

図4 措置入院患者における陰性確認

		病日(☆:診断日 O:遺伝子陽性 N:遺伝子陰性 ★:退院)																		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		■				N	N★													
2				■			■		○	○	N	N★								
3						■	■		○	○	■	○	○	○	○	○	N	■	N	N★
4				☆			N	○	■	■	■	■	○	○	○	○	N	■	■	■
5																				
6				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7																				
8		☆																		

■	275H
○	275未確認

表8 新型インフルエンザ A/H1N1sw1 対応における担当部署別問題点

部署	時期	問題点	解決	対応
1 ウイルス研究室				
	5月	機器設備（リアルタイムPCR、シーケンサー、RNA抽出装置、炭酸ガス培養器等）の不足	△	シーケンサー緊急増設 リアルタイムPCR増設（8月）
	5月	PCR結果疑義（最終的に陰性と判断した2件の診断遅延）	○	感染研に相談し、SOP修正 （リアルタイム優先へ）
	6月まで	深夜にわたる検査要請の頻発	○	措置入院中止後、県庁・中核市と受入体制を調整
	通期	対象業務人口あたり職員数の不足 関連調査研究の遅延	×	所内、県内応援 増員要求
	7月	escape mutantによるconv/real結果乖離	○	シーケンス確認 感染研へ報告
2 企画情報部（基幹感染症情報センター）				
	通期	業務量に対する人員不足 感染症専門家の不足	△	研修等への積極的派遣 所内応援
	通期	英語力・情報収集力不足	△	所内応援
3 管理部署				
	通期	微生物・感染症専門家の不足	△	所内養成・外部との連携
	通期	人員・設備・検査研究費用の確保不足	△	人員・設備強化及び専門家養成の必要性を継続的に訴える

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)

地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討
分担研究報告書

研究課題: 新型インフルエンザウイルス遺伝子検出における escape mutant への
初期対応—地衛研の立場から

研究協力者 皆川 洋子 (愛知県衛生研究所)
研究分担者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究代表者 宮村 達男 (国立感染症研究所)
研究協力者 安井 善宏、小林 慎一、山下 照夫 (愛知県衛生研究所)
研究協力者 三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

2009年4月にメキシコで探知された新型インフルエンザ A/H1N1sw1 の実験室診断を円滑に行うため国立感染症研究所(以下 感染研)により開発された swH1 を特異的に検出するリアルタイム RT-PCR プロトコルは、多くの地衛研で5月6日以降新型インフルエンザ迅速診断の第一選択とされている。7月以降、本プロトコルでは検知されないウイルスを含む検体を経験した。何れもコンベンショナル RT-PCR では増幅されたため、結果報告が当初予定より数時間遅れた以外に影響はなかった。速やかに感染研に報告されたエスケープ検体の遺伝子該当部分の塩基配列に基づき、検出プロトコルのアップデートが行われた。変異の集中しやすいインフルエンザ亜型検出体制の維持には、病原体サーベイランス及び感染研-地衛研間・地衛研相互の情報共有体制の強化が必要と思われる。

A. 研究目的

2009(平成21)年4月にメキシコで探知され、5月には国内患者発生の確認された新型インフルエンザ A/H1N1sw1 (H1pdmとも表記、以下新型 flu) の実験室診断には、迅速性を重視してリアルタイム(real) RT-PCR が多用されている。今回のパンデミーに際し、わが国では上記に加えて感染症法上の扱いや社会的対応の大きく異なる季節性(H1 亜型内の季節性 A ソ連型ウイルス)との鑑別が求められた。感染研により TaqMan プローブ法を用い季

節性 H1 と交差反応を示さず、上記ニーズを満たす real RT-PCR プロトコルがいち早く開発され(病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ 2009年5月 ver. 1)、5月2日には全国地衛研にプライマー・プローブセットが配布された。

7月以降に前述プロトコルでは検出されない新型インフルエンザ A/H1N1sw1 ウイルスを経験したのでここに報告し、エスケープ検体の可能性を考慮した検出体制の維持について考察を加える。

B. 研究方法

検体：新型 flu 疑い患者の行政検査用検体（鼻腔若しくは咽頭拭い液）。

遺伝子増幅法：2009年5月以降A型インフルエンザ検出には、病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ 2009年5月 ver. 1 に示された real RT-PCR (M 及び swH1) とコンベンショナル (conv) RT-PCR (M, swH1, H1, H3) を併用した。5月22日以降は H1 及び H3 についても感染研より 2008年に示されたプロトコルを用いた real RT-PCR を併用している (表1)。

遺伝子塩基配列解析：conv RT-PCR 産物の塩基配列を直接決定 (ダイレクトシーケンス) した。

C. 研究結果

2009年5月以降7月までに507件実施したA型インフルエンザウイルス RT-PCR 検査において、2件が real RT-PCR では亜型決定不能となった [M(+), swH1(-), H1(-), H3(-)]。conv RT-PCR の結果判明 [M(+), swH1(+), H1(-), H3(-)] を待つて新型 A/H1N1sw1 と判定した。

現行の real RT-PCR プロトコルでは検知されない escape mutant が疑われたため、conv RT-PCR 産物の遺伝子塩基配列を決定した。プローブ結合部位に2症例とも同一の1塩基置換変異 (218番 A→C) がみられた。

なおこれら2症例は異なる保健所管内医療機関を受診しており、疫学的リンクは見出されていない。

同じ時期に大阪府堺市において、リアルタイム蛍光強度立ち上がり角度が小さいと認識された症例からは、該当遺伝子

塩基配列の異なる部位に、2箇所 (208番 G→A, 210番 T→A) の1塩基置換変異がみられた (表2)。

これらの検出不能事例及び変異情報は、速やかに感染研インフルエンザウイルス研究センターに報告され、検出マニュアルに反映されることとなり、2009年11月付マニュアル ver. 2 において、プロトコル改正 (プローブ延長) が通知された。

D. 考察

行政及び医療機関において、新型 flu 患者は季節性とは異なる対応を要する場面が少なくない。新型 flu ウイルス迅速検査においては、型特異的遺伝子検出にとどまることなく季節性との鑑別診断 (血清亜型内タイピング) までも遺伝子診断に頼らざるを得ない。新型 flu 海外発生直後に感染研が開発し、地衛研に提示された swH1 検出用 real RT-PCR プロトコルは、swH1 特異性が高く近縁の季節性インフルエンザ A/H1N1 ソ連型に反応しないため、発生初期対応における迅速な鑑別診断の実現に大いに貢献した。

血清亜型決定に有用な遺伝子部位は、当然ながら抗体による選択圧がかかり変異を集積しやすい部位でもある。このため、開発当初に用いたウイルス株に高感度を示したプライマー・プローブセットに対して、すり抜け変異ウイルス出現の可能性を常に念頭に置く必要がある。

具体的な対応としては、今回感染研より地衛研に示されたマニュアルのように、予め real と増幅領域の重なる conv PCR プロトコルを準備しておき、A型陽性 H 亜型陰性検体を経験した場合に速やかに

塩基配列確認ができる体制が望ましい。

同時に病原体サーベイランスの維持・強化につとめ現在流行している株における変異動向を把握する必要がある。これら変異に関する情報を感染研及び全国地衛研間で速やかに検証・共有するシステム構築が求められる。

E. 結 論

感染研が開発し地衛研に提示された近縁の季節性亜型に反応しない swH1 検出用 realRT-PCR プロトコルでは検出されない新型 flu 患者 3 例の検体 3 件について、該当遺伝子断片の塩基配列を解析したところ、プローブ結合部位に 1~2 塩基変異を検出した。

インフルエンザウイルス亜型遺伝子検出では、しばしば大きな変異選択圧のかかる部位を検出標的とせざるをえない。エスケープ検体の出現に対する備えとして、病原体サーベイランス強化による流行株動向の把握とともに、予め該当遺伝子断片の増幅・塩基配列検証法を用意しておき、さらに感染研・地衛研間での迅速な情報共有を進める必要がある。

F. 研究発表

病原微生物検出情報に投稿準備中。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 愛知県衛生研究所におけるA型インフルエンザウイルス検出法選択の変遷

実施時期	～2009年4月	2009年5月～	5月22日～
A型M遺伝子検出	conv. PCR	real PCRとconv PCRを併用	real PCR (疑義のある場合のみconv 増幅産物を確認)
H1(季節性・新型sw1とも検出可能)	conv. PCR	real PCRとconv PCRを併用、新型除外にはシーケンスを決定	real PCR (疑義のある場合のみconv 増幅産物を確認)
H1(sw1特異的)	図表目次項目が見つかりません。	real PCRとconv PCRを併用	real PCR (疑義のある場合のみconv 増幅産物を確認)
H3(季節性)	conv. PCR	conv PCRとreal PCRを併用	real PCR (疑義のある場合のみconv 増幅産物を確認)
H5	conv. PCR	(変更なし)	(変更なし)
H7	conv. PCR	(変更なし)	(変更なし)
ウイルス分離	MDCK	(変更なし)	(変更なし)

表2 変異部位周辺の遺伝子塩基配列

検体ID	採取年月日	181-塩基配列 (_ はプローブ結合部位)	
対照*	非該当	CTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAATGTAACATTGCTG	
t557	7月15日	CTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAATGTACCATTGCTG	愛知県
t643	7月20日	CTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAATGTACCATTGCTG	愛知県
09v328	7月11日	CTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGAGAAAATGTAACATTGCTG	堺市
09v375	7月15日	CTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGAGAAAATGTAACATTGCTG	堺市

*A/California/7/2009株の配列

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)

地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討
分担研究報告書

研究課題： 大阪府における新型インフルエンザへの初期対応の総括

研究協力者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所)
研究分担者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究代表者 宮村 達男 (国立感染症研究所)
研究協力者 加瀬 哲男、廣井 聡、森川 佐依子
(大阪府立公衆衛生研究所)
加藤 友子 (大阪府健康医療部)

研究要旨:

将来の新たな新型インフルエンザ対策に資することを目的として、平成21年に勃発した新型インフルエンザ(A/H1N1swl)に対して、発生状況に応じて当所が行った検査対応における問題点、迅速抗原診断法の評価、人的動員、検査体制、情報発信体制等について総括し、以下の課題について結論を得た。1. 検査診断における初期対応については、検査診断法、検査の人的体制に大きな問題はなく、1日の最大検査数は66検体であり、十分検査対応が可能であった。2. 新型インフルエンザ検査診断について、迅速診断法陽性でPCR法が陰性である検体が約4割を占めたことが最大の問題点であった。この原因として、迅速抗原診断法の偽陽性の可能性が最も考えられた。PCR法の偽陰性の可能性の原因として、検体採取の問題、PCRを阻害するインヒビターの存在、PCR法が低感度であること、などの可能性が考えられた。3. オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出の問題点は検査に時間を要することにあり、より迅速、高感度でシーケンス可能な方法の開発が必要である。また、耐性株検出時に迅速に厚労省へ報告しなかったことは反省点であった。4. 新型インフルエンザ情報の情報発信については、大阪府内の流行状況、脳症等の重症者や死亡者等の情報などを比較的迅速にHPから発信できた。これらの課題の問題点について、将来来るべきパンデミック対策に考慮が必要と考えられた。

A. 研究目的

平成21年に勃発した新型インフルエンザ(A/H1N1swl)の国内侵入と感染拡大に

際し、大阪府立公衆衛生研究所(以下、当所)が行った検査等に対する対応について要約し、将来の新たな新型インフルエンザ対策に資することを目的とする。

特に、新型インフルエンザの発生状況と検査対応、迅速抗原診断法の評価、人的動員、検査体制におけるネットワーク、改良すべき課題等について総括する。

B. 研究方法

本研究では以下の点について調査、研究を行った。検査診断に関する方法は、当所で独自に開発し、また国立感染症研究所（以下、感染研）からの検査診断マニュアルを参照した。1、2については大阪府健康医療部感染症ならびに保健所から情報を入手し検討した。5. については、本研究班からの実験マニュアルに準拠した。この結果については、研究班全体でまとめ他に報告する。

1. 検査診断における初期対応
2. 検査診断上の問題点
3. オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出とその対応
4. 新型インフルエンザ情報の情報発信に関する検討
5. LCR 法によるオセルタミビル耐性遺伝子の有無の鑑別

C. 研究結果と考察

新型インフルエンザ検査診断の初期対応とその問題点について、以下の項目に焦点をあて要約する。

1. 検査診断における初期対応
2. 検査診断上の問題点
3. オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出とその対応
4. 新型インフルエンザ情報の情報発信に関する検討

1. 検査診断における初期対応

大阪府における新型インフルエンザの初期検査対応について図1、2に要約する。平成21年4月21日 アメリカで豚インフルエンザの2例の感染例がCDCより報告されたため、当所ではA型インフルエンザウイルスのHA遺伝子に共通するプライマーを保持していたため、それを用いてPCRを行い、塩基配列を決定することで豚インフルエンザウイルスを診断する対応をとった。29日にはWHOが新型ウイルスのHA塩基配列を公表したため、それをもとにHA遺伝子を検出するプライマーを作製し、PCR-塩基配列決定というシステムで診断することに変更した。5月2日に国立感染症研究所（感染研）がリアルタイムPCR用の試薬を配布し、当所ではその検査体制を整えるべく準備にかかり、成田空港で3名の帰国者から新型ウイルスが検出された9日にその検査体制を整えた。当所では、感染研からの新型検出用とA型共通PCR法の2法を用いて診断を行った。所要時間は約3時間である。

5月16日に神戸の高校生の国内第1例が確認、報告された。大阪では5月12日より府内A高校でインフルエンザの集団発生、学年閉鎖があり、新型インフルエンザが疑われ、5月16日に当所でリアルタイムPCR法により検査したところ、14検体中9例の新型インフルエンザ患者(A型共通陽性、新型特異的PCR陽性)が確認された。これを受けて、翌17日に大阪府対策本部会議が招集された。同日、A高校の生徒を中心に、また、Y市の小学校からの検体 41例中32

例が陽性となったため、翌18日には大阪府対策協議会が開催され、大阪府知事は「流行警戒宣言」を発し、全中高等学校、一部小学校、幼稚園、大学などが1週間閉鎖された。20日には検査数が66検体でピークとなり以後減少に転じた。21日からは、全大阪府内（政令指定都市を含む）の患者発生数を経日的に、居住地別、年齢別に集約しHPに毎日掲載することを開始した。23日には感染終息傾向を確認し、24日には2例の陽性を認め、25日には全学校が再開した。その後、6月26日までの約1ヵ月間は1日当たりの検査数は数件前後（0-10件）であり、陽性検体数は0-3/日であった（図3）。

5月から10月までの大阪府における行政検査での新型インフルエンザウイルス検出状況を表1に示す。（病原体サーベイランスは含まない。全数把握は7月24日まで）5月1日から6月30日までの2か月間では、総検査数522検体の36%が新型インフルエンザウイルス陽性であり、11%が季節性と判断され、3%の検体では、A型陽性、亜型PCR陰性（型別不明）、残りの50%はA型、新型ともに陰性であった。7月の総検査数は899となり、新型は88%でH3が6例から検出され、PCR陰性例は11%に減少した。8月の検体数は261例で、亜型等の傾向は同様であった。9、10月の検体数は100例弱で同様の傾向であった（9月のPCR陰性は28%）。

当所における新型インフルエンザ検査体制を図4に示す。5月16日の発生最初の初日は2名で24時間体制、翌17日

は4名で午後11時まで検査をおこなった。

5月18日から8月3日までは原則1日2回検査で、検査担当者は、ウイルス課研究員10名が交替で1日2人が担当する体制で行った。午前9時から午後1時までに搬入された検体の検査結果は午後5時に本庁に報告し、午後1時から午後6時まで搬入された検体の結果は、翌日の午前中に報告する体制とした。（5/18のみは午後10時報告）

7月25日より全数検査が中止され、クラスターの一部患者および全入院患者、治療上必要な者に対して検査が行われた。8月28日よりはクラスターでの検査が中止され、主に入院患者に対して診断検査が行われたため、8月29日より原則休日検査を中止した。10月19日以降は、原則週2回検査とし、検体は毎日受け付け、結果は午後5時までに報告した。検査担当は呼吸器ウイルス担当の2名が交替で対応した。死亡例に対しては即日結果を報告した。12月14日より重症患者（死亡、脳症、人工呼吸器装着、集中治療管理）のみに検査を限定した。

2. 新型インフルエンザ検査診断上の問題点

発生初期には大部分の疑い患者は迅速抗原検査を受け、当所でリアルタイムPCR法により検査を行った。疫学調査結果を考慮して問題点を検討した（図5）。

（1）迅速抗原診断でA型陽性であった検体のうち約4割は両方（A型共通と新型）のPCR法で陰性であった。この原因として考えられる理由は迅速抗原診断法の偽陽性かPCR法での偽陰性の可能性である。

1) 迅速抗原診断法の偽陽性の可能性について

発生初期に迅速診断検査を受けた疑い患者について、迅速診断陽性で両 PCR 法が陰性であった 44 例に対して使用されたキットの商品名の調査結果を表 5 に示す。使用されたキットは 10 種類で、ある特定のキットに偏っていることは見られなかったが、上位 2 種が約半数をしめた。冬季のインフルエンザシーズンにシェアが高い上位 3 種は在庫減少と思われる、あまり使用されておらず、冬季でのシェアが少ない商品がよく認められる。また、これらの商品は金コロイドを用いた検出法であるものが多く、金コロイドは所定の反応時間以上経つと非特異的バンドが認められる傾向があるので、今回の偽陰性を生む一原因となっている可能性も考えられる。実際、検査を行った医療関係者に聞き取りを行うと、所定の反応時間を超えてバンドが出現したので陽性と判断したという例も見られた。以上より、迅速抗原診断法の偽陽性の可能性はある程度存在すると考えられたが、その程度、範囲は不明である。

2) PCR 法での偽陰性の可能性

PCR 法での偽陰性の可能性について、原因となる要因は (1) 検体採取上の問題点 (2) PCR 法の感度 (3) 精製 RNA 中のインヒビターの存在、などが考えられ順に述べたい。

(1) 検体採取上の問題点

新型インフルエンザ疑い患者に対する検査検体は、迅速診断用と PCR 法用に 2 度鼻腔スワブを採取する。2 度目のスワブ採取の状況について調査した結果を表

6 に示す。同日に同機関で採取された検体が 44 例中 25 例 (57%)、この中には 1 回目と異なる採取者が咽頭よりスワブを採取した例も認められた。他機関で採取された例が 16 例で、そのうち保健所医師が行った例 8 例、入院などのため他の医療機関で行った例 7 例 (このうち 2 例は再度の迅速診断検査で陰性であった)、老人ホームでの採取 1 例であった。翌日に他の医療機関で採取され、タミフルを服用していた例が 3 例認められた。このように 2 度目の採取検体の約 4 割は他の医療機関で採取されており、また、普段から熟練している採取者が行っていない可能性や 2 度目の採取までに時間が経過していることもあり、状況は一定ではないことが判明し、これらが PCR 法による偽陰性の一原因であることも考えられる。この状況となった原因としては、PCR 法およびウイルス分離用の検体の採取をハンクス液で行うことを順守したためである。ハンクス液を使用せず直接採取後冷蔵して即日搬送し検査を行う場合は、PCR 法およびウイルス分離法には支障がなく、検査可能であることが確認されているので (他の地衛研による検証)、今後、ハンクス液がすぐに使用できない状況で即日検査が可能であれば、この方法の導入は考慮すべき点である。

(2) PCR 法の検出感度についての検討
5 月から 6 月にかけての検体については迅速診断陽性検体の約 4 割が両 PCR 法で陰性であったが、7-8 月の検体では迅速診断陽性検体の 90% 以上は両 PCR 法で陽性であり、大部分が新型インフルエンザウイルスと診断され、両 PCR 法で

陰性例は激減した。この結果は両 PCR 法の感度は實際上十分な感度であることを示している。使用した A 型共通 PCR と新型 PCR の検出感度を新型ウイルス RNA を用いて比較すると、A 型共通 PCR の検出感度がやや高い。ある地方衛生研究所が開発した新型ウイルスリアルタイム PCR（プライマーの位置が異なる）の検出感度は現行の新型 PCR よりやや高いことが示されている。実際、当所では迅速診断と A 型共通 PCR 法で陽性であったが、新型 PCR が陰性であり、疫学的状況から新型インフルエンザが強く疑われた症例を 2 例認めた。将来勃発が懸念される致死率の高い新型インフルエンザの発生とその対応について考えると、検出感度を極限まで向上させる意義は高い。新型 PCR の試薬類が配布された時は、検出感度は不明であったが、できるだけ早期に感度を確定し、改良の余地があれば早急に感度を向上させる対応が重要であると考えられる。

上記の新型 PCR 法で陰性であった 2 例については、その時点で、新型を疑い通常の RT-PCR 法を用いた確認検査やリアルタイム新型 PCR 法での再試は行っていない。このような疑い症例の場合には、確定診断のためにも RT-PCR 法による精査や再試が必要であったと考える。

（3）精製 RNA 中のインヒビターの存在

両 PCR 法が偽陰性となる一原因として、検体を精製した RNA 中に存在する、いわゆる PCR インヒビターの存在の可能性が考えられる。しかし、7-8 月の検体で迅速診断陽性であれば、ほぼ両 PCR 法で陽性であったことより、このイ

ンヒビターの存在による偽陰性の頻度は非常に低いと考えられる。将来的には、偽陰性が疑われる場合には、内部コントロールを用いて、インヒビターの存在を確認するシステムの導入が必要となってくる可能性を考慮しておくべきと考える。

3. オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出とその対応

平成 22 年 2 月 1 日現在、大阪府では新型インフルエンザ患者 4 例から 4 株のオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスが検出されている（表 2、3）。9-12 月の検査件数 75 株中 3 株（4%）が耐性ウイルスであり、他県と比較してやや高率である（5 月の耐性ウイルスを含めると 5.3%）。本研究班において、今回行ってきた耐性株のサーベイランスは、その出現頻度を把握することが第一の目的であるが、今後、公衆衛生対策上、耐性株をより迅速に検出することが必要となることが想定される。現在、耐性遺伝子の変異の確認には、ウイルス分離後に塩基配列を決定するため、検体搬入後 2-5 週間を要する。より迅速に検査診断するために検体 RNA から直接 NA 遺伝子を増幅させ塩基配列を決定する方法が可能となれば 3 日で判定できる。平行して耐性ウイルスを分離し、感受性試験に供すれば効率よく検査が進むと考えられる。また、本研究班で行った LCR 法を応用した場合には 1 日で耐性遺伝子の判定が可能となり、将来検査診断法として応用が可能であると考えられる。

表 3 の第 1 例目は国内初発例であり、世界で 2 例目である。その詳細と対応を図 8、9 に示す。症例は 5 月 15 日発症

の高校女子生徒の母親で、娘は17日PCR法で新型と診断される。母親は18日からタミフルを内服するが、24日微熱出現、29日検体採取となる。ウイルスを分離し、6月18日H275Yの耐性遺伝子を確認した。6月22日に耐性ウイルス変異を確認したことを本庁感染症課へ連絡し、6月24日に論文投稿した。この間タミフルの感受性試験の開発を試みたが実験は進まず、7月1日本庁から厚労省へタミフル耐性遺伝子変異株の検出について連絡し、感染研へ感受性試験を依頼した。7月5日にタミフル感受性が約60倍低下していることが判明し、耐性株と断定された。この事例に関しては、

- 1) 耐性遺伝子が検出された時点で大阪府本庁へ、さらに厚労省へ連絡すべきであったこと
- 2) 感受性試験の開発に日数を要し、確認が遅れたこと、が反省点としてあげられる。

4. 新型インフルエンザ情報の情報発信に関する検討

5月16日に大阪で最初の感染者を確認し、20日から感染症情報センターのHPより患者発生状況を毎日情報発信することを開始した。発信した内容は、当該日に確定した新型インフルエンザ患者の患者数を居住市町村別、年齢群別、男女別に分けて表に記載し掲載した。これを全数把握が終了する7月24日まで継続した(図10)。

この情報により、府内における患者の発生状況が毎日確認でき、居住する地域での流行状況が把握できた。この情報発信内容について、国立感染症研究所 感染症情報センターの岡部信彦センター長に

連絡したところ、情報センターのHPより当所のHPの発生状況のページをリンクすることをご提案いただいた。

9月からは病原体サーベイランス定点医療機関からの検体から分離したウイルスについてタミフル耐性遺伝子およびRNA合成酵素遺伝子の変異の有無を検査し、その情報を上記のようにHPに掲載した。現在までに検出された耐性株を、患者居住地別(北、中、南部)、月別に分類し掲載して現在も継続中である。

E. 結論

1. 検査診断における初期対応については、検査診断法、検査の人的体制に大きな問題はなく、1日の最大検査数は66検体であり、十分検査対応が可能であった。
2. 新型インフルエンザ検査診断について、迅速診断法陽性でPCR法が陰性である検体が約4割を占めたことが最大の問題点であった。この原因として、迅速抗原診断法の偽陽性の可能性が最も考えられた。PCR法の偽陰性の可能性の原因として、検体採取の問題、PCRを阻害するインヒビターの存在、PCR法が低感度であること、などの可能性が考えられた。
3. オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの検出の問題点は検査に時間を要することにあり、より迅速、高感度でシーケンス可能な方法の開発が必要である。また、耐性株検出時に迅速に厚労省へ報告しなかったことは反省点であった。
4. 新型インフルエンザ情報の情報発信については、大阪府内の流行状況、脳症等の重症者や死亡者等の情報などを比較

的迅速にHPから発信できた。

F. 研究発表

1. 研究会発表

1) 検疫医学研究会で発表予定

平成22年2月25日 神戸市

2. 誌上発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

大阪府における検査対応 4月

- 21日 アメリカ、豚インフルエンザ2例の感染例が報告 (CDC)
インフルエンザウイルス共通プライマー PCR 塩基配列決定
- 23日 カリフォルニア州などで5例の患者を確認 (CDC)
メキシコ市 120例感染、13例死亡 (カナダ公衆衛生局)
- 24日 メキシコのインフルエンザ様大規模集団感染は
豚インフルエンザが原因(メキシコ政府)
- 25日 WHO 「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」
- 28日 WHO 警戒水準を「フェーズ4」に引き上げ
大阪府対策本部会議、対策協議会開催
豚インフルエンザウイルス特異的プライマー PCR 塩基配列決定
最初の疑似患者を検査 陰性 陽性コントロールなし
- 29日 WHO 新型インフルエンザウイルスの塩基配列を公表
新型インフルエンザウイルス特異的プライマー PCR 塩基配列決定
- 30日 WHO 警戒水準を「フェーズ5」に引き上げ
9カ国、150例の感染

図 2

大阪府における検査対応 5月

- 2日から 感染研がリアルタイムPCR用の試薬を配布
- 9日 成田空港で3例の感染者が確認
リアルタイムPCRによる検査体制を構築 24時間体制
- 16日 神戸で国内発生1例目が確認、感染者からの2次感染
兵庫、大阪で高校における集団感染
新型陽性者 9例 / 14検体
- 17日 新型陽性者 32例 / 41検体 大阪府対策本部会議
A校と疫学リンク切れの八尾市内小学校女児感染確定
- 18日 大阪府対策協議会開催 大阪府知事「流行警戒宣言」
大阪 全中高校学校閉鎖、一部小学校、幼稚園、大学など閉鎖
- 20日 検査数がピーク 66検体
- 21日 日ごとの患者発症数、居住地別、年齢別にHPに毎日掲載開始
大阪府 新型対策協議会 毒性は季節性と同等か？
- 23日 大阪府対策本部会議
大阪府感染終息確認 都市機能回復に向けた方針決定
- 24日 新型陽性者 2例 / 17検体
- 25日 ほぼ全ての学校が再開

図 3

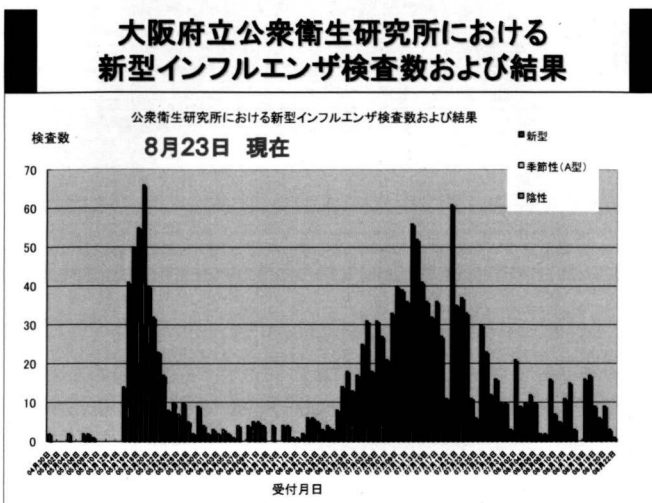


図 4

当所における新型インフルエンザ検査体制

- ・ 5/16 2名 (24時間体制)
- 5/17 4名 (午後11時まで)
- ・ 以後～8/3 原則1日2回検査

	1回目	2回目
検体受付	9-13時	13-18時
結果報告	17時	翌日午前 (5/18は当日22時)

検査担当 : ウイルス課研究員10名全員で対応 2人/日

- ・ 8/4 1日1回検査へ 午後搬入は翌日検査

検体受付	9-13時
結果報告	17時

- ・ 8/29 より 原則休日検査なし
- ・ 10月19日から
原則週2回(火、金)検査 (死亡例等は即日)

検体受付	毎日
検査結果	17時 (火、金)

検査担当 : 呼吸器疾患担当者

図 5

検査結果についての問題点

1. 迅速抗原診断で陽性の検体のうち約半数はPCR法で陰性であった。
迅速抗原診断法の偽陽性
PCR法での偽陰性
2. リアルタイムPCR法での検出感度が不明である
既知のコピー数の標準RNAコントロールが必要
検査法の精度管理が必要である

A型共通PCRは陽性、新型特異的PCRは陰性の症例で疫学的には新型インフルである可能性が非常に高い
→ 新型特異的PCRの感度が不十分である可能性

図 6

迅速抗原診断陽性、PCR法陰性の44症例の検討

使用された迅速抗原検出キット	
キャピリアFLU	13
ラピッドテストFLU	11
プロラストFL	7
イムノエースflu	3
クイックビュー	2
エスプライン	2
スポットケム	2
エグザマン	2
クイックナビ	1
メディエンス	1

図 7

迅速抗原診断陽性、PCR法陰性の44症例の検討

- PCR用検体は同日に同機関で採取 25#
 - PCR用検体は同日に他機関で採取された

保健所医師	8
他の医療機関(入院などのため)	7*
老人ホームで	1
 - 翌日他の医療機関で採取、タミフル服用中 3
- #1例は再度他のキットで陽性、1例は採取方法が不適
*7例中2例は迅速抗原診断陰性
ハンクス液へ採取することを遵守したため他機関や翌日検体を採取することになった場合が約4割認められた

図 8

オセルタミビル耐性ウイルス株の検出とその対応

K高校生女子(長女、15歳)
5月15日 発症し、17日検体採取(AH1N1pdm)、タミフル投与
母(47歳):
18日 タミフルの予防投与(予防量)開始
24日 微熱・鼻汁等で発症
27日 投与終了
29日 検体採取 リレンザを投与し翌日には症状軽快
A/H1N1pdm (H275Y)
夫(48歳): タミフル予防投与、発症せず
29日 リレンザを再度予防投与
長男(13歳): リレンザ予防投与、発症せず
29日 リレンザを再度予防投与

母親はこの間外出なく在宅療養しており、外部への感染はない

図 9

オセルタミビル耐性ウイルス株の検出とその対応

6月18日 AH1N1pdm H275Y確認
感受性試験を計画するが進まず
6月22日 当所から大阪府健康医療部感染症課へオセルタミビル耐性
遺伝子保有株の検出を報告
担当者が論文をEDJに投稿
7月1日 大阪府健康医療部感染症課から厚生労働省へ報告
厚生労働省からWHOへ報告
7月2日 ウイルス株を感染研インフルエンザ研究センターへ搬送
7月5日 オセルタミビル耐性であることを確認

反省事項: 厚生労働省への報告が大幅に遅れたこと

図 10

患者発生状況のHPでのリアルタイムな発信

診断確定日:5月17日

市町村	合計		～4歳		5～9歳		10～14歳		15～19歳		20～29歳		30～39歳		40～49歳		50～59歳		60歳～		
	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	
大阪市	4	2					1	4							1						
豊中市	5	3					1	5	2												
池田市	3	1						3	1												
吹田市	4							4													
高槻市	5	5						4	5								1				
茨木市	3	3					1	3	2												
八尾市	1						1														
箕面市	5	2						5	2												
島本町	1							1													
合計	30	17					4	29	12					1			1				

表 1

大阪府における新型インフルエンザウイルス検出状況（リアルタイム PCR 法による、2009.5.1 - 10.31）

（行政検査（保健所依頼）のみ）

検出型	検体数(割合)					
	5月	6月	7月	8月	9月	10月
総検査検体数	398	124	899	261	81	92
AH1 新型	134(34%)	53(43%)	790(88%)	232(89%)	58(72%)	82(89%)
AH1 ソ連型	1(0.25%)	2(1.6%)				
AH3 香港型	50(13%)	5(4%)	6(0.6%)	2(0.7%)		
B						
A 型共通 PCR 陽性で亜型 PCR 陰性	16(4%)	2(1.6%)	1(0.11%)	1(0.35%)	1(1.2%)	
リアルタイム PCR 法陰性(A 型共通、新型)	197(49%)	62(50%)	102(11%)	26(10%)	23(28%)	10(11%)

表2

大阪府での分離された新型インフルエンザウイルスの変異株検出状況

			総検査株数	タミフル耐性変異株数
大阪府	北部	9月	11	1
		10月	7	0
		11月	9	1
		12月	15	1
	中部	9月	4	0
		10月	6	0
		11月	4	0
		12月	3	0
	南部	9月	2	0
		10月	7	0
		11月	4	0
		12月	3	0

表3

大阪におけるタミフル耐性新型インフルエンザウイルス

症例	検体採取日	居住地	発生状況	年齢・性	検体採取時まで のタミフル投与の有無		最高体温	症状	耐性ウイルスの伝播
					あり	なし			
1	5月29日	豊中	家族内	40代女性	あり		37℃台	上気道炎	認めず
2	9月2日	豊中	散発	30代男性	なし		37℃台	上気道炎 肺炎・嘔	認めず
3	11月27日	吹田	集団	小学生女性	あり		40℃	吐	
4	12月9日	豊中	集団	小学生男性	あり		38.6℃	嘔吐	認めず

厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働省科学特別研究事業)

「新型インフルエンザ(インフルエンザ A/H1N1sw1) 発生への検査、調査に
ついての準備及び初期対応と、病原体検査や感染者に関する今後の国と
地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究」

地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討
分担研究報告書

研究課題：2009年ブタ由来インフルエンザウイルス A/H1N1pdm パンデミックにおける
初期対応と今後の課題

研究分担者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究代表者 宮村 達男 (国立感染症研究所)
研究協力者 吉田永祥、内野清子、三好達也、松尾光子、高橋幸三
(堺市衛生研究所)
研究協力者 三輪 秀明 (市立堺病院臨床病理)
研究協力者 影山 努
(国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)
研究協力者 佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨：

今回の新型インフルエンザ A/H1N1pdm パンデミックに対して、地方衛生研究所、国立感染症研究所は協働して迅速に対応した。メキシコでの発生情報入手から間髪を入れず遺伝子検査試薬等配布による診断検査体制の確立、検体取り扱い施設基準の見直し、遺伝子検査の精度向上のための様々な情報提供が行われた。このスクラムを組んだ臨戦態勢が本邦における新型インフルエンザ感染対策に大きく貢献した。

診断検査を担う地方衛生研究所はこのような連携を背景に、新型インフルエンザ全数把握対応時には、膨大な数の臨床検体を処理することが出来た。サーベイランス体制への移行後においても、個々の事例を詳しく解析し、今後の感染対策の資料に供した。

一方、アンケート調査から、各自治体では検査機器整備、検査人員体制の充実等に迅速な対応がなされたことが判明した。

A. 研究目的

メキシコに端を発したブタ由来新型
インフルエンザ A/H1N1pdm の本邦へ

の侵入、感染拡大の事態に対し、国立
感染症研究所インフルエンザ研究セ
ンターと地方衛生研究所が信頼と連

携のもとに、インフルエンザウイルス遺伝子診断検査体制を構築した。この初期の迅速な診断検査対応の評価、その過程で生じた様々な課題および改良した点について総括する。さらに、インフルエンザ全数把握体制からウイルスサーベイランス体制への移行に際し発生した課題とその対応、得られた様々な情報等の解析により得られる知見・成果を集約し、今後発生が予測されている H5N1 インフルエンザ感染症健康危機発生時への一つの対応方針として、厚生労働省、国立感染症研究所、地方衛生研究所および各自治体等へ感染症対策の提言を発信していくことを研究目的とする。

A. 研究方法

[1] これまでの対応

1997 年香港で高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の人への感染が確認され 18 人の感染者のうち 6 人が死亡した。感染防止対策として約 150 万羽の鶏が処分された。2001 年には再び香港で大量の鶏の感染がみられ、さらに 2003 年には中国南部に里帰りした香港の男性ら二人が H5N1 感染にて死亡した。その年の 12 月には韓国中部で H5N1 感染による鶏の大量死がみられ、約 185 万羽の鶏が処分され、2004 年にはベトナムでも鶏の大量死と共に感染者 91 人中 41 人の死亡事例が報告された。H5N1 インフルエンザはその後インドネシア、ロシア、ヨーロッパにとグローバルな感染症に発展した。

本邦においても 2004 年山口県における H5N1 感染事例を初めとして大分県、京都

府と相ついで感染事例がみられた。H5N1 の世界的な感染拡大を受けて、政府は鳥インフルエンザ対策省庁会議を設けた。H5N1 感染はその後、2007 年には宮崎県、岡山県と次第に感染区域の拡大を示した。2006 年には茨城県および埼玉県における H5N2 感染事例があり、養鶏場従業員の抗体検査の結果から少なくとも 13 名に感染が認められた。本邦においても亜型は異なるが鶏から人への感染が確認された。

1) 新型インフルエンザ情報提供・共有(リスクコミュニケーション)ガイドライン

新型インフルエンザ対策の本格化と共に感染症情報の共有化を目的として、得られた情報が厚生労働省(厚労省)、国立感染症研究所(感染研)のみならず、全国地方衛生研究所(地衛研)及び検疫所との共有化を図るため、新型インフルエンザ専門家会議の情報提供・共有部門の WG が設けられた。この WG の中に地衛研前感染症対策部会から 3 名が参画した(堺市衛生研究所 田中智之、神奈川県衛生研究所 今井光信、茨城県衛生研究所 土井幹雄)。

2) 医療機関に置ける診断のための検査ガイドラインの改定

2006 年に H5N1 型が指定感染症に指定されると共に「新型インフルエンザ対策」専門家会議の中で、新型インフルエンザウイルスの診断検査について、医療機関での対応にとどまらず包括的な対応が可能なように「新型インフルエンザウイルス診断検査の方針と手引き」の策定が開始され、地衛研、感染研の役割分担が明文化された。とくに検査体制では検体採取の部位および種類や採取時期、保存方