

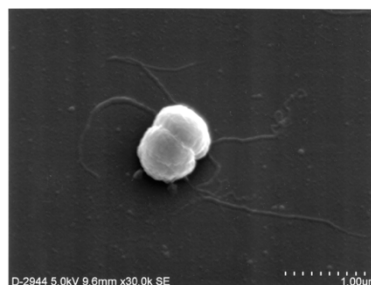
## 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

マシギザリングにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

### 髄膜炎菌の保存・輸送・薬剤感受性試験マニュアル

### PCR法を用いた髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* 検出・解析マニュアル

髄膜炎菌はグラム陰性の球菌であり、ヒトのみを唯一の宿主とする。通常ヒトの鼻咽頭に定着して、くしゃみ等の飛沫感染を介してヒトからヒトへ伝播する。0.5～30%のヒトには何の症状も発症しない「健康保菌者」として存在しうるが、何かのきっかけで人の血中や髄液に侵入すると敗血症や髄膜炎の主症状を発症させる危険な病原菌である。髄膜炎菌の他にインフルエンザ菌、肺炎球菌、大腸菌 K-1 株などが化膿性髄膜炎の起炎菌として挙げられるが、流行性の髄膜炎を引き起こすのは髄膜炎菌のみである。侵襲性髄膜炎菌感染症の発生事例の後には近縁者への二次感染の可能性もあるため、十分に注意する必要がある。



#### -----目次-----

I. 髄膜炎菌の培養、保存及び輸送	P. 1
II. 薬剤感受性試験	P. 4
III. DNA の精製法	P. 5
IV. PCR 法による髄膜炎菌の検出	P. 6
V. PCR 法による髄膜炎菌の血清群型別法	P. 9

## I. 髄膜炎菌の培養、保存及び輸送

### 1) 培養

髄膜炎菌を培養するには5%CO<sub>2</sub>（微好気）及び湿度が高い培養環境が必要である。CO<sub>2</sub>インキュベーターやガスパックを用いた加湿条件下で、チョコレート寒天培地、血液寒天培地（血液の動物種は問わない）、GC寒天培地（市販のGC粉末培地に発育促進剤を添加したナイセリア専用培地、生培地も市販されている）を用いて通常は12～16時間ほど培養する。逆に長時間（20時間以上）の培養は髄膜炎菌の自己融解を誘引し、死滅させてしまうので、培養時間には十分な注意が必要である。

### 2) 保存

髄膜炎菌を保存するには大量（培地 1/4 分画以上）の新鮮培養菌を用いた凍結保存法が最も安定的な保存方法である。具体的には、マイクロバンク（イワキ株式会社）を用いて-80℃で保存することを推奨する。髄膜炎菌の保存は腸内細菌科等と比較すると難しく、寒天培地で保存することは推奨しない（培地上の病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすく、冷蔵・常温にかかわらず3日を過ぎると死滅する）。下記に本研究で作成した菌株保存の簡易マニュアルを示す。

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  
マシヤザリグにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

### 髄膜炎菌の保存簡易マニュアル<sub>ver.20191010</sub>

他施設から輸送された菌株



18h培養後（35℃、5%CO<sub>2</sub>）のCA培地所見

スワブを取り出し、CA培地に直接塗抹後、16-20h培養（35℃、5%CO<sub>2</sub>）

培地1/4分画程度の菌をスワブで採取し、マイクロバンク（マイクロバンク使用方法参照）を用いて保存（-80℃\*）  
\*もし無ければ-20℃で代用する

#### マイクロバンクの使用方法

- マーカーペンを用いて保存菌名をバイアルに記載します。
  - ①18～24時間純培養した幼若菌をとり、バイアル中の液体培地に濃度がマクファランド#3～4に相当するように浮遊させます（図1）。
  - ②キャップを締め、浮遊菌がビーズに吸着するようにバイアルを穏やかに4～5回上下させます（図2）。この際、バイアルをうす状に回転させないでください。
  - ③上記の操作により菌は多孔性ガラスビーズに吸着します。つぎに滅菌ピペットを用いて浮遊菌を残らず吸引します（図3）。キャップを固く締め、フリーザーに入れ保管します。
- 菌株の復元
  - ①バイアルをフリーザーから取り出します。バイアルの凍結融解を防ぐため、別売のアルミ製保冷スタンドを使用することを推奨します（図4）。バイアルのキャップを開け、滅菌した白金線なしピンセットを用いてビーズを1個取り出します（図5）。バイアルはキャップを締め、直ちにフリーザーに戻します。
  - ②取り出したビーズを平板ないし液体培地に接種します（図6）。



イワキ株式会社HPより

### 3) 輸送

髄膜炎菌を輸送するには大量（培地 1/4 分画以上）の新鮮培養菌を活性炭含有シードスワブ（シードスワブ γ3 号 ‘栄研’、栄研化学）で採取し、適切な容器に包装後、輸送を行う。その際、予備を含め 2 本以上のスワブを輸送するのが望ましい。室温輸送が可能である。スワブの包装は国立感染症研究所バイオセーフティー管理室の遵守事項を参照する。下記に本研究で作成した菌株輸送簡易マニュアルを示す。

※なお、室温輸送は生残菌数を速やかに減少させるが、輸送後 7 日までは多数の生残菌を得ることが出来る。

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  
 マスギャザリングにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

## 髄膜炎菌の輸送簡易マニュアル Ver.20191010

### 菌株の継代培養とスワブ採取

- 他施設から輸送された菌株（スワブ）をCA培地に直接塗抹する
- 35℃（5%CO<sub>2</sub>）で16-20h培養後、**培地1/4分画程度の菌をシードスワブ** \*γ3号‘栄研’で採取し、培地入りチューブに挿入（キャップはしっかり閉める）
- 合計**3本**採取する



18h培養後（35℃、5%CO<sub>2</sub>）のCA培地所見

### （例）培養と輸送のタイムスケジュール

日	月	火
	起眠	スワブで採取、輸送

記載ラベルは下記の通り  
 1. 施設名①  
 2. 施設名②  
 3. 施設名③

### 輸送

採取したスワブを**二次容器\***と**三次容器\***で梱包し、それらを**ジュラルミンケース**を用いて指定された施設に**室温**で輸送する  
\*二次・三次容器は決められた組合せで用いる（カテゴリーAまたはB）



サンプルを二次容器に入れた様子  
（写真ではスワブは6本あるが、実際は3本梱包する。二次容器のジッパーは閉じ、シールで密封する）



二次容器を三次容器で梱包した様子  
（三次容器の蓋はテープ等を用いて開かないようにする）



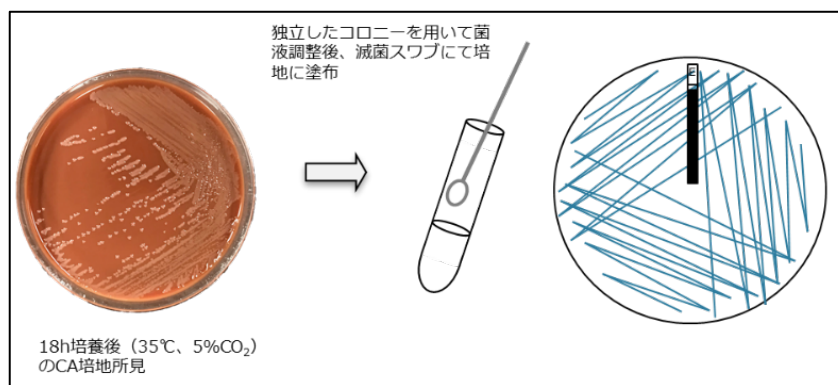
三次容器をジュラルミンケースに入れた様子

## II. 薬剤感受性試験

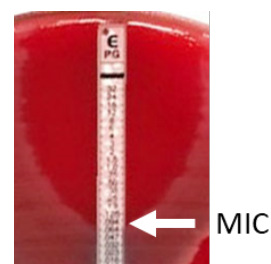
### 1) E-test 法

新鮮培養菌を用いて、下記の手順に従い実施する。

1. 保存菌株をチョコレート寒天培地に塗布し、35°C (5%CO<sub>2</sub>) で 16 時間程度培養する。
2. 独立したコロニーを釣菌し、生理食塩水を用いてマックファーランド #0.5 と同じ濁度の菌液を調整する。
3. 滅菌スワブを調整した菌液に浸し、過剰な菌液を試験管内壁に押し付けて除去する。血液加ミューラーヒントン寒天培地（日本 BD）の表面全体に、シャーレを 60 度ずつ回転させながら、むらなく 3 回塗布する（下図を参照）。



4. 培地表面が乾いたのを確認して E-test ストリップを置く（ただし、菌液塗布後、15 分以内に終える必要あり）。
5. 35°C (5%CO<sub>2</sub>) で 24h 培養後、阻止帯から MIC 値を読み取る。
6. 各抗菌薬 MIC 値は、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing が報告している clinical breakpoints を基に感性・耐性を判定する。



### III. DNA の精製法

プレートに培養した髄膜炎菌を 1 $\mu$ l ループで  
掻き取り、100 $\mu$ L TE に懸濁する。

その懸濁液を DNeasy Blood & Tissue Kits  
(QIAGEN) を用いて精製する。



精製法の簡略版は以下に示すが、その詳細は添付プロトコルを参照のこと。

<DNeasy Blood & Tissue Kits を用いた髄膜炎菌の DNA の調製法>

1. Protease K 溶液を 20  $\mu$ l 添加する。
2. Vortex して混ぜる。
3. Buffer ATL を 200  $\mu$ l 添加する。
4. 56°C で 10 分インキュベートする。
5. その DNA 溶液を DNeasy Mini spin column に入れる
6. 8000rpm で 1 分 遠心
7. 新しい 2mL チューブ (付属) に DNeasy Mini spin column に移す
8. 500 $\mu$ l の Buffer AW1 を加える
9. 8000rpm で 1 分 遠心
10. 新しい 2mL チューブ (付属) に DNeasy Mini spin column に移す
11. 500 $\mu$ l の Buffer AW2 を加える
12. 最大速度で 2 分 遠心
13. 1.5mL チューブに DNeasy Mini spin column に移す
14. 200 $\mu$ l の Buffer AE を加える
15. 8000rpm で 1 分 遠心
16. DNeasy Mini spin column を外して捨てる。

※キアゲンのキットに限らず、通常使用している DNA 精製キットがあればそれを用いれば十分である。

※DNA 精製キットを用いた方が以下の検査結果がクリアに出るが、もし入手しにくい場合には菌懸濁液を 100°C で 5 分処理後、遠心処理した上清 (ボイルサップ) を用いても同様の結果を得られる可能性は高い。

#### IV. PCR法を用いた髄膜炎菌の検出・同定

髄膜炎菌の検出には莢膜多糖体合成酵素遺伝子群の一つである *ctrB* 遺伝子、髄膜炎菌の簡易同定マーカー、 $\gamma$ -グルタミルアミノペプチダーゼの *ggt* 遺伝子を同時に検出することにより、莢膜多糖体非合成髄膜炎菌株も含めた形で同定と検出が可能となる。

詳細は以下の論文を参照のこと。

1. Hideyuki Takahashi and Haruo Watanabe. A gonococcal homologue of meningococcal  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene is a new type of bacterial pseudogene that is transcriptionally active but phenotypically silent. *BMC Microbiology* **5**:56, 2005
2. Hideyuki Takahashi, Masae Haga M, Tomimasa Sunagawa, Takehito Saitoh, Takeru Kitahara, Shohkichi Matsumoto, Makoto Ohnishi. Meningococcal carriage rates in healthy individuals in Japan determined using Loop-Mediated Isothermal Amplification and oral throat wash specimens. *Journal of Infection and Chemotherapy* **22**:501-504, 2016.

##### 1) プライマーセット

###### ① *ctrB* : 髄膜炎菌 莢膜多糖体産生株検出用プライマー

*ctrB*-F3            5' - ACCAGTTGAACGATCGTGC -3'    19mer

*ctrB*-B3            5' - CCAGCTGGGTTTGAATCACA -3'    19mer

###### ② *ggt* : 髄膜炎菌 $\gamma$ -グルタミルアミノペプチダーゼ検出用プライマー

*ggt*-63            5' -ATGCCTTGTATGAATC -3'                            16mer

*ggt*-20            5' - TGTCGTCTGCACCGCCACCATCGC -3'            24mer

##### 2) PCR 反応液組成及び反応条件

反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

※Takara Ex Taq buffer の場合

(他メーカーのPCR酵素でも使用可能だが、その場合にはプライマーの至適濃度に注意して使用すること)

---

精製 DNA	1	$\mu$ l
10 x ExTaq buffer	2.5	$\mu$ l

2.5mM dNTPs	2	μl
ctrB-F3 (100μM)	0.25	μl
ctrB-B3 (100μM)	0.25	μl
ggt-63 (100μM)	0.25	μl
ggt-20 (100μM)	0.25	μl
Taq polymerase	0.25	μl
H <sub>2</sub> O	18.25	μl
<hr/>		
Total	25	μl

※検体分(x)、更に PCR のクオリティコントロールが必要な場合には (1) 莢膜多糖体産生株陽性コントロール、(2) 莢膜多糖体非産生株陽性コントロール、(3) 淋菌 (陰性コントロール)、(4) DNA なしの 4 つを追加すること。

3) PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 30sec.	} 25 cycles
56°C × 30sec.	
72°C × 30sec.	

4) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。図 1 は髄膜炎菌の検出・判定例を示す。

ctrB	210bp
ggt	327bp

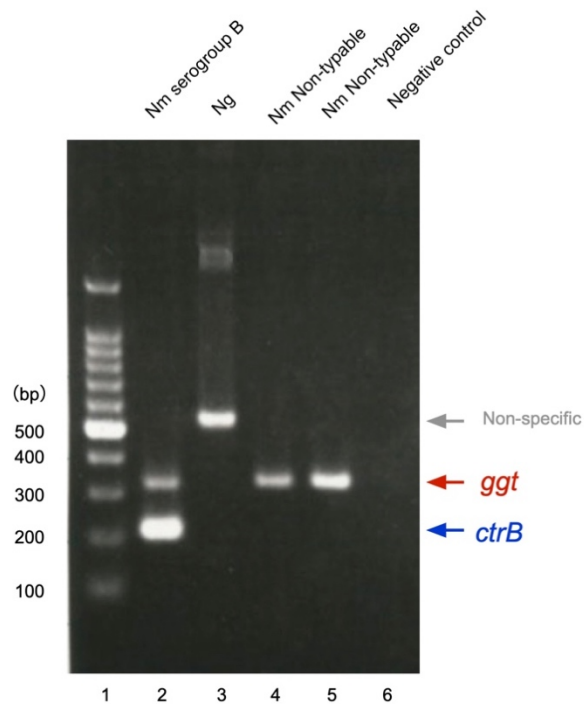


図1 Duplex PCRによる髄膜炎菌の同定例

lane 1: 100 bp ラダー、lane 2: 髄膜炎菌（血清群 B）、lane 3: 淋菌、lane 4: 髄膜炎菌（莢膜多糖体非合成株「血清群型別不能株」)-1、lane 5: 髄膜炎菌（莢膜多糖体非合成株「血清群型別不能株」)-2、lane 6: DNA なし (Negative control)

*ctrB* 遺伝子陽性の場合には、次項の血清群型別への作業へ移行する。

※*ctrB* 遺伝子陰性の場合には、次項の血清群型別への作業へは移行しない。

（「莢膜多糖体非合成株（型別不能株）」であるため）

※ExTaq より増幅効率の良い polymerase（例えば Takara ExTaqHS）を用いると薄い extra band（非特異的バンド）が検出されることを確認している。特異的なバンドと比べ、シャープではなく且つ薄いので、コントロールと比較するとその差別化は容易である。そのためにも必ずコントロール DNA はおくべきである。



## V. PCR法を用いた髄膜炎菌の血清群の同定

髄膜炎菌の莢膜多糖体は複数の多糖体が数珠つなぎに繋がった構造をしており、その血清群は莢膜多糖体の末端に存在する糖の種類（もしくは分岐の違い）を抗体を用いて区別することにある。本検査ではその莢膜多糖体の末端に存在する糖の種類（もしくは分岐の違い）が一酵素の種類の違いにあることに着目し、各血清群に特異的な酵素の遺伝子を multiplex PCR法を用いて検出することにより、その血清群を迅速に決定することを可能としている。

詳細は以下の論文を参照のこと。

3. Muhamed-Kheir Taha. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:855-857, 2000.
4. Zacharoula Drakopoulou, Konstantinos Kesanopoulos, Maria Sioumalas, Alexandra Tambaki, Jenny Kremastinou & Georgina Tzanakaki. Simultaneous single-tube PCR-based assay for the direct identification of the five most common meningococcal serogroups from clinical samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **53**:178-182, 2008.

### 1) プライマーセット

#### ① sacB (serogroup A) : 髄膜炎菌 血清群 A 検出用プライマー

sacB-F            5' - GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC -3'        25mer  
sacB-R            5' - CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT -3'        24mer

#### ② siaD (B) : 髄膜炎菌 血清群 B 検出用プライマー

siaD (B)-F        5' - GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA -3'        24mer  
siaD (B)-R        5' - GCATGCTGGAGGAATAAGCATTA -3'        24mer

#### ③ siaD (C) : 髄膜炎菌 血清群 C 検出用プライマー

siaD (B)-F        5' - TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT -3'        25mer  
siaD (B)-R        5' - CAATCACGATTTGCCCAATTGAC -3'        23mer

#### ④ siaD (Y/W) : 髄膜炎菌 血清群 Y/W 検出用プライマー

siaD (Y/W)-F     5' - TCCGAGCAGGAAATTTATGARAA -3'        23mer  
siaD (Y/W)-R     5' - GCCATTCCAGAAATATCACCAG -3'        22mer

2) PCR 反応液組成及び反応条件

反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

※Takara Multiplex Assay Kit Ver.2 の場合

(他メーカーのPCR酵素でも使用可能だが、その場合にはプライマーの至適濃度に注意して使用すること)

精製 DNA	1 $\mu$ l
2 x Multiplex PCR Buffer	12.5 $\mu$ l
sacB-F (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
sacB-R (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(B)-F (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(B)-R (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(C)-F (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(C)-R (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(Y/W)-F (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
siaD(Y/W)-R (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.125 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9.375 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※検体分(x)、更に PCR のクオリティコントロールとして (1) 莢膜多糖体 A、B, C, Y, W5 種混合陽性コントロール、(2) DNA なしの2つを追加すること。

※上記の Multiplex PCR は各血清群の遺伝子が効率よく増幅させるために Takara Bio の Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 を使用している。

しかし、各研究所の研究環境においてはこのキットを用意することが困難な場合もあると考えられる。その場合は通常の PCR 酵素 (執筆責任者は Takara Bio の ExTaq polymerase) でも実施可能であった。通常の PCR 酵素で行い場合には以下の組成で PCR を行う。

精製 DNA	1 $\mu$ l
10 x Ex Taq Buffer	2.5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	2 $\mu$ l

sacB-F ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
sacB-R ( <u>100μM</u> )	0.25 μ
siaD(B)-F ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
siaD(B)-R ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
siaD(C)-F ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
siaD(C)-R ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
siaD(Y/W)-F ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
siaD(Y/W)-R ( <u>100μM</u> )	0.25 μl
Ex Taq polymerase	0.25 μl
H <sub>2</sub> O	17.25 μl
<hr/>	
Total	25 μl

3) PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 1min  
↓  
94°C × 30sec  
57°C × 30sec  
72°C × 30sec

} 25 cycles

4) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。

Serogroup A	sacB	400 bp
Serogroup B	siaD(B)	450 bp
Serogroup C	siaD(B)	250 bp
Serogroup Y/W	siaD(Y/W)	120 bp

図 2 は髄膜炎菌の検出・判定例を示す。

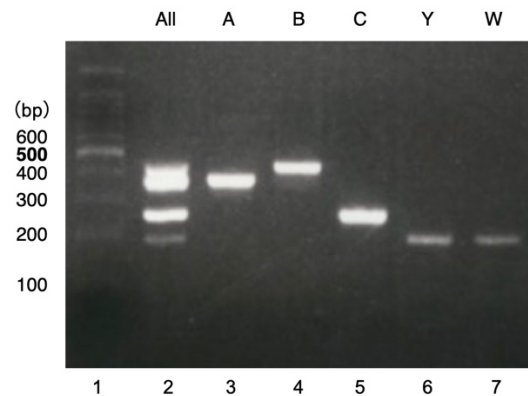


図2 Multiplex PCRによる髄膜炎菌の血清群同定例

lane 1: 100 bp ラダー、lane 2: 髄膜炎菌 (血清群 A+B+C+Y+W 5種混合)、lane 3: 髄膜炎菌 血清群 A、lane 4: 髄膜炎菌 血清群 B、lane 5: 髄膜炎菌 血清群 C、lane 6: 髄膜炎菌 血清群 Y、lane 7: 髄膜炎菌 血清群 W

※この Multiplex 法は検体が複数ある場合には検査の手間を少なくするには有効であるが、Y と W の区別が出来ない欠点がある。

検体数が少ない場合には参考文献 3 の方法を試みる方法もある。以下に参考までに single PCR 法による血清群決定法を紹介する。

#### 1) プライマーセット

##### ①crgA : PCR 陽性コントロール用プライマー

crgA-1            5' -GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3'    25mer  
crgA-2            5' -CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'        24mer

##### ②orf2 : A 群髄膜炎菌同定用プライマー

orf2 (A)-1        5' -CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'        24mer  
orf2 (A)-2        5' -CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'        24mer

##### ③siaD (B) : B 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD (B)-1        5' -GGATCATTTTCAGTGTTCACCA-3'        24mer  
siaD (B)-2        5' -GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'        24mer

##### ④siaD (C) : C 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD (C)-1        5' -TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3'        25mer  
siaD (C)-2        5' -CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'        23mer

⑤ siaD(W) : W 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD(W)-1	5' -CAGAAAGTGAGGGATTTCATA-3'	22mer
siaD(W)-2	5' -CACAAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	27mer

⑥ siaD(Y) : Y 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD(Y)-1	5' -CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	22mer
siaD(Y)-2	5' -CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	27mer

2) PCR 反応液組成及び反応条件

①反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

精製 DNA	1	μl
10 x ExTaq buffer	2.5	μl
2.5mM dNTPs	2	μl
ctrB-F3 (100μM)	0.25	μl
ctrB-B3 (100μM)	0.25	μl
ggt-63 (100μM)	0.25	μl
ggt-20 (100μM)	0.25	μl
Taq polymerase	0.25	μl
H <sub>2</sub> O	18.25	μl
Total	25	μl

②PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 3min.	} 2cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	
↓	
94°C × 40sec.	} 30cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	

3) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマ

イド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。

crgA	230bp
orf2(A)	400bp
siaD(B)	450bp
siaD(C)	250bp
siaD(W135)	120bp
siaD(Y)	120bp

図 3 は Y 群髄膜炎菌の判定例を示す。

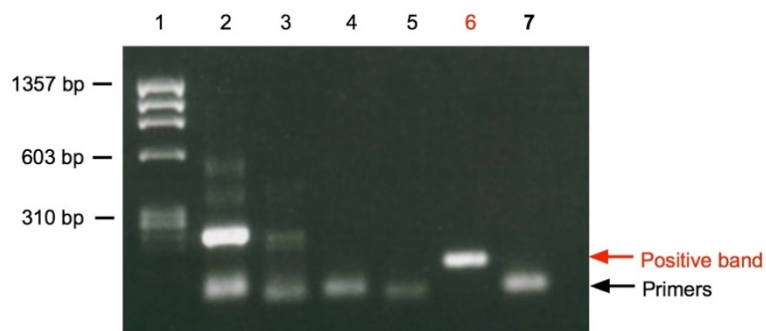


図 2 Multiplex PCR による髄膜炎菌の血清群同定例

lane 1: DNA マーカー、lane 2: PCR 陽性コントロール、lane 3: 血清群 A プライマー、lane 4: 血清群 B プライマー、lane 5: 血清群 C プライマー、lane 6: 血清群 Y プライマー、lane 7: 血清群 W プライマー

## 問い合わせ先

何か不明な点がございましたら、お気軽にお問い合わせ下さい。

〒113- 8510

東京都文京区湯島 1-5-45

東京医科歯科大学 大学院医歯学総

合研究科 分子病原体検査学分野

齋藤良一

E-mail: r-saito.mi@tmd.ac.jp

Tel:03-5803-5368

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1- 23-1

国立感染症研究所 細菌第一部

第五室

高橋英之

E-mail:hideyuki@nih.go.jp

Tel:03-5285-1111(内線 2227)

Fax:03-5285-1163

### 執筆者一覧

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子病原体検査学分野

齋藤良一 [r-saito.mi@tmd.ac.jp](mailto:r-saito.mi@tmd.ac.jp)

国立感染症研究所 細菌第一部 第五室

高橋英之 [hideyuki@nih.go.jp](mailto:hideyuki@nih.go.jp)

### 結果検証協力者一覧

東京医科歯科大学医学部附属病院 検査部 中島 淳、小林亜由香

独協医科大学埼玉医療センター 感染制御部 飯草正実、永野栄子

横浜市立みなと赤十字病院 検査部 酒井雄一郎

千葉県千葉市立海浜病院 臨床検査科 大塚 武

県立宮崎病院 臨床検査科 佐多 章

那覇市立病院 医療技術部 検査室 大城健哉

さいたま市健康科学研究センター 保健科学課臨床微生物係 菊地孝司

横浜市衛生研究所 微生物検査研究課 細菌担当 松本裕子

千葉県衛生研究所 細菌研究室 菊池 俊、中村正樹

宮崎県衛生環境研究所 微生物部 吉野修司、宮原聖奈

沖縄県衛生環境研究所 衛生生物班 柿田徹也、宮平勝人

(敬称略)