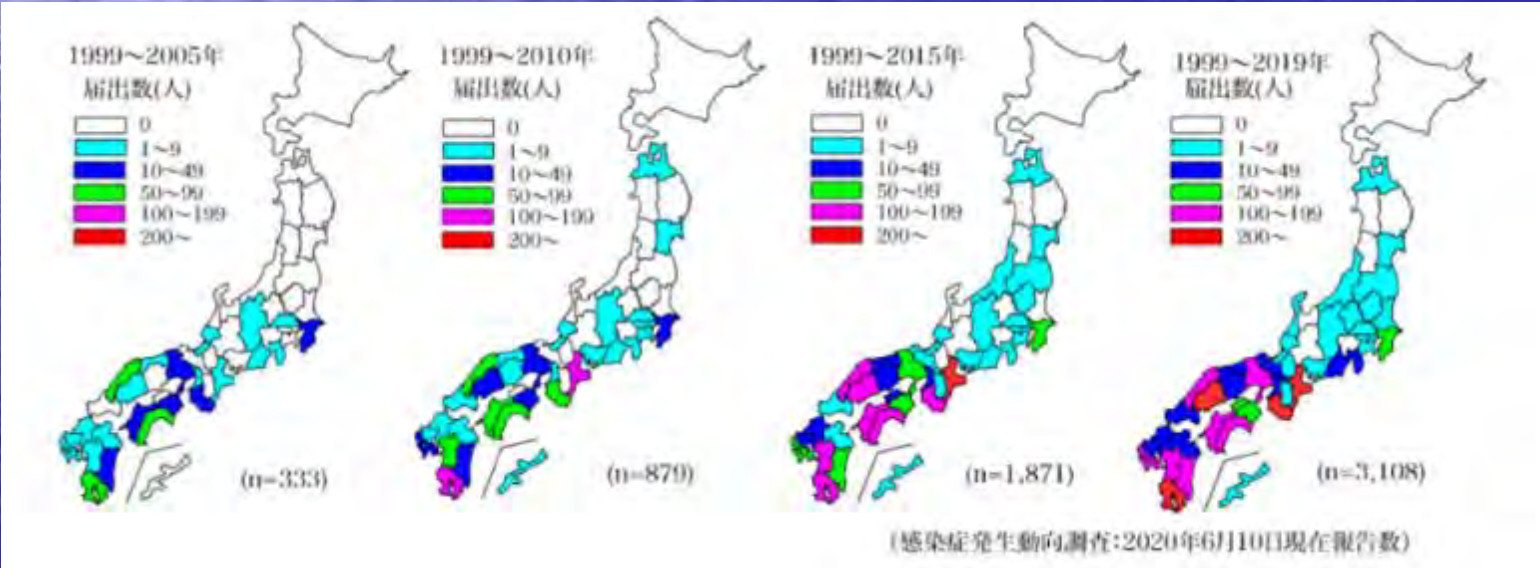


図2. つつが虫の診断月別届出数, 2007～2021年



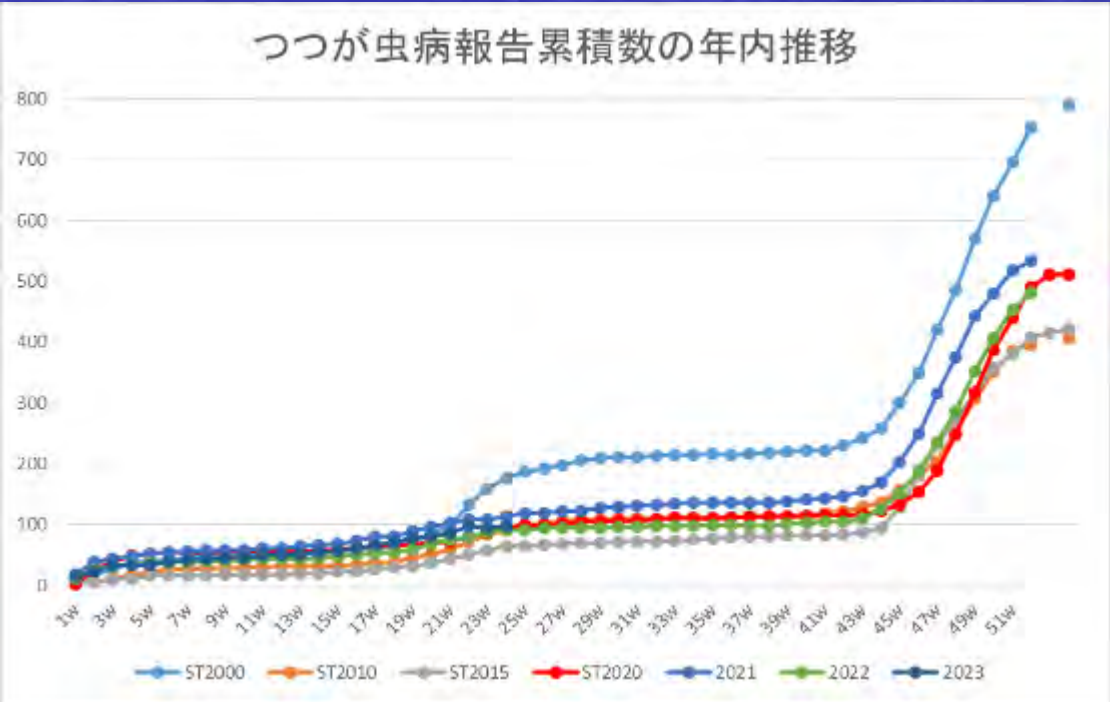
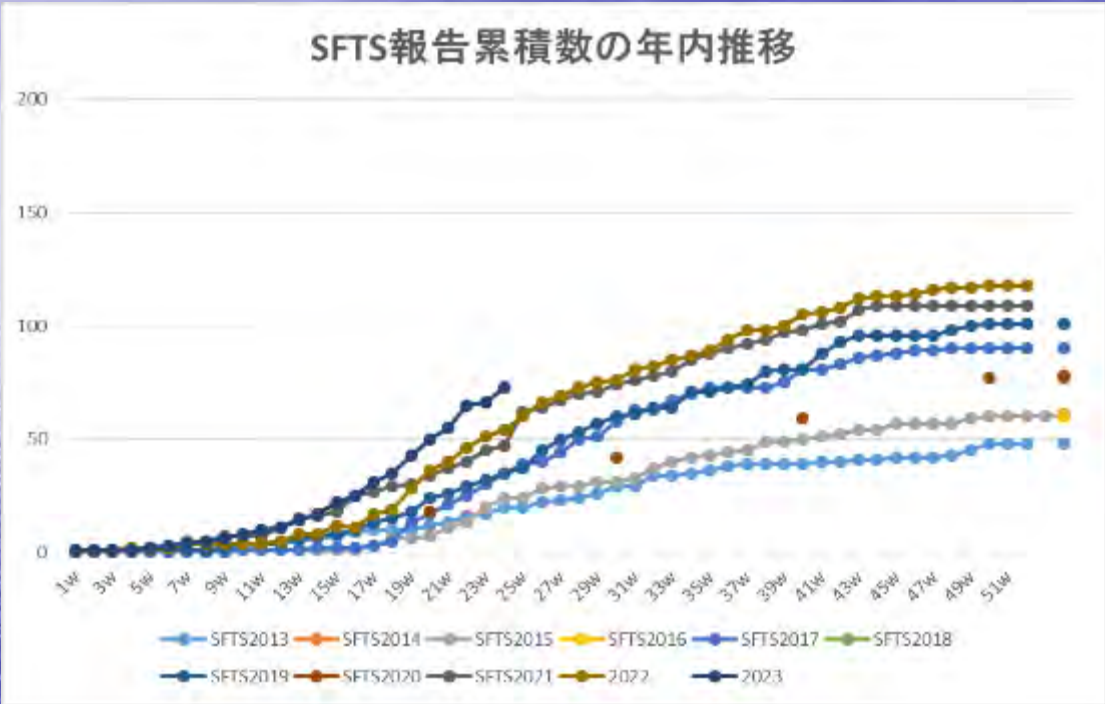
日本紅斑熱



	SFTS			日本紅斑熱		
	死亡	致命率	年総計	死亡	致命率	年総計
1999					0.0	39
2000					0.0	38
2001				1	2.5	40
2002				1	2.8	36
2003					0.0	52
2004				1	1.5	66
2005				1	1.6	62
2006				1	2.0	49
2007					0.0	98
2008				1	0.7	135
2009				1	0.8	132
2010				3	2.3	132
2011				2	1.1	190
2012					0.0	171
2013	14	35.0	40	1	0.6	175
2014	16	26.2	61		0.0	241
2015	11	18.3	60	5	2.3	215
2016	8	13.3	60	3	1.1	277
2017	8	8.9	90	6	1.8	337
2018	4	5.2	77	4	1.3	305
2019	5	4.9	102	14	4.4	318

* 死亡は届出時点

全国のリケッチア症 発生情報の共有



- 富山県における日本紅斑熱の確認
- 茨城県におけるOzウイルス感染症
- 中国地方におけるShimokoshi型つつが虫病の確認

詳細は各自治体から後日？
OzはIASR発表(速報)済み

PCR/qPCR用の合成プラスミドPCの検討

- SFTS／DENV／CHIKVのContAmplicon (CA)を用いた合成PCを参考
- ユーロフィンにプラスミドの合成依頼
 - － 各所でコンスタントに品質のそろったPCが準備可能となる
- 機器ならびに試薬に関し、各所で評価

qPCR用の合成プラスミドPCの検討

リアルタイムPCR (1) SFG and Tsutsugamushi Diseases

*紅斑熱群リケッチア (*R. japonica* 含む) とつづが虫病リケッチア (*O. tsutsugamushi*) の Duplex Real-time PCR (Kawamori et al, 2018)

日本国内の紅斑熱群リケッチアとつづが虫病の多様性, 輸入リケッチア症を幅広く拾い上げるために開発された Duplex の系である. 試薬調製が比較的単純である利点がある.

①プライマー及びプローブ

Primer (probe)	Sequence (5' to 3')
OR-F	GGAGCATGCGGTTTAATTCG
OR-R	GCCATGCAACACCTGTGTGT
(Ot-FAM)	FAM-AATGGAGACATTTTCTTC-MGB
(Rj-VIC)	VIC-CGGATCGCAGAGATG-MGB

②試薬調製 *Premix Ex Taq (Perfect Real Time)(TaKaRa)

Premix Ex Taq (2×) *	12.5 µL
OR-F (10 µM)	0.7 µL
OR-R (10 µM)	0.7 µL
Ot-FAM (10 µM)	0.5 µL
Rj-VIC (10 µM)	0.5 µL
DW	1.1 µL
	each 16 µL
DNA Template	9 µL
	total 25 µL

③反応条件

Initial denaturation	95°C 30 s
PCR Denaturation	95°C 5 s
PCR Annealing/extension	62°C 40 s
PCR Cycle	45 cycles

Light Cycler 98 →

R1マニュアル p8, Kawamori et al

Orientia用ポジコン (Ot-PC)

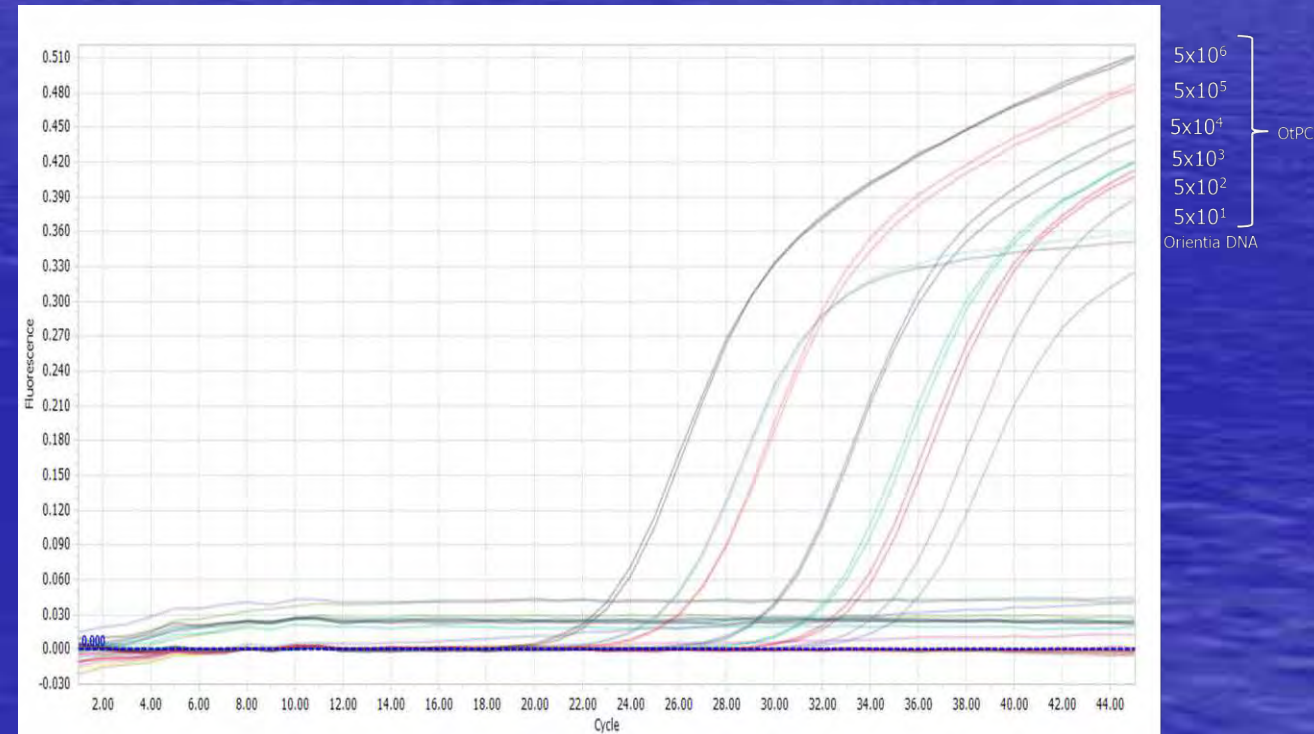
GAATTGACGGGGGCCCCGCACAA

TTAATTTCGATGATCCGCGAAAAA

agtagcttgcctcttcacgtgttacgATGGTAG

ATTTTCTTCAGTTTGGCTGGA

TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT



PCR用の合成プラスミドPCの検討

コンペンショナル PCR

1. *Orientia tsutsugamushi* 共通プライマーによる Nested PCR (I)

プライマーは Gilliam 株と Karp 株の 56 kDa のポリペプチドをコードした DNA 塩基配列を基にし、相同性が高く、合成効率の良い部分を一對のプライマー (34, 55)、変異の著しい領域をはさむように一對のプライマー (10, 11) を設計した Furuya らをベースに Shimokoshi 株も検出できるよう佐藤らの改変を加えたものである。

①プライマー

1 st	Sequence (5' to 3')
34'	ATTGCTAGTGCAATGTCTGC
55'	CTGCTGCTGTGCTTGCTGCG
SH6	TAGTATCTGACTGCTTCTTATCCTTAGAG
Nested	Sequence (5' to 3')
10m2	CCD CCT CAR CCT AMT ATR.ATG CC
10'	CCTCAGCCTACTATAATGCC
11'	CGACAGATGCACATTAGGC

②試薬調製(Taq, Buffer, dNTP は用いる酵素 Kit に準じる)

1stPCR

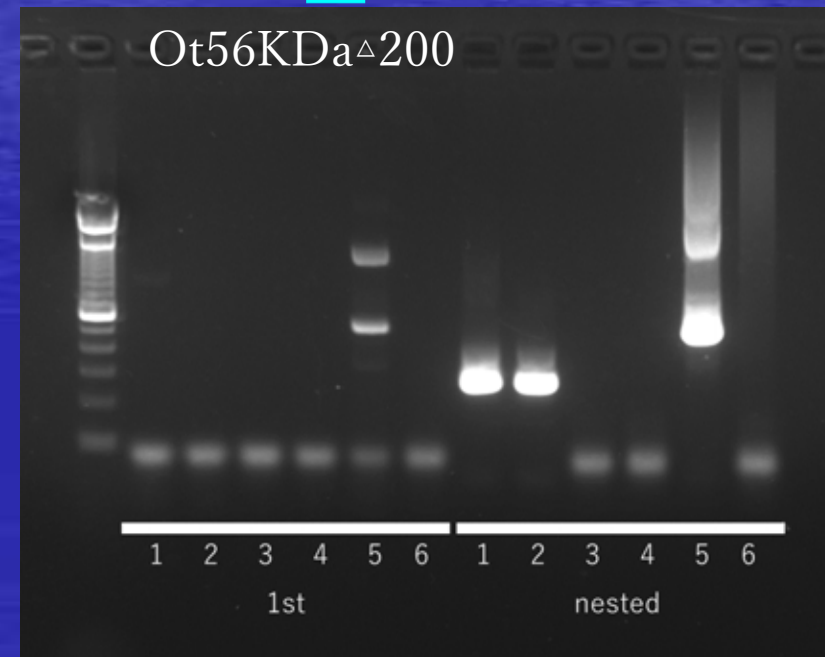
10×PCR Buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
Primer1 (34') (10 μM)	1 μL
Primer2 (55') (10 μM)	1 μL
Primer3 (SH6) (10 μM)*	1 μL
*Shimokoshi を想定する場合加える。不要の	
DW	31.5 μL
Taq (5 U/μL)	0.5 μL
	Each
Template DNA	45 μL
	5 μL
	Total
	50 μL

Nested PCR

上記と同様の組成量で、Shimokoshi 株を想定する場合は (10m2/11') のプライマーの組み合わせ、Shimokoshi 株を想定しない場合は、(10' / 11')の組み合わせを用いる。

③反应条件

98℃	3分	} 35~40 サイクル
94℃	30秒	
57℃	1分	
72℃	1分	
72℃	7分	
4℃	hold	

[illegible]

番号	
1	5×10^2 copy/反応
2	5×10^1 copy/反応
3	5×10^0 copy/反応
4	5×10^{-1} copy/反応
5	$\times 10$ Kp DNA
6	NC

PCR/qPCR用の合成プラスミドPCの検討

- 複数のブロック・レファレンスセンターにおいて、それぞれの施設に用意されている機器、試薬で試行。
- 比較評価後、配列情報等を公開予定。

14. アデノウイルス

衛生微生物技術協議会第43回研究会

アデノウイルス レファレンスセンター会議 開催概要

日 時 令和5年12月21日（木）

午後16時～18時

ZOOM会議

<公開用資料>

参加者

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター 第4室

花岡希（世話人：議決権有）、高橋健一郎

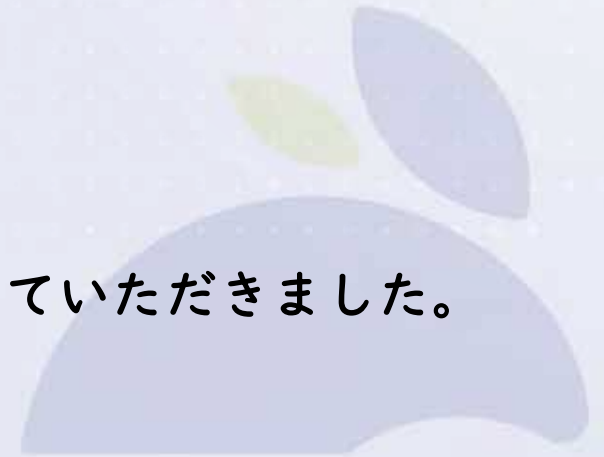
<地区ブロック代表>

- ・青森県環境保健センター
- ・新潟県保健環境科学研究所
- ・東京都健康安全研究センター
- ・大阪健康安全基盤研究所
- ・広島市衛生研究所
- ・福井県衛生環境センター
- ・熊本県保健環境科学研究所

坂恭平 先生
西田晶子 先生
長谷川道弥 先生
廣井聡 先生
山木戸聡 先生
高橋美帆 先生
笠純華 先生

地方衛生研究所等の先生方

＊少なくとも51施設以上、100名を超える先生方に参加していただきました。



会議次第

【開会】

司会：世話人花岡希 注意事項等、地区代表の先生方の参加確認

【議事】

1. アデノウイルスレファレンスセンターの構成、現状確認、議決案件・・・花岡

2. 各ブロック報告

- ・青森県環境保健センター 坂恭平先生/新潟県保健環境科学研究所 西田晶子 先生
- ・東京都健康安全研究センター 長谷川道弥先生
- ・大阪健康安全基盤研究所 廣井聡先生
- ・広島市衛生研究所 山木戸聡先生
- ・福井県衛生環境センター 高橋美帆先生
- ・熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部 笠純華 先生

3. 小児急性関連まとめ：東京都内の原因不明小児急性肝炎における病原ウイルスの探索 東京都健康安全研究センター 浅倉弘幸先生等

4. C種組換え関連：過去の分離株を用いた組み換え型アデノウイルスの探索 愛知県衛生研究所 廣瀬絵美先生等

5. アデノウイルスゲノム解析の話・花岡

6. 議決案件

7. 参加者含めた全体での課題など討論。

昨年度からの課題+確認事項

- マニュアルの更新に関して
→ Fiber 低感度に関して、分離株での実施が基本だがNestedPCR化も継続して検討する。

- アデノウイルスの新型登録問題
→ Human Adenovirus Working Groupが正常に機能していない可能性があり、ICTVを介しての改善を求める。

日本だけで決裁できる方法の提案等を行う。

<裁決> ● NESID登録型の更新(追加)に関して

→ 日本で検出されている、以下をNESIDへの登録依頼を行うことを決裁した。

61、65、79、81、82、85、111

NESID登録に関しては、型の記載がない場合は、ヘキソン型を優先して記入してください。
可能であれば、備考欄にXX型(PxHxFx)という記載をお願いします。

各地区ブロック報告・解析・まとめ

<原因不明小児急性肝炎対応に関して>

- ・約半数程度の地衛研で検査依頼があった。
- ・調査終了の状況含めて保健所や医療機関における引継ぎ等に不安な部分があった。
- ・網羅的な検査に関して、個々の検査系が整備されていない、陽性コントロールが配布されていない病原体に関する検査検討が困難であった。＊マニュアルが整備されていない病原体について、自治体間での検査可否等に差が出ているように感じた。
- ・1症例あたり複数の検体について複数の項目の検査が必要であり、検査担当者への負担が大きかった。また、重症例も多かったことから、原因究明が期待される。

<咽頭結膜熱の急増とこれまでにない流行や、流行性角結膜炎の増加に関して>

- ・新型コロナウイルス流行に伴い患者数の減少、これまで最も日本で流行していたB種3型が検出されていなかったが、2023年では夏頃から検出数が増加し、現在は最も検出されているアデノウイルス型であることが全国的に同じ状況として確認できた。
- ・現在流行しているアデノウイルス型は概ねこれまでの流行型と同様であった。
- ・患者年齢も新型コロナウイルス流行の影響が示唆される状況であった。
- ・一部重症呼吸器疾患と関連した3型系統の検出が全国的にみられ、B種7型との組み換えを考慮した積極的な3型遺伝子解析の検討を継続する。

<アデノウイルス検査法に関して>

- ・共有可能なNGS解析法を作成していく。（公的検査機関対象の限定公開情報ページを利用）
- ＊マイナークローンの存在が明らかとなっており、ロングリードシーケンスやクローン化が重要である。

ロシュ 試薬組成変更に関して

1、上記製品に含まれる Binding バッファーまたは Lysis バッファーに使用されている界面活性剤の変更

変更点	変更前	変更後
界面活性剤	Triton X-100	polidocanol

※組成変更に伴う性能への影響に関しましては、3 ページ目以降の製造元の同等性比較データ（別紙・翻訳版）をご参照ください。

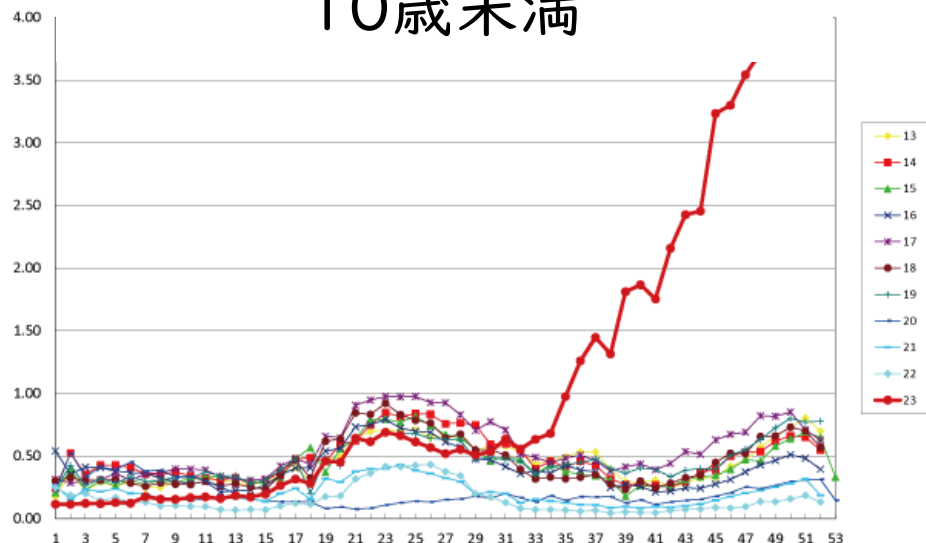
2、組成変更品におけるプロトコルの追加

2-① 下記 3 製品の製品説明書に、サンプルの溶解および DNA 結合処理の新しい推奨培養温度の追加

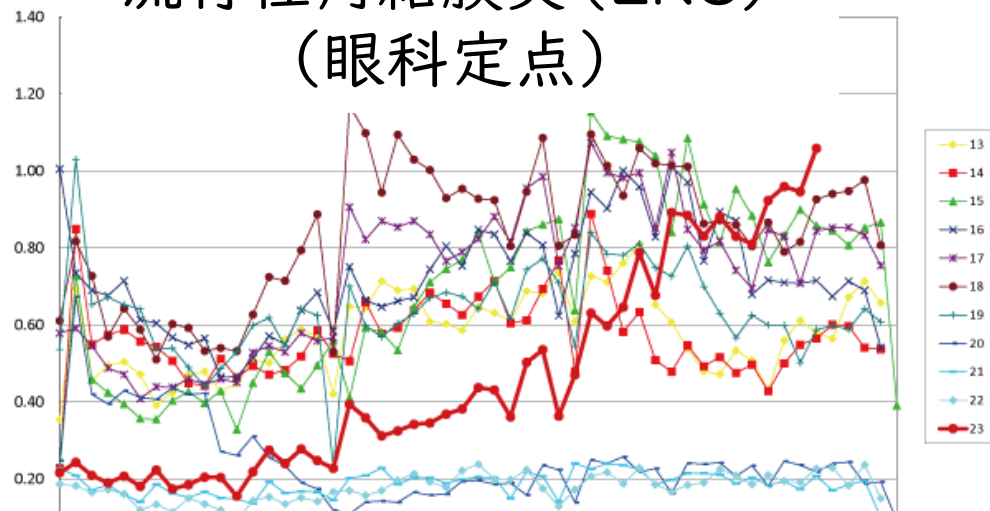
型番	製品名	追加記載
11796828001	High Pure PCR Template Preparation Kit	白血球/56°C/15 分
11858874001	High Pure Viral Nucleic Acid Kit	血清, 血漿/56°C/15 分
05114403001	High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit	血清, 血漿 56°C/15 分

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

咽頭結膜熱（小児科定点）
10歳未満

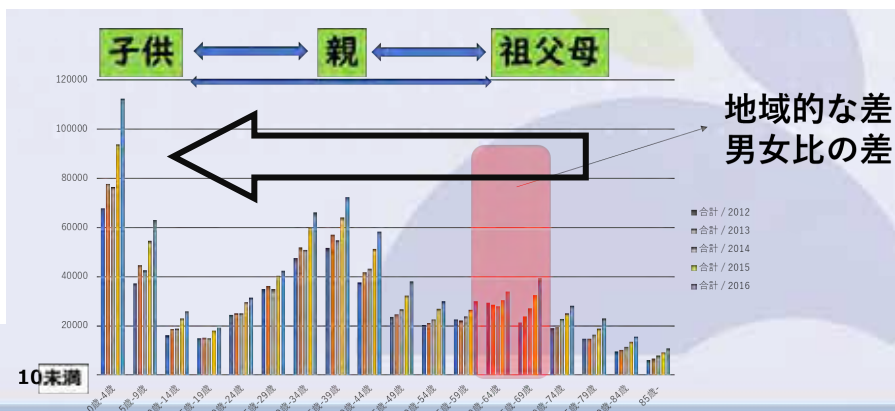


流行性角結膜炎（EKC）
（眼科定点）



コロナ渦で、20年、21年、22年で大幅減少

EKC患者数年齢別変遷 総数



年齢構成に変化ない。IDWRでも同様の傾向

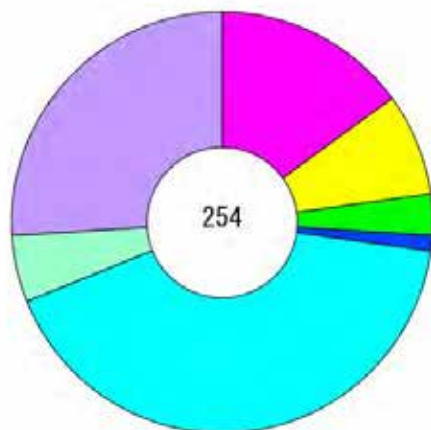
コロナ渦における行動制限解除の
影響が大きく出ている(?)

20年での大幅減少から大幅上昇

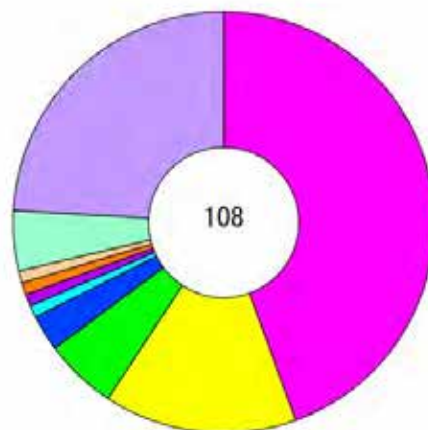
**EKCは親世代から子供への感染
の可能性が示唆**

コロナ渦での感染症発生動向調査結果から感染症の感染環の推測が可能

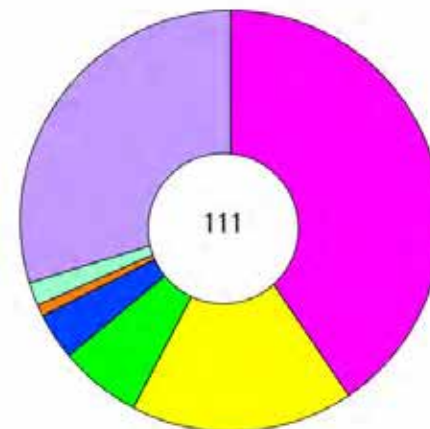
B種3型の再興



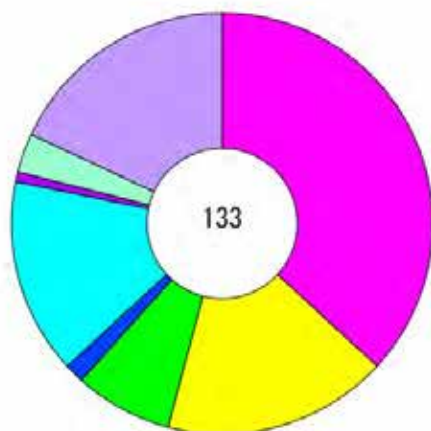
2023年



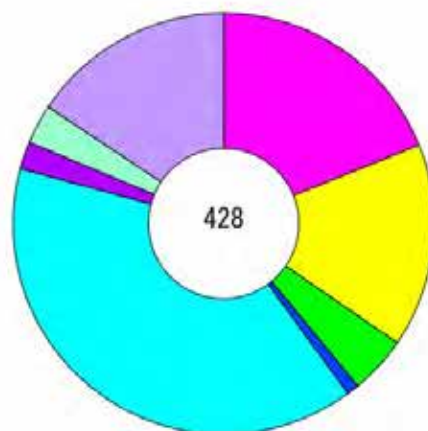
2022年



2021年



2020年



2019年

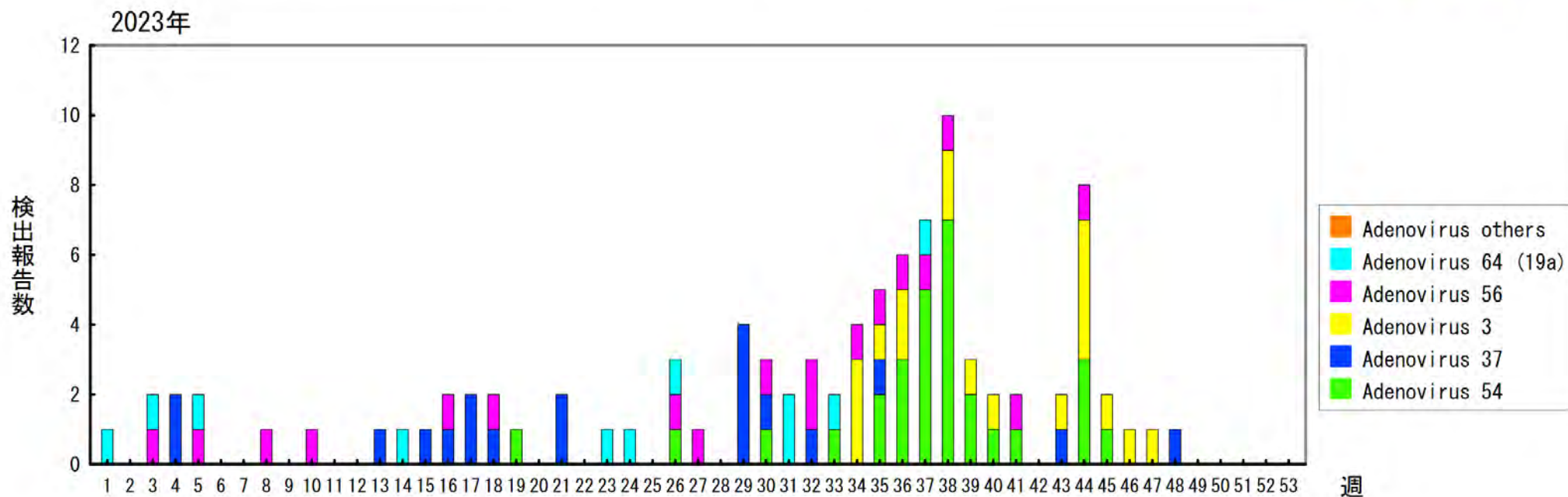
- Adenovirus 2
- Adenovirus 1
- Adenovirus 5
- Adenovirus 6
- Adenovirus 3
- Adenovirus 4
- Adenovirus 37
- Adenovirus 41
- Other adeno
- その他

流行性角結膜炎

* 各都道府県市の地方衛生研究所等からの分離／検出報告を図に示した

IASR

Infectious Agents Surveillance Report



来年度に向けて

- (マニュアルの更新に関して)
Fiber 低感度ーNestedPCR化(検討中)
- アデノウイルスの新型登録問題
- 開催はZoom、12月を予定
- NGSマニュアルの作成と活用を目指す

公的検査機関対象の限定公開情報ページを利用して情報共有する

* 公的検査機関対象の限定公開 病原体検出マニュアルページ内での運用

登録用URL <https://manual.niid.go.jp/niid/entry>

サイトURL <https://manual.niid.go.jp/niid/login>

- アデノウイルス感染症の位置づけ

重点感染症的な流行状況であるが、、

- ・2022年原因不明小児急性肝炎との関連
- ・2023年異次元の患者数増加、2024年？

15. 大腸菌

腸管出血性大腸菌の現況等について

○伊豫田 淳, 李 謙一, 窪村亜希子,
石嶋 希, 泉谷 秀昌, 明田 幸宏

国立感染症研究所・細菌第一部



本日の話題

伊豫田：

1. EHECの感染状況等
2. 血清型別について
3. HUS症例における血清診断等について

泉谷：

MLVAについて

レファレンス会議 「大腸菌」

- 他の病原体レファレンス会議とは異なり、レファレンス担当の地衛研を設定していません（菌株をお送り頂いている、またはEHECの検査に関わるすべての地衛研・保健所等を対象としています）。
- 2019年までは全国衛生微生物協議会の第一日目の午前中に開催（3年に一度感染研が、それ以外は地衛研が持ち回りで主催）。
- 2020-2021年はコロナ禍によって開催せず、2022年からオンライン開催に変更。

今年度会議参加登録：71施設, 115名以上

EHEC感染症の現況・特徴

- ・ 国内で年間 3,000-4,500 名の感染者数
- ・ 感染者の約30-40%は重症例 (小児や高齢者に多い)
- ・ 分離されるO血清群の多様化が進んでいる

経口感染 (10^2 オーダーの菌数で感染が成立)



潜伏期間 (多くは 1- 8 日間, ~14日)



激しい腹痛, 下痢



重症例 (血便, HUS, 脳症, 死亡)

特に10才までの小児に多い (HUS発症率 : 6.1%)

患者の血便

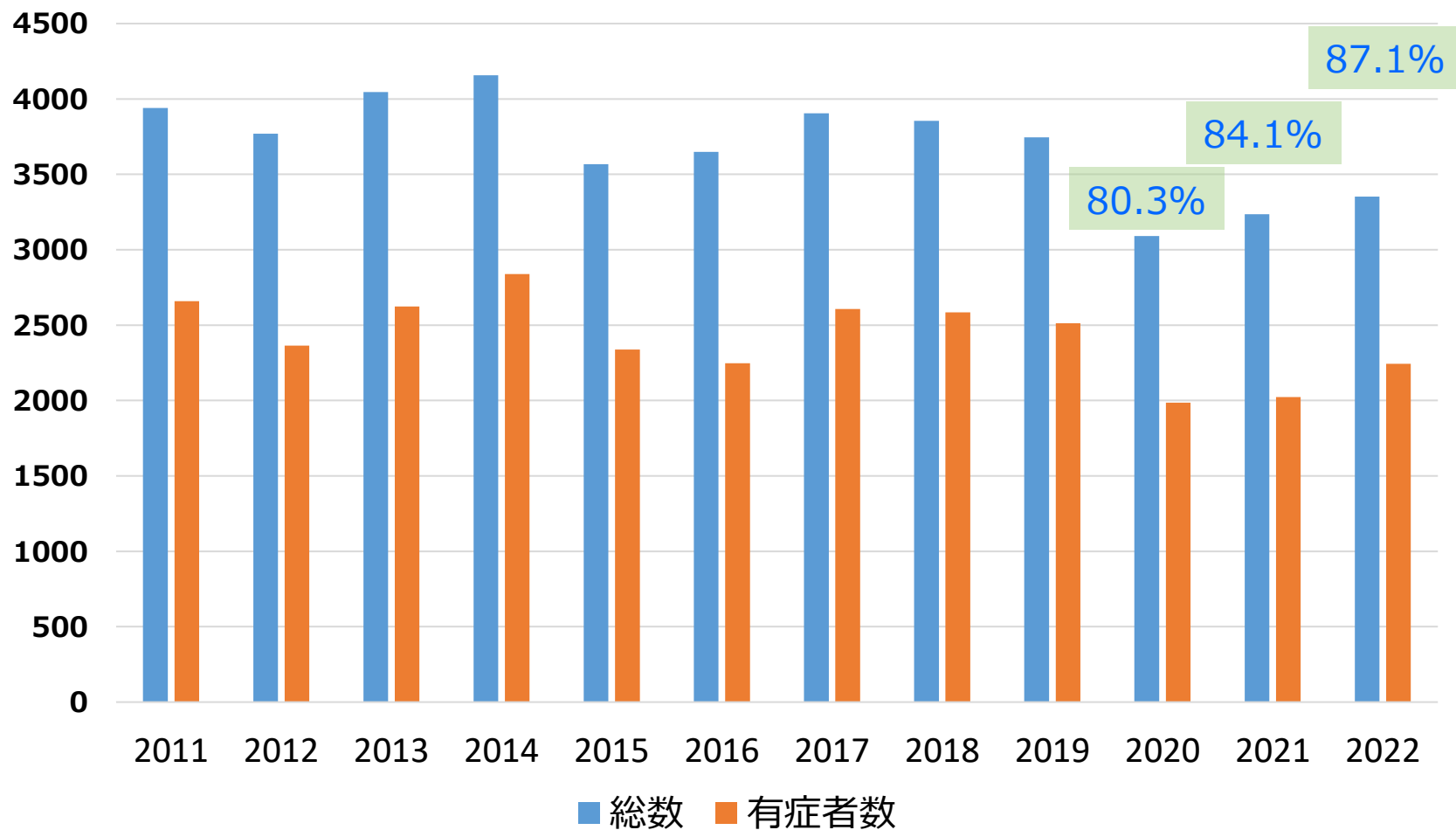


腎後遺症 : HUS患者の20-40%が慢性腎臓病へ移行

(Pediatr Nephrol. 2013; 28(11): 2097-2105)

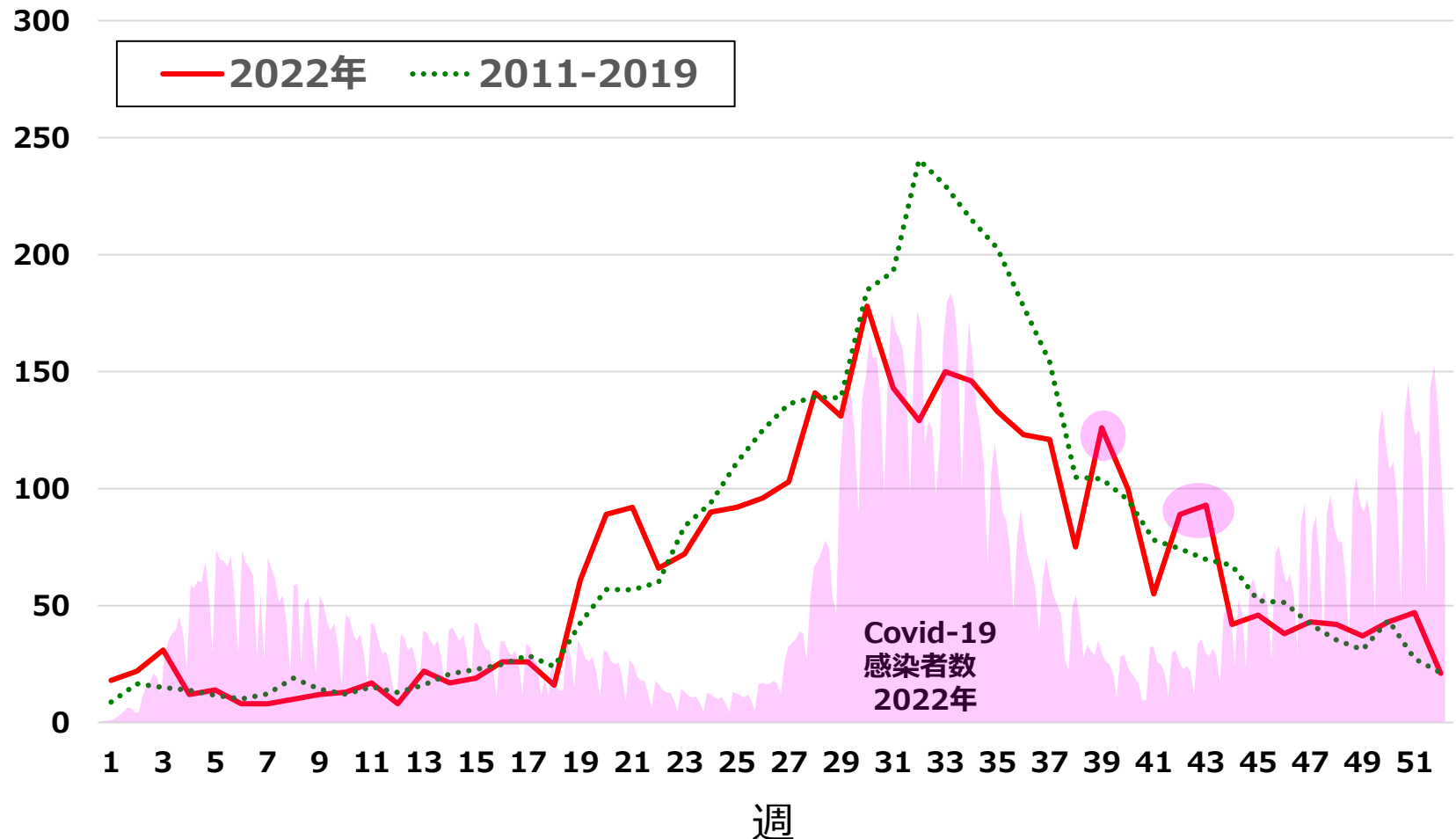
EHEC年次届出数（2011-2022）

2011-2019年平均：3,848



Covid-19パンデミックのEHEC届出総数への影響は限定的

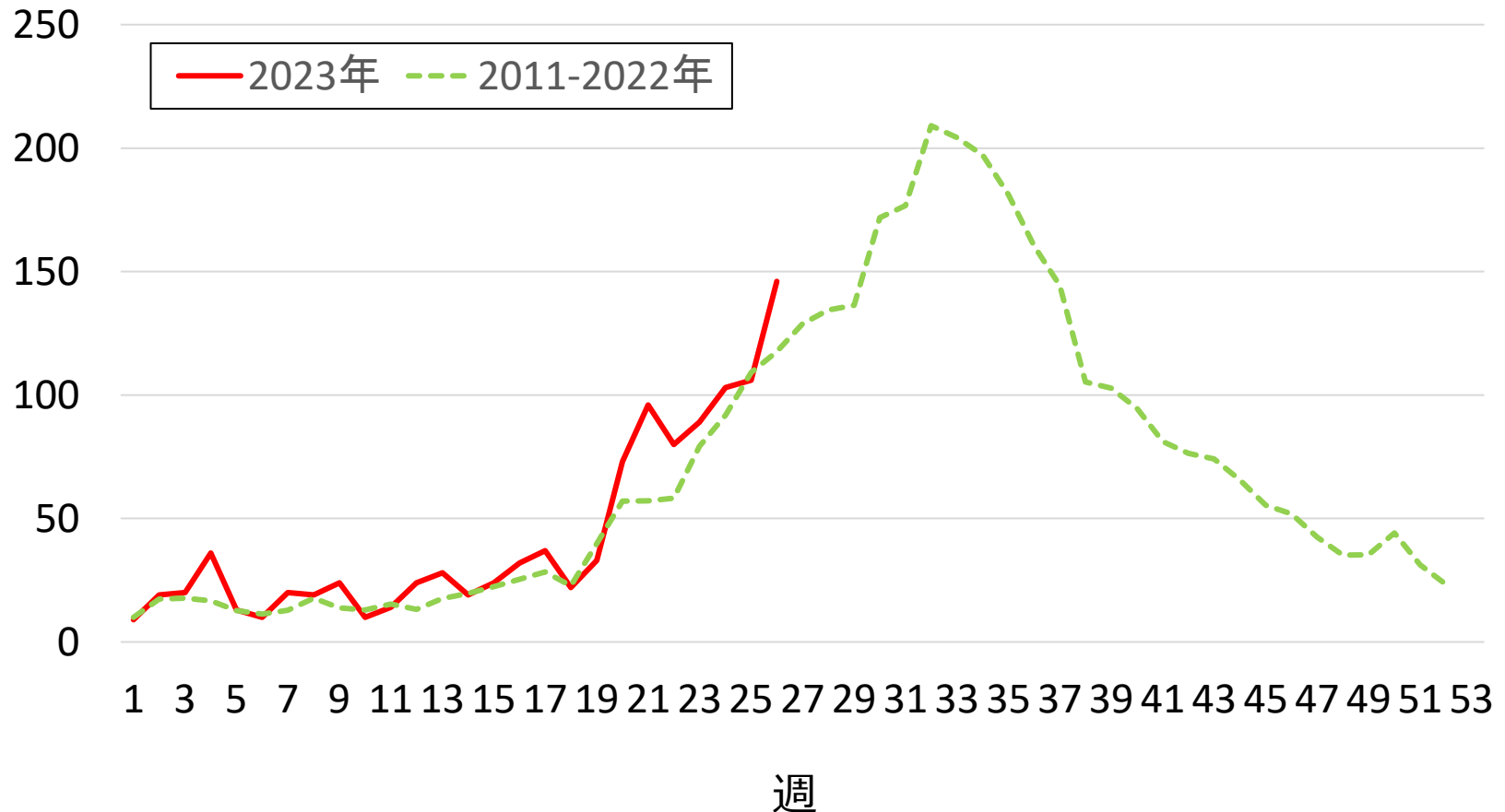
EHEC週別報告数 (2011-2019, 2022)



NESID 集計データ、2011-2019は9年間の平均数

Covid-19 2022年感染者数データ : <https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/open-data.html>

EHEC週別報告数（2023年第26週まで）



2023年第26週までの累積数：1,106
(2011-2022年の第26週までの累積数平均：918)

NESID 集計データをグラフ化、2011-2022年は平均数（2011-2019の平均数：928）

EHECによる食中毒事例・食品汚染事例

IASR 2023年5月号

＜特集関連情報＞

2022年8-9月に京都府で発生した**レアステーキ**等を原因とするEHEC **O157**
食中毒事例：患者40名（入院者6名），**死亡1名**

厚労省HP

O26（VT2産生）が検出された輸入「**馬刺し**」について
2023年2月26日



出典：厚労省ホームページ・公開回収事案詳細
https://ifas.mhlw.go.jp/faspub/_link.do?i=IO_S020502&p=RCL202300471#

レアステーキの提供図

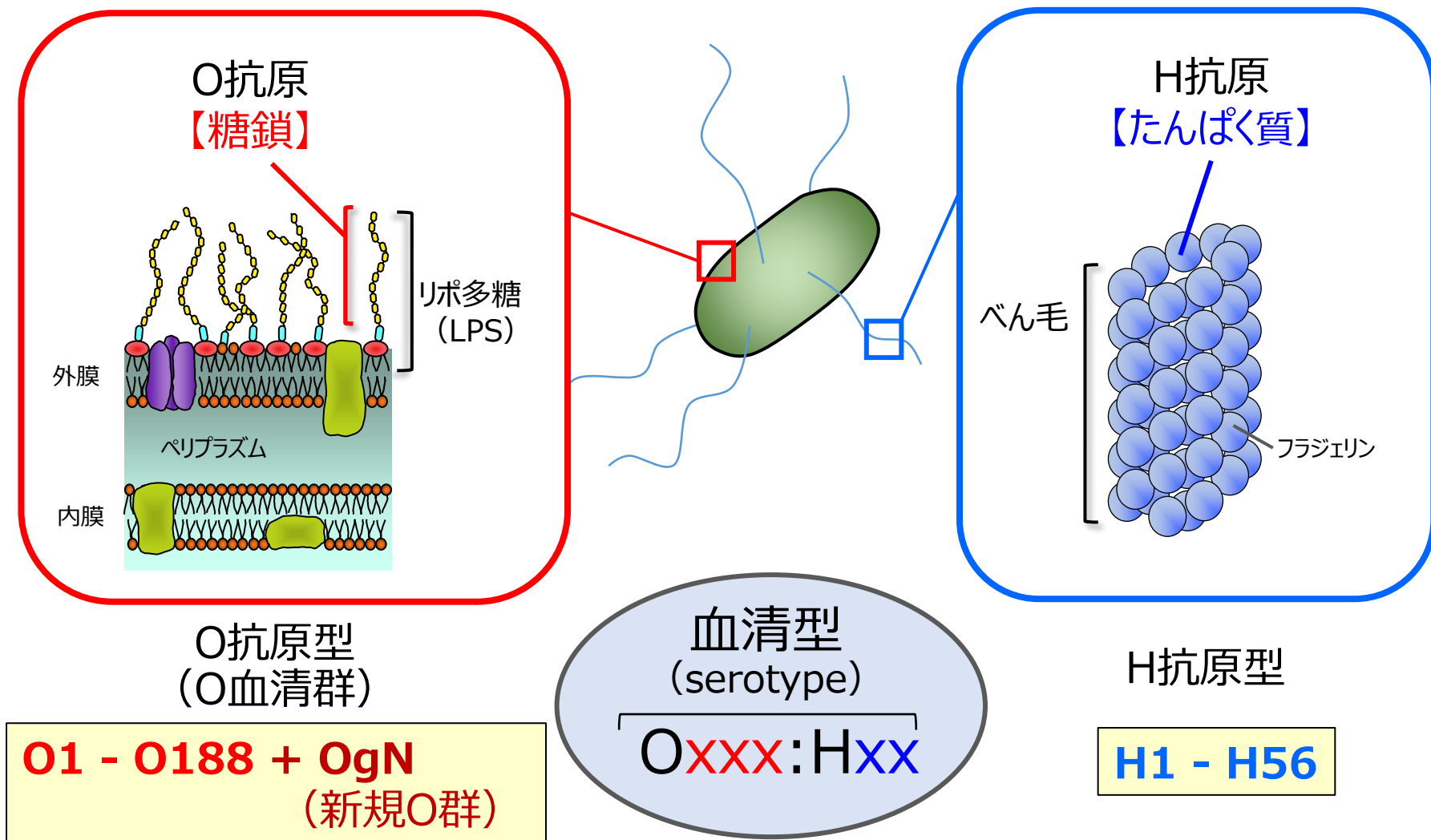


出典：厚労省ホームページ・薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 食中毒部会資料

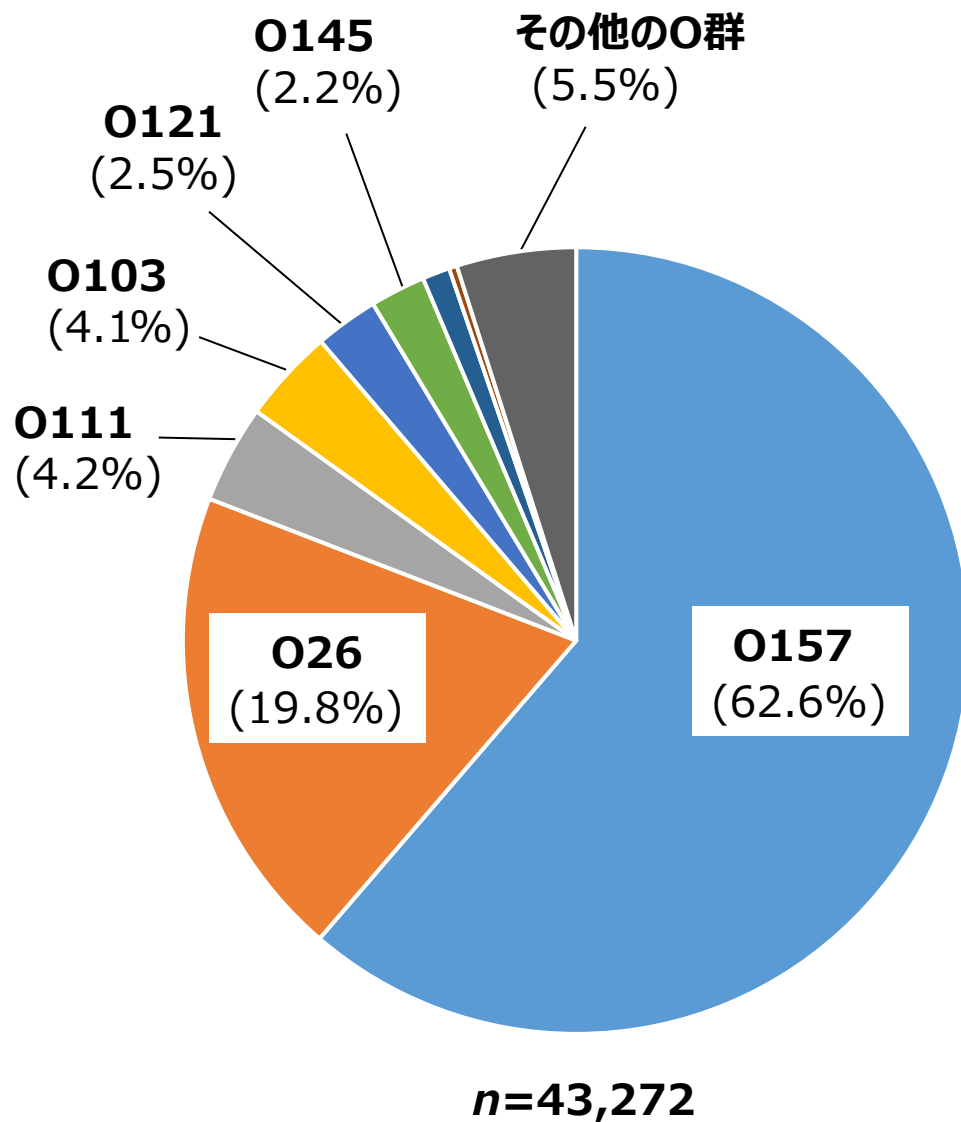
<https://www.mhlw.go.jp/content/12401000/001075569.pdf>

大腸菌の血清型

大腸菌の血清型は O:H の組み合わせで決定される（O群のみの場合は「**血清群O157**」などと呼ぶ）



ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2022)

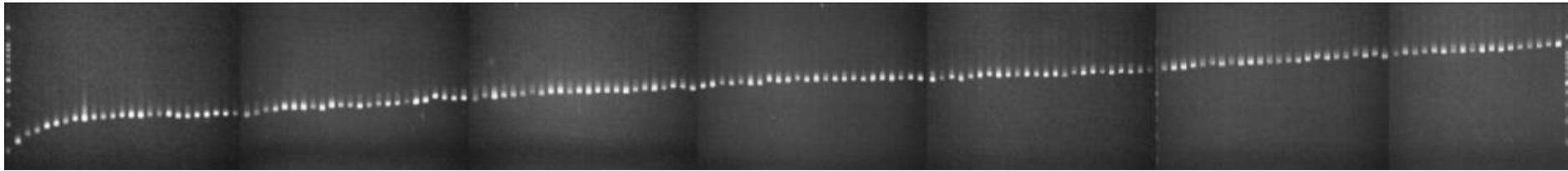


O血清群の多様化

O157, O26, O111, O103, O121, O145 以外の分離率

2007 :	2.0%	5.7%
	↓	↓
2022 :	15.4%	24.6%

E. coli O-genotyping PCR (宮崎大・井口先生)



マルチプレックスPCR法の開発 (全188種類のうち, O14とO57を除くO群を検出可能)

MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	MP 7	MP 8	MP 9	MP 10	MP 11	MP 12
O165 O103 O111 O157 O26 O121 O145 <i>stx1</i> <i>stx2</i> <i>eae</i>	O112ac O148 O158 O114 O144 O159 O169	O1 O146 O119 O142 O167 O74 O125	O63 O6 O126 O143 O27 O168 O136	O78 O128 O15 O166 O161 O29 O55	O91 O86 O152 O8 O115 O25	OGp1 OGp9 OGp11 OGp12 OGp4 OGp3 OGp13 OGp2	O9 O41 O33 O108 O174 O60 O54 O80 O92	O98 O96 O59 O69 O82 O177 O71 O95 O93	O172 O88 O37 OGp8 O23 O163 O170 O99 O116	O150 O30 O84 O183 O75 O113 O160 O138 O132	O40 O45 OGp10 O7 O182 O109 O79 O181 O171
MP 13	MP 14	MP 15	MP 16	MP 17	MP 18	MP 19	MP 20	MP 21	MP 22	MP 23	
O58 O12 O141 O179 O11 O140 O81 O56 O21	O43 O187 O180 O173 O110 O147 O120 O185 OGp15	O102 O38 O64 O51 O61 O70 O35 O34 O97	O133 OGp7 O149 O5 O22 O19 O16 O105 O87	O100 O176 O175 O03 O76 O85 O66 O112ab	O104 O53 O155 OGp14 O32 O65 O154 O131	O184 O48 O39 O10 O28ab OGp5 O36 O156	O130 O49 O4 O52 OGp6 O83 O139 O24	OgSB7 OgN10 OgSB17 OgSS OgN9 OgN31 OgN12 OgSB13	OgN8 OgN6 OgN5 OgSB12 OgSB18 OgN11 OgN3	OgSB9 OgN1 OgSB2 OgN7 OgSD10 OgN2	

MP 1-23:
整合性の評価を行い,
実用化.



O抗原型別 (感染研) :

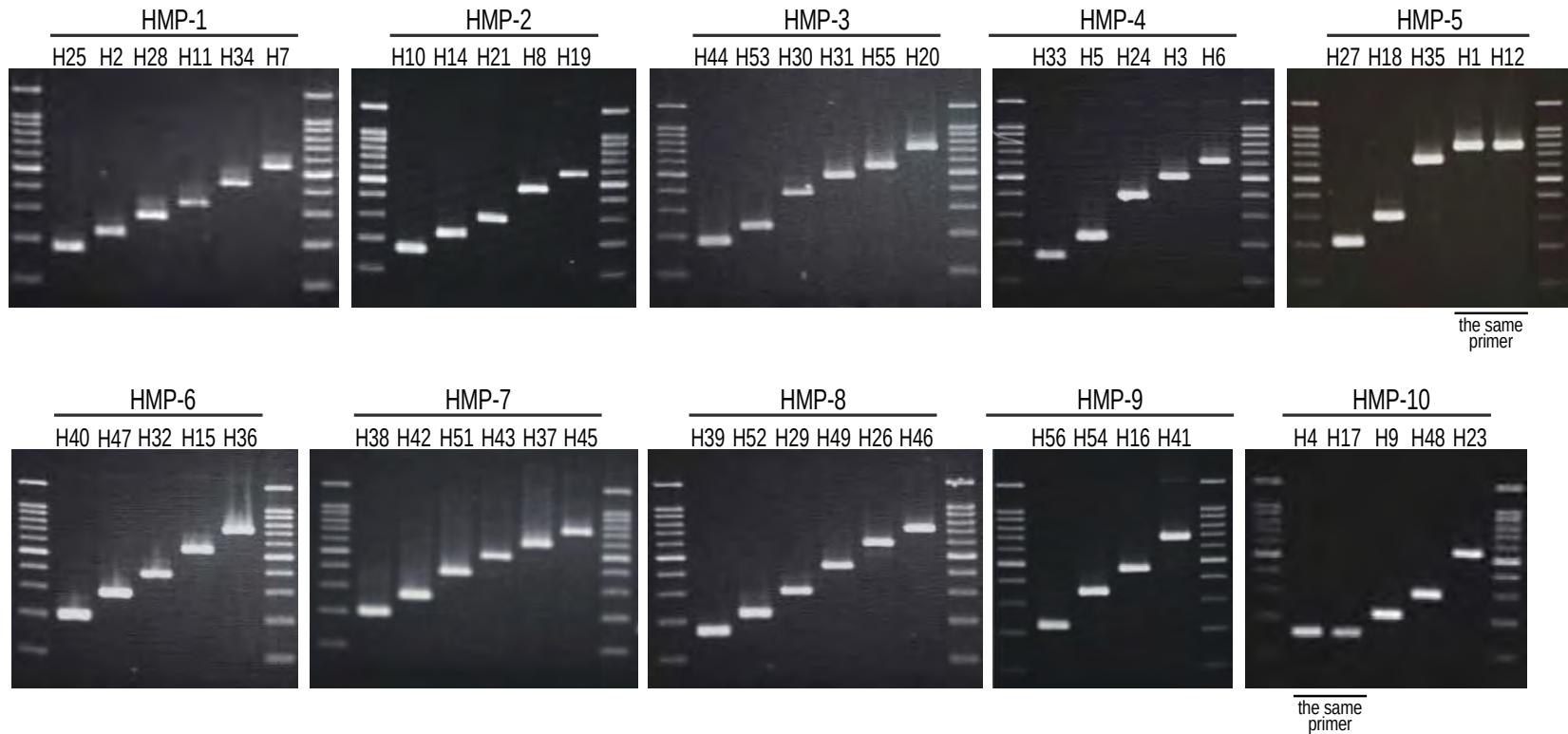
- ① O-genotyping PCR
- ② 地衛研でのO/Og型別結果と一致する場合は確定
- ③ 必要に応じてSSIの抗血清を用いた型別確認 (段階的にゲノム解析に移行)

↑MP24,MP25も使用しています!

E. coli H-genotyping PCR (宮崎大・井口先生)

マルチプレックスPCR法の開発と整合性の確認 (*J Clin Microbiol.* 56(6), 2018)

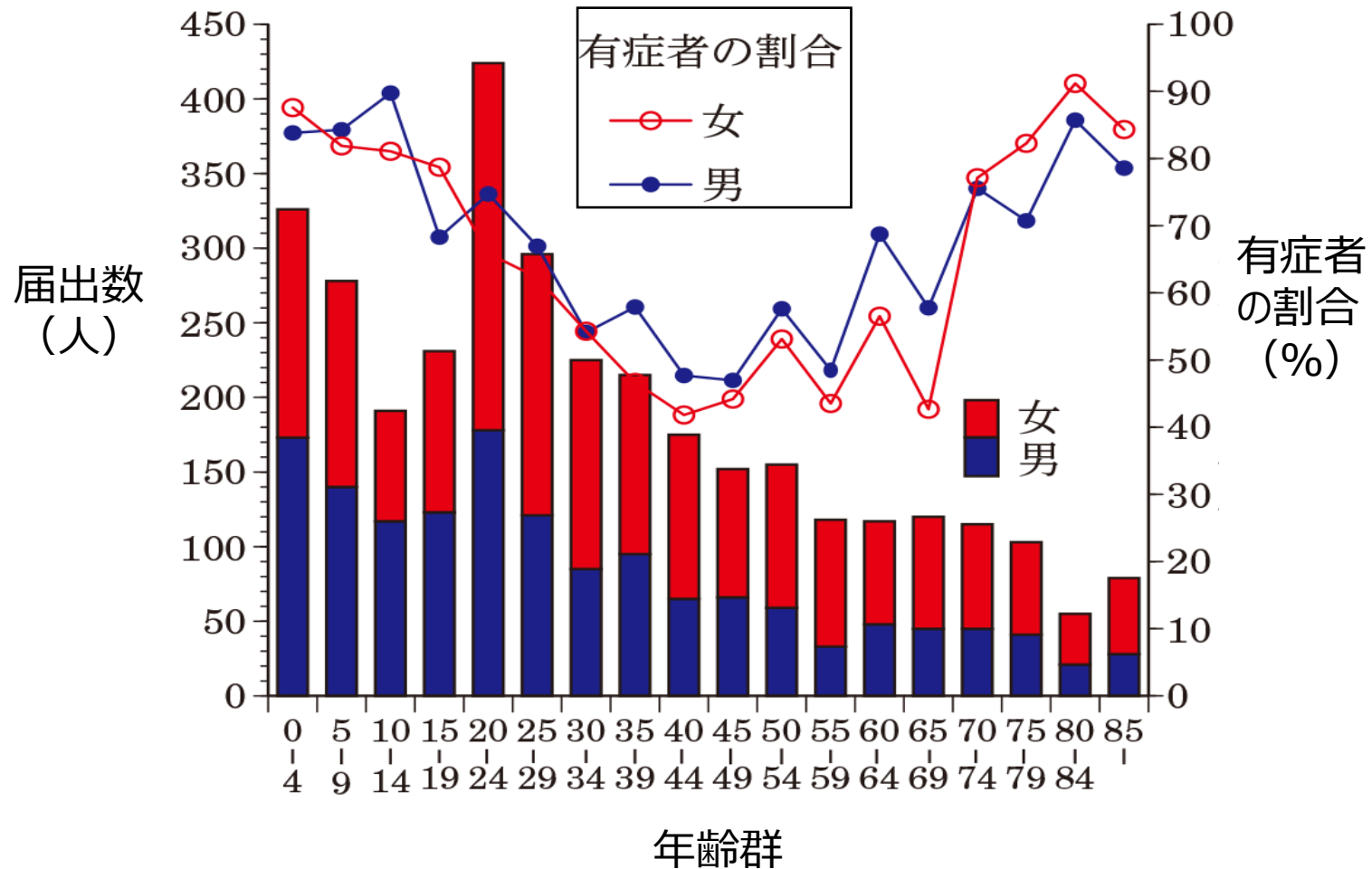
全53種類すべてのHg型を検出可能 (H1/H12, H4/H17はグループとして検出)



- ・ H抗原型別 (感染研) : 運動性の確認およびHg-typing PCR (必要に応じて抗血清を用いた型別)
- ・ EHEC分離株の10-20% (O群によっては100%) を占める H- (非運動性) 株のHg型が決定可能となった.



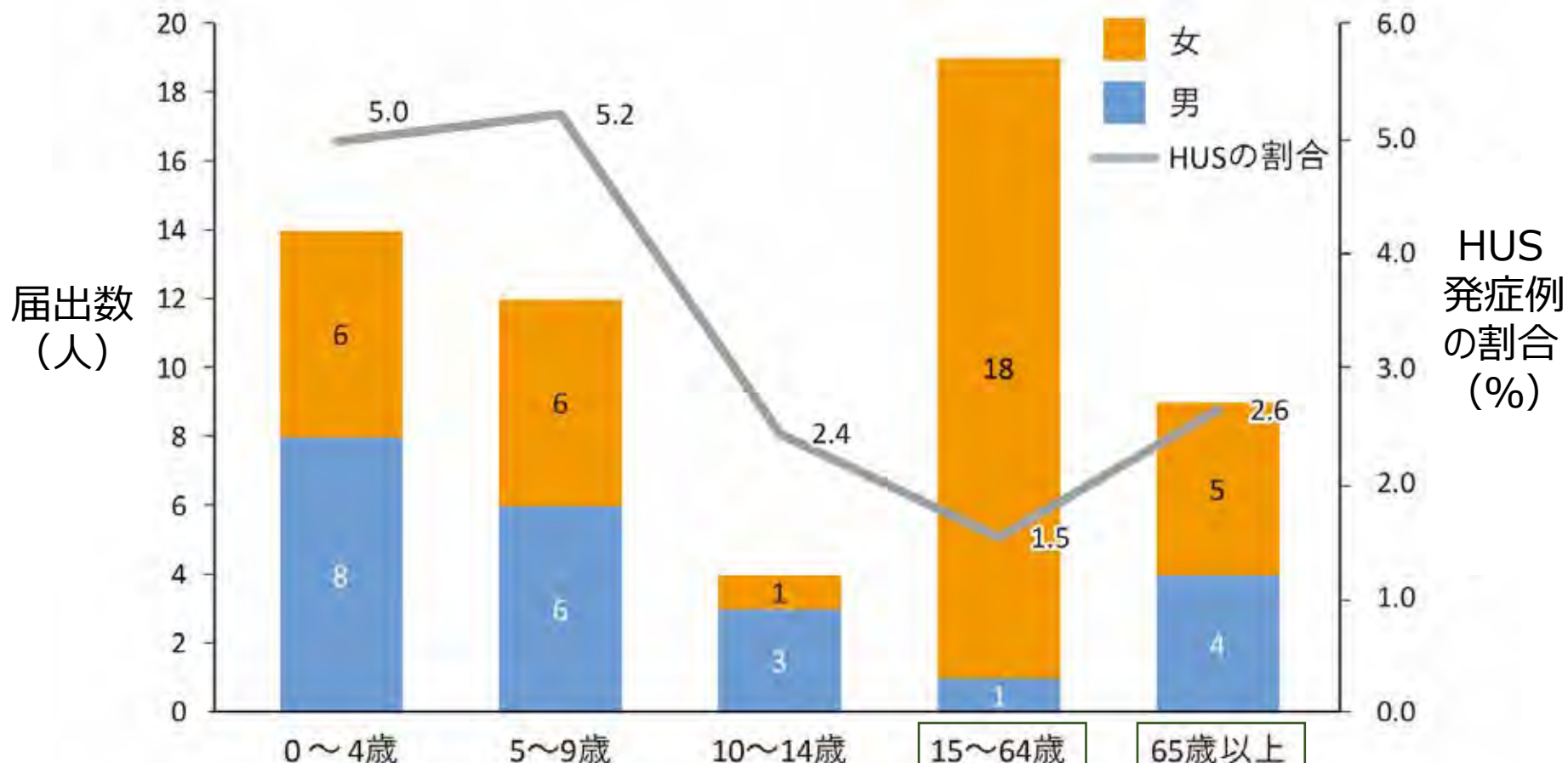
年齢別届出数と有症者の割合 2022年



病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report: IASR) 2023年5月号

年齢別HUS届出数と有症者に占める割合 2022年

IASR 2023年5月号

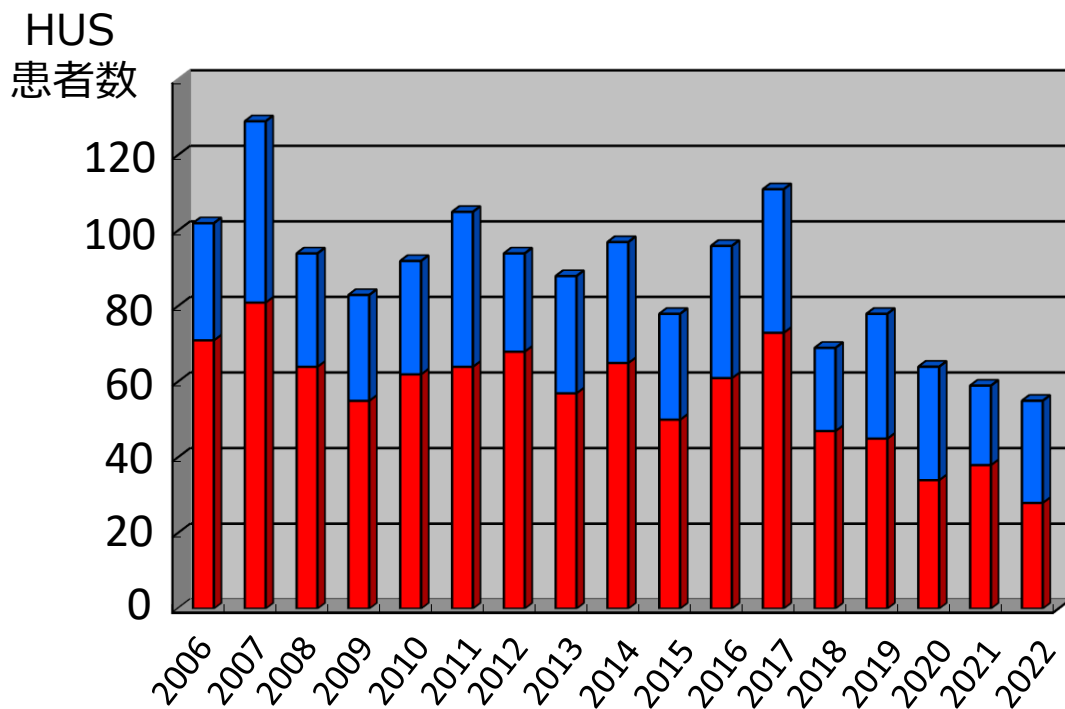


有症者におけるHUSの発症率 (2011-2022年の平均値)

0-9歳: 6.1%, ≥75歳: 3.4%

HUS症例数とEHECの分離率

■ EHEC不分離のHUS症例数
■ EHEC-HUS



菌不分離のHUS症例：約35%

便中の志賀毒素または
患者血清中の抗大腸菌
(主要7血清群) 抗体価等の測定.



陽性であれば EHEC-HUSと確定することが可能.

重症例由来主要7血清群: O157, O26, O111, O121, O103, O145, O165

HUS症例における血清診断解析依頼

血栓性微小血管障害症
(thrombotic microangiopathy: TMA)

血小板減少・溶血性貧血・急性腎機能障害

EHEC-HUS

EHEC感染症

非典型的HUS
(atypical HUS)

補体制御系異常
not EHEC-HUS
not TTP



エクリズマブ (ソリス)
ラブリズマブ (ユルトミリス) 投与対象
anti-C5 mAb

血栓性血小板減少
性紫斑病 (TTP)

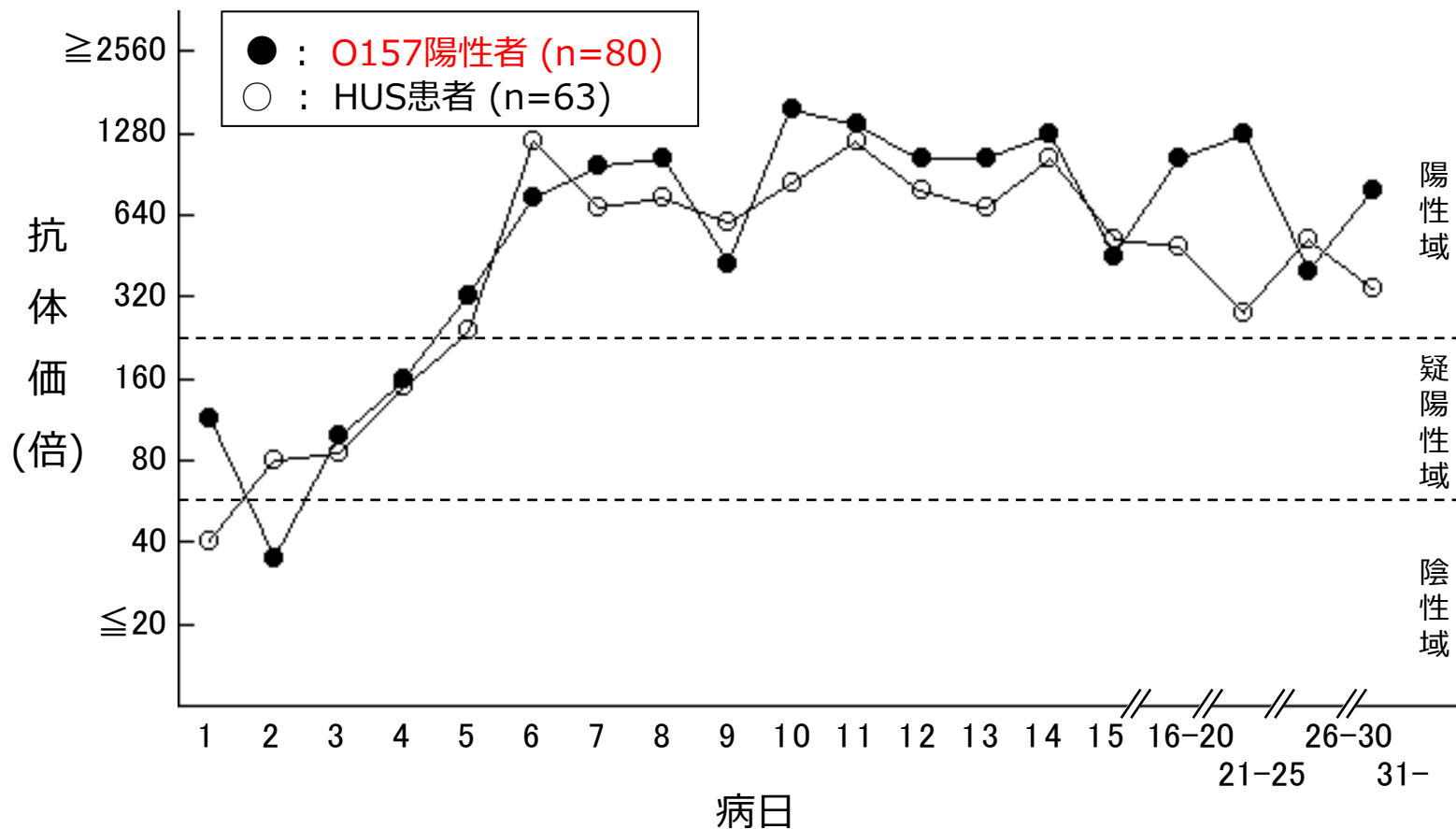
ADAMTS13活性の著減
止血因子のプロテアーゼ

二次性TMA

その他の感染症
妊娠
悪性腫瘍
自己免疫疾患
臓器移植
コバラミン代謝異常
薬剤性
悪性高血圧症
DIC

下痢発症後の病日と抗大腸菌O157凝集抗体価の推移

感染症学雑誌 第70巻 第1号: 80-86, 1996年1月 のデータを改訂



96w-plate法 (感染研) : ×160以上で陽性判定

HUS患者血清中の抗大腸菌抗体価解析例

HUS患者（60歳男性、EHEC不分離）

発症日 5月 4日 水溶性下痢
5月 7日 血便→HUS

血清1: 5月 7日 非凝集

血清2: 11日 非凝集

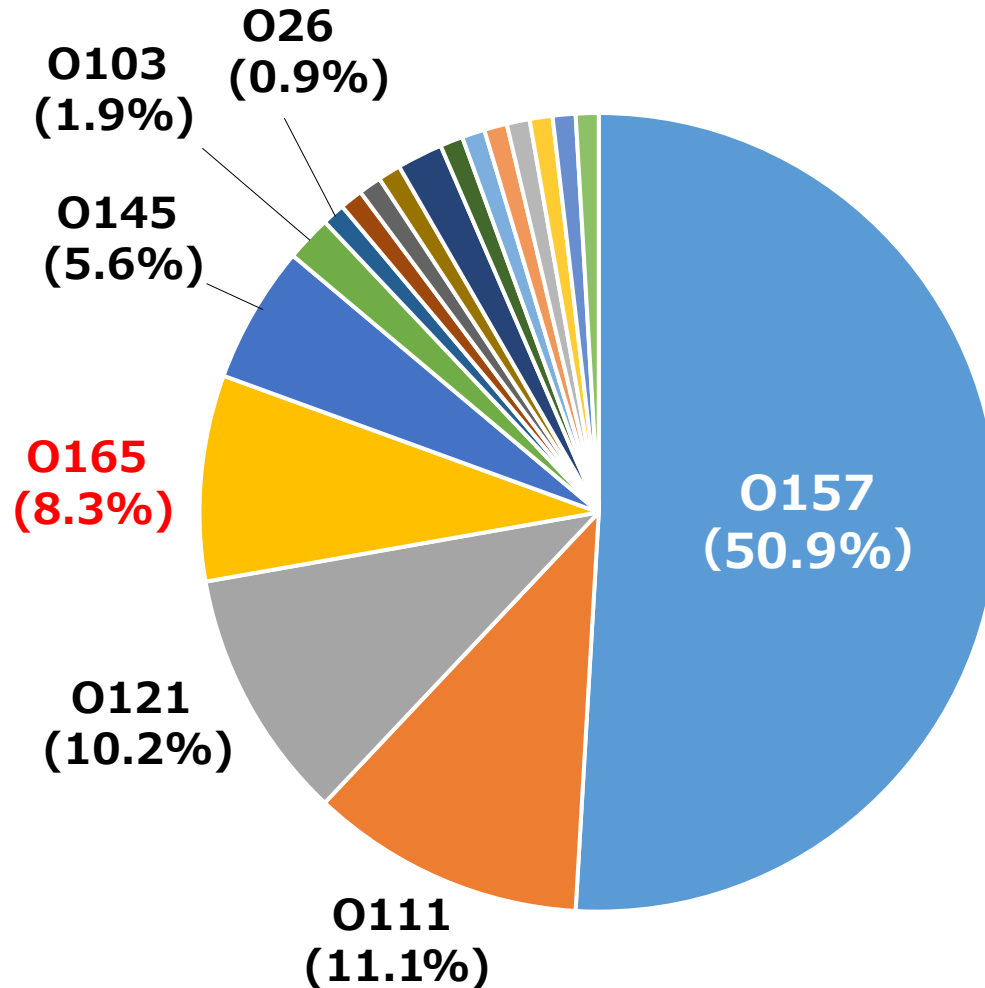
血清3: 12日 O121 (×80)

血清4: 13日 O121 (×160)

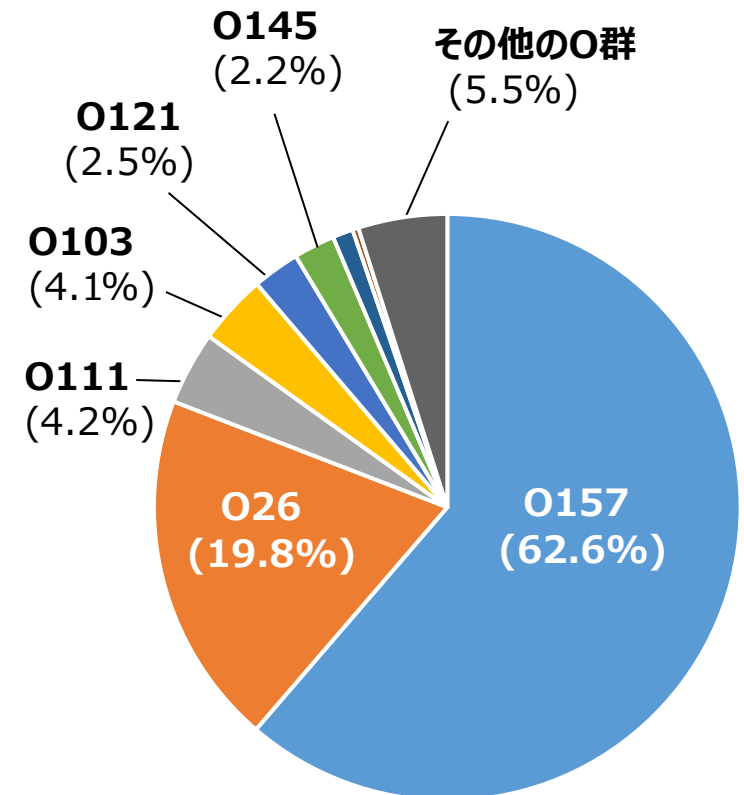
- ・ 発症日・臨床症状・血清採取日等の情報が重要.
- ・ 採取日の異なる複数の血清（出来れば発症直後と発症から7日以降の2点以上）が必要.

HUS患者の血清診断 (2009-2022)

陽性数 / 解析件数 = 93/116 (陽性率 80.2%)

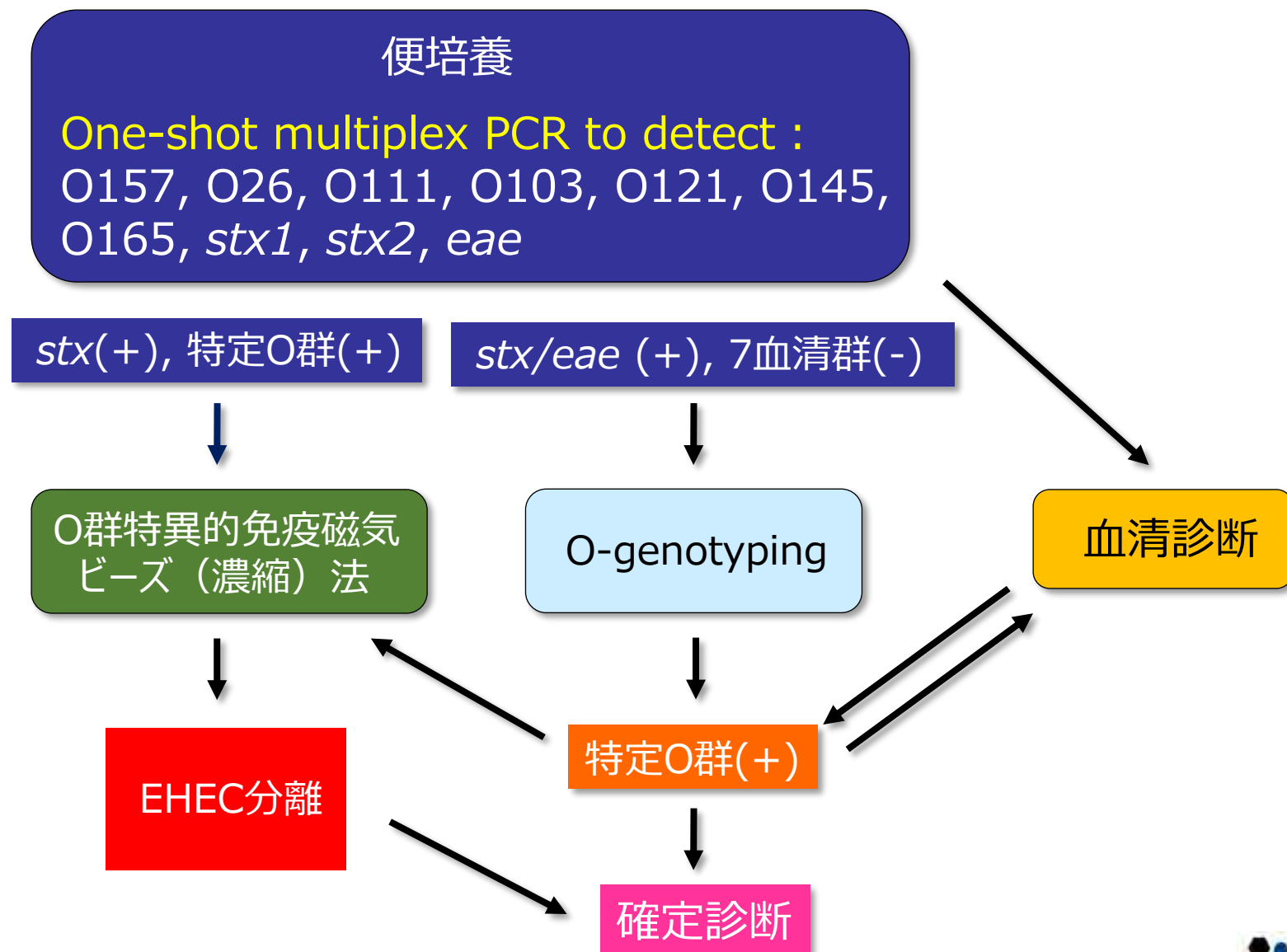


EHEC総分離数 (再掲)

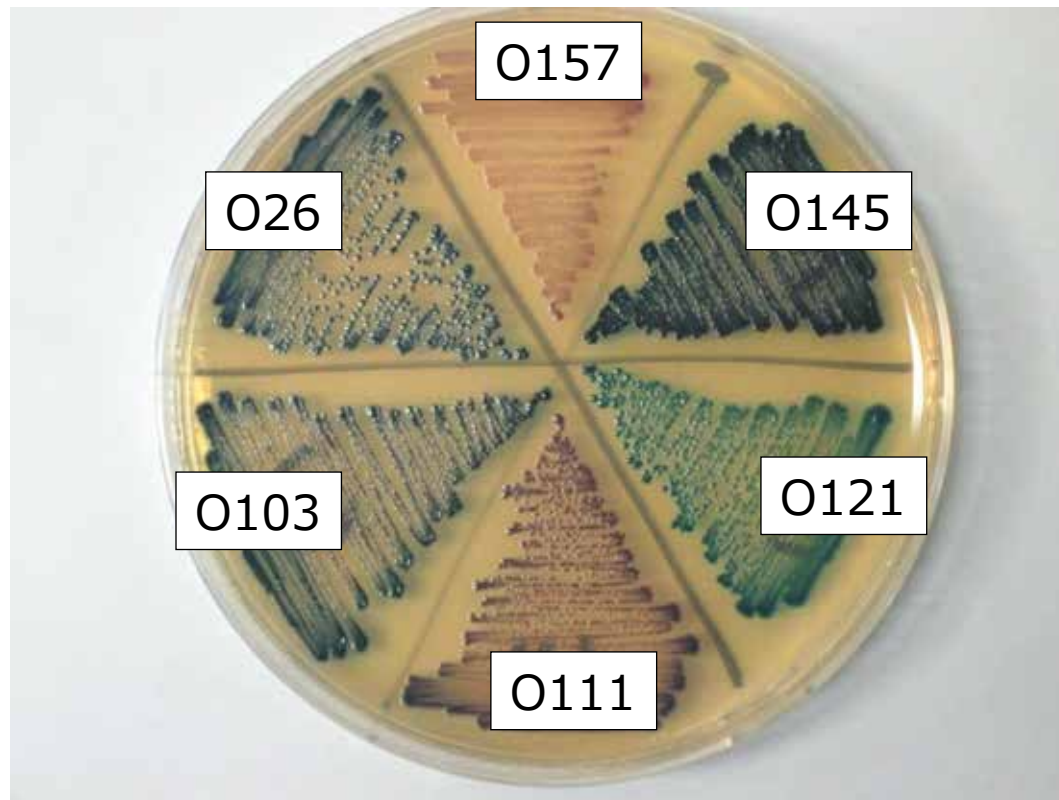


✓ 血清診断に伴って菌分離が可能となった事例: 26事例 (EHECの見逃し事例)

EHEC-HUS症例の細菌学的・血清学的確定診断法



XM-G 寒天培地「ニッスイ」

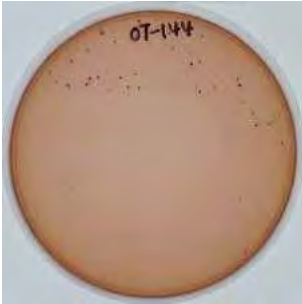
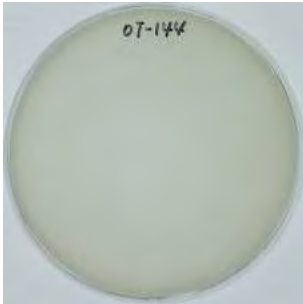
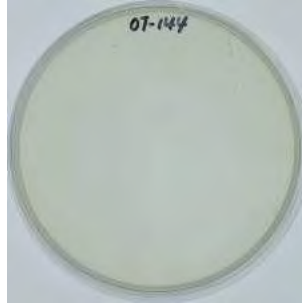
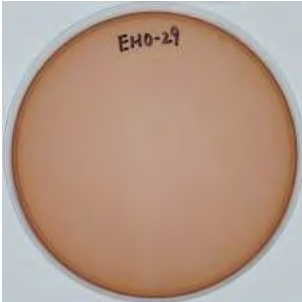
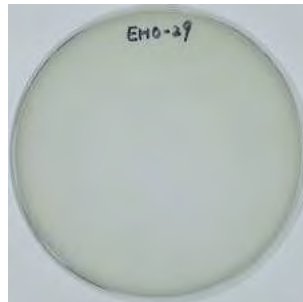
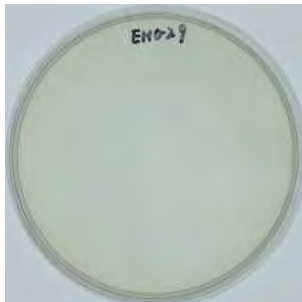


O157: Gluc (-)
O111: Gluc (+/-)
O121: Lac (-)

O165: same as O26 and O103

- ・ 酵素基質X-GLUCは β -glucuronidase (Gluc) で分解され、**青色**色素を生成
- ・ 酵素基質MAGENTA-GALは β -galactosidase (Lac) で分解され、**赤色**色素を生成

市販選択培地上でのO165の生育

	CT-SMAC	クロモアガー STEC	XM-EHEC	“KBM”EHEC 発色基質培地
O165-1				
O165-2				
O157				

出典： 宮崎大学・農学部・井口研究室HP

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル

2022年10月改訂

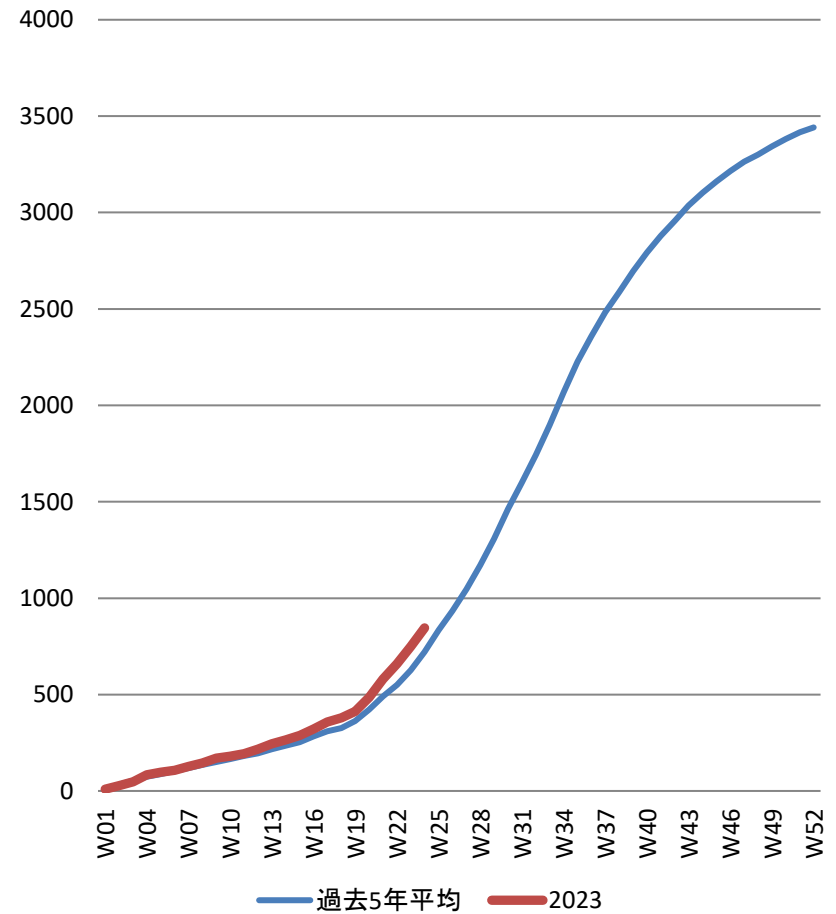
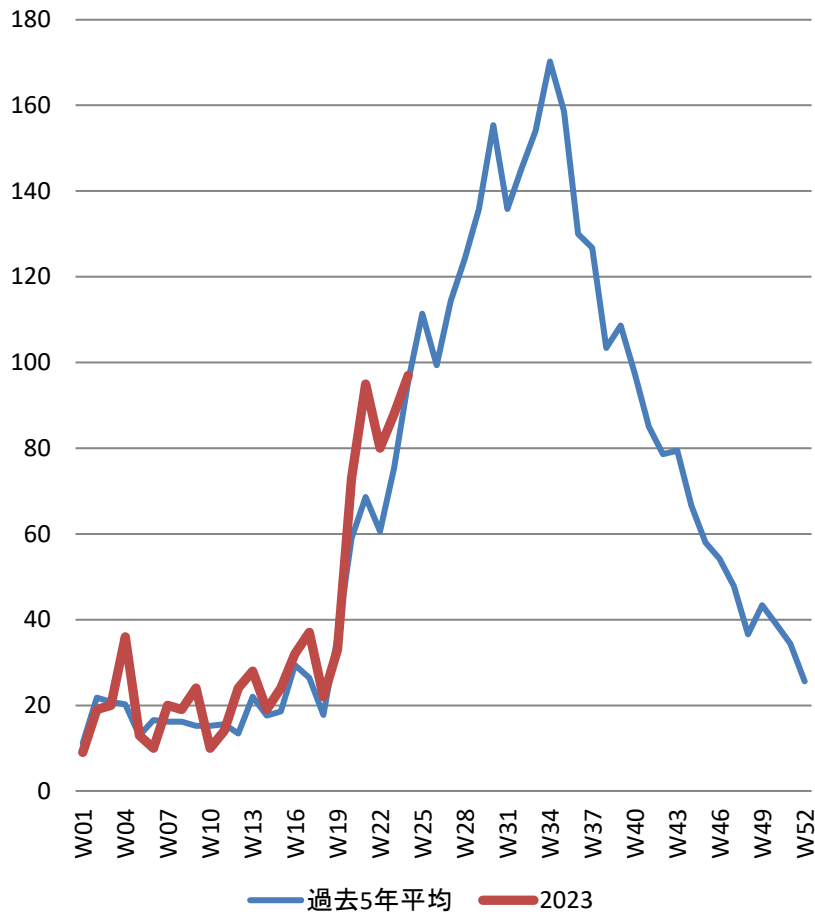
EHECの陰性確認法について追記
(厚労科研費・五十嵐班→伊藤班 R5～)

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20210907.pdf>

EHEC MLVAについて

衛生微生物技術協議会
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

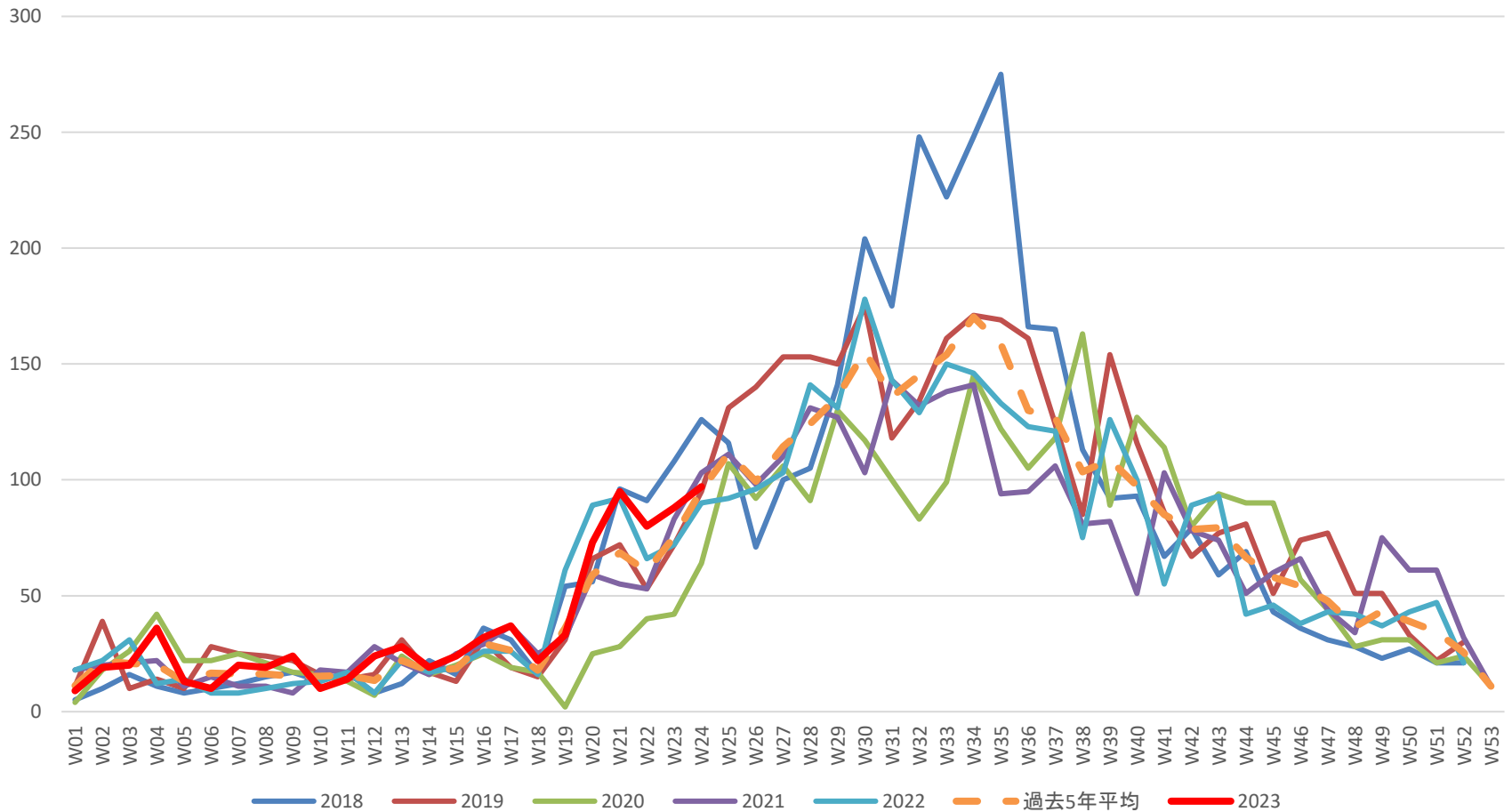
EHEC感染症発生状況2023年



(NESID)

EHEC感染症発生状況

2018-2023年



(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

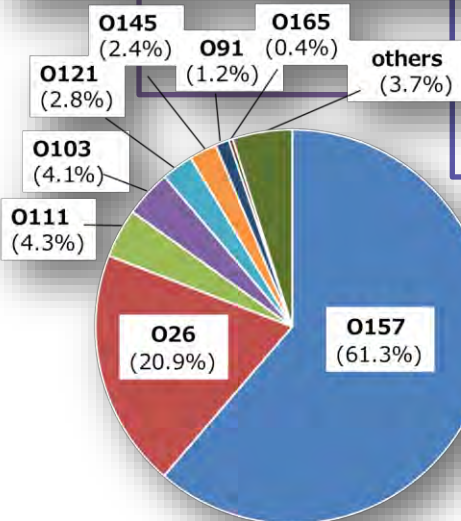
2018事務連絡

統一手法

(2017:追加5血清群)

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。

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(再周知令和5年6月28日)

- 令和5年第1～23週までの機関において感染症発生動向調査に報告された腸管出血性大腸菌感染症の届出数は例年より多き状況で推移しており、平成26年以後で最も多くなっています。また、血清群・毒素型の内訳としてO157 VT2(ベロ毒素2型)の届出数が例年より多い状況で推移しております。
- 腸管出血性大腸菌による感染症等の調査は、平成30年6月29日付厚生労働省健康局結核感染症課・医薬・生活衛生局食品監視安全課事務連絡「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」(別添)に基づいて対応いただいているところですが、引き続き、感染症部局、食品衛生部局及び検査部門が連携を図り、確実かつ可能な限り迅速な調査を行うようよろしくお願いします。

(参考)

年別 第1～23週 腸管出血性大腸菌感染症及びO157 VT2 累積報告

年	平成26年	平成27年	平成28年	平成29年	平成30年	令和元年	令和2年	令和3年	令和4年	令和5年
腸管出血性大腸菌感染症届出数*1	485	589	472	530	664	639	477	608	665	738
O157 VT2届出数*2	47	96	63	61	86	97	63	57	64	179

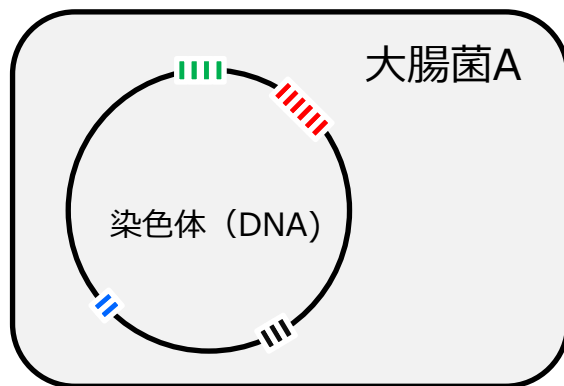
* 1 : 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) から抜粋
(各年第23週集計時暫定値)

* 2 : 感染症発生動向調査から個別に集計 (各年第23週集計時暫定値)

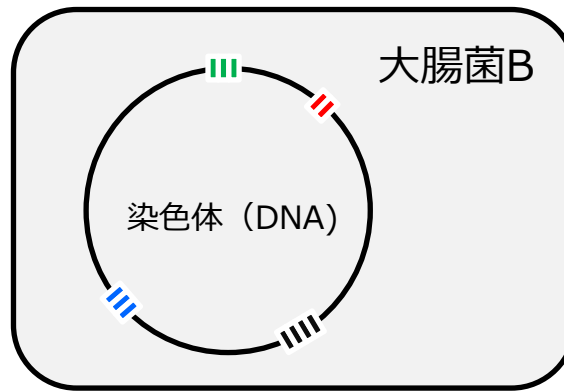
MLVAについて

原理

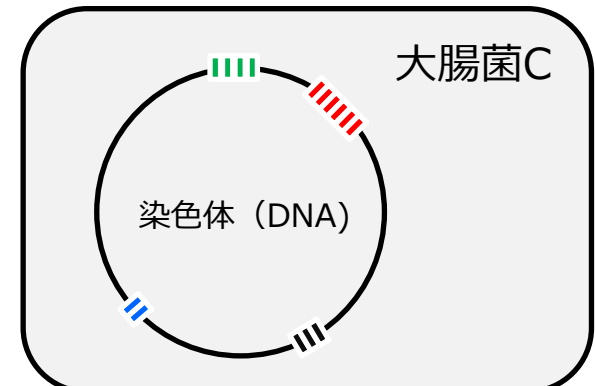
大腸菌の染色体上に存在する複数箇所（緑－赤－黒－青）の反復配列領域を解析してそれぞれの繰り返し回数を数える。



緑 4－赤 6－黒 3－青 2



緑 3－赤 2－黒 4－青 3

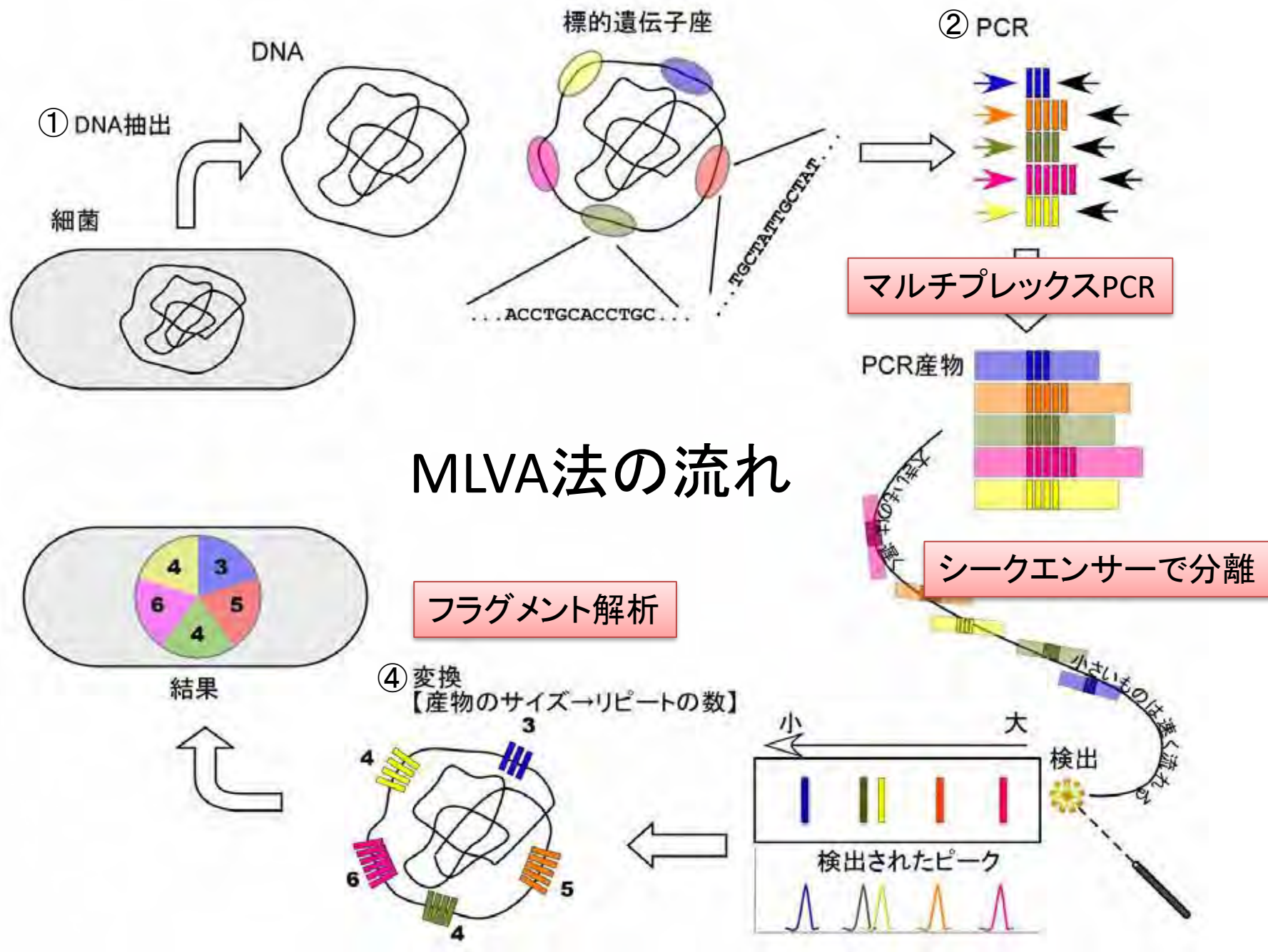


緑 4－赤 6－黒 3－青 2

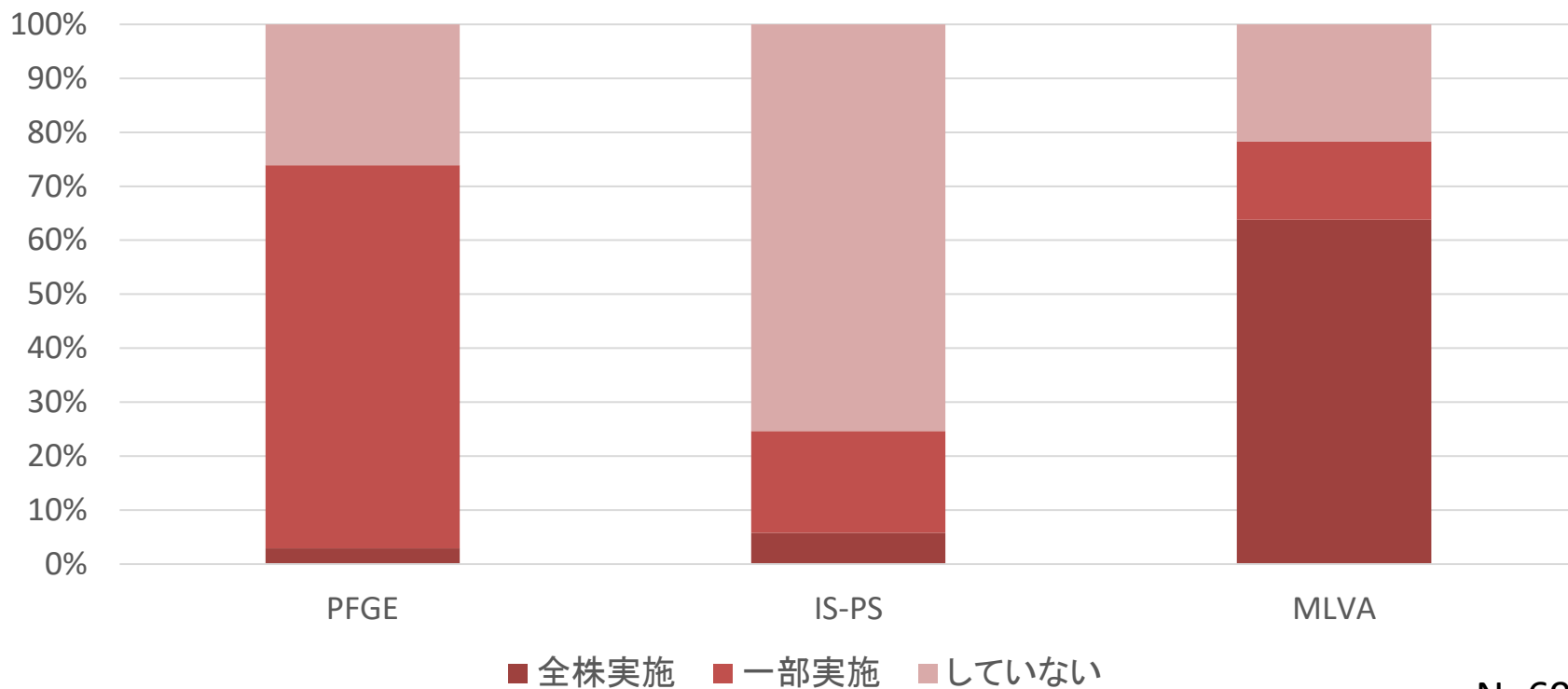
実際のデータ

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)

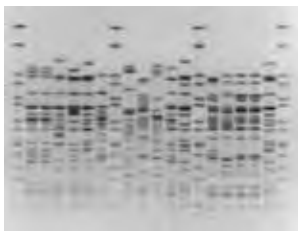


2022年アンケート 解析手法実施状況-1

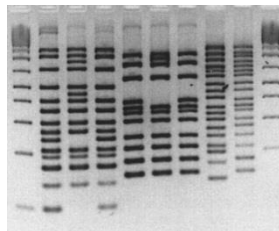


N=69

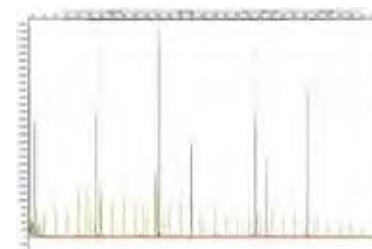
PFGE



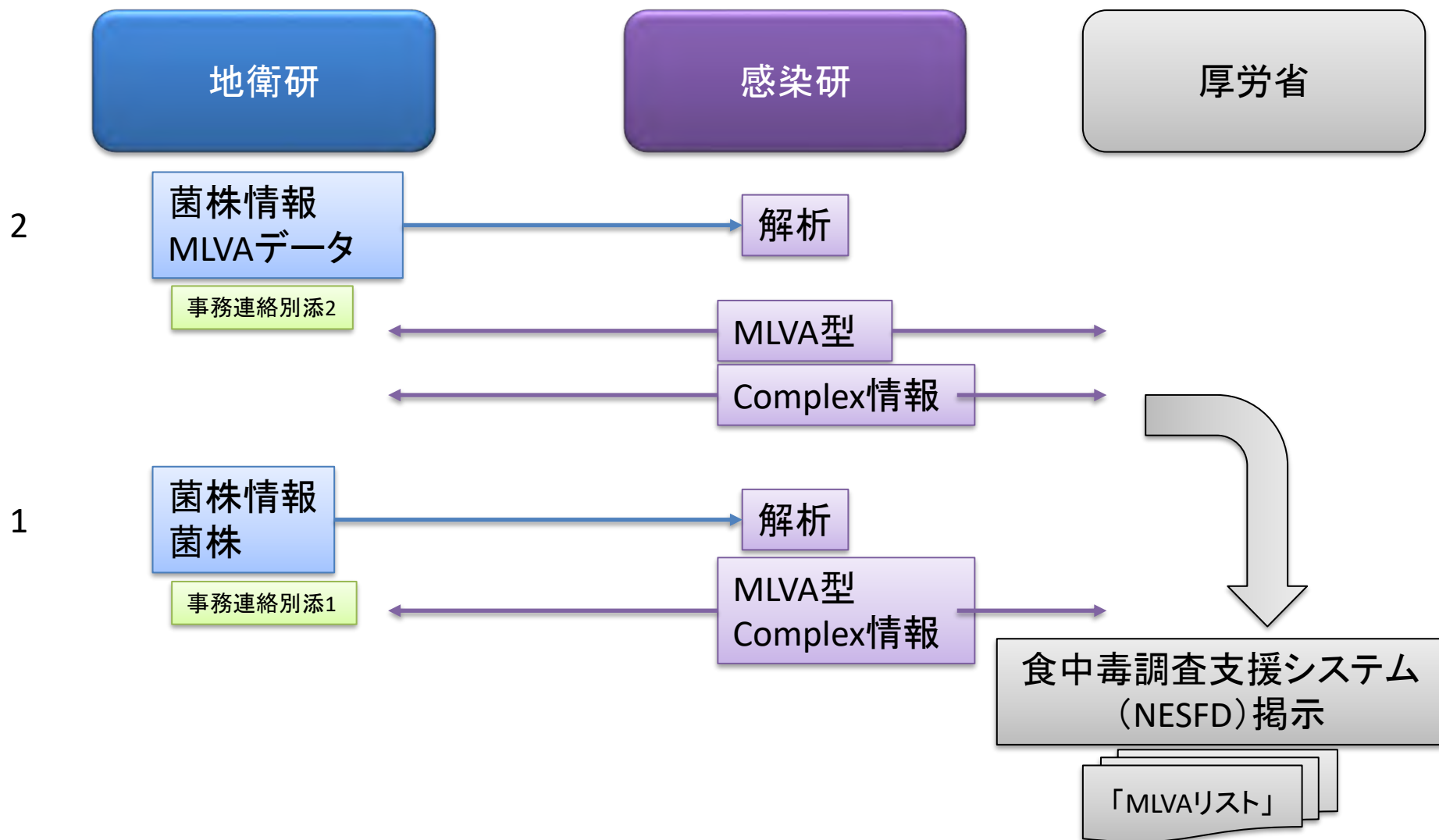
IS-PS



MLVA



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: 地方衛生研究所等の検査実施施設から国立感染症研究所細菌第一部へ菌株を送付する際に添付

発症日	分離日（不明の場合は診断日）	地研菌株ID疫学情報（散発・集発）	症状	O:H	感染経路O:H	VT1	VT2	測定法	MLVA typ	MLVA con	PFGE コー	入手元	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）

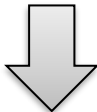
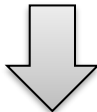
感染研側からも地研側からもデータのやり取りに問題がないと判断

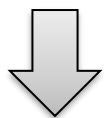
型名付与

- 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）

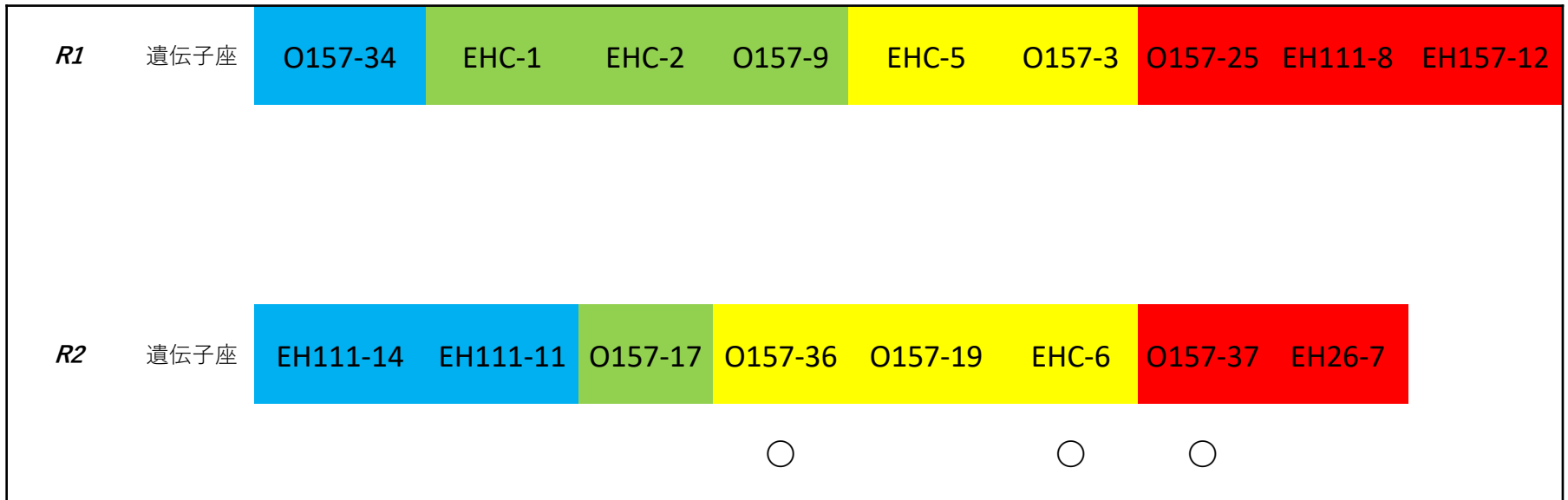
O157、O26、O111においてピークの出現頻度が 99%以上(2017-2020年株)の遺伝子座

										
<i>R1</i>	遺伝子座	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH111-8	EH157-12
		○ (100%)	○ (100%)	○ (99.9%)				○ (100%)	○ (99.9%)	○ (100%)
<i>R2</i>	遺伝子座	EH111-14	EH111-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	
			○ (99.9%)		○ (99.9%)					

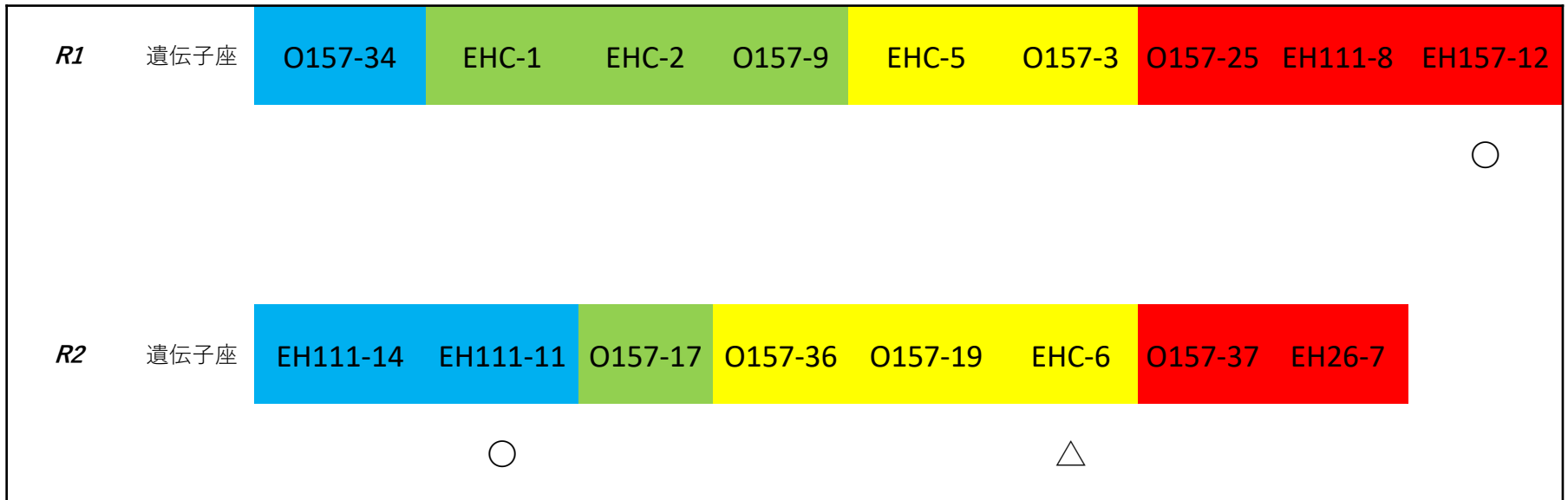


増幅効率が悪い傾向がある⇒試験の条件が良いかどうかの指標にする
(特にO157-34)

プラスミド(にあると考えられている)遺伝子座



Binからずれやすい遺伝子座



日によって泳動度が変わりやすい

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）

MLVAデータ精度確認について

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

地衛研

感染研

1

MLVAデータ

照合

結果

2018年6月29日
事務連絡
別添2形式

2

菌株番号

MLVAデータ

3

MLVAデータ
fsaファイル

解析・照合

結果

MLVAデータ精度確認について

テーマ

ページ設定

拡大縮小印刷

シートのオプション

B34

✕

✓

fx

coYYYYYY

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1		関係図番号	EH111-11T	EH111-14E	EH111-90	EH157-12N	EH26-7D	EH0-1Q	EH0-2C	EH0-5S	EH0-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-2Sj	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V		
2		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
3		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
4		coYYYYYY	2	-2	1	6	-2	12	4	-2	-2	14	9	12	5	5	7	9	7		
5		coYYYYYY	2	-2	1	1	-2	5	5	10	-2	-2	9	12	2	3	7	5	8		
6		coYYYYYY	2	1	1	2	3	7	30	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2		
7		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	11	7	7	5	3	5		
8		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
9		coYYYYYY	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
10		coYYYYYY	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
11		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
12		coYYYYYY	3	1	7	2	-2	6	17	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	4		
13		coYYYYYY	4	1	5	2	-2	13	10	-2	3	-2	3	13	2	-2	1	-2	12		
14																					
15																					
16																					
17																					
18		関係図番号	EH111-11T	EH111-14E	EH111-90	EH157-12N	EH26-7D	EH0-1Q	EH0-2C	EH0-5S	EH0-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-2Sj	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V		
19		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
20		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	7	6	3	7		
21		coYYYYYY	2	-2	1	6	-2	12	4	-2	-2	14	9	12	5	5	7	9	7		
22		coYYYYYY	2	-2	1	1	-2	5	5	10	-2	-2	9	12	2	3	7	5	8		
23		coYYYYYY	2	1	1	2	3	7	30	-2	-2	-2	1	8	2	-2	1	-2	-2		
24		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	8	12	11	7	7	5	3	5		
25		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
26		coYYYYYY	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
27		coYYYYYY	2	-2	1	3	-2	8	9	-2	-2	17	12	11	3	9	7	4	4		
28		coYYYYYY	2	-2	1	4	-2	11	5	-2	-2	4	9	-2	3	5	7	6	5		
29		coYYYYYY	3	1	7	2	-2	6	17	-2	3	-2	3	9	2	-2	1	-2	4		
30		coYYYYYY	4	1	5	2	-2	13	10	-2	3	-2	3	13	2	-2	1	-2	12		
31																					
32																					
33		関係図番号	EH111-11T	EH111-14E	EH111-90	EH157-12N	EH26-7D	EH0-1Q	EH0-2C	EH0-5S	EH0-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-2Sj	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V		
34		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
35		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
36		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
37		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
38		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
39		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
40		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
41		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
42		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
43		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
44		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
45		coYYYYYY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

型名付与開始までの流れ

地衛研

感染研

送付済み菌株

データ送付

データ送付1

- 別添2形式

データ確認1

- 返信

データ送付2

- 別添2形式

データ確認2

- 返信

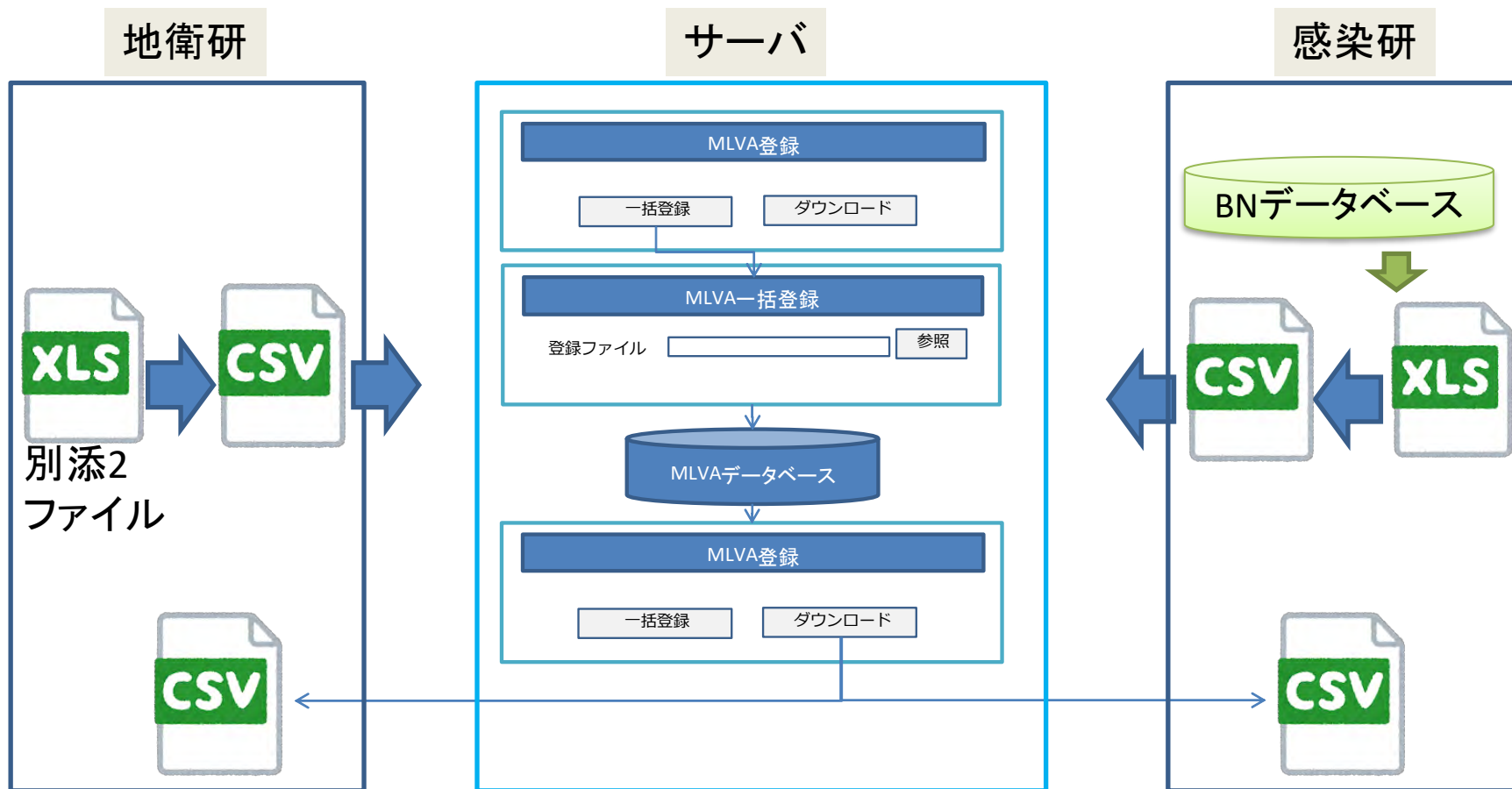
送付済み菌株に関して、複数回感染研にてデータ確認(答え合わせ)を実施し、特に問題がなければ型名付与をお受けします。

型名付与開始後の注意点

- 特段の問題がないかぎり、fsaファイルは不要です。
 - 非定型な株の場合、Binにあたらない、などの問題があった場合には菌株もお送りください。
- 型名付与を行っていても、定期的に（最低年1回）、一部もしくはすべての株を送付して、データの確認を実施してください。
 - メールベースでの型名付与
 - MLVAシステムによる型名付与
 - いずれの場合も定期的な精度確認をお願いします。

MLVAシステム

型名付与が可能
になった後の段階

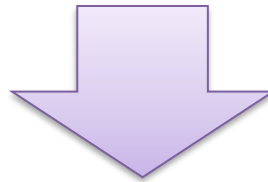


オンラインでMLVA型が取得できます

MLVAシステム

メールアドレスの型名付与の処理において、

- 送付データに明らかな問題がないこと
- ほぼリアルタイムにMLVA検査を実施してデータを送っていただいていること
- 精度確認において特段の問題が見られないこと



現在22機関に
IDを配布

MLVAシステムが利用可能となります。

MLVAデータ処理数

年	データ数
2018年	391
2019年	675
2020年	590
2021年	691
2022年	880
総計	3227

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2023年株のみと比較を行っております。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。

16. 百日咳・ボツリヌス

百日咳レファレンスセンター

- 1.活動報告と計画
- 2.百日咳菌のMALDI-TOF MS同定
- 3.マクロライド耐性百日咳菌

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

1. 活動報告と計画

百日咳レファレンスセンター

計 10施設



令和4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

論文発表

- Koide K, Yamaguchi T, Katsukawa C, Otsuka N, Kenri T, Kamachi K. Complete Genome Sequence of a Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Isolated in Japan. Microbiol Resour Announc. 2022 Oct 20;11(10):e0071822.
- Koide K, Yao S, Chiang CS, Thuy PTB, Nga DTT, Huong DT, Dien TM, Vichit O, Vutthikol Y, Sovannara S, Samnang C, Takayama I, Ainai A, Nakajima N, Otsuka N, Kamachi K, Saitoh A. Genotyping and macrolide-resistant mutation of *Bordetella pertussis* in East and South-East Asia. J Glob Antimicrob Resist. 2022 Dec;31:263-269.

令和5年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

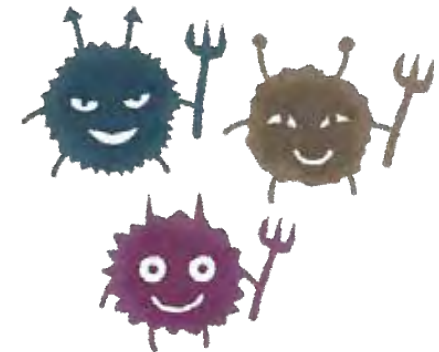
- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

※ マクロライド耐性菌遺伝子検出キットはレファレンスセンター以外の地研にも配布しています



2) 百日咳病原体サーベイランス

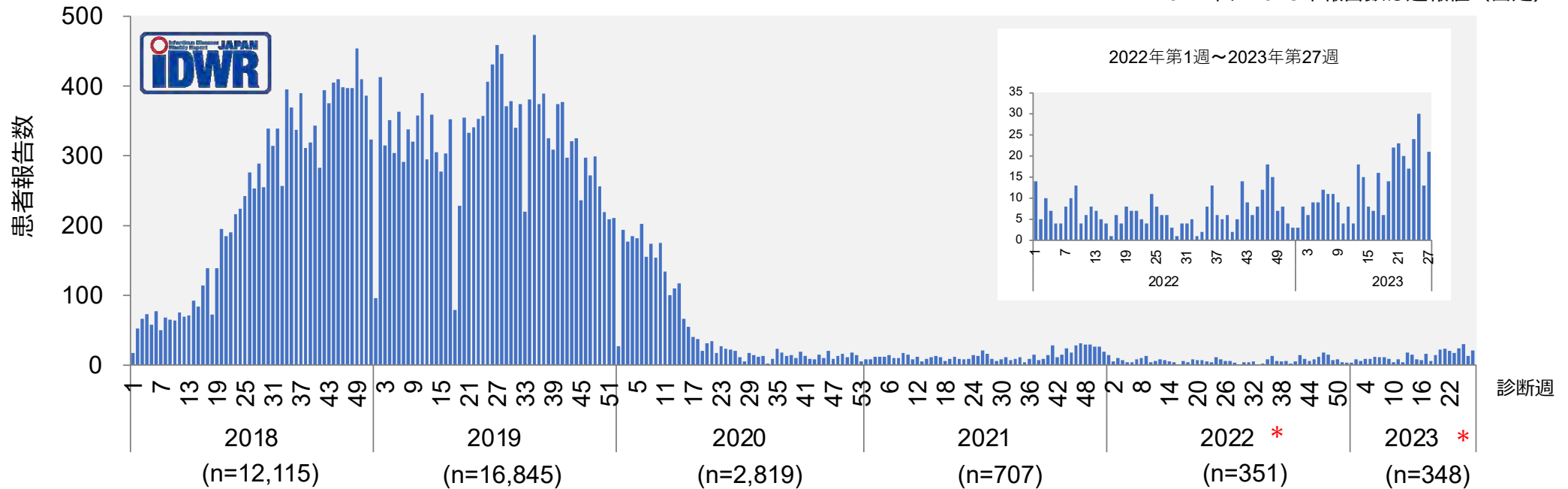
- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌



国内百日咳の発生状況

2018年第1週～2023年第27週*

* 2022年、2023年報告数は速報値（暫定）



- 新型コロナウイルス感染症流行の影響で2020年以降報告数が激減している
→ 今後は人流の再開とともに患者増加が懸念される
外国人旅行者からの持ち込みにも要注意

2. 百日咳菌のMALDI-TOF MS同定

MALDI-TOF MS微生物分類同定分析装置

ぬる

- コロニーを滅菌つまようじなどでターゲットプレートに塗布
- マトリックス溶液を添加



解析

- 試料をイオン化する
- イオンを分離する
- マスマスペクトルを取得



MALDI Biotyper microflex-NID1
(Bruker Daltonics, Germany)

同定

- スペクトルパターンをデータベースと照合
- 同定

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Bordetella pertussis BORD_487 UZB	2.000	520
2 (++)	Bordetella pertussis BORD_246 UZB	1.999	520
3 (++)	Bordetella pertussis BORD_631 UZB	1.999	520
4 (++)	Bordetella pertussis BORD_653 UZB	1.999	520
5 (++)	Bordetella pertussis DSM_4926 DSM	1.998	520
6 (++)	Bordetella pertussis DSM_4925 DSM	1.998	520
7 (++)	Bordetella pertussis REF_049 ATCC_3340 UZB	1.997	520
8 (+)	Bordetella pertussis DSM_5571T DSM	1.871	520
9 (+)	Bordetella pertussis DSM_4923 DSM	1.776	520
10 (+)	Bordetella pertussis DSM_4927 DSM	1.751	520

<同定結果の信頼度>

① Score value

0.0 一致なし 1.6

1.7 Probable 1.9
属レベル

2.0 Probable 2.2
種レベル

2.3 Highly probable 3.0
種レベル

② Consistency categories (CC): Rank-1とRank-2の菌種の一致度。High (A), Low (B), No (C) consistency

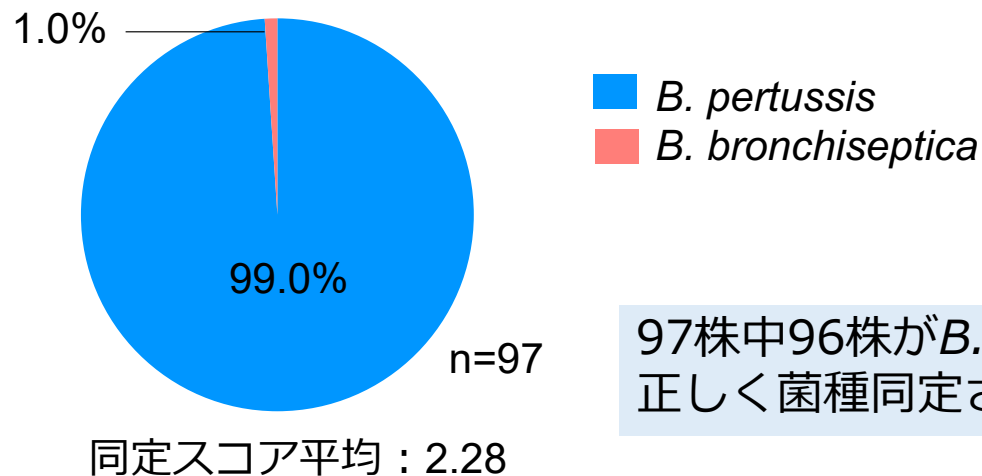
百日咳菌の菌種同定は難しい？

臨床微生物質量分析計検査法ハンドブック (2017) p. 24

「MSスペクトルのパターンが極めて類似しているために同定が困難なケース」
百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、パラ百日咳菌(*B. parapertussis*)、気管支敗血症菌(*B. bronchiseptica*)



PT, FHAを産生する一般的な臨床分離百日咳菌の同定結果 (Rank-1)

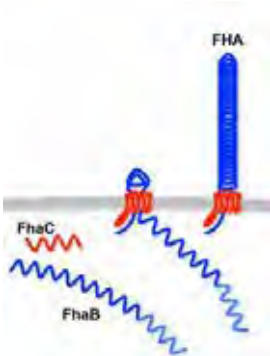


97株中96株が*B. pertussis*と正しく菌種同定された

百日咳菌FHA欠損株の菌種同定

繊維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin, FHA)

240 kDaの巨大な菌表層タンパク質。ヒト呼吸器への百日咳菌の接着に寄与する。PTとともに百日せきワクチンの主要なワクチン抗原でもあるが、FHA産生を欠損した百日咳菌が臨床分離されることがある



Melvin JA et al.
PMID: 24608338



- FHA欠損株では*B. bronchiseptica*と誤同定される確率が上がる
- Rank-1とRank-2の菌種の一致率 (CC) も低下する

百日咳菌FHA欠損株とサンプル調製方法

■ *B. pertussis*
■ *B. bronchiseptica*

スミア法

オンプレートギ酸法

エタノール・ギ酸抽出法



エタノール・ギ酸抽出法により菌種同定の精度が有意に上昇した

百日咳菌のMALDI-TOF MS同定

- ① 一般的な百日咳菌であれば、MALDI-TOF MSによる菌種同定は可能
- ② 百日咳菌抗原欠損株（FHA欠損株）は、*B. bronchiseptica*と誤同定される確率が上がる
※*B. bronchiseptica*のヒト感染は非常に稀である

→エタノール・ギ酸抽出法により同定精度が上昇した
- ③ 菌種同定に難渋した場合は、遺伝子検査（BP-LAMP法、4Plex RT-PCR法など）も有用である
※抗血清を用いたスライド凝集法は同定精度が低いので注意

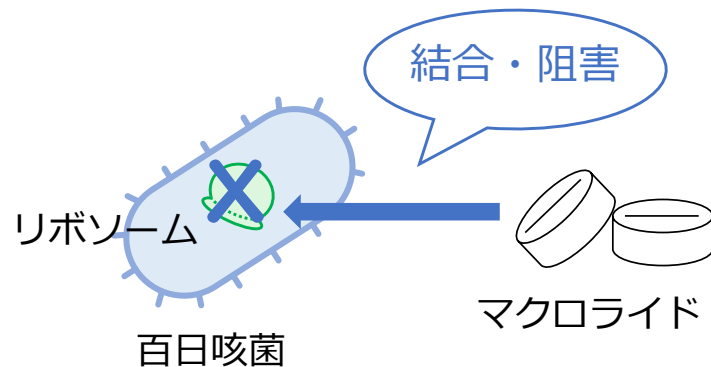
3. マクロライド耐性百日咳菌の流行状況

マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) とは？

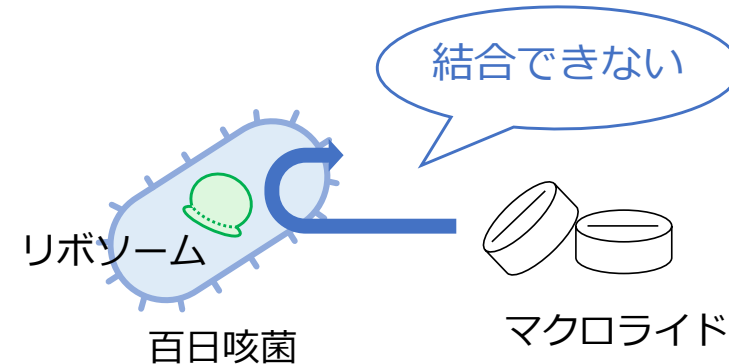
- 百日咳の治療薬であるマクロライド系抗菌薬（エリスロマイシンやアジスロマイシンなど）に対して耐性を示す百日咳菌
- リボソームを構成する23S rRNAの配列の2047番目の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)に置換することで耐性化（検出キットの標的）
- 治療薬が効かないことで治療期間の延長や重症化等につながるため、耐性菌の出現は公衆衛生上重要な問題のひとつ

☆ 百日咳菌のマクロライド耐性機序

マクロライド感受性百日咳菌 (MSBP)

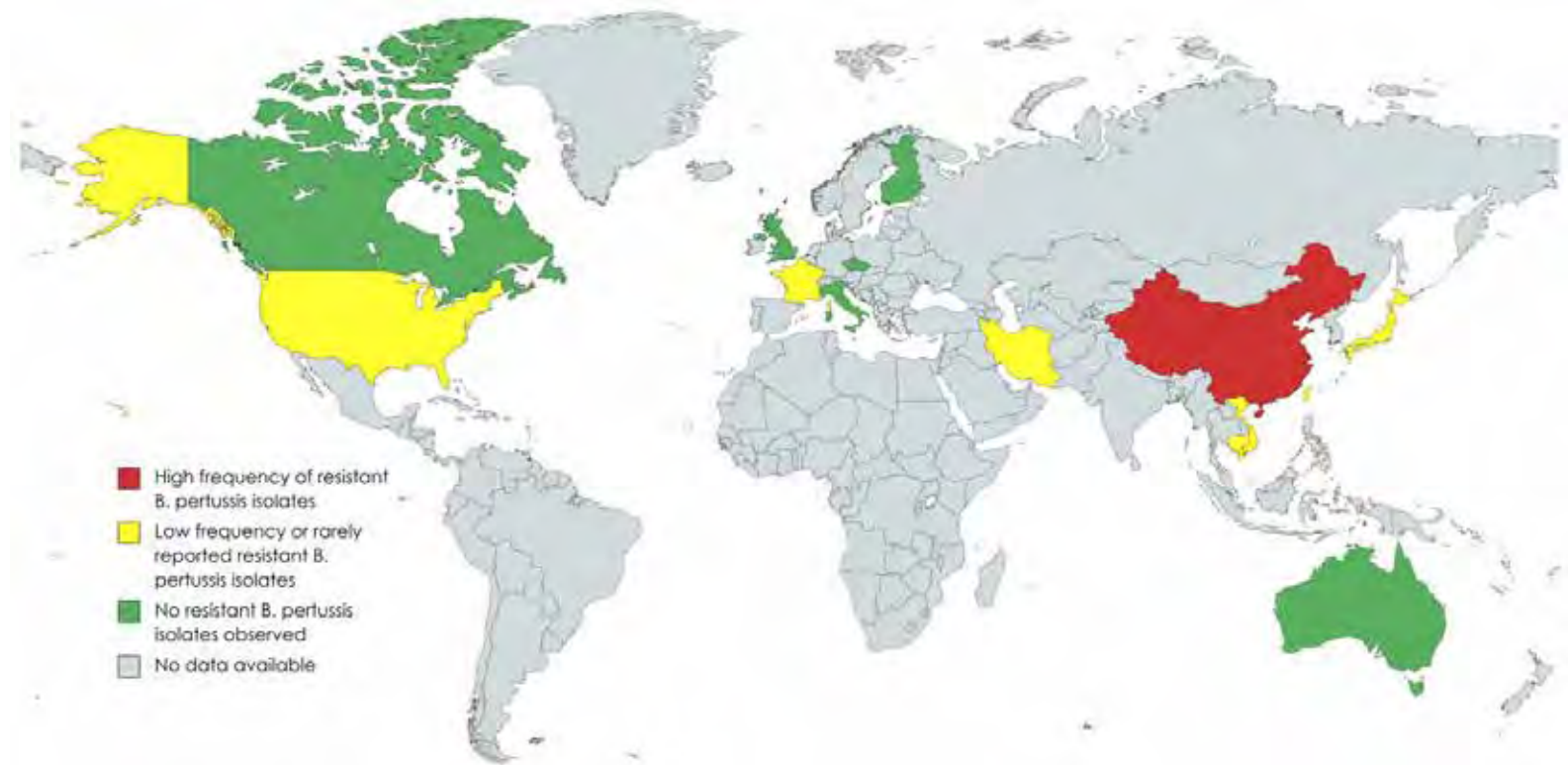


マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP)



MRBPの分離状況

- MRBPは中国において高頻度で分離されている
- 日本では2018年にMRBPが2株分離された

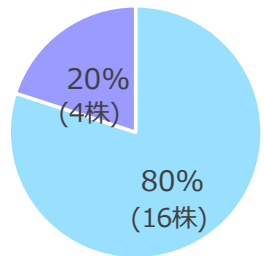


中国国内におけるMRBPの分離状況

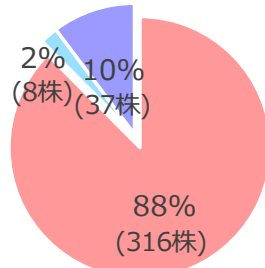
- 2011年に中国で最初のMRBPが分離された
- 2018年以降 *ptxP3*を持つMRBP株が上海市で増加している

中国全体

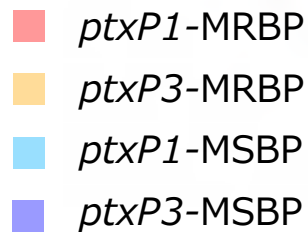
2000年-2008年
(分離株数: 20)



2013年-2018年
(分離株数: 361)

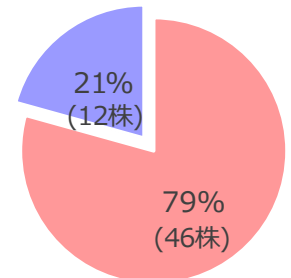


Yao K, et al. 2020. Expert Rev Vaccines.



西安市

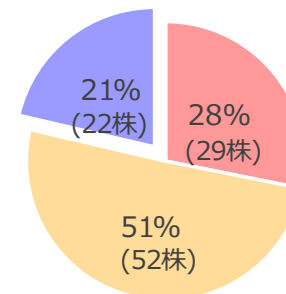
2018年-2020年
(分離株数: 58)



Zhang J, et al. 2022. J Int Med Res.

上海市

2018年-2022年
(分離株数: 103)



Cai J, et al. 2023. Int J Antimicrob Agents.

日本国内で分離されたMRBP

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か月齢	男児 1か月齢
エリスロマイシンの 最小発育阻止濃度	>256 µg/mL	>256 µg/mL
MLVAタイプ	MT195	MT195
遺伝子型	<i>ptxP1</i> / <i>ptxA1</i> / <i>prn1</i> / <i>fim3A</i> / <i>fhaB3</i>	<i>ptxP1</i> / <i>ptxA1</i> / <i>prn1</i> / <i>fim3A</i> / <i>fhaB3</i>

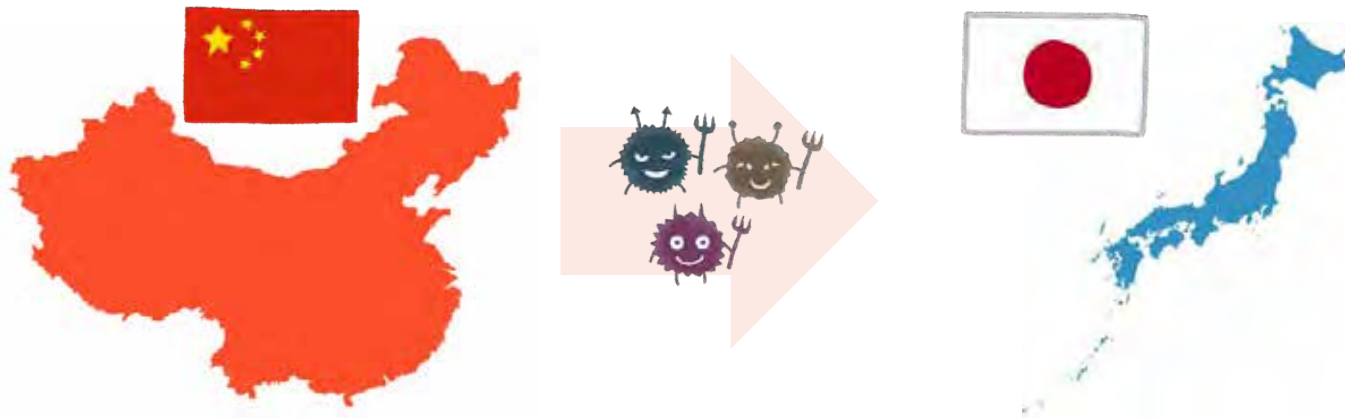
Yamaguchi T, et al. 2020. Jpn J Infect Dis.

全ゲノム解析の結果、これらの株は遺伝的に大きく異なるが、
どちらも中国MRBPと近縁であった

MRBPの流行状況（まとめ）

- 中国を中心にMRBPが広がっている
- 中国では $ptxP3$ を持つMRBPが出現した
- 日本では2018年にMRBPが2株見つかった
- 中国から日本へMRBPが侵入したと考えられる

➡ 今後、日本でも $ptxP3$ を持つMRBPが分離される可能性がある



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

2023.7.27

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、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
1995	青森県	3	ウグイのいずし	E

発生年	発生場所	患者数	原因食品	毒素型
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	あずきぱっとう（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
2022	東京都	1	アユのいずし	E

*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2例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、1例は5歳の基礎疾患を持つ小児で、もう1例は臓器移植歴のある成人であった。2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)

第9回講習会

2023年11月15日～17日

参加者募集中（残3、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：細菌第二部第三室 妹尾 (senoh@niid.go.jp)
油谷 (yutanim@niid.go.jp)

230727

ボツリヌス毒素の *in vitro* 検出系の開発状況

ボツリヌス症

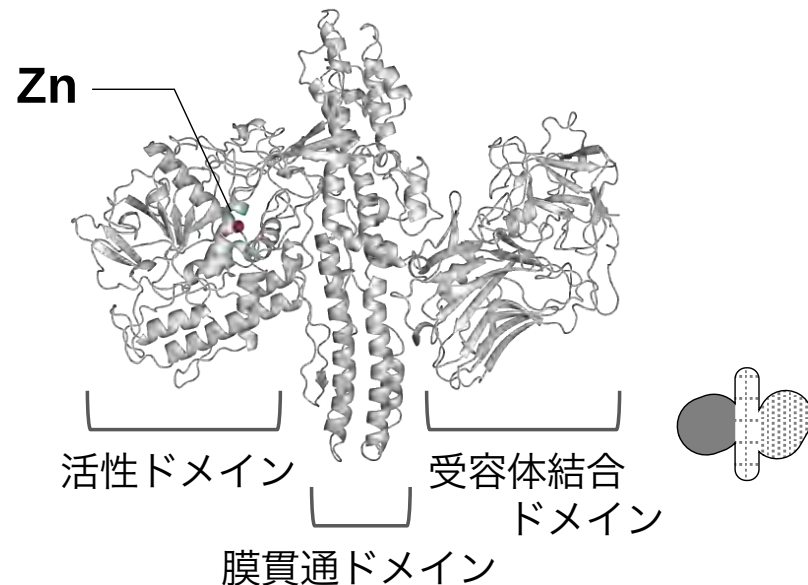
- ・ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)など※が産生するボツリヌス神経毒素によって惹起される。
- ・弛緩性麻痺 → 呼吸困難により致死。

※ ボツリヌス（様）毒素産生性
C. butyricum, *C. baratii*

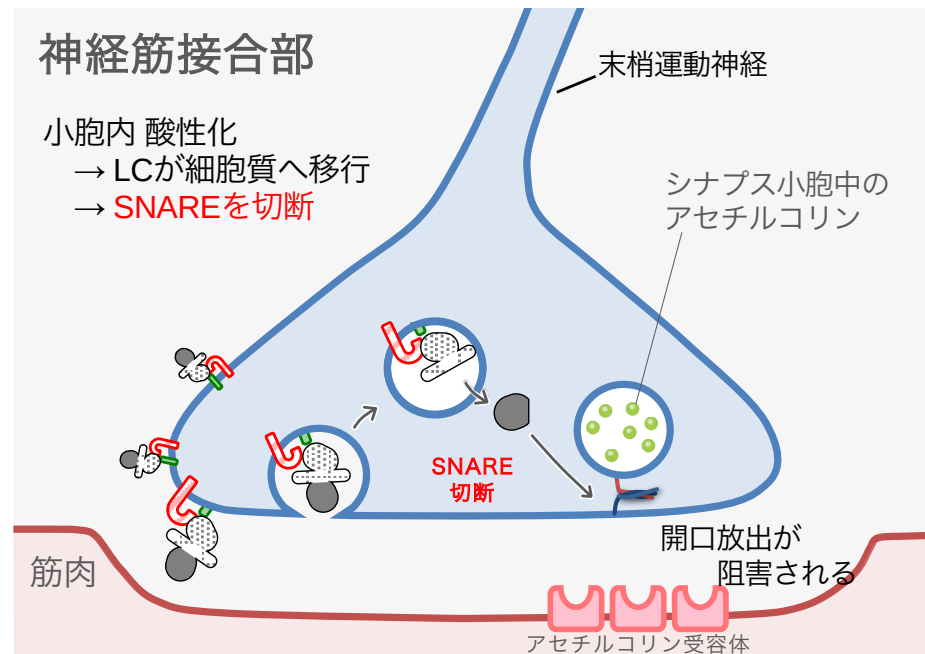
ボツリヌス神経毒素

botulinum neurotoxin (**BoNT**)

Zn依存性メタロプロテアーゼ（分子量 約15万）



毒素活性：SNAREタンパク質を切断



BoNT 血清型別、基質と切断部位

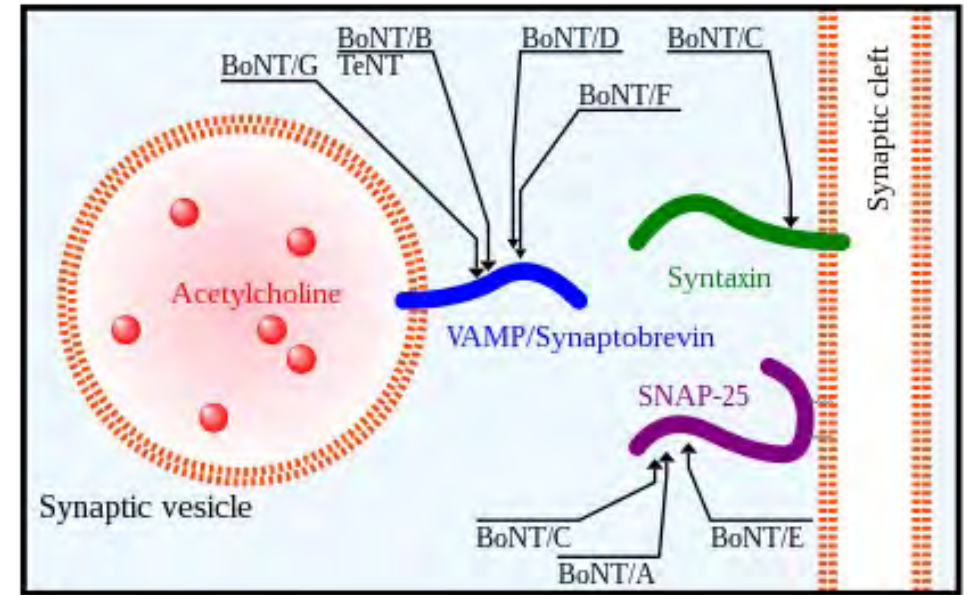
血清型

A ~ G の 7 血清型に分けられる。

ターゲット (基質)

A, E, C → SNAP25

B, D, F, G → VAMP2



wikipedia



Laura von Berg et al. *Scientific Reports*, (2019)

血清中・糞便中・被疑食品中からボツリヌス毒素が検出される → 確定診断
(ボツリヌス毒素産生菌の分離)

検査法

- ・ マウス法がゴールドスタンダード。
検体をマウスの腹腔に投与し、症状の有無・生死で判定。
感度、特異性ともに良い。

- ・ 検出感度：1 mouse i.p.LD₅₀ (精製A型毒素 10 pg前後)
- ・ 所要時間：数時間～1日程度
- ・ 試験（検査）機関によっては実施が困難。
- ・ 一度に多くの検体を調べるのは困難。

(ボツリヌス毒素はバイオテロでの使用が懸念されている)

※ 3Rsの観点から、*in vitro*の代替試験法の開発が望まれる。



うずくまり
毛並みの悪さ
筋弛緩
致死

開発が進められている *in vitro* 検出系の例

Method Principles	Analysis Time	BoNT Toxinotype	Sensitivity	Benefits/Limitations	References
Immunological methods: sandwich ELISA, electro-chemiluminescent assay	6–7 h	A–F	2–176 pg/mL	Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs, detection hampered by neurotoxin associated proteins	[25–31]
Immunological methods: lateral flow assay,	30 min	A–B	10–50 ng/mL (10,000–50,000 pg/mL)	Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs, detection hampered by neurotoxin associated proteins	[25,34,37]
Mass spectrometry	5–8 h	A–F	0.1–1 pg/mL pg/mL	Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs	[39–44]
Endopeptidase ELISA based or MS based	7–8 h	A–G	0.1–1000 pg/mL	Rapid detection/detection of cleavage only	[44–56]
Immunosensors and FRET assays	2–5 h	A	0.1–20 pg/mL	Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs	[60–63]
In vivo mouse bioassay	4 days	A–F	1–10 pg/mL	Sensitive method detecting functional toxin but ethical concern, variability and duration	[23,68,69]
Ex vivo methods hemidiaphragm test	9–5 h	A–F	1–10 pg/mL	Sensitive method detecting functional toxin but ethical concern and technically demanding	[70–72]
Cell-based assays human neurons from induced pluripotent cells and monitoring of SNAP-25 cleavage by Western blot	3–5 days	A–E	0.003 pM–10 pM (0.55–1500 pg/mL)	Sensitive method detecting functional toxin but technically demanding	[73–76,80,81,89, 90,95–98]
Cell-based assays using differentiated cell lines	3–5 days	A–E	5.5 pM–10 nM (825–150,000 pg/mL)	Sensitive method detecting functional toxin but technically demanding	[77,82–88,94,99, 105,106]
Electrical conductance assays	1–3 days	A	25,000 pg/mL	Method detecting functional toxin but long and technically demanding	[86,87]

原理・手法

- ELISA
- FRET
- MS
- 分化誘導した細胞

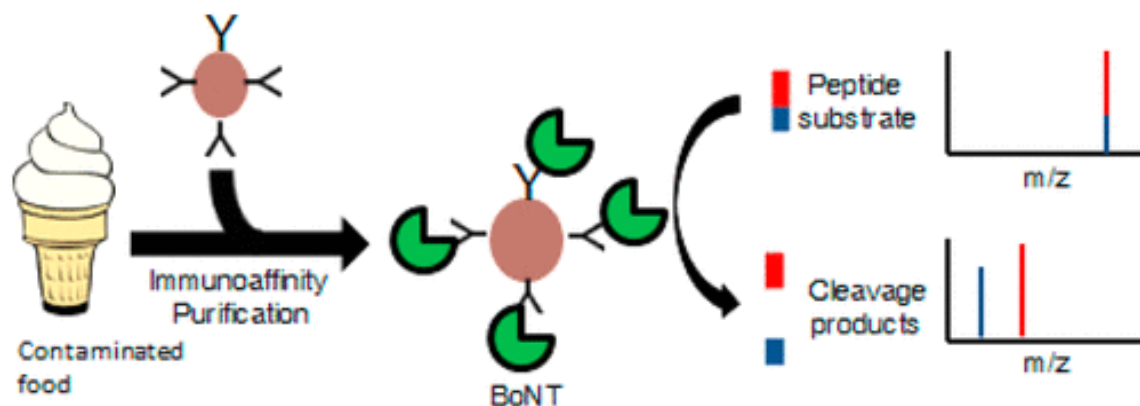
Rasetti-Escargueil, C. & Popoff, M. R.
Recent Developments in Botulinum Neurotoxins Detection. *Microorg* 10, 1001 (2022).

開発例1

Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS

Kalb SR et al., *J. Agric. Food Chem.* 2015

(Barr JR et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2005から始まる)



特異的に切断されたりコンビナントSNAREタンパク質のフラグメントをTOF-MSで検出

(抗体固相化ビーズで精製)
各血清型に対するモノクロ抗体

Table 2. Limit of Detection of BoNT/A, /B, /E, and /F Spiked into 10 Selected Food Matrices

food	food state	BoNT/A	BoNT/B	BoNT/E	BoNT/F
milk	liquid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
infant formula	liquid	0.5 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
green bean liquid	liquid	0.5 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
orange juice ^a	liquid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.5 mLD ₅₀ /mL	0.025 mLD ₅₀ /mL
tomato juice ^a	liquid	0.5 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.025 mLD ₅₀ /mL
liquid egg	liquid	0.75 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.5 mLD ₅₀ /mL	0.05 mLD ₅₀ /mL
yogurt	semisolid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
broccoli	solid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
salami	solid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL
salmon	solid	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.1 mLD ₅₀ /mL	0.25 mLD ₅₀ /mL	0.01 mLD ₅₀ /mL

^aRequires pH adjustment.

開発例2

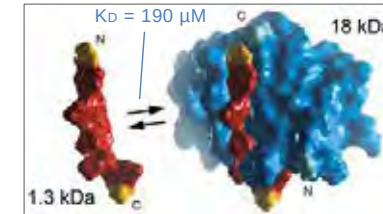
Split luciferase-based assay to detect botulinum neurotoxins using hiPSC-derived motor neurons

Laurent Cotter¹, Feifan Yu^{2,3,4}, Sylvain Roqueviere¹, Juliette Duchesne de Lamotte¹, Johannes Krupp⁵,
Min Dong^{2,3} & Camille Nicoleau¹

Commun Biology 6, 122 (2023).

←この論文で採用されている技術

NanoLuc binary technology (NanoBit)

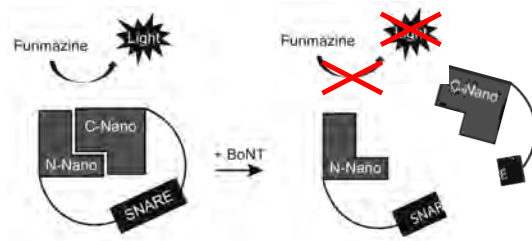


Dixon, A. S. et al.

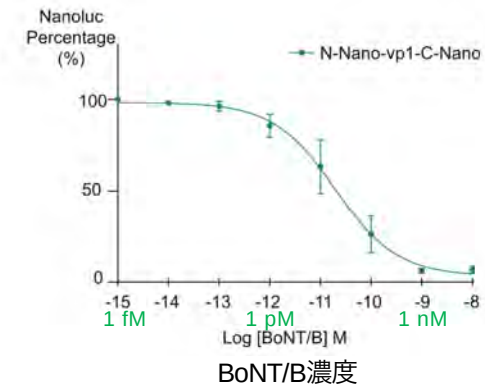
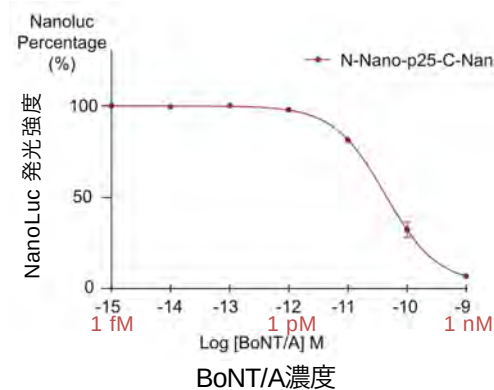
ACS Chem. Biol. 11, 400–408 (2016).

深海エビ由来ルシフェラーゼを元に作製された

SNAREタンパク質でつないだNanoBitを利用



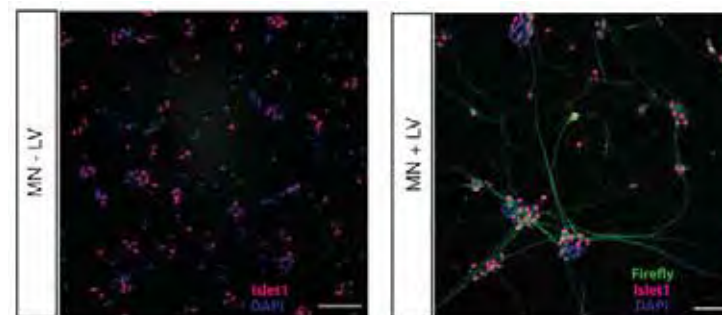
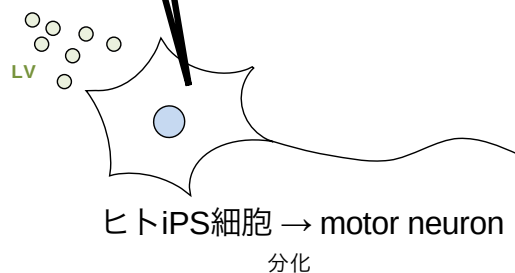
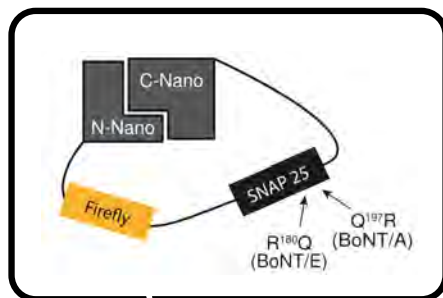
感度



開発例2

ヒトiPS細胞をmotor neuronに分化、かつ、NanoBit-SNAP25を発現

(N末) N-Nano  SNAP25  (C末)



LV : Lentiviral vector

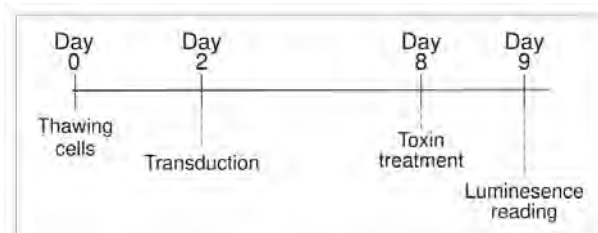
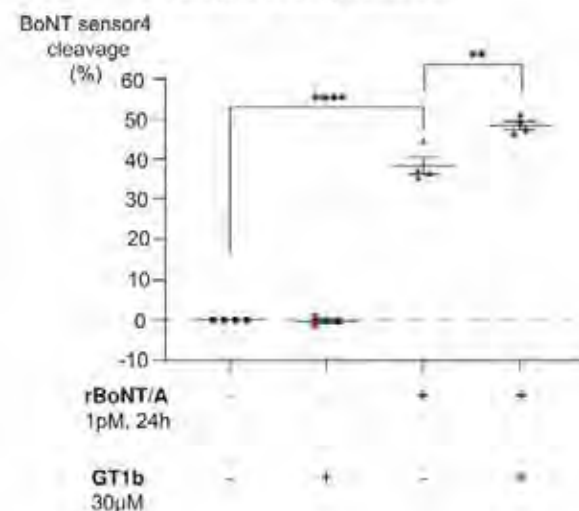
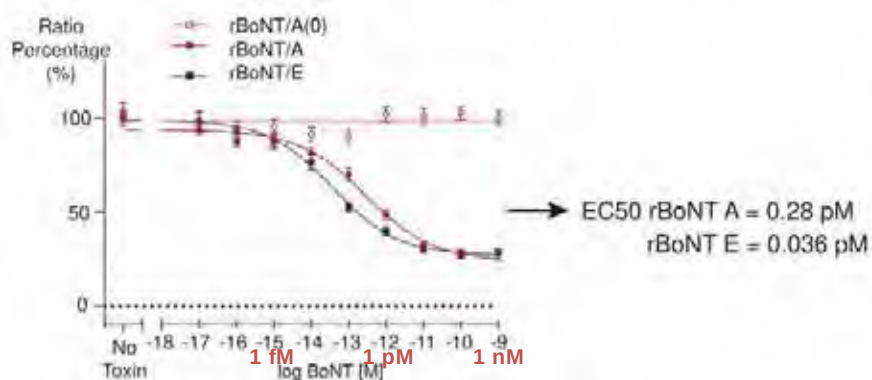
Islet1 : nuclear motoneuronal marker

ホタルLuc

ガングリオシド添加で（ちょっとだけ）強化

Receptor binding modulation

感度



・感度良好（精製毒素を使用したデータ）
受容体結合と基質切断の両方をクリア

・準備に数日かかる

上市されているin vitroボツリヌス毒素検出試薬

・ 蛍光タンパク質間のFRETを利用

Biosentinel社（米国） 日本ではフナコシが取り扱っている

- ・ BoTest A/E BoNT Detection Kit (for academic) A1004 (200 test) 20万円（税込）
- ・ BoTest B/D/F/G BoNT Detection Kit (for academic) A1009 (200 test) 20万円（税込）

2000 test 容量もある（フナコシのサイトには掲載されていない）

・ 蛍光基（ドナー）－発色基（クエンチャー）間のFRETを利用

List Biological Laboratories社（米国） 日本ではフナコシが取り扱っている

- ・ SNAPtide（A型用として販売）
- ・ VAMPTide（B型用として販売）
- ・ SNAP Etide（E型用として販売）
- ・ SYNTAXtide（C型用として販売）



基質となるSNAREタンパク質の配列をもつペプチド

切断箇所を挟むように2箇所のアミノ酸残基を蛍光基と発色基で修飾している

（未切断 FRETによりクエンチ状態 → 切断 クエンチ解除・蛍光を発する）

市販されている*in vitro* ボツリヌス毒素検出キット(BoTest) について

Biosentinel社 (米国) 日本ではフナコシが取り扱っている

- ・ BoTest A/E BoNT Detection Kit (for academic) A1004 (200 test) 20万円 (税込)
- ・ BoTest B/D/F/G BoNT Detection Kit (for academic) A1009 (200 test) 20万円 (税込)

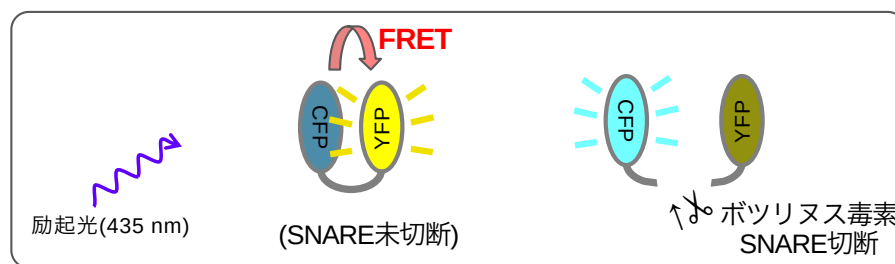
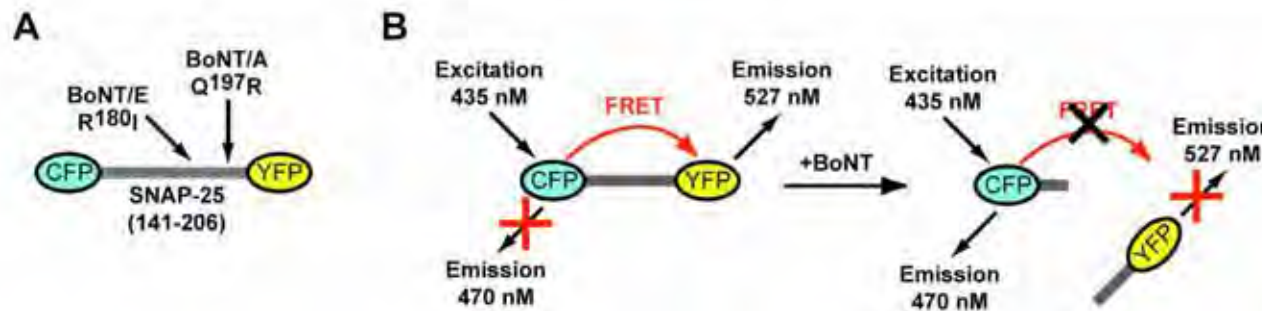
2000 test 容量もある (フナコシのサイトには掲載されていない)

【概要】

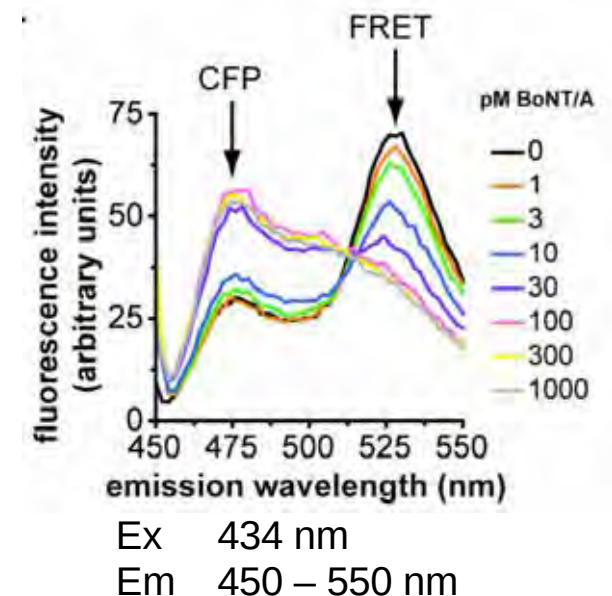
- ・ FRETを利用したBoNT検出キット (リコンビナント **CFP - SNAREタンパク質 - YFP**の切断)。
- ・ BoNTの基質切断活性を検出する系。
- ・ クールドサンプル中のBoNTも測定できる。(実施例に "糞便サンプル" はない)
(milk, carrot juice)

BoTest A/Eの説明書より (一部加筆)

検出原理 (FRETを利用)



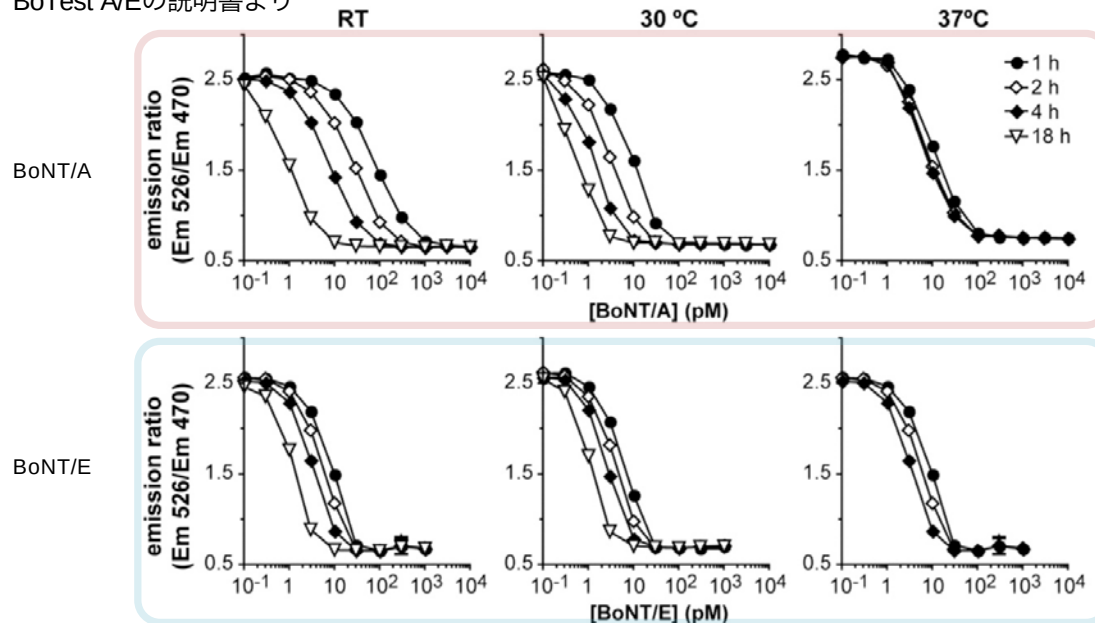
BoNT/A濃度依存的な FRETの消失



市販されている*in vitro* ボツリヌス毒素検出キット(BoTest) について

反応温度と感度

BoTest A/Eの説明書より



検出限界

temp.	time (h)	EC ₅₀ (pM)		LOD (pM)	
		BoNT/A	BoNT/E	BoNT/A	BoNT/E
RT	1	76	8.2	<10	<3
	2	25	5.1	<3	<1
	4	7.4	3.2	<1	<1
	18	0.88	1.2	<0.3	<1
30 °C	1	9.0	5.6	<3	<1
	2	2.9	3.6	<0.3	<1
	4	1.7	2.4	<0.3	<1
	18	0.4	1.1	<0.3	<0.3
37 °C	1	9.9	4.6	<3	<1
	2	7.1	3.1	<3	<1
	4	6.3	2.3	<3	<1
	18	8.5	2.2	ND	ND

ex 434 nm → Em 526 / Em 470 の比

BoNTで切断されると YFP (FRET, 526 nm) ↓、CFP (470 nm) ↑ ⇒ 比の値が小さくなる

- ・ 室温、18時間反応条件では、精製毒素 1 pM前後から検出できる（サブタイプによる差は不明）
- ・ 長くインキュベーションする場合、低温（室温程度）でインキュベートする方がよりstableなBoNTの活性を見ることができるとしている。
- ・ A型毒素の場合、感度は30°C条件で最も高くなる。

BoTest A/Eを用いた実際のデータ

製品を購入し、A型試験毒素を用いて試験を行なった。

反応液組成 (100 μ L/well)

1x Buffer (製品に付属)
 5x cOmplete(プロテアーゼインヒビターカクテル, EDTAフリー)
 5 mM DTT
A型試験毒素 (none, 0.53, 2.68 i.p.LD50/well)
 BoTest reporter (基質)
 20% v/v 【0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4) 】

	none	0.53 i.p.LD50/well	2.68 i.p.LD50/well
10x Buffer	9.5	9.5	9.5
50x cOmplete ^{EDTA-}	10	10	10
50 mM DTT	10	10	10
A型試験毒素 (1 or 4 TD/mL)	0	10	10
0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4)	20	10	10
BoTest reporter	5	5	5
H ₂ O	45.5	45.5	45.5
total 100 μ L (/well)			

ウェルプレート：パーキンエルマー OptiPlate 96-F Black 低吸着処理 (# 6055260)

反応温度：室温 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) 遮光して静置

蛍光測定：0 (mix直後)、1、2、4、8、16 h

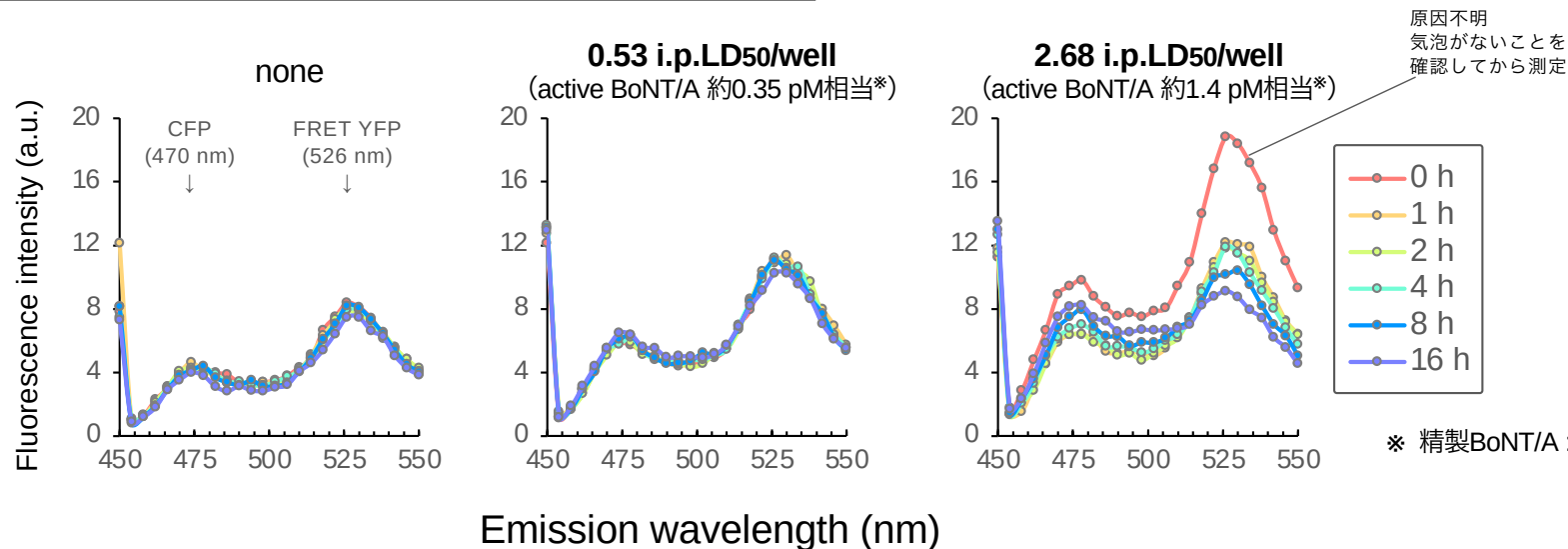
励起波長：434 nm

蛍光波長：450 – 550 nm (4 nm刻み)

(それぞれ**1 well**だけで検討)

¥ 1,000/test

蛍光スキャンニング結果 (測定値をそのままプロットしたもの)



* 精製BoNT/A : 1 i.p.LD50 = 10 pgとして換算

BoTest A/Eを用いた実際のデータ

470 nm (CFP) と 526 nm (FRET (YFP)) の蛍光強度、およびratio (Em 526/Em 470) の経時的変化

YFP / CFP

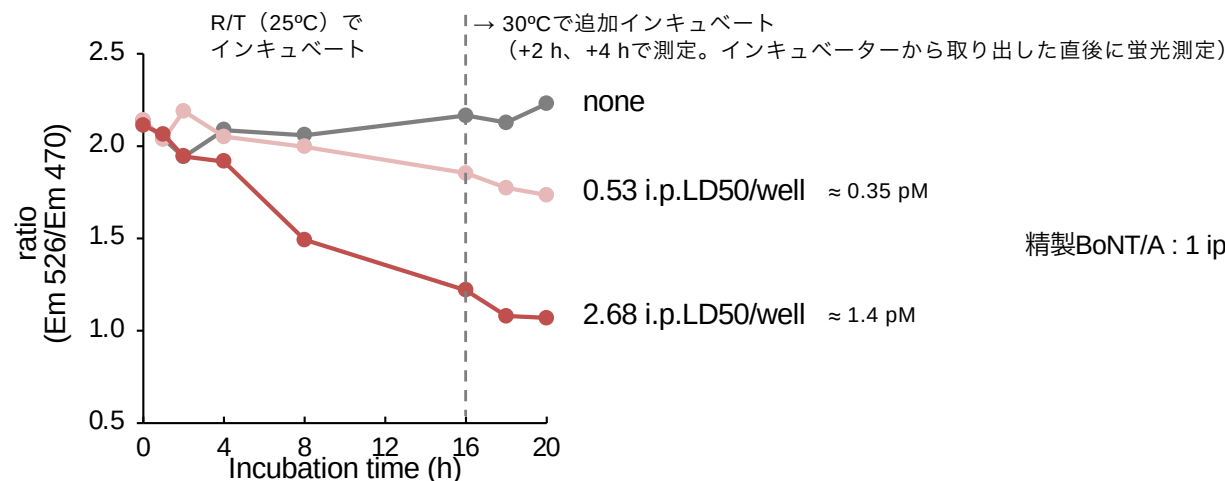
A型試験毒素
none

Em 526 / Em 470 の比

none				0.53 i.p.LD50/well				2.68 i.p.LD50/well				
	CFP	FRET	ratio		CFP	FRET	ratio		CFP	FRET	ratio	
	0 h	3.92	8.36	2.14	0 h	5.22	11.16	2.14	0 h	8.91	18.82	2.11
	1 h	3.99	8.14	2.04	1 h	5.34	10.88	2.04	1 h	5.89	12.16	2.06
	2 h	4.08	7.93	1.94	2 h	5.06	11.09	2.19	2 h	6.08	11.83	1.95
	4 h	3.80	7.94	2.09	4 h	5.46	11.19	2.05	4 h	6.21	11.91	1.92
	8 h	3.87	7.97	2.06	8 h	5.54	11.06	2.00	8 h	6.80	10.14	1.49
	16 h	3.79	8.20	2.17	16 h	5.53	10.24	1.85	16 h	7.48	9.13	1.22
※	16+2 h	3.51	7.47	2.13	16+2 h	5.31	9.42	1.77	16+2 h	7.28	7.86	1.08
	16+4 h	3.40	7.57	2.23	16+4 h	5.58	9.69	1.74	16+4 h	7.61	8.14	1.07

※ 室温 (25°C) で16時間インキュベートしたあと、30°Cで追加インキュベーションを行なった。

ratio (Em526/Em470) の経時的変化



- 25°C・16 h条件では、A型試験毒素 2.68 i.p.LD₅₀/well (約 1.4 pM相当) が検出可能だった。(概ね説明書どおり)

BoTest A/Eを用いた実際のデータ

条件検討いろいろ ・ プロテアーゼインヒビター(ロシュ cOmplete EDTA-free) の影響
・ 抗体で中和されるか

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
基質	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A型毒素	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
cOmplete	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
抗毒素	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-

1 wellあたり

規定量

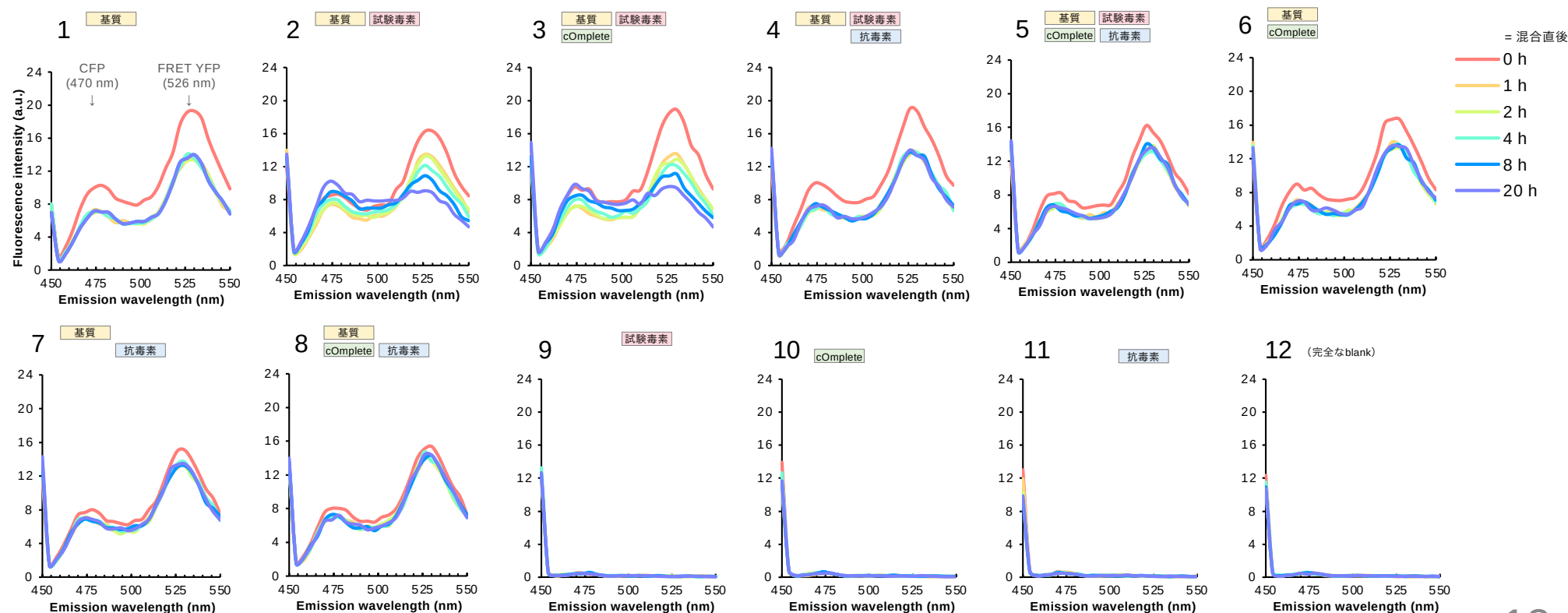
2.68 i.p.LD50

x5濃度

0.01 IU

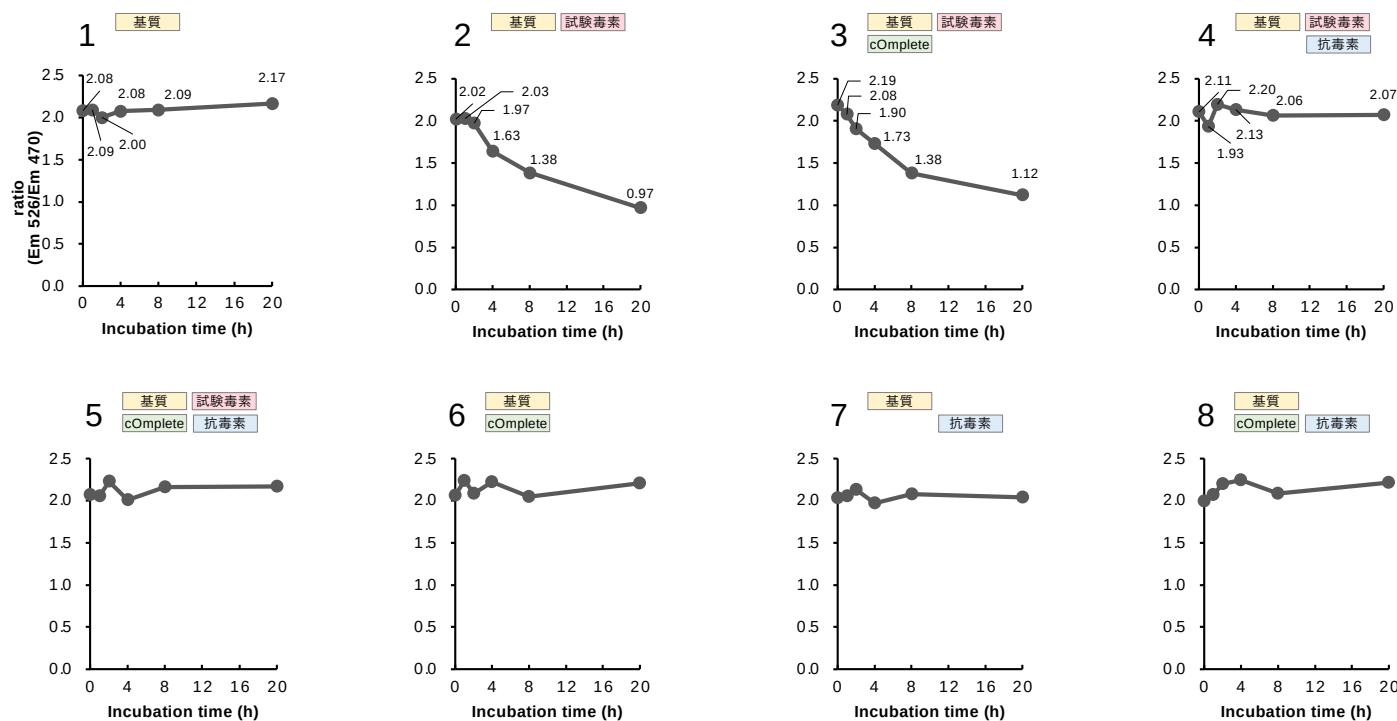
□ 毒素 + 抗毒素はあらかじめ室温で1 h
インキュベートしたものを加えた

↓ 30°Cでインキュベート
↓ 経時的に蛍光測定 (Ex. 434nm, Em 450-550)



BoTest A/Eを用いた実際のデータ

ratio (Em526/Em470) の経時的変化



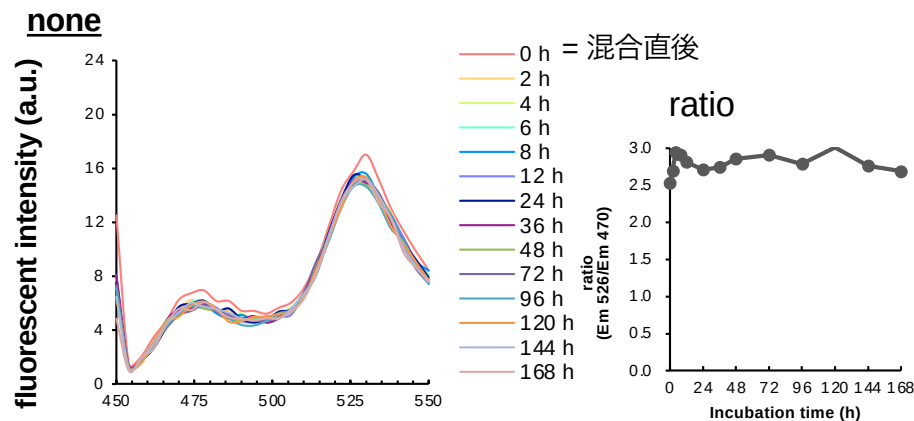
- ・ A型試験毒素 2.68 ipLD50/wellを30°C・8～20 hで検出可能であった。
- ・ A型標準抗毒素による中和も確認できた。

BoTest B/D/F/G を用いた実際のデータ

反応液組成 (100 μ L/well)

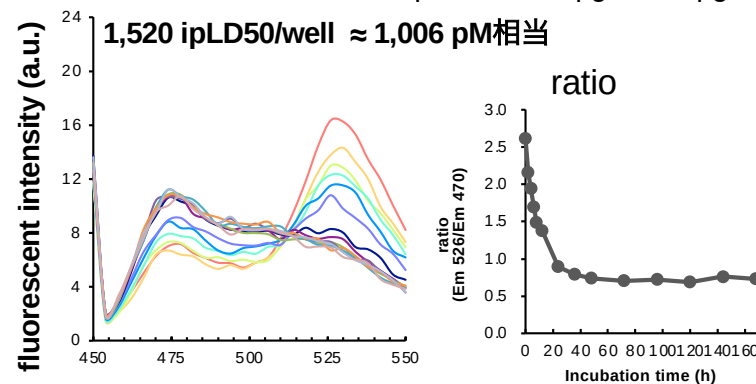
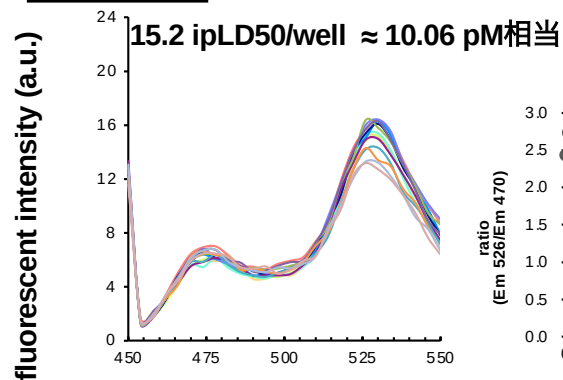
1x Buffer (製品に付属)
5x cOmplete(プロテアーゼインヒビターカクテル, EDTAフリー)
5 mM DTT
B型試験毒素 (none, 15.2, 1,520 i.p.LD50/well)
BoTest reporter (基質)
20% v/v 【0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4)】

↓ 30°C インキュベート
↓ 経時的に蛍光測定 (~1週間)



感度 — BoTest A/E : A型試験毒素より
やや劣る

B型試験毒素



1 i.p.LD50 = 10 pg、151 pg/mL = 1 pMとして計算

まとめ

- ・ 開発が進められているボツリヌス毒素 *in vitro* 検出系について紹介した。
- ・ 上市されている検出試薬（BoTest）を使用したデータを紹介した。

今回試験を行った範囲では、

BoTest A/E = 2.68 ipLD50 のA型試験毒素

BoTest B/D/F/G = 1,520 ipLD50のB型試験毒素

が30°C条件下、~20 hで検出可能であった。

17. 動物由来感染症

衛生微生物技術協議会第43回研究会
レファレンスセンター等関連会議
令和5年7月5日（水）10:15～

令和4年度動物由来感染症レファレンスセンター研修会の概要

国立感染症研究所 獣医科学部
松嶋 彩

令和4年度動物由来感染症レファレンスセンター研修会

日時：令和5年3月6日（月）13:00～17:35

令和5年3月7日（火）8:50～12:00

場所：国立大学法人山口大学共同獣医学部iCOVER棟

内容：狂犬病に関する講義、実験室内診断実習（RT-PCR法／直接蛍光抗体法）、脳模型を用いた解剖実習
SFTSの発生状況と検査法（講義）



山口大学共同獣医学部iCOVER
60名規模の実習（BSL2/3）

開催周知と案内の送付

- 1月16日 メールにて企画案について地域ブロック担当者に送付し打診、大体の参加希望者について調査
→45名の参加希望者を把握
- 1月23日 メールにて開催案内の送付、出席希望者のとりまとめを地域ブロック担当者に依頼
→48名の参加者決定
- 3月6～7日 実習の開催

地区ブロック	参加者	所属組織
北海道・東北・新潟	1名	1
関東	3名	3
東海・北陸	5名	5
近畿	10名	7
四国	5名	5
中国	16名	14
九州	8名	5

参加申込：48名
当日参加者：46名（8班で実習）

- ・ 地方衛生研究所32名
- ・ 愛護センター4名
- ・ 保健所9名
- ・ 本庁職員1名

スタッフ：山口大学教員1名、学生4名
感染研職員6名

当日のスケジュール



実習前の講義

令和5年3月6日（1日目）			
13:00-13:05	5分	挨拶	
13:05-13:15	10分	研修ガイダンス	
13:15-13:45	30分	狂犬病に関する講義1 「国内の狂犬病対策について」	
13:45-14:15	30分	狂犬病に関する講義2 「狂犬病の診断方法」	
14:15-14:25	10分	休憩、移動、準備	
14:25-15:55	90分	狂犬病の実験室 診断1 RT-PCR法 (1～4班)	脳模型を用いた 解剖実習 (5～8班)
15:55-17:25	90分	脳模型を用いた 解剖実習 (5～8班)	狂犬病の実験室 診断1 RT-PCR法 (1～4班)
17:25-17:30	5分	事務連絡など	
令和5年3月7日（2日目）			
8:50-9:00	10分	ガイダンス、実習準備	
9:00-11:00	120分	狂犬病の実験室診断2 蛍光抗体法	
11:00-11:10	10分	休憩、移動	
11:10-11:40	30分	SFTSに関する講義1 「SFTS総論」	
11:40-12:10	30分	SFTSに関する講義2 「伴侶動物におけるSFTSの検査法について」	
12:10-12:30	30分	総括、質疑応答	

参加者アンケート

質問1. 研修の満足度について

回答数：46名

(ア)	とても有意義	37名
(イ)	有意義	9名
(ウ)	普通	0名
(エ)	意義がやや薄い	0名
(オ)	意義が薄い	0名

質問2. プログラムの内容を5段階で評価し、数字を○で囲んでください。

回答数：46名

[illegible]

参加者アンケート

質問3 研修会の内容で特に興味深かった・役に立ったトピックについてご記入ください。（自由記載）

【講義】10件

- あまり聞く機会がなかったため
- 技術を活用する機会は少ないかもしれないが、狂犬病等の希少な感染症の講義の方が研修として有意義でした
- 咬傷犬の検診に役立つ
- 実際の手順を確認できたため
- 遺伝子抽出試薬により、検出に違いがあることがわかり、非常に勉強になった（他5件）

【PCR実習】4件

- キットでの抽出しかしたことがなかったので、実習できて良かった（他2件）
- 狂犬病のRT-PCR及び蛍光抗体法は検査の必要性が出たときに何も知らない状態からはじめるより、一度経験しておくことで少しでもスムーズに対応できるので良い経験になった

【蛍光抗体法実習】4件

- 蛍光抗体法：ポジコンは配布されて、試しにやらないといけなく感じていたので大変ありがたい
- 蛍光抗体法について、実際に陽性、陰性のサンプルをみることもできた
- 実物の組織をあつかった染色
- 直接蛍光抗体法。普段はPCRしか行わないため勉強になった

【解剖実習】18件

- 動画により解剖の様子を学べたのは良かった（他4件）
- 模型を使用して脳出しの練習をする体験をできたこと（他12件）
- 動物の解剖が分かっていなかったので勉強になりました
- 狂犬検査時の採材方法

【SFTS】7件

- SFTSの広がりについて学べた。検査時の人間の防御対策の重要性について学べた
- SFTS、話にはよく聞いていたが、具体的な内容が理解できた
- SFTSは国内では対症療法が一般的ですが、ファビピラビルという有効な薬があるということが興味深かったです
- SFTSの講義は参考になりました。動物検体の検査と、衛研で実施できる法的理屈があると良いと思いました。
- SFTSに関する講義：致死率が高い等の特徴は知っていたが、詳しい発生状況や検査法については知らなかったのととてもためになった（他1件）
- SFTSの自治体の状況：扱う犬猫にダニがついていることがよくあるため

【その他】4件

- 実験室診断の実習：技術的な情報交換したりすることができた。（他2件）
- どのような作業、見え方なのかを体験でき、今後の参考になった

参加者アンケート

質問4 研修会の内容で、理解できなかった・わかりづらかった箇所があれば具体的に記入してください。（自由記載）

回答数：7件

- ・ 犬の狂犬病のDVDは少し冗長な気がした
- ・ 狂犬病のプライマーセット2を使用した場合のシークエンス解析方法について
- ・ RT-PCRなどは実際に行ったことがない部局なので、理解が追い付いていない
- ・ SFTSの検査法が難しかった
- ・ 丁寧に教えていただきありがたかった
- ・ 動画視聴（犬の狂犬病）について早くて聞き取りやメモが追い付かなかった
- ・ 戻って資料を復習し、繰り返し学びたいと思います。

質問5 研修のスケジュールについて

回答数：42名

(ア)	長すぎる	0名
(イ)	やや長い	3名
(ウ)	丁度良い	30名
(エ)	やや短い	9名
(オ)	短すぎる	0名

質問6 所属自治体における狂犬病検査研修（市職員の場合、県主催の研修を含む）の実施状況について

回答数：43名

(ア)	毎年実施	4名
(イ)	不定期に実施	8名
(ウ)	実施していない	28名
(エ)	その他	3名

質問7 所属自治体における狂犬病研修（市職員の場合、県主催の研修を含む）の内容について（複数回答可）

回答数：13名

(ア)	採材について	6名
(イ)	検査について	4名
(ウ)	座学	4名
(エ)	その他	6名

参加者アンケート

質問9. 動物のSFTSの実験室診断の実施状況について

回答数：46

- | | | |
|-----|-------------|-----|
| (ア) | 実施している | 17名 |
| (イ) | 実施していない | 24名 |
| (ウ) | 今後実施する予定がある | 0名 |
| (エ) | その他 | 5名 |
- ・ 感染研マニュアルのコンベンショナルPCR(Set1, Set2)で実施。近日中にリアルタイムPCR(吉川先生の論文の3セット)を導入予定(回答：ア)
 - ・ 過去の調査研究で野生動物を対象とした診断を実施(回答：エ)
 - ・ 現所属では実施できる体制ではない。衛生研究所の状況は不明(回答：エ)
 - ・ 研究レベルで実施していた時期もあった(回答：イ)
 - ・ 動物病院とどのように検体を集めるか予算調整がついていない(回答：イ)
 - ・ 山口県環境保健センターで実施(回答：ア)
 - ・ PCRと抗体検査を実施しています(回答：ア)
 - ・ リアルタイムPCR(回答：ア)
 - ・ 研究として実施(回答：ア)
 - ・ 私は従事していない(回答：イ)
 - ・ ネコ血清を用いた間接蛍光抗体法(地域猫、避妊、去勢)、スクリーニング的に行っていることも(回答：ア)

質問10. 動物のSFTSについて共有を希望される情報(自由形式)

回答数：10件

- ・ 検体種別の検出率などで情報ありましたら教えてください(尿から検出というのを聞いたことがあります)
- ・ 検出情報
- ・ やってみたいが検体の扱い方に苦慮
- ・ 犬、猫の陽性事例(数)情報、逐次いただけるとありがたい
- ・ 発生状況、動物での検査法
- ・ 発生状況(分布、感染動物種など)
- ・ 検査数のアップデート
- ・ 伴侶、野生動物の発生状況
- ・ 検査プロトコル
- ・ 間接蛍光抗体法などのプロトコル

参加者アンケート

質問11. 今回の研修会についての感想、今後の研修会への要望等ありましたらご記入ください。（自由形式）

[開催について] 8件

- 今後も実技中心の研修会があれば是非参加したい
- **定期的に開催**していただきたい（他5件）
- 特に狂犬病については国内での発生が少ないこともあり、他自治体でもどこの所属が担当するのか、明確になっていないところもあるようで、情報交換の場所としても非常にありがたかった
- 狂犬病などは希少な感染症となっており、現状地方衛生研究所では専門家がいなくなっている気がします。このような研修会を通じてみなさんに教えていただけると助かります。今後も続けていただけるとありがたいです

[開催場所、時間など] 5件

- バスの本数が少ないので終わる時間が気になる、タイムスケジュールをもう少し時刻表と合わせて組んでもらうか、マイクロバスなどで最寄り駅まで送迎があるとありがたい
- **実習で時間に追われた**感じがありましたので、もう少し余裕をもってできる時間配分をお願いしたいです（他2件）
- 座学の際に席を固定していただき、座席表があるとどこの自治体の方というのが分かった、自治体間の情報共有もできるのでありがたい

[テーマについての要望] 11件

- もし実際に解剖を含めて犬の脳を用いる実習があれば参加したいです
- 今後SFTSのELISA法についてご教授いただきたい
- 今回はSFTSだったので次回は紅斑熱も取り上げてほしい
- 蚊の媒介感染症、リケッチア（つつが虫、日本紅斑熱）
- バベシアの関東への進出。感染地域からの感染保護犬の広がりが気になる
- カブノサイトファーガ、レプトスピラなどを希望
- ブルセラ、野兔病（希望）
- NGSが整備され、メタゲノム解析できるようになり、ダニ媒介性感染症疑いのものをやってみると、ウイルスならともかく細菌や原虫など知らないものが出てくる事もあるので、それらの総論のようなものも知りたい
- 鳥インフルエンザ（高病原性）とかいかがでしょうか
- 難しいかもしれませんがニパウイルスなどの希少感染症の実習を受講したいです
- リケッチア等

まとめ

R4年度レファレンスセンター事業として狂犬病とSFTSの診断法を中心とした実習と講義を行い、参加者の満足度は概ね高かった

今後の課題

- 東日本からも参加しやすい会場の確保
- 参加人数に合わせて研修時間を長く確保する、ボリュームを工夫するなどの対応が必要
- 定期的開催、対面形式での実習の要望は多い

衛生微生物技術協議会第43回研究会
レファレンスセンター等関連会議
令和5年7月5日（水）10:15～

狂犬病ブロック技術研修会について

国立感染症研究所
獣医科学部
堀田明豊

動物の狂犬病調査ガイドラン(2014)

➤ 疑い犬(猫)への対応

➤ 野生動物 (※ 咬傷事故等の加害動物、行動異常、交通事故死)

◇第一優先候補種: アライグマ
タヌキ
アカギツネ
フイリマングース



Raccoon



Red
fox



Raccoon dog



mongoose

◇第二優先候補種: アナグマ、ハクビシン、
チョウセンイタチ、テン

◇第三優先候補種: コウモリ

● 調査結果の記録と報告

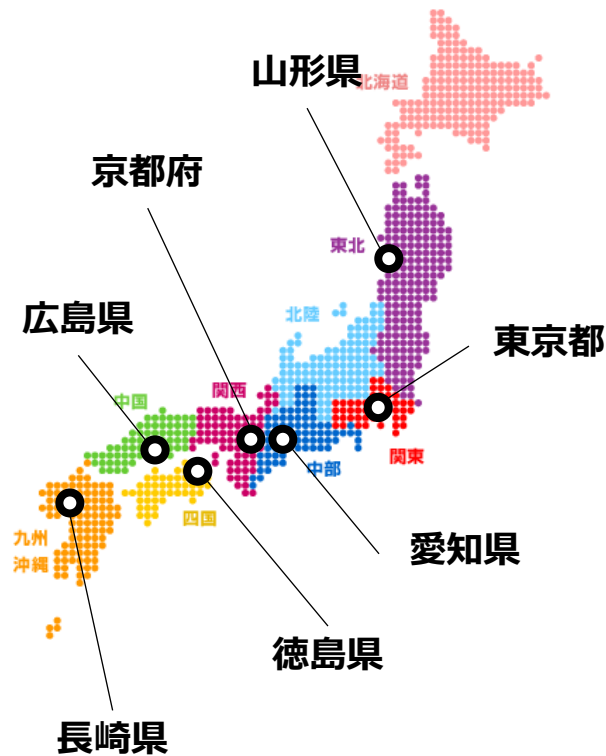
速やかに探知、対策を実行できるシステムを構築。

狂犬病の発生がない状況下や、発生後の清浄化確認において、国内に狂犬病の発生がないことを積極的に証明できる。

各自治体が狂犬病の疑い動物の検査をできることが望ましい

検査対応と連携（患者と感染源動物）

動物由来感染症レファレンスセンター
地域ブロック／衛生研究所



地方自治体（公衆衛生部局）

健康増進課等

生活衛生課等

衛生研究所

動物管理センター

保健所

病原体検査

感染源動物

(捕獲・解剖)

患者の対応

市民の相談

解剖と蛍光顕微鏡観察が可能な場所が異なる
部署間で意識のずれ？
自治体間で検査対応能力の差あり

これまでの狂犬病ブロック技術研修会

- 2015年度：
東北地域（5県6市），近畿地域（2府2県10市），
中国地域（5県5市），四国地域（4県6市）
- 2016年度：
北陸地域（4県3市），九州・沖縄地域（5県4市）
- 2017年度：
中部地域（5県9市），北関東地域（4県11市），
九州・沖縄地域（5県1市）
- 2018年度：
九州・沖縄地域（6県4市），北海道地区（延期／震災）
- 2019年度
九州・沖縄地域（6県4市），北海道地区（1道、3市）
- 2020、2021年度 ウェブ開催（宮崎大学）

主な参加者は動物管理センター職員
2019年で南関東地域以外は一巡

研修会場

	自治体	大学（宮崎大、北大）	国立感染症研究所村山庁舎
利点	自治体参加者の移動が比較的楽	学生の単位に組み込める	実習室あり
	担当自治体には機材類の提供あり	広い実習室	解剖室あり
	自治体施設を見学可能	広い解剖室	用具の輸送が楽、輸送費不要
		近隣に食堂、売店あり	不足用具の補充が容易
		学生と公衆衛生獣医師の交流の場	蛍光顕微鏡が同じ部屋に2台並列
			継続的に実施可能
難点	蛍光顕微鏡の所在が限定	授業時間と調整必要	実験動物以外は搬入不可
	輸送用具が多く、輸送費用大	施設使用料	1hのバイオ講習受講が必要
	解剖室が狭いところが多い	大学により施設充実度が異なる	近くに飲食施設がない
	担当者の負担大	スタッフが少ない	アクセス悪い
	実施前日に下見が必要	実施前日に下見が必要	地方の参加者は2泊必要

自治体開催は**自治体担当者の負担大**
 動物愛護センターの引き取り犬は使用不可
 大学開催は大学と近隣自治体の事前の連携が必要



感染研村山庁舎における
 研修事業を実施

研修スケジュール

1日目		
10 : 30	入庁手続き（IDカード受取）	
10 : 50	集合 挨拶・趣旨説明	
11 : 00	バイオセーフティ講習	
12 : 10	昼食 講義室	
13 : 00	講義 清浄国における狂犬病の検査	
13 : 30	講義 狂犬病疑い動物の移送、解剖、除染、廃棄におけるバイオセーフティ	
	実習 犬模型による解剖方法の手技確認	
15 : 00	休憩	
15 : 10	PPE装着 犬の解剖 脳の採材 スタンプ標本作製	講義 狂犬病の検査方法
		講義 人の狂犬病と疫学、ワクチン
		蛍光顕微鏡検査 観察、模擬操作
17 : 45	連絡事項 1日目終了	
2日目		
9 : 00	集合	
9 : 10	講義 狂犬病の検査方法	PPE装着 犬の解剖 脳の採材 スタンプ標本作製
	講義 人の狂犬病と疫学、ワクチン	
	蛍光顕微鏡検査 観察、模擬操作	
11 : 40	アクティブラーニングの説明	
11 : 50	昼食	
12 : 40	狂犬病発生時対応アクティブラーニング	
14 : 30	各自治体の対策状況の情報共有、質問	
15 : 30	アンケート記入 IDカード返却	
15 : 40	終了	



実験犬を用いた実際の脳出し作業

参加者（1都6県6市から19名）へのアンケート

所属 動愛センター 9名、衛生研究所 3名、保健所 3名、本庁 2名
満足度 とても有意義 12名、有意義 5名

項目	3（普通）	← 4 →	5（良い）
バイオセーフティ講習	4	1	12
清浄国における狂犬病の検査	1	3	13
動物の輸送方法、狂犬病検査時のPPE	1	4	12
人の狂犬病とワクチン	1	4	12
狂犬病の検査法	1	4	12
解剖実習	-	2	15
蛍光顕微鏡検査、観察、模擬操作	-	3	14
発生時対応のアクティブラーニング	-	5	12
各自治体の対策状況の報告	-	5	12

研修スケジュールについて やや長い 2名、ちょうど良い 13名、やや短い 2名

今後の予定

- 今後も毎年1回以上実施予定
- 今年度は東北ブロックの研修を村山庁舎で計画
- 対象は地衛研、動物愛護センター、保健所、本庁の
狂犬病発生時の対応部署職員

衛生微生物技術協議会第43回研究会
レファレンスセンター等関連会議
令和5年7月5日（水）10:15～

令和5年度 動物由来感染症レファレンスセンター研修会について

国立感染症研究所
獣医科学部
堀田明豊

令和4年度研修会のアンケート結果より

今後の要望・課題

- 定期的開催、対面形式での実習の要望は多い
- 参加人数に合わせて研修時間やボリュームの工夫が必要
- 東日本からも参加しやすい会場の確保



令和5年度動物由来感染症レファレンスセンター研修会

国立感染症研究所村山庁舎 6 号棟
(東京都武蔵村山市学園4-7-1) で開催

今後取り上げて欲しいテーマ

- ・ SFTSのELISA法 2015年度にEQA実施
- ・ 蚊媒介感染症
- ・ ダニ媒介感染症（つつが虫、日本紅斑熱）
- ・ レプトスピラ
- ・ カブノサイトファーガ
- ・ ブルセラ症 2011、2017年度にEQA実施
- ・ 野兔病 2009、2010（5自治体）, 2016年度（24自治体）にEQA実施
- ・ 高病原性鳥インフルエンザ
- ・ ニパウイルス
- ・ バベシア症

青字は獣医科学部で実施可能

野兔病の検査研修 スケジュール案

1日目 （ 月 日）	
13 : 00	入庁手続き（IDカード受取）
13 : 10	集合 オリエンテーション
13 : 20	バイオセーフティ講習
14 : 20	講義 野兔病の検査法
15 : 00	休憩
15 : 10	野兔病の検査実習（菌培養、凝集反応試験、conventional PCR）
17 : 00	1日目終了
2日目 （ 月 日）	
9 : 30	集合
9 : 40	菌コロニー観察、グラム染色鏡検、PCR産物電気泳動像観察
11 : 40	記録、考察、まとめ
12 : 00	昼食
13 : 00	講義 動物由来感染症に関する最近の話題
14 : 15	アンケート回答
14 : 30	解散（IDカード返却）

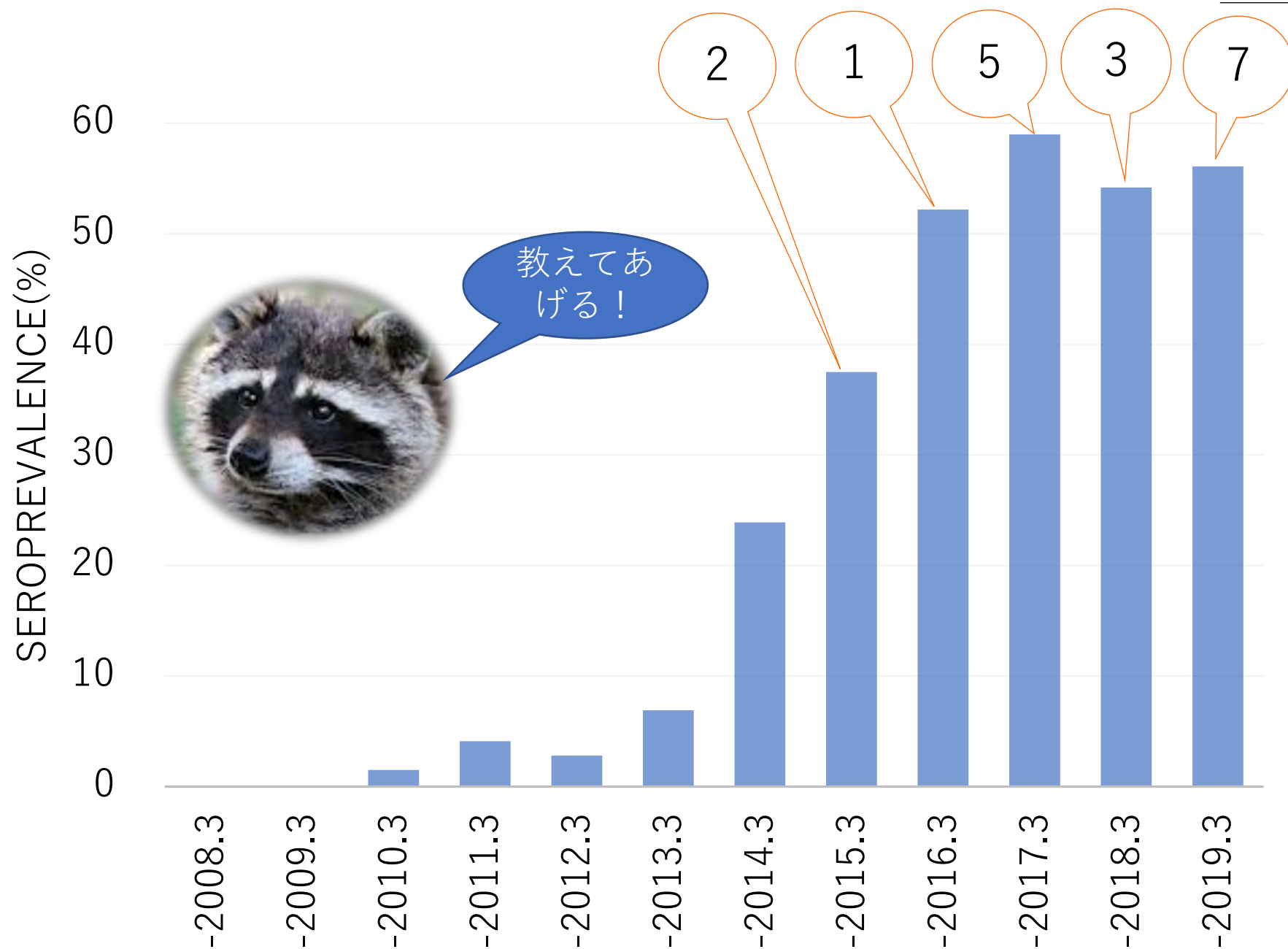


村山庁舎実習室

村山庁舎における研修について

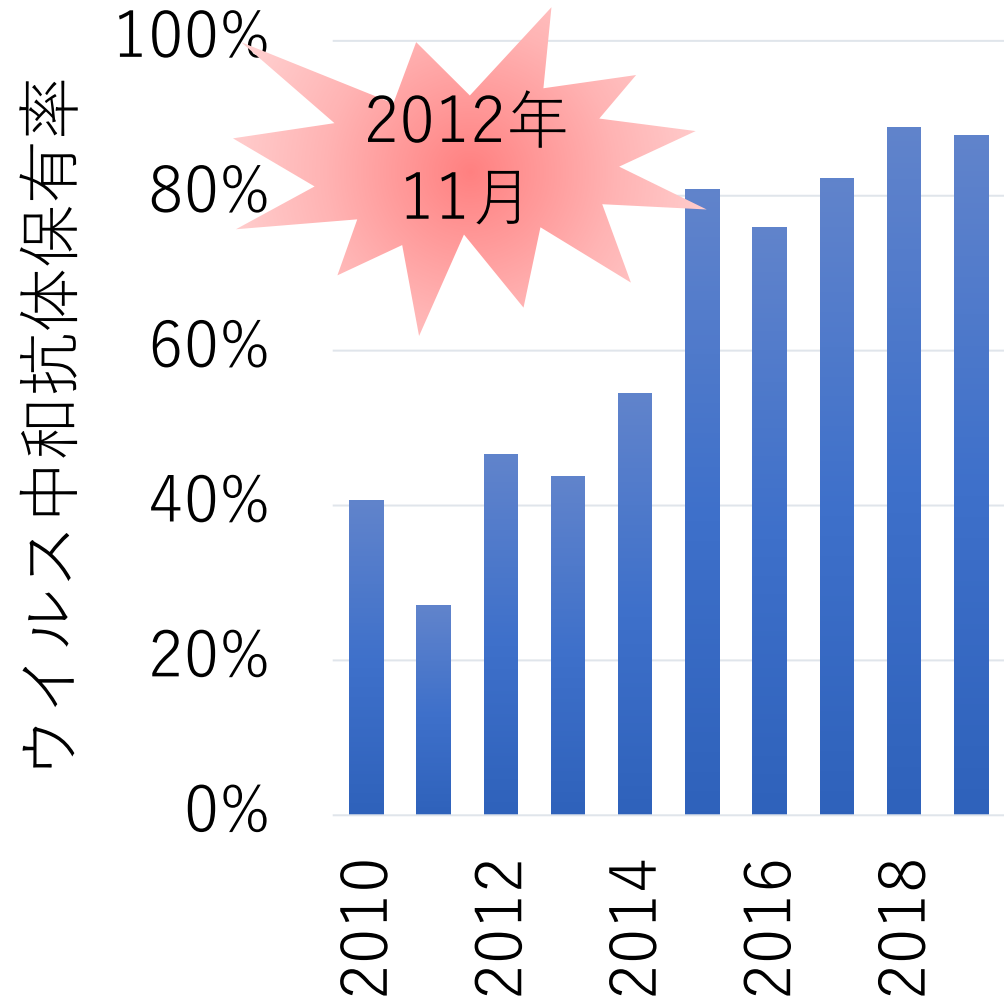
アクセス	東京駅から1.5時間、羽田空港から2.5時間
参加人数	1回30名まで
開催時期	2024年1-3月 1泊2日
BSL2使用	バイオセーフティ講習（1h）の受講が必要

アライグマで陽性が増加後、患者発生

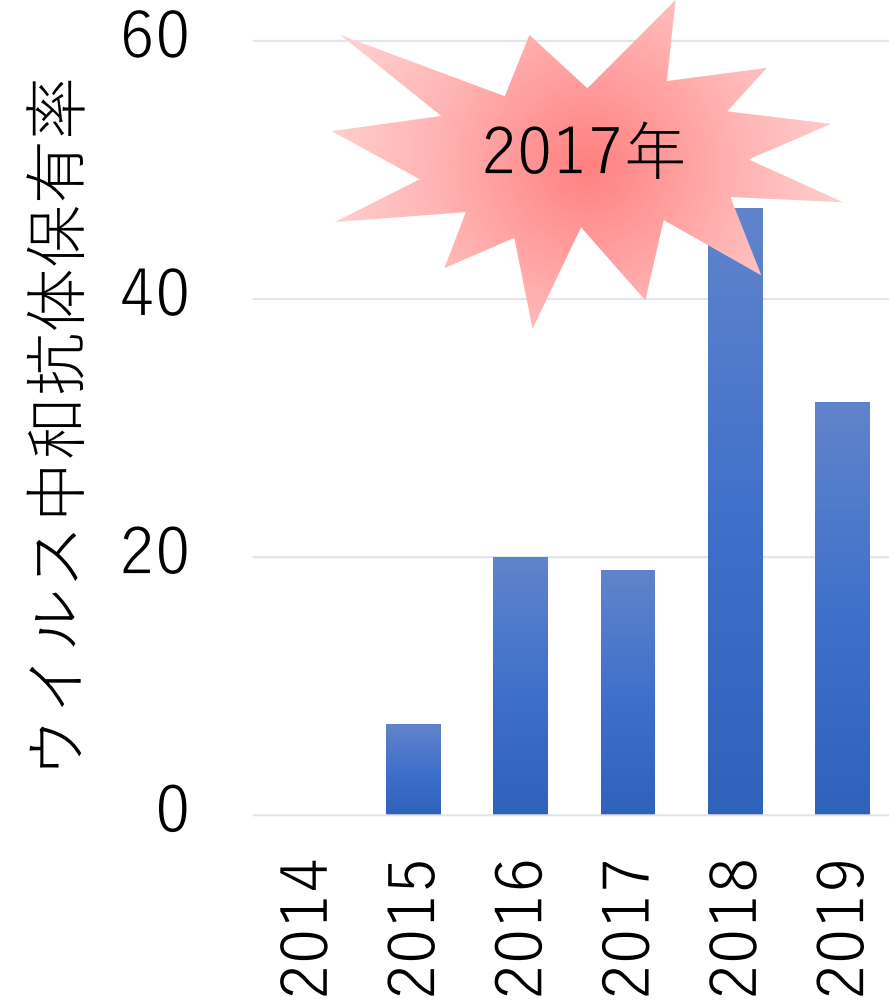


シカも！

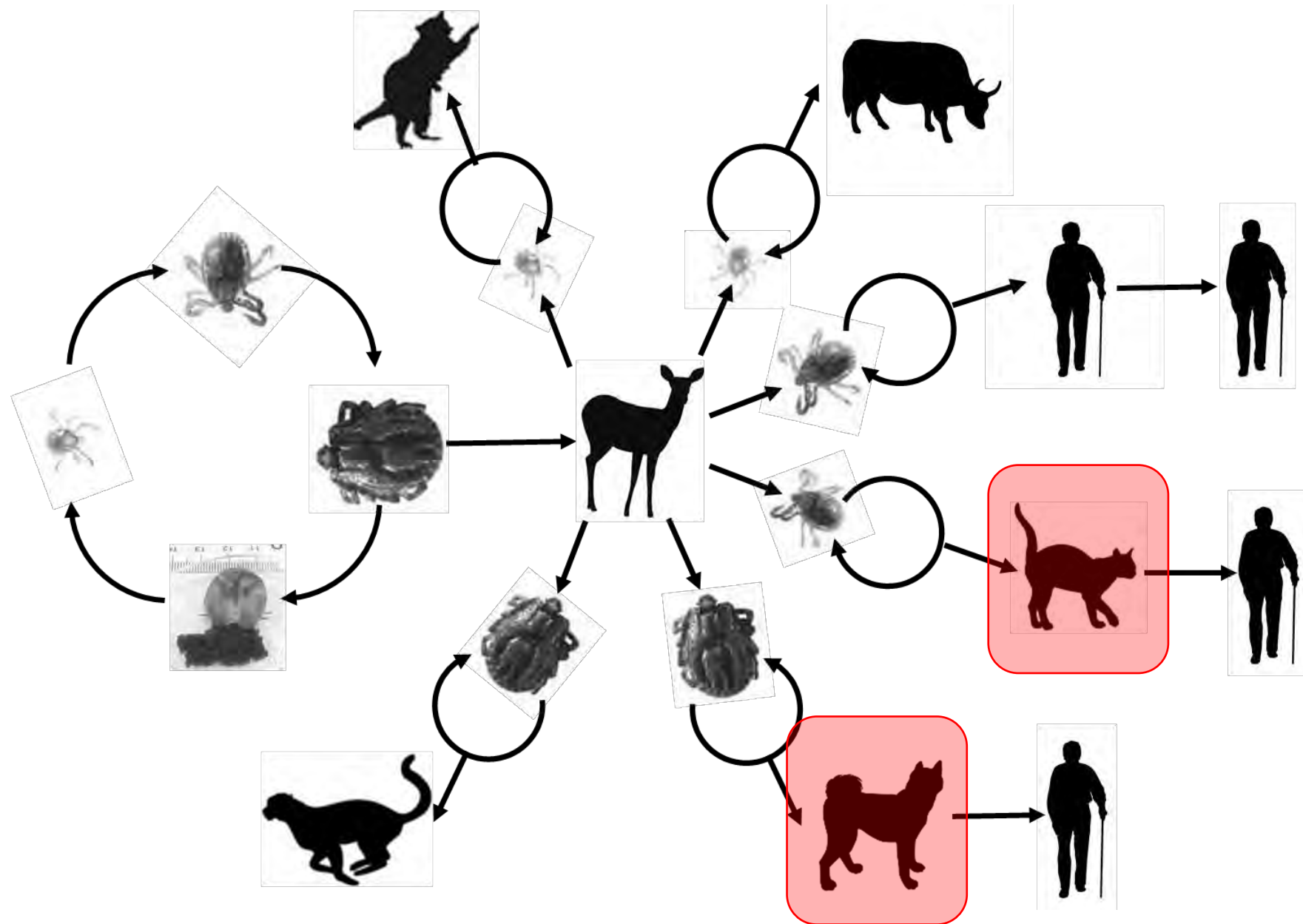
山口県



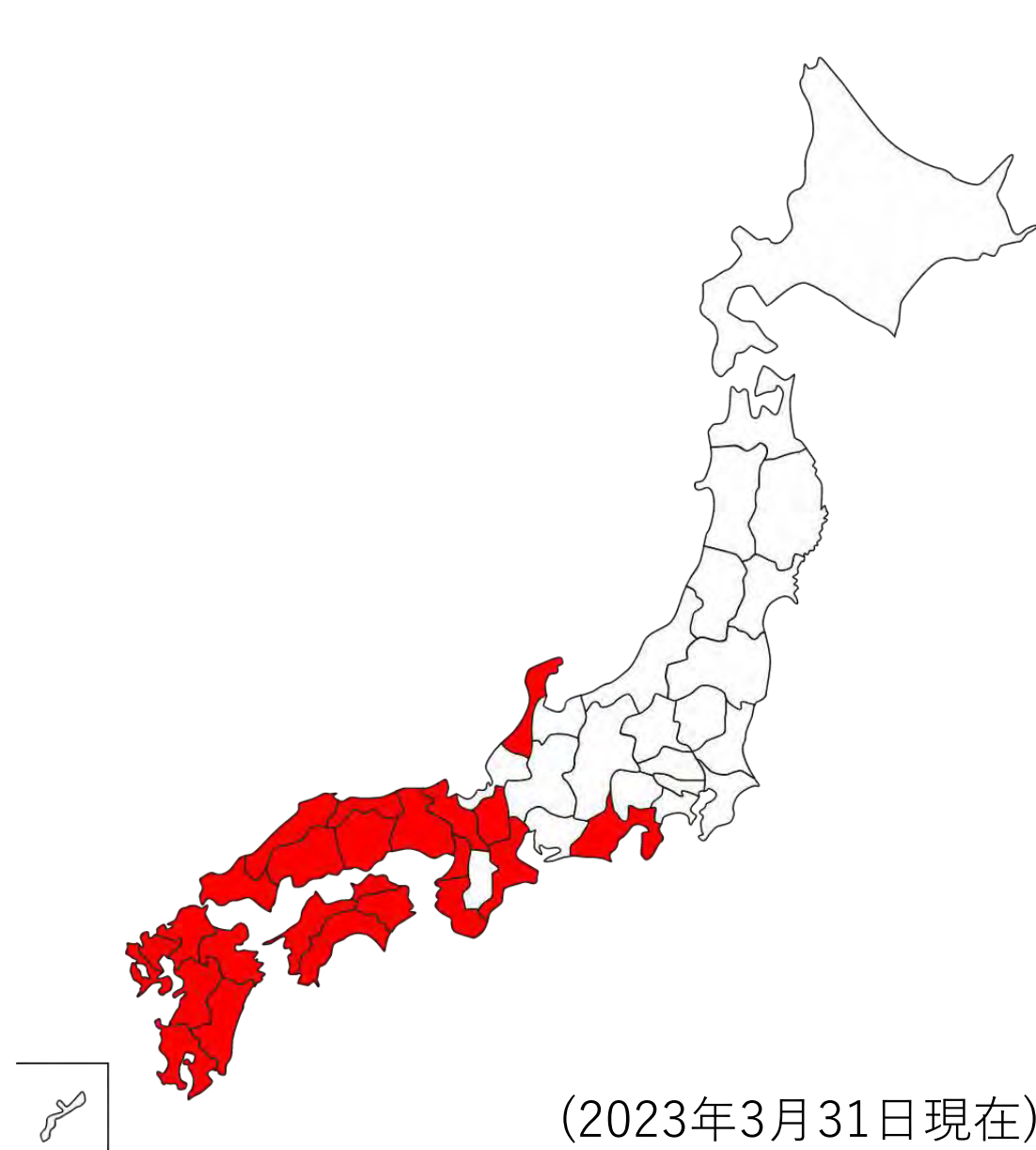
千葉県



SFTSの感染環



新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築

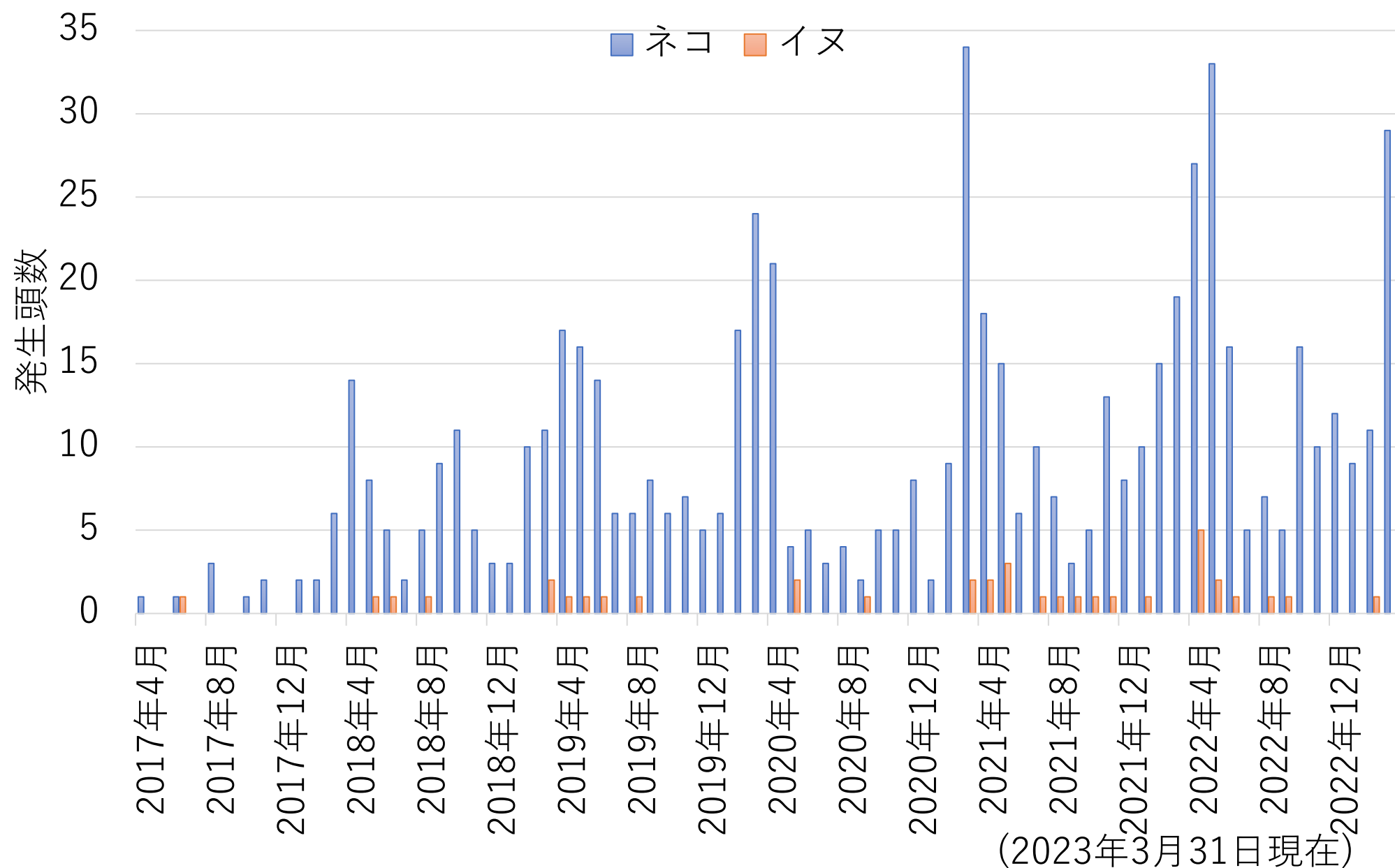


(2023年3月31日現在)

別に、富山県から2頭のSFTSV発症犬の報告

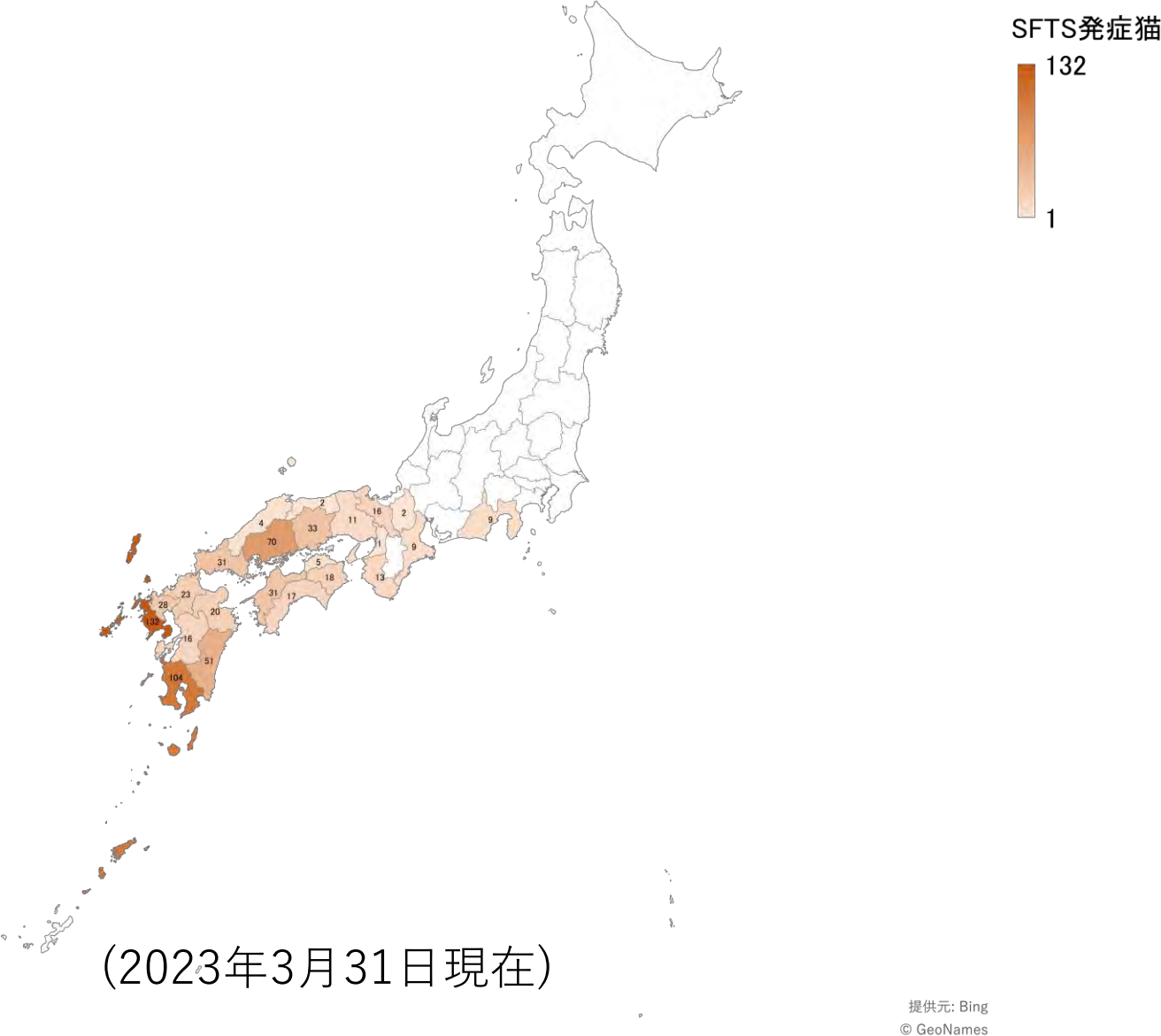
	ネコ	イヌ
石川県	0	1
静岡県	9	2
三重県	9	0
滋賀県	2	1
京都府	16	1
大阪府	1	0
兵庫県	11	4
和歌山県	13	1
岡山県	33	0
広島県	70	2
鳥取県	2	1
島根県	4	0
山口県	31	3
徳島県	18	1
香川県	5	0
愛媛県	31	3
高知県	17	1
福岡県	23	2
佐賀県	28	1
長崎県	132	1
熊本県	16	0
大分県	20	8
宮崎県	51	3
鹿児島県	104	1
不明	1	0
総数	647	37

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築



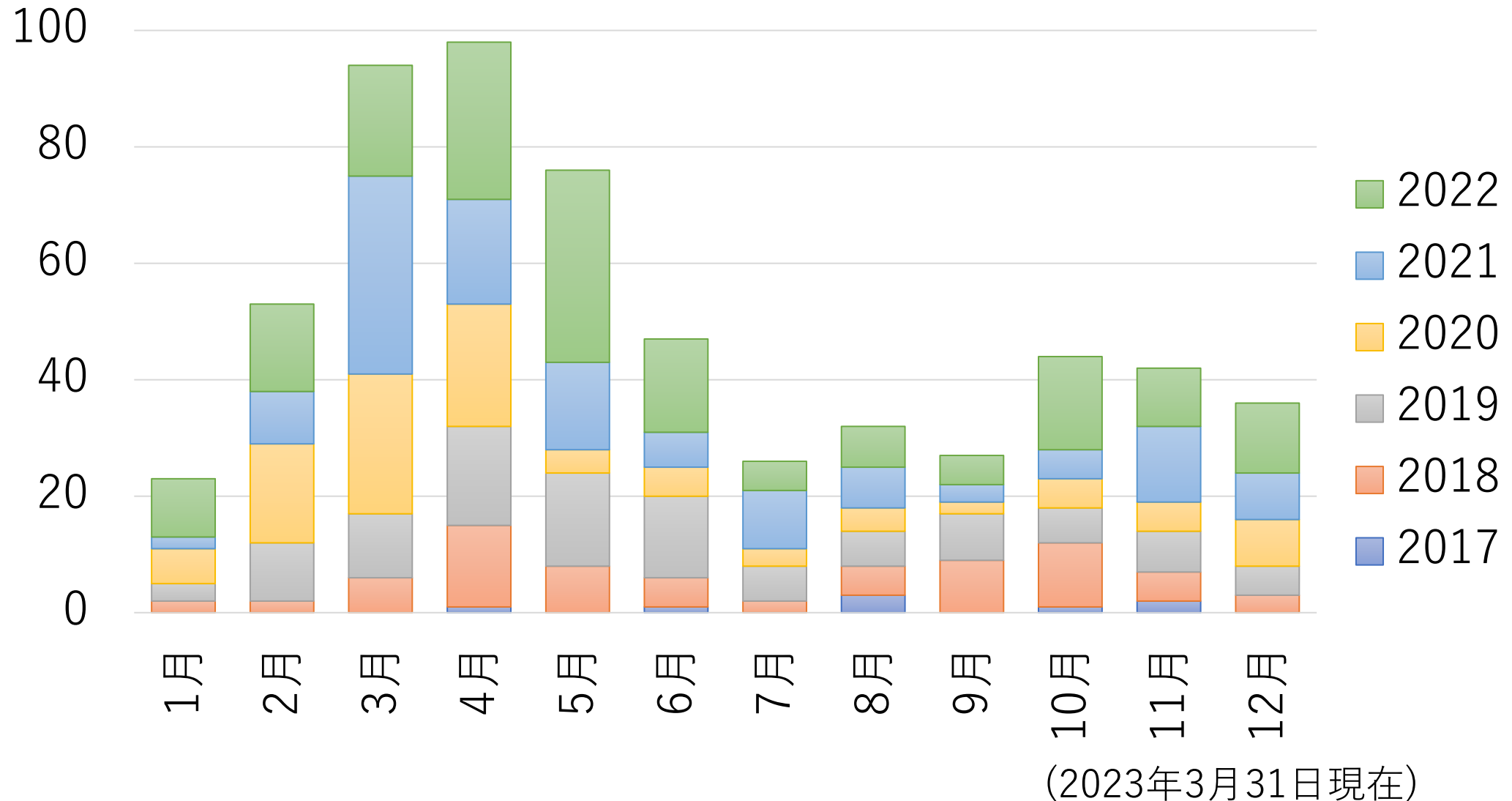
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築

SFTS発症猫数



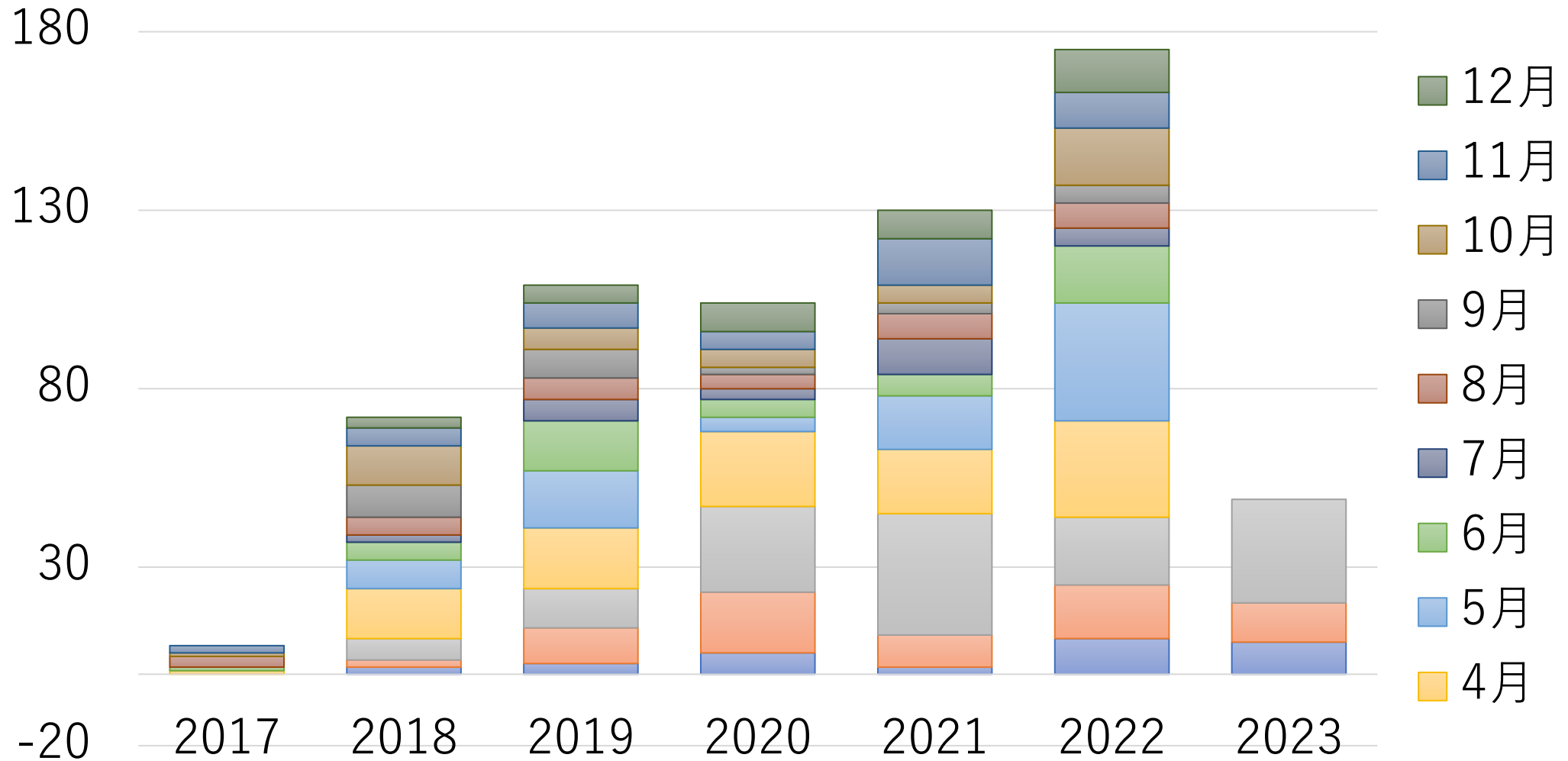
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築

SFTS発症猫



新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築

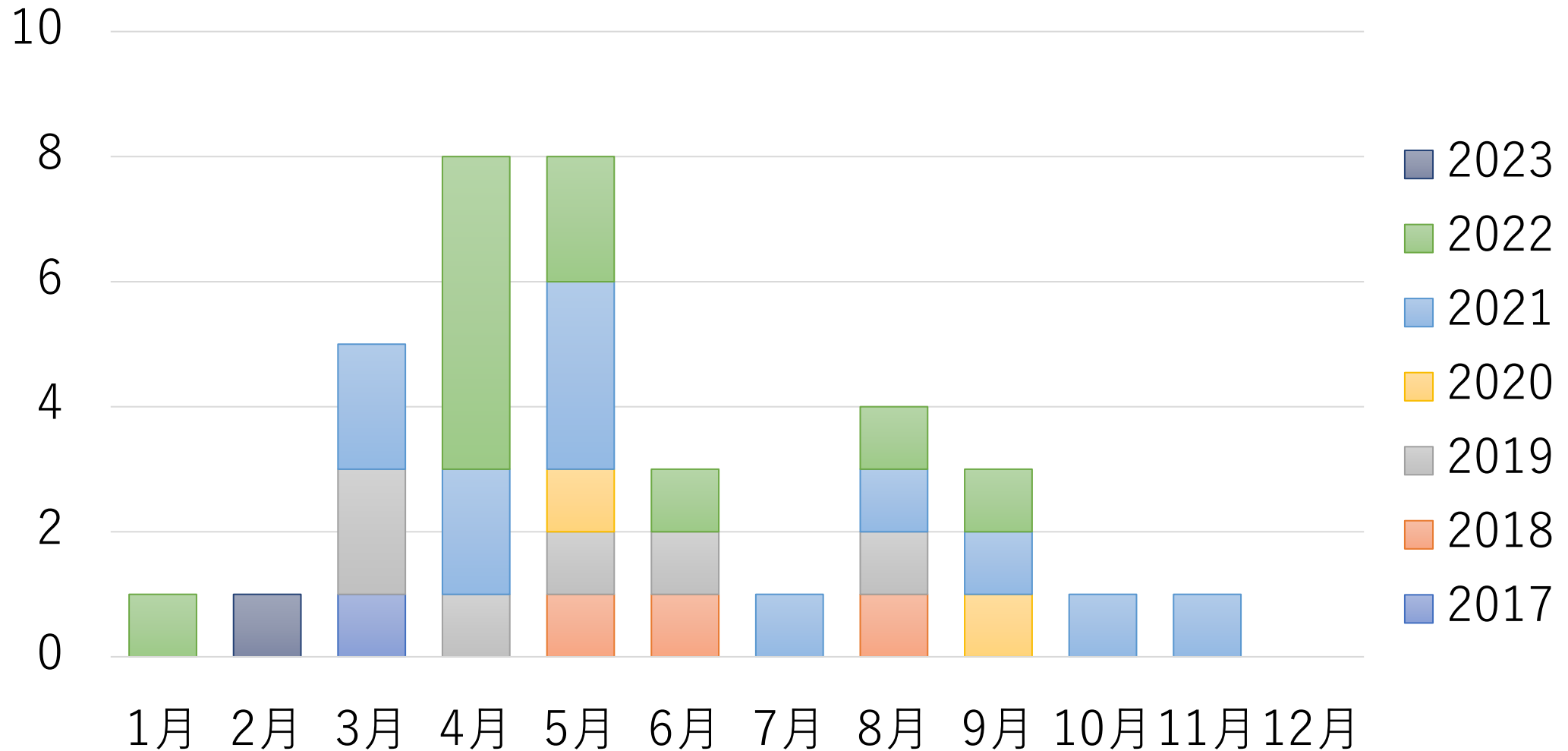
SFTS発症猫



(2023年3月31日現在)

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
愛玩動物由来人獣共通感染症に対する検査及び情報共有体制の構築

SFTS発症犬

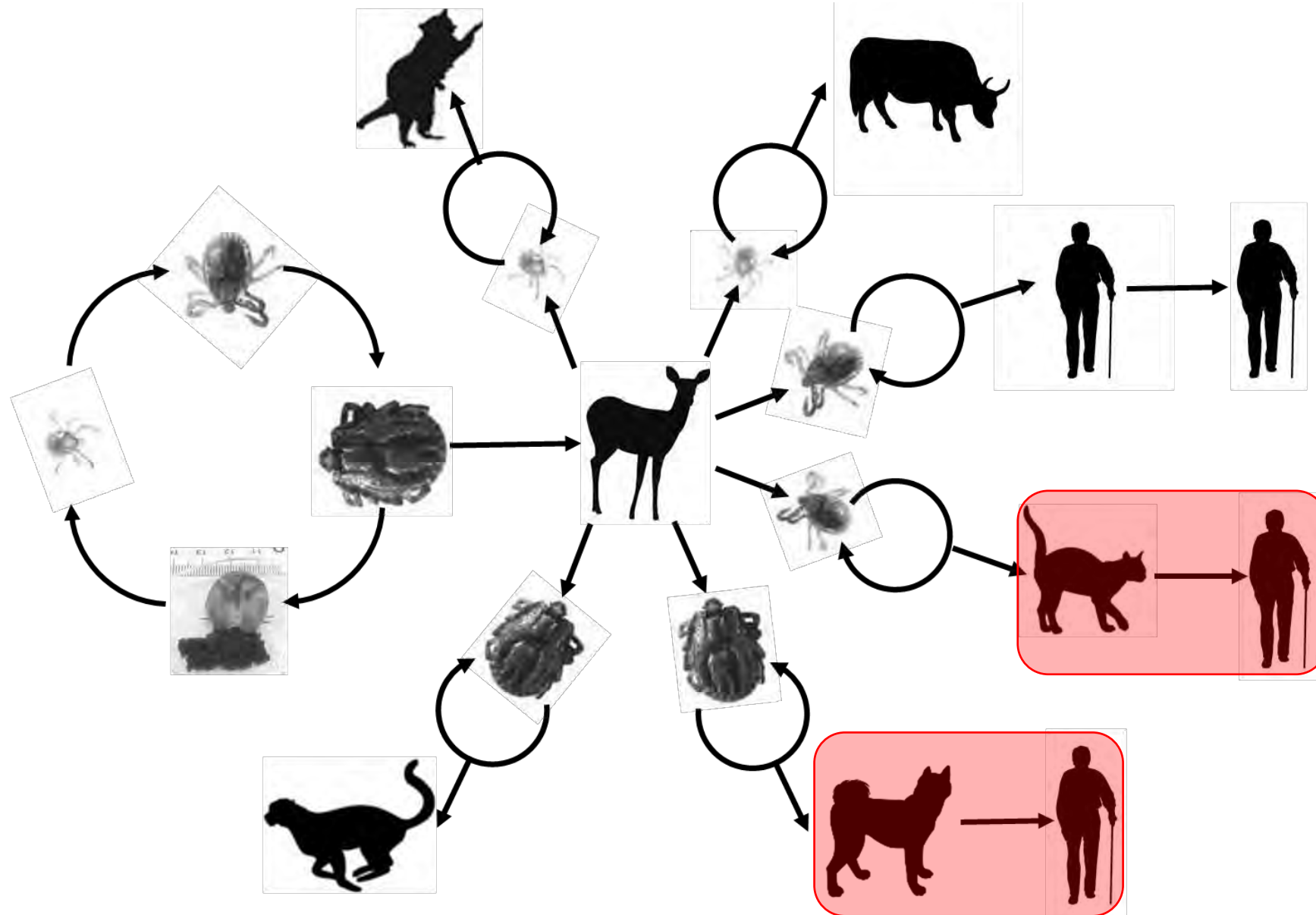


(2023年3月31日現在)

臨床症状

	ネコ	イヌ
元気・食欲低下	100%	100%
発熱 (39℃以上)	73.2%	92%
白血球数減少	83.6%	83%
血小板数減少	99.2%	100%
黄疸	96%	0%
総ビリルビン上昇	94.4%	50%
CRP上昇	No data	100%
死亡率	66%	40%

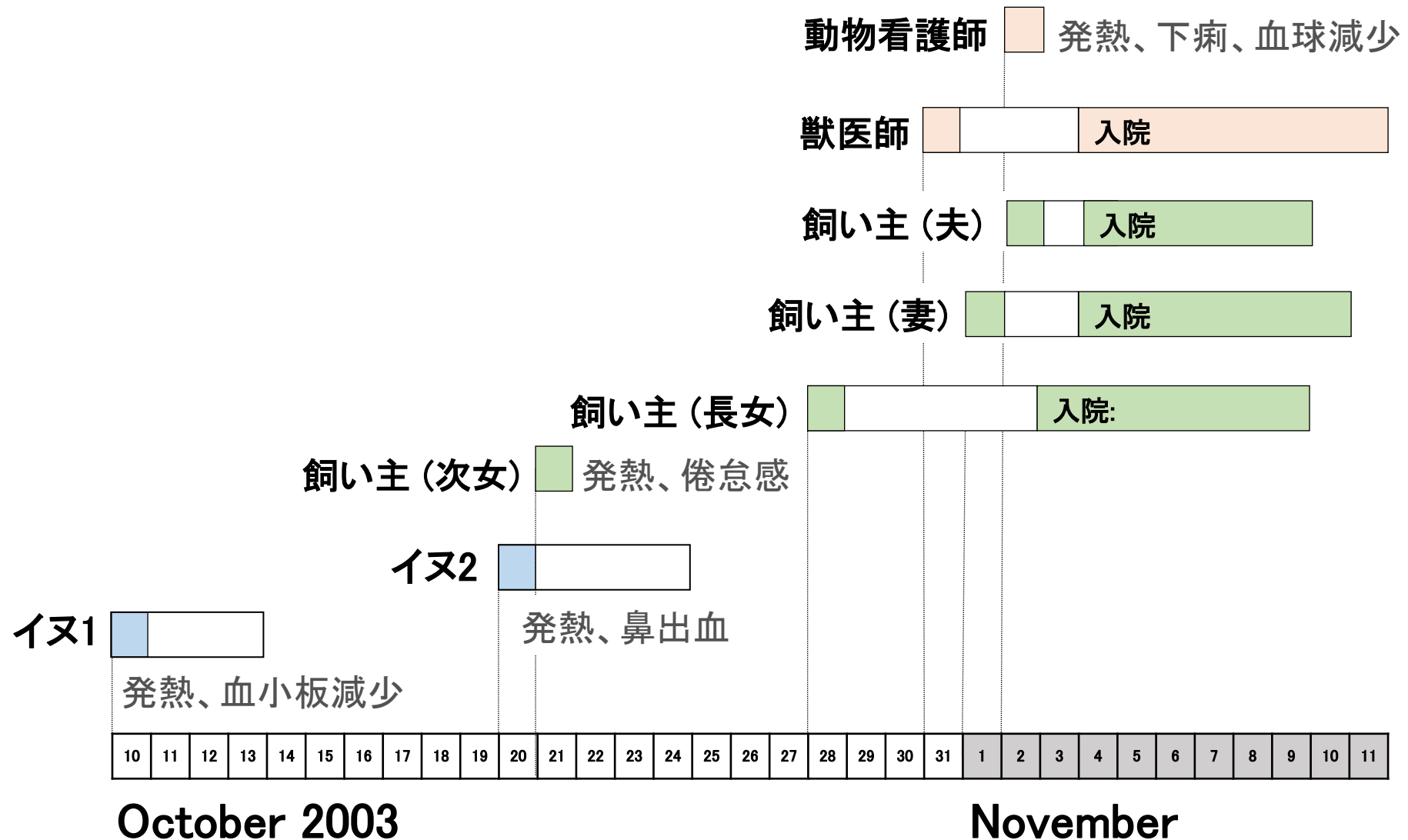
SFTSの感染環



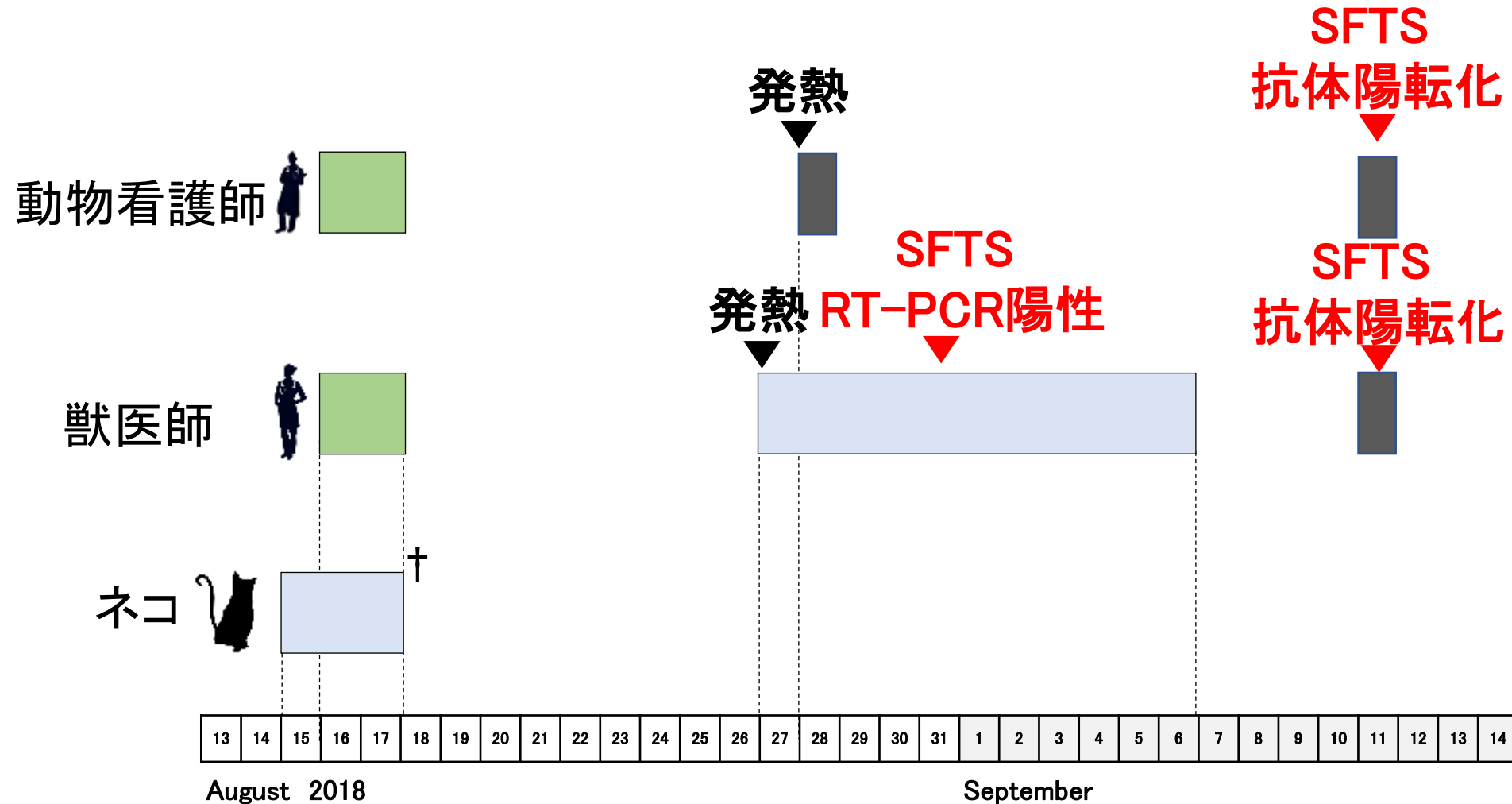
SFTS患者を咬んだ猫のデータ (野良猫、オス、3.99kg) 22日に行方不明

16年6月21日		
体温		40.6
食欲		—
	正常値	2日前より食欲ない。嘔吐、沈鬱
WBC(10^2 /ul)	60–170	8.7
RBC(10^4 /ul)	550–850	976
PLT(10^4 /ul)	20–50	1.2
GPT(U/I)	13–53	468
GOT(U/I)	9–69	
ALP(U/I)	14–142	<10
BUN(mg/dL)	4.8–31.4	25
CRE(mg/dL)	0.2–1.6	1.1
GLU(mg/dL)	50–124	135
ALB(g/dL)	2.2–2.4	2.6
LIP(U/I)	30–200	
TP(mg/dL)	6–8	7.7
Tbil(mg/dL)	0–0.5	5.3

SFTSの集団感染疑い事例の経過



SFTS ネコ-ヒト感染事例 経過



■ : ネコとの接触期間 ■ : 入院 ■ : 外来受診

動物からヒトへの感染例

2017年6月 SFTS発症犬と同居→飼い主SFTS発症後、回復

2018年8月 SFTS発症猫の診療→**獣医師**、**看護師**SFTS発症

2018年10月 SFTS発症猫を3匹診断→**獣医師**発症後回復

2018年10月 SFTS発症猫→飼い主SFTS発症後、死亡

2019年5月 SFTS発症猫による咬傷→飼い主SFTS発症後回復

2019年8月 SFTS発症猫→飼い主SFTS発症

2019年11月 SFTS発症猫→**獣医師**発症後、回復

2020年3月 SFTS発症猫→飼い主発症後、回復

2020年6月 SFTS発症猫→**獣医師**発症、回復

2021年2月 SFTS疑い猫→**獣医師**発症、回復

2021年2月 SFTS発症猫→**獣医師**発症、回復

2021年6月 SFTS発症猫→**獣医師**発症、回復

実際にあった感染疑い例（陰性）

- SFTS発症猫による獣医師の搔き傷
→リバビリンの予防的投与15日間
- SFTS発症猫の治療中、獣医師の針刺し事故
→発症の際の緊急搬送法の確認
- SFTS発症猫による獣医看護師の咬傷
→検査入院
- SFTS発症猫を小学生が救護
→教育委員会を通して学校対応
- SFTS発症猫 死ぬ直前飼い主が吐血を口で吸引
- SFTS発症猫 飼い主甘噛み、看護師2名引つかかれる(リバビリン投与)、獣医師針刺し事故

動物での調査検討依頼

- 疾患ネコやイヌでの遺伝子検査
- ネコ（特にTNR）やイヌでの抗体検査
- 野生動物での抗体検査



- 地域のリスクを知ることができます
- 現在、Ozウイルスに関しても抗体検査を含めて検討中