

ウイルス研究室におけるウイルス・リケッチア検査の概要と検査精度維持向上の取り組みについて

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症の流行に伴い地方衛生研究所(地衛研)は PCR による遺伝子検査や疫学的な解析を行うことで、その存在意義が社会に大きく認識された。地衛研は公衆衛生行政における最前線の検査・研究機関として、厚生労働省や国立感染症研究所(感染研)と協力して病原体検査の技術水準の維持・向上及び検査法の開発や効率化に努めることで、検査結果の信頼性を確保することが重要である。

当所のウイルス研究室では病原体検索を担当しており、平成 11 年 4 月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成 10 年法律第 114 号。以下「感染症法」という。)に基づいて感染症の報告を行っている。その検索方法は、感染研と全国地衛研の共同作業で作成された病原体検出マニュアル¹⁾に従い、各種病原体の検査を標準化しており、検査試薬や陽性コントロールが整い次第、早急に所有機器を用いた検査の妥当性評価(検証)を実施している。

検査技術のベースには、本県で昭和 51 年に開始し、さらに昭和 56 年から全国ネット化された感染症発生動向調査事業がある。この事業は、感染症の発生情報の正確な把握と分析、その結果の国民や医療機関への迅速な提供・公開により、感染症に対する有効かつ確かな予防・診断・治療に係る対策を確立し、多様な感染症の発生及びまん延を未然に防止することを目的とし継続されている。近年の病原体の遺伝子解析技術等の

飛躍的な進歩に伴い、感染症のまん延防止対策等の立案のために、感染症の患者や動物等から検体を採取し、病原体の遺伝子型や薬剤耐性等の情報を収集・解析する重要性が高まっている。

このため、平成 26 年 11 月に「改正感染症法」が公布され、平成 27 年 11 月には感染症発生動向調査実施要綱が改正されるとともに、検査の信頼性を確保することを目的として「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」が策定された²⁾。これらにより、感染症法に病原体の検査に関する明確な規定が設けられ、平成 28 年 4 月 1 日から感染症に対する情報収集体制が強化されることになった。

主な内容としては、全ての感染症について都道府県が患者等に対し検体の採取等に応じるよう要請できるようになるとともに、医療機関等に対して保有する検体の提出を要請できるようになった。インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く)については患者検体又は病原体を提出する機関を指定し、調査単位(流行期:週 1 回、非流行期:月 1 回)毎に 1 件以上の患者検体又は病原体が都道府県に提出される制度(指定提出機関制度)が創設された。入手した検体等について、都道府県は検査を実施し、その結果を国に報告することとなった。

また、平成 28 年度から厚生労働省が主体となり、感染症法に基づく検査に関して外部精度管理調査を行い、調査結果の評価・還元等を通じて精度管理の取組を促進し、病原体等検査の

信頼性を確保することを目的とした事業が開始されている³⁾。

今回は、令和3年現在の生物学部ウイルス研究室における各種病原体の検査実施状況と外部精度管理調査事業への参加概要を紹介する。

2. 新興・再興感染症監視、及び感染症発生動向調査

(1) 輸入感染症対策

県内医療機関において渡航歴のある患者が輸入感染症を疑われた場合に、医師の届出等に基づき、新型(鳥)インフルエンザ、中東呼吸器症候群(MERS)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)、麻疹、狂犬病、蚊媒介性ウイルス感染症等、全数把握対象疾患の検査を実施している。

(2) 希少感染症対策等

県内医療機関等で原因不明の感染症及び集団発生が疑われた場合に、医師の届出等に基づき上記全数把握対象疾患の他、急性脳炎脳症、急性弛緩性麻痺(ポリオウイルス、エンテロウイルスD68型を含む)、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、風疹、先天性風疹症候群(CRS)、つつが虫病、日本紅斑熱、Q熱等を対象として希少感染症の病原体検査を実施している。

また、食中毒疑い事例の病原体検査では、食品衛生法に基づき、病原細菌検出に並行してノロウイルス遺伝子検出を実施し、場合に応じてサポウイルス、ロタウイルス、A型肝炎、E型肝炎の遺伝子検出を追加実施している。学校や高齢者施設等における集団呼吸器感染症の病原体検査では、インフルエンザ等のウイルス分離、型別同定を実施している。

その他、特定感染症予防対策として県内保健所で実施される性感染症等の匿名検査ではヒト免疫不全ウイルス(HIV)のスクリーニング検査陽性例に対して抗原抗体確定診断等を実施している。

(3) 感染症発生動向調査

5 類感染症等に属する疾患には原因ウイル

スが複数存在するものも多く、臨床診断名だけでは病原体が特定できないものがある。流行ウイルスは一年の中で季節により変化したり、年ごとに変化したりする。病原体提出医療機関において年間を通じて検体が採取され、ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎、急性出血性結膜炎は主にエンテロウイルスを、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎は主にアデノウイルスを、インフルエンザはインフルエンザウイルスを、感染性胃腸炎はノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス等をターゲットとして病原体検出を実施している。

3. 各種病原体の検索

ウイルス・リケッチア感染症の検査には、患者検体から原因ウイルス・リケッチアを分離検出する方法と、患者血清から原因ウイルス・リケッチアに対する特異的抗体を検出する方法がある。また、抗体の検出には更に感染初期のIgM抗体を検出する方法と、急性期、回復期(2週間後)のペア血清を用い抗体価が上昇している事を確認する方法がある。例えば、医療機関ではインフルエンザ診断の目的で、インフルエンザ抗原検査が実施される。病院検査室や衛生検査所ではヒト免疫不全ウイルス(HIV)やC型肝炎ウイルスに対する抗体検査が実施される。

当研究室の各種病原体の検査は行政検査としてウイルス分離や遺伝子抗原検出、型別等が実施され、なかでも病原体検出結果は、感染症の発生状況および動向の情報として公衆衛生行政対応方針を決定する基礎資料となっている。

以下、当研究室が実施している各種病原体の検査方法について記述する。(表1)

(1) 2類感染症

① 急性灰白髄炎(脊髄性小児麻痺)

病原体：ポリオウイルス

検体は糞便、咽頭ぬぐい液、髄液が有用である。Vero細胞(アフリカミドリザル腎臓上皮細

表 1. 当所で検査対応可能な病原体と検出法

感染症法における分類一覧 (令和 3 年 3 月 3 日改正)

| | 疾患名 | 検体 (病原体検出マニュアルより) | 細胞培養法 | コンベンショナル(RT-)PCR 法の増幅領域 | リアルタイム(RT-)PCR 法の増幅領域 | その他 |
|------------------|---|--|--|--|--|---|
| 2 類感染症 | 急性灰白髄炎 (脊髄性小児麻痺) | 糞便、咽頭ぬぐい液、髄液 | Vero, HeLa, RD, L20B (ポリオウイルス受容体を発現しているマウスL細胞) | エンテロウイルス属Viral capsid protein:VP1 遺伝子, VP4 遺伝子 ポリオウイルス VP1 遺伝子 | | 中和試験 遺伝子解析: ワクチン由来株 VDPV (vaccine-derived poliovirus) 判定 |
| | 重症急性呼吸器症候群 (SARS-CoV) (病原体がベータコロナウイルス属 SARS コロナウイルスであるものに限る) | 喀痰、鼻咽頭ぬぐい液あるいは鼻咽頭洗浄液/吸引液、組織、糞便 (発症 10 日前後)、尿 (発症 4 日後以降発症 10 日前後)、血清 | VeroE6 | Open Reading Frame: ORF1b 遺伝子, Nucleocapsid Protein: N 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | 中東呼吸器症候群 (MERS-CoV) (病原体がベータコロナウイルス属 MERS コロナウイルスであるものに限る) | 鼻咽頭ぬぐい液 | | | Envelope: E 遺伝子 | |
| | 鳥インフルエンザ (H5N1) (H7N9) | 鼻咽頭ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、鼻腔洗浄液、鼻咽頭分泌液、鼻腔ぬぐい液、うがい液、鼻汁鼻かみ液 | トリプシン加 MDCK | Hemagglutinin: HA 遺伝子, Neuraminidase: NA 遺伝子, A 型 Flu Matrix protein: M 遺伝子 | HA 遺伝子, NA 遺伝子, A 型 FluM 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| 新型インフルエンザ等感染症 | 新型コロナウイルス感染症 (SARS-CoV-2) | 咽頭ぬぐい液、唾液、肺胞洗浄液、鼻腔吸引液、鼻腔ぬぐい液、糞便 | VeroE6/TMPRSS2 (ウイルスが開裂活性化するために必要な TMPRSS2 遺伝子を人工的に組み込んだ細胞) | N 遺伝子, Spike protein: S 遺伝子 | N 遺伝子, S 遺伝子 | 遺伝子解析 変異株解析 |
| 全数把握の対象 | E 型肝炎 | 糞便、血清(急性期) | | ORF2 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | A 型肝炎 | 糞便(発症前 2 週間～発症後 1 週間)、血清、血漿 | | VP1+Non-structural proteins: NSP-2A 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | チクングニア熱 | 血液(発症後 5～6 日以内が望ましい)、血清 | Vero (9013 株, ATCC 株) ヒトスジマカ由来 C6/36 | E 遺伝子 | E 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | つつが虫病 | 刺し口痂皮>紅斑部生検≧急性期血液 (抗菌薬投与前の急性期血液、EDTA-2K またはクエン酸 Na 処理全血) | | 56kDa 蛋白遺伝子種型別 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株) | 16SrDNA 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | デング熱 | 急性期(発症後 5～6 日以内(発熱期、解熱以前))の血液・血清 | ヒトスジマカ由来 C6/36 | E 遺伝子 | E 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | 鳥インフルエンザ (2 類感染症の鳥インフルエンザを除く) | 咽頭ぬぐい液 | トリプシン加 MDCK | HA 遺伝子, NA 遺伝子, A 型 FluM 遺伝子 | HA 遺伝子, NA 遺伝子, A 型 FluM 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | Q 熱 | 血液 | | 外膜蛋白 Com 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | 狂犬病 | 頸部皮膚生検、気管吸引材料、唾液腺など生検組織、角膜塗抹、剖検での脳などの神経組織、臓器、唾液、脳脊髄液 | | N 遺伝子 | | 遺伝子解析 直接蛍光抗体法 |
| | 日本紅斑熱 | 刺し口痂皮>紅斑部生検≧急性期血液 (抗菌薬投与前の急性期血液、EDTA-2K またはクエン酸 Na 処理全血) | | リケッチア属共通 17kDa 蛋白遺伝子, gltA 遺伝子 | 16SrDNA 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | ジカウイルス感染症 | 血液(発症後 5～6 日以内(発熱期、解熱以前))、血清、尿 | | E 遺伝子 | E 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| | 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) | 血清(血漿、血液も可)、咽頭ぬぐい液、気道分泌物、尿 | Vero | N 遺伝子 (2 領域) | | 遺伝子解析 |
| | 5 類感染症 | 急性弛緩性麻痺 (急性灰白髄炎を除く。) | 糞便、髄液、血液、咽頭ぬぐい液、尿 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス属 (EV-D68 含む) VP1 遺伝子 他 | |
| 急性脳炎脳症 | | 糞便、髄液、血液、咽頭ぬぐい液、尿 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス属、アデノウイルス: Hexon 遺伝子 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| 後天性免疫不全症候群 (HIV) | | 血液 (血清) | | | Nucleic acid Amplification Test (NAT 法) | ゼラチン粒子凝集 (PA) 法・ラプロット I 抗体検査 |
| 風しん 先天性風しん症候群 | | 咽頭ぬぐい液、血液(臍帯血、血清)、尿、脳脊髄液 | Vero, VeroE6, RK-13, Vero/hSLAM | Non structure: NS 遺伝子, E 遺伝子 | E 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| 麻しん | | 咽頭ぬぐい液、血液、尿(発症前 2-3 日前から発疹出現後 1 週間程度) | Vero/hSLAM, B95a | N 遺伝子, HA 遺伝子 | N 遺伝子 | 遺伝子解析 |
| RS ウイルス感染症 | | 鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、鼻咽頭吸引液、喀痰 | | glycoprotein: G 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| 5 類感染症 | 咽頭結膜熱 | 咽頭ぬぐい液、結膜ぬぐい液 | Vero, HeLa, RD | アデノウイルス: Hexon 遺伝子 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 感染性胃腸炎 | 糞便、吐物 | Vero, HeLa, RD | ノロウイルス: VP1 遺伝子, RNA-dependent RNA polymerase: RdRp 遺伝子、サボウイルス: VP1 遺伝子、ロタウイルス: Non structure protein: NSP3 遺伝子、アデノウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス: VP1 遺伝子) 他、各特異領域 | ノロウイルス: VP1 遺伝子、サボウイルス: VP1 遺伝子、ロタウイルス: NSP3 遺伝子 (各特異領域) | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 手足口病 | 咽頭ぬぐい液、糞便、髄液、水疱内容液 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス、パレコウイルス他、各特異領域 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 伝染性紅斑 | 咽頭ぬぐい液 | | ヒトパルボウイルス B19: NS1 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | ヘルパンギーナ | 口腔・咽頭ぬぐい液、糞便、水疱内容液 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス、パレコウイルス他、各特異領域 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 流行性耳下腺炎 (ムンプスウイルス感染症) | 唾液、髄液、尿、血液 | Vero, HeLa, RD, Hep2, LLCMK2 | SH 遺伝子 | NP 遺伝子 | 中和試験 遺伝子解析 |
| | インフルエンザ | 咽頭ぬぐい液 | トリプシン加 MDCK | HA 遺伝子, NA 遺伝子, A 型 FluM 遺伝子 | HA 遺伝子, NA 遺伝子, A 型 FluM 遺伝子 | 赤血球凝集抑制 HI 試験、遺伝子解析 |
| | 急性出血性結膜炎 | 結膜ぬぐい液 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス VP1 遺伝子, VP4 遺伝子 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 流行性角結膜炎 | 結膜ぬぐい液 | Vero, HeLa, RD | アデノウイルス: Hexon 遺伝子 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| | 無菌性髄膜炎 | 鼻腔・咽頭ぬぐい液、糞便、髄液、血液 | Vero, HeLa, RD, Hep2, FL, CaCo2 | エンテロウイルス、ムンプスウイルス (small hydrophobic: SH 遺伝子) 他、各特異領域 | | 中和試験 遺伝子解析 |
| その他 | 単純ヘルペスウイルス感染症 | 病変ぬぐい液 | Vero, HeLa, RD | | | 直接蛍光抗体法 |
| | 呼吸器感染症 ヒトメタニューモウイルス | 咽頭ぬぐい液 | Vero E6 | Fusion: F 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | 呼吸器感染症 ヒトパラインフルエンザウイルス | 咽頭ぬぐい液 | Vero E6 | hemagglutinin-neuraminidase: HN 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | 呼吸器感染症 ライノウイルス | 咽頭ぬぐい液 | Vero, HeLa, RD | VP4 遺伝子 | | 遺伝子解析 |
| | 不明熱 | 糞便、髄液、血液、咽頭ぬぐい液、尿 | Vero, HeLa, RD | エンテロウイルス、パレコウイルス他、各特異領域 | | 遺伝子解析 |

* 血液: 抗凝固剤 (EDTA)

胞由来の細胞株)、HeLa 細胞 (子宮頸管癌由来の細胞株)、RD 細胞 (横紋筋腫由来の細胞株) 等を用いた細胞培養法によるウイルス分離、中和試験による型別同定及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (Virus protein:VP1 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。L20B 細胞 (ヒトポリオウイルス受容体を発現しているマウス由来 L 細胞株) はポリオウイルスを選択的に分離できる。経口生ポリオワクチン株 (OPV)、ワクチン由来ポリオウイルス株 (vaccine-derived poliovirus; VDPV)、及び野生株の型内鑑別が重要であり、ウイルスの構造領域の一部 (VP1 全領域) の 1 塩基置換レベルの同定が必要である。(1, 3 型は 1%以上、2型は 0.6%以上変異した株を VDPV と定義し、報告の対象としている。) 野生株の 2 型は 2015 年 9 月に根絶が宣言されている。分離ウイルスの確定診断は感染研へ依頼する。

② 重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; SARS)

病原体 : SARS コロナウイルス (SARS-CoV)

検体は、喀痰、鼻咽頭拭い液あるいは鼻咽頭洗浄液/吸引液、組織、糞便、尿、血清が有用である。VeroE6 細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮由来の細胞株) を用いたウイルス分離及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (Nucleocapsid:N 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。血清学的検査法 (間接蛍光抗体法、ELISA 法、中和試験) 及び確定診断は感染研へ依頼する。

③ 中東呼吸器症候群 (Middle East Respiratory Syndrome ; MERS)

病原体 : MERS コロナウイルス (MERS-CoV)

上気道、下気道検体からリアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (Envelope:E 遺伝子) の検出を実施している。確定診断は感染研へ依頼する。

④ 鳥インフルエンザ

病原体 : 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H7N9 亜型, H5N1 亜型等)

検体は咽頭拭い液、肺胞洗浄液、剖検材料、鼻腔吸引液、鼻腔拭い液などが有用である。MDCK 細胞 (イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞株) を用いたウイルス分離、リアルタイム RT-PCR 法及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (Hemagglutinin:HA 遺伝子, Neuraminidase : NA 遺伝子, A 型 Flu Matrix protein:M 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。血清学的検査法 (赤血球凝集抑制 HI 試験、中和抗体測定試験) 及び確定診断は感染研へ依頼する。

(2) 新型インフルエンザ等感染症

① 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)

病原体 : 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)

検体は咽頭拭い液、唾液、肺胞洗浄液、鼻腔吸引液、鼻腔拭い液、糞便などが有用である。VeroE6/TMPRSS2 細胞 (ウイルスが開裂活性化するために必要な II 型膜貫通型セリンプロテアーゼの一種である TMPRSS2 遺伝子を VeroE6 細胞に人工的に組み込んだ細胞) を用いたウイルス分離、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (N 遺伝子) の検出を実施している。変異株検出には、変異アミノ酸に特異的プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法、次世代シーケンサー (MiSeq : イルミナ社) を用いた全ゲノム解析を実施している。

(3) 4 類感染症

① デング熱 (Dengue fever)

病原体 : デングウイルス

検体は発症後 5~6 日以内の EDTA 採血血液及び血清が有用である (ヘパリン採血血液は PCR 検査を阻害するため不可)。1~4 型各血清型に特異的なプライマー・プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (E 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。

② チクングニア熱 (Chikungunya fever)

病原体 : チクングニアウイルス

検体は発症後 5~6 日以内の EDTA 採血血液及び血清が有用である。リアルタイム RT-PCR 法及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (E 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。

③ ジカウイルス感染症 (Zika Virus Infection)

病原体：ジカウイルス

検体は発症後 5~6 日以内の EDTA 採血血液及び尿が有用である。リアルタイム RT-PCR 法及びコンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (E 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。

上記 3 疾患はウイルスを保有している蚊の吸血によって感染する。ジカウイルス感染症はヒト-ヒト感染も報告される。多くの場合感染者には渡航歴があり、国内発生例は稀である。臨床症状からの病原体同定は難しいため、3 疾患に対するウイルス遺伝子検査を実施することがある。

④ Q 熱

病原体：*Coxiella burnetii* (偏性細胞内寄生細菌)

検体は血清、血液が有用である。コンベンショナル PCR 法によるリケッチア遺伝子 (外膜蛋白 Com 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。感染動物の分泌物や排泄物の吸入により感染するため、動物との接触歴は重要となる。

⑤ つつが虫病

病原体：*Orientia tsutsugamushi* (偏性細胞内寄生細菌)

検体は刺し口痂皮、紅斑部生検、抗菌薬投与前の急性期血清が有用である。リアルタイム PCR 法 (16SrDNA 遺伝子) 及びコンベンショナル PCR 法 (56kDa ポリペプチド遺伝子) によるリケッチア遺伝子の検出を実施している。型別プライマーを用いたコンベンショナル PCR 法及び塩基配列の解析にて、つつが虫病原型別 (Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi 株) を同定する。

⑥ 日本紅斑熱

病原体：*Rickettsia japonica* (偏性細胞内寄生細菌)

検体は刺し口痂皮、紅斑部生検、抗菌薬投与前の急性期血清が有用である。リアルタイム PCR 法 (16SrDNA 遺伝子) 及びコンベンショナル PCR 法 (17kDa, gltA 遺伝子) によるリケッチア遺伝子の検出、塩基配列の解析を実施している。紅斑熱群リケッチア症の鑑別は感染研へ依頼する。

上記 2 疾患はそれぞれつつが虫、マダニが媒介する。咬傷や臨床症状からは、つつが虫病と日本紅斑熱の鑑別は難しいため、2 疾患に対する病原体遺伝子検査を同時に実施することがある。

⑦ 重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome ; SFTS)

病原体：SFTS ウイルス

検体は血清、EDTA 採血血液 (血漿も可) が最も適するが、咽頭拭い液、気道分泌物、尿等も有用である。コンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (N 遺伝子の 2 領域) の検出、塩基配列の解析を実施している。

⑧ A 型肝炎

病原体：A 型肝炎ウイルス (Hepatitis A Virus, HAV)

検体は発症の 2 週間前から発症後 1 週間の時期の糞便、血清または血漿が有用である。コンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (VP1, 2A 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。

⑨ E 型肝炎

病原体：E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus, HEV)

検体は急性期に採取された血清と糞便が有用である。コンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子 (ORF 遺伝子) の検出、塩基配列の解析を実施している。

⑩ 狂犬病

病原体：狂犬病ウイルス (Rabies virus)

検体は唾液、脳脊髄液、項部皮膚生検、気管

吸引材料など（剖検時の脳などの神経組織）が有用である。コンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子（N 遺伝子）の検出、塩基配列の解析及び組織塗抹標本の直接蛍光抗体法による抗原検出を実施している。緊急時の狂犬病暴露後ワクチン接種（PEP）を接種可能にしておく必要がある。

（4）5 類感染症・その他

① 麻疹

病原体：麻疹ウイルス（Measles virus）

② 風しん、先天性風しん症候群（congenital rubella syndrome:CRS）

病原体：風しんウイルス（Rubella virus）

麻疹・風しんは臨床症状からは診断が難しいため、同時にリアルタイム検査を実施することが多い。検体は咽頭拭い液、尿、血液が有用である。リアルタイム RT-PCR 法（麻疹：N 遺伝子、風しん：E 遺伝子）及びコンベンショナル RT-PCR 法（麻疹：N, HA 遺伝子、風しん：Non structure :NS, E 遺伝子）によるウイルス遺伝子の検出、塩基配列の解析による遺伝子型別及びワクチン株の鑑別を実施している。

陰性の場合、発疹を症状とする他の感染症を疑い、伝染性紅斑（ヒトパルボウイルス B19 感染症）やエンテロウイルス感染症等に対する検査を実施している。

③ 急性弛緩性麻痺（acute flaccid paralysis:AFP）

病原体：ポリオウイルス、エンテロウイルス D68 型等

検体は糞便（発症後できるだけ速やかに、24 時間以上の間隔を開けて、2 回採取）、咽頭拭い液、髄液、EDTA 採血血液、尿が有用である。

細胞培養法によるウイルス分離及び既知抗血清を用いた中和試験による型別同定に並行して、ポリオウイルス、エンテロウイルス D68 型とエンテロウイルス特異的プライマーを用いたコンベンショナル RT-PCR 法（エンテロウイルス：VP1, VP4 遺伝子）によるウイルス遺伝

子の検出、塩基配列の解析を実施している。ポリオウイルスの確定診断は感染研に依頼する。

④ 急性脳炎・脳症

病原体：エンテロウイルス、アデノウイルス、パレコウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス等

検体は脳脊髄液、血液（血清）、咽頭ぬぐい液等が有用である。細胞培養法によるウイルス分離及び既知抗血清を用いた中和試験による型別同定に並行して、コンベンショナル（RT-）PCR 法による各ウイルスの遺伝子（アデノウイルス：Hexon 遺伝子、パレコウイルス：VP1 遺伝子、RS ウイルス：glycoprotein:G 遺伝子、ヒトメタニューモウイルス：Fusion:F 遺伝子、ヒトパラインフルエンザウイルス：hemagglutinin-neuraminidase:HN 遺伝子）の検出、及び塩基配列の解析による型別同定を実施している。

⑤ 季節性インフルエンザ

病原体：インフルエンザウイルス（鳥インフルエンザウイルス、新型インフルエンザウイルスを除く）

検体は鼻咽頭拭い液、うがい液等が有用である。MDCK 細胞を用いたウイルス分離、血清学的検査法（赤血球凝集抑制 HI 試験）及びリアルタイム RT-PCR 法を用いた亜型の同定、リアルタイム RT-PCR 法及び塩基配列の解析による薬剤耐性遺伝子の検出、及び HA、NA 遺伝子の塩基配列解析を実施している。

⑥ 感染性胃腸炎

病原体：ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス等

検体は糞便、吐物、直腸拭い液が有用である。培養細胞を用いたウイルス分離（困難であることが多い）と並行してリアルタイム RT-PCR 法及びコンベンショナル（RT-）PCR 用いた各ウイルスの遺伝子（ノロウイルス：VP1 遺伝子、RNA-dependent RNA polymerase:RdRp 遺伝子、サポウイルス：VP1 遺伝子、ロタウイルス：Non structure protein: NSP3 遺伝子）の検出、及

び塩基配列の解析による型別同定を実施している。

⑦ ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎

病原体:エンテロウイルス、アデノウイルス、パレコウイルス等

検体は糞便、咽頭拭い液、髄液、血清(血液)、水疱内容物等が有用である。培養細胞を用いたウイルス分離及び既知抗血清を用いた中和試験による血清型別を実施している。また、各ウイルス遺伝子の検出、塩基配列の解析によるウイルス型別同定を実施している。

⑧ 急性出血性結膜炎・流行性角結膜炎・咽頭結膜熱

病原体:アデノウイルス、エンテロウイルス等
検体は結膜拭い液、咽頭拭い液が有用である。細胞培養法によるウイルス分離及び既知抗血清を用いた中和試験による型別同定に並行して、コンベンショナル(RT-)PCR 法による各ウイルス遺伝子の検出、塩基配列の解析を実施している。

⑨ 流行性耳下腺炎(ムンプスウイルス感染症)

病原体:ムンプスウイルス(Mumps virus)
検体は咽頭拭い液、髄液が有用である。Vero細胞を用いたウイルス分離、中和試験に並行して、リアルタイム RT-PCR 法(nucleoprotein: NP 遺伝子)及びコンベンショナル RT-PCR 法(small hydrophobic: SH 遺伝子)によるウイルス遺伝子の検出、塩基配列の解析によるワクチン株との鑑別を実施している。

⑩ 伝染性紅斑(Erythema infectiosum)

病原体:ヒトパルボウイルス B19
検体は咽頭拭い液、尿、全血(血液)が有用である。コンベンショナル RT-PCR 法によるウイルス遺伝子(NS1 遺伝子)の検出を実施している。

⑪ RS ウイルス感染症及びその他の急性呼吸器感染症

病原体:RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、アデノウイルス等

検体は咽頭拭い液等、上気道、下気道検体が

有用である。培養細胞への接種によるウイルス分離に並行して、コンベンショナル(RT-)PCR 法による各ウイルス遺伝子の検出、塩基配列の解析を実施している。

⑫ 単純ヘルペスウイルス(HSV)感染症

病原体:ヒトヘルペスウイルス 1 型、2 型
検体は水疱内容物が有用である。培養細胞を用いたウイルス分離後、HSV-1、2 型について直接蛍光抗体法にて型同定を実施している。

⑬ 後天性免疫不全症候群(AIDS)

病原体:ヒト免疫不全ウイルス(HIV)
検体は血清を用いる。ゼラチン粒子凝集(PA)法による HIV-1/2 抗体の検出、及びウエスタンブロット法による HIV-1 抗体の検出を実施している。また、抗原検出についてはリアルタイム RT-PCR 法による核酸検出検査(NAT 法)を実施している。

4. 外部精度管理調査事業への参加

ウイルス研究室では、内部精度管理と並行して、厚生労働省外部精度管理調査事業や厚生労働科学研究として実施される外部精度管理に参加することにより、検査精度の確保に努めている⁴⁾。

このうち平成 28 年度に開始された厚生労働省外部精度管理調査事業では、平成 28 年度、29 年度及び令和 2 年度はインフルエンザウイルスの核酸検出(リアルタイム RT-PCR 法)による型・亜型診断検査、平成 30 年度は RT-PCR 法による麻疹および風疹ウイルスの核酸検出検査、令和元年度は麻疹および風疹ウイルスの遺伝子型解析の精度調査に参加して、外部精度管理を受けた。

また、厚生労働省主体の外部精度管理が実施される以前から、厚生労働科学研究による感染研や地衛研全国協議会精度管理部会が実施する外部精度管理の調査研究に参加しており、平成 26 年度は狂犬病ウイルスの核酸検出検査、リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルスの遺伝子定量検査、平成 27 年度は重症熱性血小

板減少症候群 (SFTS) 原因ウイルスの血清学的検査 (動物検体からの抗体検出)、ノロウイルスキャプシド遺伝子解析 (シーケンス解析、分子系統樹解析)、平成 29 年度は手足口病原因ウイルスの型別同定、平成 30 年度は抗インフルエンザ薬耐性検査の実態調査 (インフルエンザウイルス NA 阻害薬への耐性変異 (N 遺伝子 H275Y) を検出するリアルタイム RT-PCR 及び Allelic Discrimination 解析)、令和 2 年度には HIV の核酸定量試験、新型コロナウイルスの核酸検出検査 (リアルタイム RT-PCR 法)、令和 3 年度は新型コロナウイルスの次世代シーケンシング (NGS) による遺伝子の解読・解析の精度調査を受けた。

上記外部精度管理調査においては、すべて良好な結果を得ている。

5. おわりに

当研究室では、県保健所、中核市保健所から病原体等検査の実施可否について問合せを受けることが多い。現在、検査対応可能な病原体や検査材料について表 1 にまとめたので、参考にしていただきたい。

検査精度を保証するためには、施設基準の保持や内部精度管理について今後も適切に進め、地衛研は、常に海外及び国内のウイルス流行状況を把握し、検査対応していくことが求められ

ている。その中で、病原体検査の標準化と管理体制の充実が地衛研の検査技術水準を維持、発展させていくために非常に重要となる。そして外部精度管理調査を活用していくことは客観的な検査精度を評価するために大切である。

当研究室は各種病原体に対する外部精度管理調査への参加により、検査の信頼性を確保している。今後、検査機器の技術進歩や検査試薬の開発により高度化していく検査において信頼ある検査値を得るためには、施設内において適正に内部精度管理を実施したうえで積極的に外部精度管理調査に参加していくことが必要であると考えられる。

6. 参考文献

- 1) 病原体検出マニュアル <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知. 検査施設における病原体等検査の業務管理要領 (平成27年11月17日健感発1117第2号)
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知. 平成 28 年度外部精度管理事業の実施について (平成 28 年 7 月 28 日健感発 0728 第 6 号)
- 4) 皆川洋子他 感染症法に基づく病原体検査の「質」確保について. 愛知衛研技術情報 43(1) : 1-7, 2019.

(文責：生物学部ウイルス研究室)

愛知衛研技術情報 第45巻第2号 令和3年(2021)年 12 月 1 日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のホームページ【 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/> 】

| | | | |
|----------|--------------|----------|--------------|
| 総務課： | 052-910-5618 | 生物学部 | 052-910-5654 |
| 企画情報部 | | ウイルス研究室： | 052-910-5674 |
| 健康科学情報室： | 052-910-5619 | 細菌研究室： | 052-910-5669 |
| | | 医動物研究室： | 052-910-5654 |
| | | 衛生化学部 | 052-910-5638 |
| | | 医薬食品研究室： | 052-910-5639 |
| | | 生活科学研究室： | 052-910-5643 |

代表電話： 052-910-5618

代表 FAX： 052-913-3641
