

図 3 死亡事例(6歳女児)
 剖検時の肺、心、脳、血液、髄液のリアルタイム RT-PCR 法の検出結果

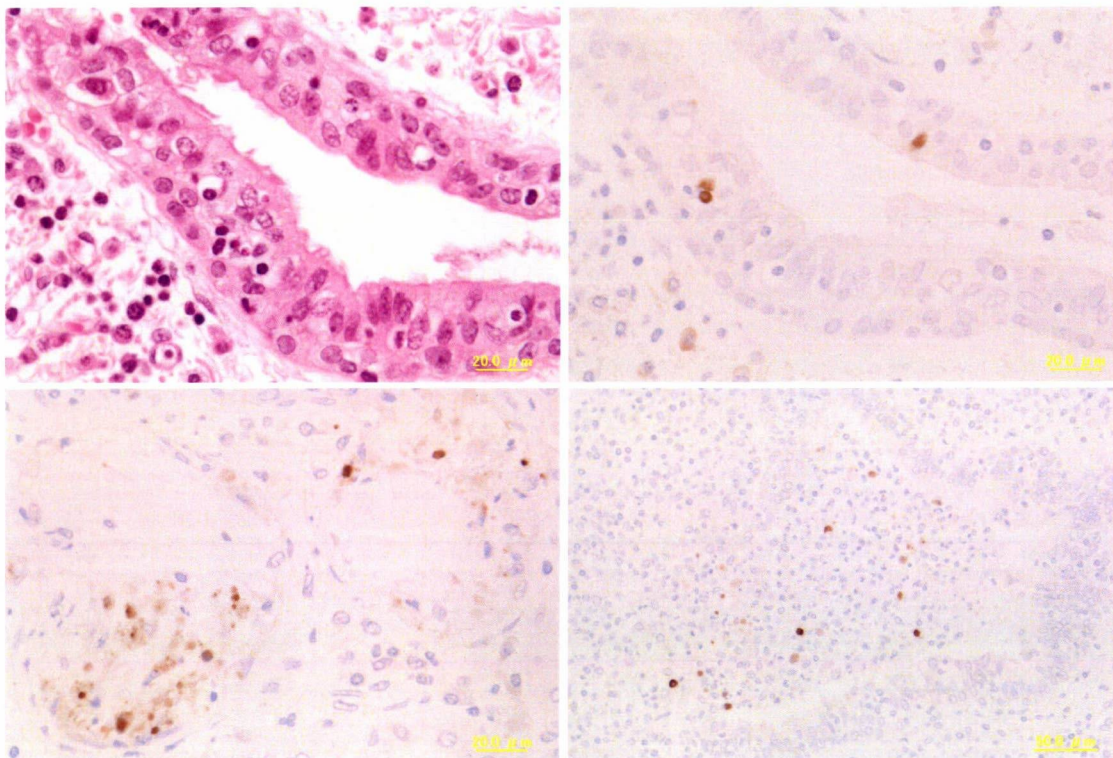


図 4 新型インフルエンザ死亡事例の免疫組織染色

左上の HE は気管腺の導管部の上皮で、配列の乱れ、細胞浸潤がある。右上の免疫染色は同部位の免疫組織化学で一部の細胞にインフルエンザ NP 抗原が陽性。同様の免疫染色で、左下は気管支腺細胞、右下は細気管支内の壊死物に混じった抗原陽性上皮細胞(と思われる)。気道への感染と、それに伴う細菌性の二次感染で、季節性インフルエンザの症例と類似する所見。

表 4 剖検組織中における新型インフルエンザ遺伝子コピー数

	sample	IHC	beta-actin	swFlu	swFlu/b-act	swFlu/cell
10-56	#36: 気管	+	627.9	0	0	0
	#37: 気管	+	1287.8333	0	0	0
	#38: 気管	-	2645.3667	0	0	0
	#39: 気管	-	2999.3333	0	0	0
	#40: 気管	-	2652.3333	0	0	0
	#41: 肺	+	3308	8.E+01	2.E-02	3.55E+01
	#42: 肺	-	4632.6667	1.E+01	2.E-03	3.75E+00
	#43: 肺	+	9792.3333	0	0	0
	#F1: 脳	ND	53310000	0	0	0
	#F2: 心臓	ND	9395000	0	0	0
	#F3: 肺	ND	461700	4.E+02	1.E-03	1.43E+00
	陽性対照(Showa 株)		6.17E+01	3.E+04	5.E+02	6.97E+05
	陰性対照(TY-1)		4.27E+06	0	0	0

*1.5x10E3 b-actin
copies/cell

IHC はインフルエンザウイルス NP 抗原を検出する免疫組織化学で、気道上皮に陽性。
swFlu は新型インフルエンザウイルスのゲノムをリアルタイム PCR で検出したもの。
β アクチン遺伝子のコピーでわり、細胞あたりのウイルスコピー数を計算すると swFlu/cell になる。

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：神戸市における新型インフルエンザ検査の対応状況および検証と課題

研究協力者 田中 敏嗣 (神戸市環境保健研究所)
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 奴久妻聡一 (神戸市環境保健研究所)
秋吉 京子 (神戸市環境保健研究所)
須賀 知子 (神戸市環境保健研究所)
森 愛 (神戸市環境保健研究所)
新型インフルエンザ検査チーム
(神戸市環境保健研究所)

研究要旨：

神戸市において厚生労働省通知に従い疑似症患者への対応、接触者等の健康観察および情報収集を進めるなか、5月15日(金)疑似症患者の定義に合致しない男性が新型インフルエンザ(インフルエンザA/H1N1sw1)の陽性反応を示し、感染が否定できない事例が発生した。翌日、国立感染症研究所での確定診断で陽性が確認され、新型インフルエンザの国内感染の最初の報告事例となった。神戸市環境保健研究所として取り組んできた新型インフルエンザ対策の検査体制および検査対応の状況について報告し、今後の在り方に向け検証した。

A. 研究目的

平成21年(2009年)4月米国疾病予防管理センター(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)はアメリカで鳥インフルエンザ(A/H5N1)とは異なるブタ由来インフルエンザウイルス(A/H1N1sw1)のヒトへの感染事例を報告した。その後、メキシコ、アメリカで同様なインフルエンザ様疾患発生を報告を受けたWHOは国際的な健康危機としてパ

ンデミックフェーズを4月28日(現地時間27日)にフェーズ4、30日にフェーズ5へと引き上げた。これを受け、国は4月28日感染症法に規定する新型インフルエンザの発生を宣言し、国際便が発着する空港や港の検疫を強化した。

神戸市においても厚生労働省通知(健康発第0429001号、平成21年4月29日)に従い疑似症患者への対応、接触者等の健康観察および情報収集を推し進めた。

そのような状況下で5月15日(金)神戸市において疑似症患者の定義に合致しない(海外渡航歴も無い)男性が新型インフルエンザ(A/H1N1sw1)の陽性反応を示し、感染が否定できない事例が発生した。翌日、国立感染症研究所(以下国感研と略す)での確定診断で陽性が確認され、新型インフルエンザ(A/H1N1sw1)の国内感染の最初の報告事例となった。

神戸市環境保健研究所として取り組んできた新型インフルエンザ対策の検査体制および検査対応の状況について報告する。そして、今後の在り方に向け今回の新型インフルエンザ検査、情報発信等の対応能力、役割を検証し、課題を検討した。

B. 研究方法および結果

1. 新型インフルエンザ対策における神戸市環境保健研究所の検査体制整備について

新型インフルエンザ対策における神戸市環境保健研究所での検査体制整備については平成19年11月22日神戸市で実施した「新型インフルエンザ要観察例患者発生時対応訓練」に向けて従来のマニュアルを見直した。検査体制、検査マニュアル、連絡体制、試薬・機材等を確認し、危機管理の組織体制を再点検し、平成19年12月27日に「新型インフルエンザ発生時対応マニュアル」を作成した。その後の改訂整備状況と検査対象ウイルスおよび検査法等を表1に示したが、このマニュアルに従った訓練等の検証から平成20年3月31日マニュアルを改訂した。

平成20年8月11日から13日に国感研

村山庁舎において「高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス感染診断技術研究会」が実施され、担当者を派遣した。研究会の目的は地方衛生研究所(以下地研と略す)における感染診断の対応能力、診断検査技術、検査精度の向上に加え、検査の統一化、Type A/H、H5、N1遺伝子すべての同定技術(従来N1は感染症研究所での確定診断とされていた)の習得である。主な内容は講義として高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスについて、診断検査の概要、結果の解釈、問題点の解決、検査室の設定と検査精度管理、検体輸送など、また実習はConventional RT-PCRを用いたA/H5N1および季節性H1、H3の検査、リアルタイムRT-PCRを用いたA/H5N1検査について実施され、陽性コントロールも配布された。

環境保健研究所では技術習得セミナー等で研修内容の共有化を図った。また平成20年11月3日(土)に実施された全市における「神戸市新型インフルエンザ発生初期対策訓練」を通して手順を見直し平成20年12月および20年4月にマニュアルを改訂した。

さらに、ブタ由来インフルエンザウイルス(A/H1N1sw1)の発生を受けて急遽作成された国立感染症研究所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および試薬の提供を受けて、平成21年5月に以下のとおり改訂した。

- I 環境保健研究所対策本部立ち上げ手順
- II 新型インフルエンザ検体運搬手順
- III P3における新型インフルエンザ検体取り扱い手順

IV 検査手順

V 検体輸送手順

VI 検査等サポート手順

別添 1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染疑い検体検査マニュアル

別添 2 国立感染症研究所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

別添 3 イントラ接続ハードディスクへの接続方法

別添 4 検体ラベル作成方法

別添 5 検体送付に関わる NESID の作業

別添 6 検体の輸送における梱包方法について

別添 7 厚生労働省事務連絡「新型インフルエンザの診断検査のための検体送付について」

別添 8 国立感染症研究所事務連絡「地方衛生研究所からの病原体輸送にかかわる費用負担の開始について」

別添 9 検体送付に必要な情報入力フォーマット作成方法

2. 国内感染初発報告事例について

1) 検査の経緯

平成 21 年 (2009 年) 5 月 12 日、神戸市保健所を通してサーベイランス定点外の医院から、インフルエンザ迅速診断キットで A 型陽性となった検体について、季節性インフルエンザ亜型同定の検査依頼があった。同日午後 5 時前に搬入された検体は、迅速診断キットの残液 0.1ml 弱であった。検査担当者が主治医に直接連絡し、ウイルス分離ができないこと、

遺伝子検査ができるかどうか保証できないことなどコミュニケーションをとる中で、海外渡航歴はないが家族の心配を除くため、季節性インフルエンザ亜型同定とともに新型インフルエンザについても検査を行うことになった。ただし、現在発熱外来からの疑似症例の定義に合致する患者 (38℃以上の発熱、急性呼吸器症状、渡航歴あり等) を優先していることから結果は少し遅くなることも了解を得て、検査を開始した。検体搬入後すぐに RNA 抽出を行ったが、その直後に疑似症例の検体が持ち込まれ、当該検体の検査を一時中断した。その後も発熱外来からの疑似症患者や食中毒の検体を優先し、5 月 15 日になって、この検体の検査を再開した。

2) 検査方法および結果

Type A/M、H1N1sw1 (H1pdm, 新型インフルエンザ) 亜型、H1 (ソ連) 亜型、H3 (香港) 亜型の 4 遺伝子の検査を行うことにしたが、国感研からはソ連型、香港型のリアルタイム RT-PCR 法は示されていない。そこで、この 2 種類については東京都健康安全研究センターのプライマーとプローブ (化学生物総合管理 第 4 巻 第 1 号: 2008. 6 4-16、蛍光色素 FAM に変更) を採用し、国感研のマニュアル (H1N1 新型インフルエンザ 2009 年 5 月 ver. 1) をベースにして、4 遺伝子同時に検査を行った (事前の検討で 08/09 シーズンの季節性インフルエンザについてはこの方法で検出が可能であるとの結果を得ていた)。

結果は、表 2 に示したように Type A/M (+)、H1N1sw1 (+)、H1 (-)、H3 (-)

という渡航歴のない患者としては予期せぬものだったことから、すぐに再検査を行い、同時に国感研マニュアル（2009年5月 ver. 1）の Conventional RT-PCR 法も実施した。再度 Type A/M (+)、H1N1sw1 (+) の結果を得たことから、Conventional RT-PCR の産物からヘマグルチニン (HA) の部分塩基配列 314 塩基を決定し、BLAST で検索した結果、海外で分離されているインフルエンザウイルス A/H1N1sw1 の HA と 100% 一致し、陽性であることがほぼ確実となった。午後 9 時半、神戸市対策本部および厚生労働省に連絡し、厚生労働省からの指示で抽出した RNA を確定診断のため国感研に搬送した。翌 5 月 16 日、国感研で確定診断が行われ、陽性と確認され海外渡航歴のない国内感染患者からの初めての検出報告事例となった。

3. 神戸市環境保健研究所における検査対応および連携の状況について

研究所における新型インフルエンザ検査については、状況の変化に応じた体制をとった。その内容は概ねⅠからⅣの 4 期に分類される。Ⅰ期は 5 月 15 日から 5 月 24 日の 10 日間で発熱外来からの検体を中心に 24 時間対応した。Ⅱ期は 5 月 25 日から 6 月 7 日の 14 日間で一般医療機関での診察体制が調べられたことから検査検体も医療機関から搬入されるようになった。Ⅲ期は 6 月 8 日から 9 月初旬で全数把握と同程度の効果を得ることを目的として早期探知のための「新型インフルエンザ定点」を 48 医療機関から 344 機関に強化し、市内での集団発生が収束した後の散発事例、特に渡航歴のある患者と

その周囲の患者の早期発見による感染拡大防止を図った。Ⅳ期は 9 月中旬から現在で PCR 検査は入院サーベイランスとして重症者を対象に実施し、ウイルス分離、同定、ウイルスの性状変異や薬剤耐性等の病原体のサーベイランス体制を強化している。

Ⅰ期およびⅡ期では 5 月 15 日に H1N1sw1 ウイルスによる新型インフルエンザ患者を報告して以降、濃厚接触者のほか、マスコミ報道を受け、発熱相談センターを通さず直接発熱外来を受診する患者が急増し、それに伴って検査が急増した。

直ちに「神戸市環境保健研究所新型インフルエンザ検査対応マニュアル」に基づき、あらかじめ決めていた Stage2（化学部門を含めた全所員で対応）を発動した。すなわち検体運搬・連絡班、検体処理（不活化）班、RNA 抽出班、PCR 班を複数班編成するとともに、その他後方支援の各班を組織し、所員全員による 2 交代 24 時間の検査体制を実施した。また、5 月 16 日は土曜日であったが、すでに購入を決めていたリアルタイム PCR 機器を至急納入するよう業者に指示した。さらに、技術、時間を必要とする核酸抽出の自動化を検討した。そして、5 月 20 日からリアルタイム PCR 機器を 2 台追加し、3 台とし、5 月 22 日に核酸自動抽出装置 2 台を導入することにより、PCR 検査の迅速、効率化が図られ、対策本部、医療機関等での対応に極めて有効に機能した。

5 月 15 日から 8 月 31 日までの検査状況を図 1 に示した。検査件数は 5 月 21 日にピークの 209 件に達し、漸次減少した。

また、陽性率は急速に低下し、症例の定義に必ずしも一致しない患者も発熱外来に殺到した可能性が示唆された。陽性者は高校での集団発生の感染者が多く、市対策本部が実施した対策により5月17日をピークに次第に減少した。このことは、5月16日未明に対策本部が国の確定診断を待つことなく、研究所の陽性結果を受けて行った「学校等の休校措置」「神戸まつり延期」などの緊急措置が、感染の拡大防止に大きな効果をもたらしたと思われる。実際、6月11日から6月22日までの陽性者は国内感染者ではなく海外渡航歴者であり、現在進めている遺伝子の系統学的研究からも感染拡大が封じ込められたことが示唆される。

検査対応要員については対応した検査要員と検査件数の推移を図2に示した。Stage2での所内技術者に加え、検査件数の増加に備え5月19日に健康部生活衛生課に検査要員の応援を求め、5月21日から6月8日まで1日当たり6名の技術者（衛生監視員）の派遣を受け検査に対応した。5月22日には検査対応要員を最高の23名（2または3交代の延べ人数）としたが、図2に示したようにその後の検査件数の減少に伴いそれに見合った必要人員で対応した。発生以来24時間体制を5月29日には夜間検査を中止、6月に入り2日、8日に検査時間を縮小し15日に通常時間とした。マニュアルに基づき、Stage2（全所員対応）からStage1の（担当部）対応へ切り替え、研究所の他の業務を再開した。特に6月22日以降には、ウイルス分離、薬剤耐性遺伝子検査等を行う余力を生み出すため、PCR検査のアド

ホックグループを組織した。アドホックグループは11名で構成され、1日当たり10件以内であれば、検体の処理、RNA抽出、PCRまでを輪番制で1人が担当し、結果判定は管理職を含む複数で行うことにした。一方、研究所における行政検査等の対応は5月18日に食中毒、身体異常、苦情検査などの緊急検査を除く行政検査、一般依頼検査を休止したが、6月8日に一般依頼検査、6月15日に行政検査を再開した。

さらに、神戸市医師会の一般医療機関における診療体制に対応するため、医師会で採取された検体のPCR検査を神戸検疫所に応援を求めた。内容は医師会が設置した「新型インフルエンザ定点」から神戸市保健所がPCR検査を神戸検疫所に依頼し、その検査結果を医師会に報告するシステムを構築した。5月25日から6月6日の期間に31検体についてPCR検査を実施し、一般医療機関での患者発生動向の把握そして蔓延防止が図られた。

神戸検疫所との連携協力についてはSARS（平成15年）の発生を契機に「神戸港健康危機管理対策委員会」が神戸検疫所長を会長として組織され、国、兵庫県、神戸市、港湾関係機関等の参加で「神戸港における新型インフルエンザ水際対策実施要領」を作成するなど新型インフルエンザ対策について連携協力を協議、申し合わせを行っていた。5月18日（月）には検疫所長の呼びかけで神戸市環境保健研究所、兵庫県健康科学研究所が集まり、検査の状況と今後の対策を話し合った。そこで、今後増加が予想される検査に対応する試薬の供給不足の懸念に

対し、検疫所側から PCR 検査試薬の提供を受けその後の検査を円滑に進めることができた。

神戸市における新型インフルエンザ感染者の発症日別推移の状況を図 3 に示した。端緒が高校生でもあり感染者は高校生が多く、国内感染初発事例を報告した 5 月 16 日をピークに患者は減少したが、それ以前からの発症が認められた。さらに、5 月 5 日の患者は当初季節型インフルエンザの診断で対処されていたが、5 月 20 日に残っていた検体が持ち込まれ、検査の結果 H1N1sw1 ウイルス陽性となり、少なくとも 5 月の初旬から国内感染者の存在が示唆された。

C. 考 察

地研が求められている健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能保持、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準確保において、今回の一連の新型インフルエンザ検査、情報発信等がその対応能力、責務、役割をいかに実践したかが問われている。また、「感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針」においては国感研や地研間の役割分担を明確にしてそれぞれ連携を図ることが重要であるとされている。

近年の人員の確保、育成が極めて困難な社会情勢において、その陣容は平時の業務を遂行するための限りなく必要最小限にスリム化された中で、その求められたものは多大で能力の限界を超えるものであった。それは地研の位置づけが明確ではなく健康危機発生時における人員、機器整備といった体制整備の具体的な基

準がないことがこの現状をまねいている原因の一つといえる。

しかし、「新型インフルエンザ発生時対応マニュアル」の整備とマニュアルに従った訓練などの検査体制整備、関係機関との連携・支援、健康危機事象に対する所員の意識、自覚などそれぞれが相まって機能し、想定外かつ土日の展開、その後の予想を超える検査件数にもかかわらず大きな混乱もなく比較的スムーズに対応することができた。今後も継続した検証による体制整備の見直しと訓練が重要となる。さらに、今後はウイルス分離、同定、ウイルスの性状変異や薬剤耐性等のサーベイランス体制を強化し、的確な科学的情報を提供することにより適切な新型インフルエンザ対策が図られ、保健所、医療機関等との連携における検査、情報解析、提供等の再構築と学校、施設、市民等への正しい情報・知識の普及や啓発への支援が求められる。

「感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針」での役割分担や連携については平成 20 年 8 月の国感研での「高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染診断技術研究会」および平成 21 年 5 月 2 日に国感研病原体検出マニュアルおよび試薬の提供は、その後の検査の円滑な対応に大きく貢献した。さらに地研全国協議会からの要望もあり、平成 21 年 10 月に新型および季節型インフルエンザのリアルタイム PCR による同時試験法が国感研から提示され、新型および季節型一斉試験法の統一化が図られた。このことは今後のインフルエンザ発生状況の迅速な探知に極めて有効なツールとして活

用されると思われる。今後においても技術者の確保、育成や教育が不可欠となることから、国、国立研究機関および地研等それぞれの役割を一層明確にし、その推進が急務である。例えば検査体制整備においては国立研究機関による迅速適切な公定法の提示や研修の実施、地研は迅速、的確なフィールドサーベイを実施できる機能、能力の維持そして検査の精度管理向上の推進が必要である。また、国感研と地研とで組織する衛生微生物協議会などの有効な活用、そしてこの度の事例を検証し、その連携システムの再構築と各機関の役割、責務をより明確にし、法制化等による位置づけが不可欠な課題である。

連携においては地研全国協議会としての協力関係は近畿地域では平成18年に各自治体の首長による「健康危機発生時における近畿2府7県8市地方衛生研究所の協力に関する協定書」が締結され、地研の迅速かつ円滑な協力を図るシステムが確立されている。また、神戸検疫所とは「神戸港健康危機管理対策委員会」が組織され、国、兵庫県、神戸市、関係機関等の参加で事前に「神戸港における新型コロナウイルス水際対策実施要領」を作成するなど連携協力を推進していた。地研間では迅速な情報交換、神戸検疫所とはPCR検査試薬の提供や検査の援助が図られた。

神戸市医師会と連携した早期探知システムは患者発生の報道を受けて発熱外来はすぐに満杯状態となったため、厚生労働省と協議し、国の行動計画では「まん延期」に実施される一般医療機関での受

診を「まん延期に準じた状態」として了解を得た。このことをふまえ神戸市医師会との協議で、5月20日から医師会の一般医療機関における診療体制が調べられた。さらに同医師会においては、全数把握と同程度の効果を得ることを目的として早期探知のための「新型インフルエンザ定点」が設けられた。設置当初は100医療機関であったが、6月中旬には344機関に強化された（従来のサーベイランスでは、神戸市内のインフルエンザ患者定点は48医療機関、病原体定点は12医療機関）。この医師会と連携した早期探知システムは、市内での集団発生が収束した後の散発事例、特に渡航歴のある患者とその周囲の患者の早期発見に大変有効に働き、感染拡大防止に繋がっているものと思われる。

健康危機管理における連携協力については、一つの想定を設定し事前に協議し、対策を検討しておくことの重要性が改めて証明された内容と思う。このことは今後の対応、対策に大いに役立つ事例となった。

発生当初、発熱相談センターから発熱外来へ誘導された濃厚接触者等は、結果が判明するまで発熱外来に留め置かれていたため、PCR検査では正確さに加え迅速性が求められた。5月2日に国感研から提供されたリアルタイムPCR検査法が有効に機能し、従来法より時間短縮が図られたもののかなりの混乱を生じた。しかし、当研究所で逐次入力した検体情報および検査結果は、発熱外来の状況や、市内の発生地域をリアルタイムに反映する情報となった。これらが、市対策本部、医療

機関、学校等関係機関・団体、さらには国対策本部での対応における重要な情報の一つとなり、健康危機管理の上で、神戸市の Lead District としての役割の一端を担うことができたと思われる。5月22日に厚労省は自宅療養を認めるなどの基本的対処方針を示し、検疫方法も見直された。しかし、現場では国の行動計画やガイドラインとのギャップもあり、必ずしも迅速で確かな対応が図られたといえなかったこともあったのも事実であった。ウイルスの性状、毒性、罹患者の状態や感染力等々の確かな情報を踏まえた速やかな見直しと、発信が必要であり、今回の一連の事象、対応状況について検証することにより、今後の対策に有効に機能することを期待する。

D. 結 論

1. 平素よりの地道な感染症サーベイランスへの対応、取り組みが有効に機能し、国内感染初発報告事例に繋がった。さらに PCR 検査が予想外の結果を示した時点で多くの所員がそれぞれの専門を駆使し、分担して遺伝子検査、そして塩基配列決定などの確認検査を即座に進め、1日で陽性が否定できないことを確定した。その後の学校等の休校措置、神戸まつりの延期など迅速な緊急措置が感染拡大防止に大きな効果をもたらした。

2. 想定外かつ土日の展開、その後の予想を超える検査件数にもかかわらず大きな混乱もなく比較的スムーズに対応することができたことを検証すると、事前の体制、マニュアル整備と訓練、関係機関との連携・支援、健康危機事象に対する

ミッションの明確化、当該分野担当を超えた組織力、意識徹底などが有効に機能したことが考えられる。

3. 地研が求められている健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能保持と試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準確保および感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針での国感研や地研間の役割分担、連携において、今回の一連の新型インフルエンザ検査、情報発信等がその対応能力、責務、役割をいかに実践したかが問われているが、平成20年8月の国感研でのインフルエンザウイルス感染診断技術研究会および平成21年5月2日に国感研病原体検出マニュアル、試薬の提供は地研における人材確保、育成および試験法の統一化、精度管理に大きく貢献し、その後の検査の円滑な対応が図られた。しかし、国、国立研究機関および地研等それぞれの役割、必要な人材、機器や連携システムなどが機能し、対応できたかについては今後の在り方に向けて十分検討される必要がある。したがって、今回の事象を再度検証し、必要な法的整備を含め明確な位置づけと各機関の役割そしてシステムの再構築が不可欠な課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

田中敏嗣、新型インフルエンザ検査チーム. 神戸市における新型インフルエンザ検査の対応について. 臨床とウイルス 38 (1) :99-105, 2010

2. 学会発表

- 1) 森 愛、奴久妻聡一、秋吉京子、須賀知子、岩本朋忠、飯島義雄、貫名正文、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）：神戸市におけるブタ由来A型インフルエンザウイルス(H1N1)国内感染発報告事例とその後の集団発生について、共同研究者：新型インフルエンザ検査チーム、第57回日本ウイルス学会学術集会、都市センターホテル、2009年10月25-27日
- 2) 秋吉京子、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）：神戸市における新型インフルエンザの検査状況について、共同研究者：須賀知子、森 愛、奴久妻聡一、岩本朋忠、新型インフルエンザ検査チーム、第68回日本公衆衛生学会総会、奈良、2009年10月21-23日
- なし

F. 知的所有権の取得状況

表1 神戸市環境保健研究所における新型インフルエンザ検査体制の整備状況等

年	月	項目	検査対象ウイルスおよび検査法等
2007	11	訓練	新型インフルエンザ要観察例対応訓練
2007	12	マニュアル作成	A/M, A/H5 (Conven. RT-PCR 法) A/H1, A/H3 (RT-Lamp 法&Conven. RT-PCR 法)
2008	8	感染診断研究会	A/M, A/H5N1 (Conven. RT-PCR 法&リアルタイム RT-PCR 法)
2008	11	訓練	新型インフルエンザ発生初期対策訓練
2008	12	マニュアル改訂	A/M, A/H5N1 (リアルタイム PCR 法) A/M, A/H5, H1, A/H3 (Conven. RT-PCR 法)
2009	5	マニュアル改訂	A/M, A/H1N1sw1, A/H5N1 (リアルタイム RT-PCR 法) A/M, A/H5, A/H1, A/H3 (Conven. RT-PCR 法)

表2 国内感染初発報告事例の検査結果

検査法	TypeA/M	H1sw1(新型)	H1(ソ連型)	H3(香港型)
リアルタイム PCR 法 (1回目)	陽性	陽性	陰性	陰性
リアルタイム PCR 法 (2回目)	陽性	陽性	not exam.	not exam.
Conventional RT-PCR 法	陽性	陽性	判定不能*	陰性

*弱い陽性バンドを含む複数のバンドが認められたため、判定不能とした

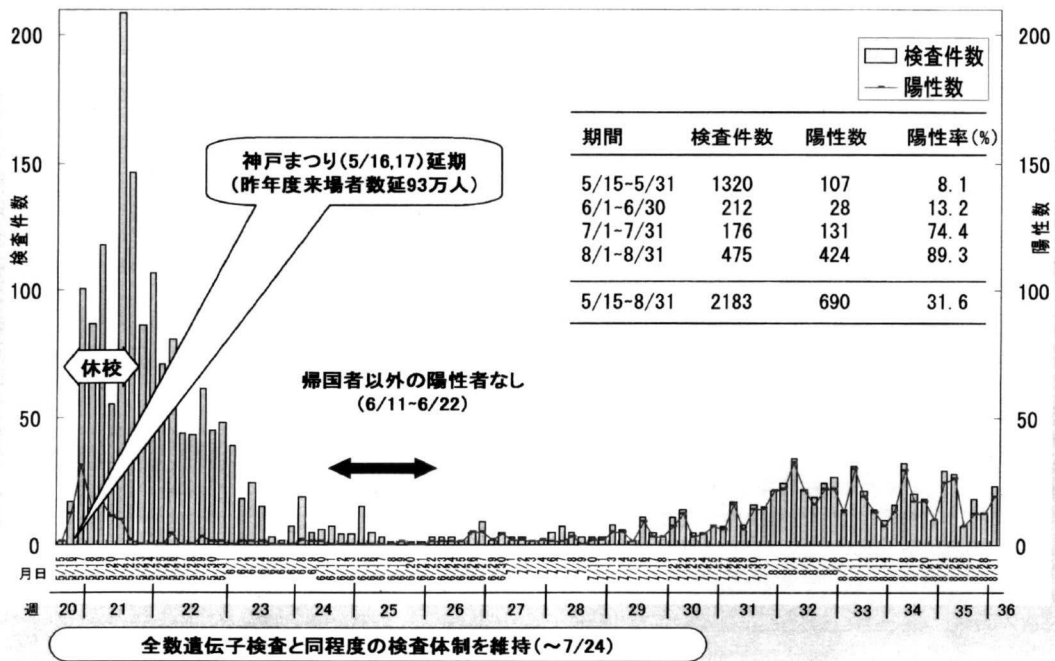


図1 神戸市における新型インフルエンザ検査の状況 (5/15-8/31)

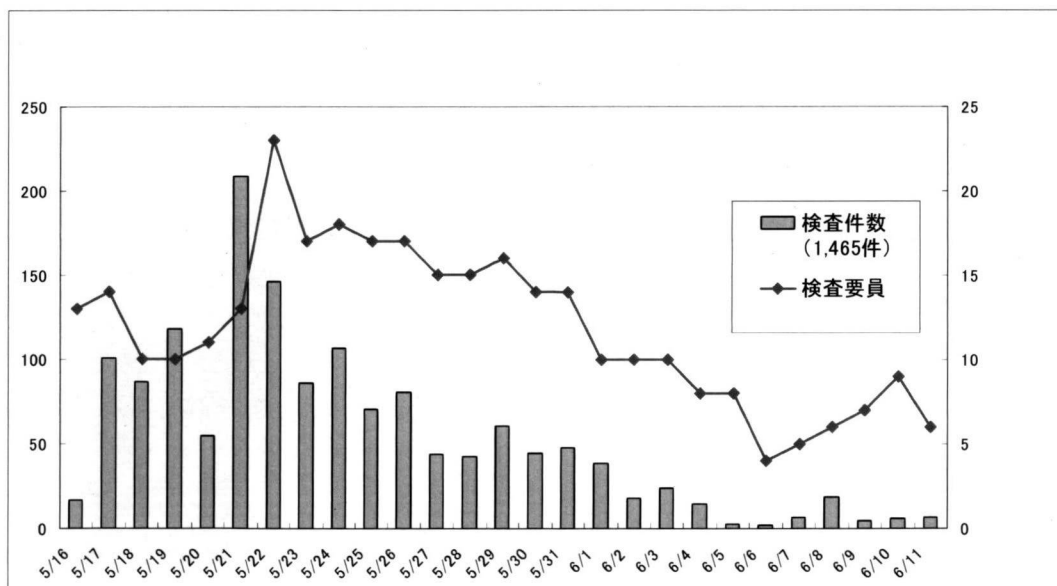


図2 神戸市における新型インフルエンザ検査要員の状況 (5/16-6/11)

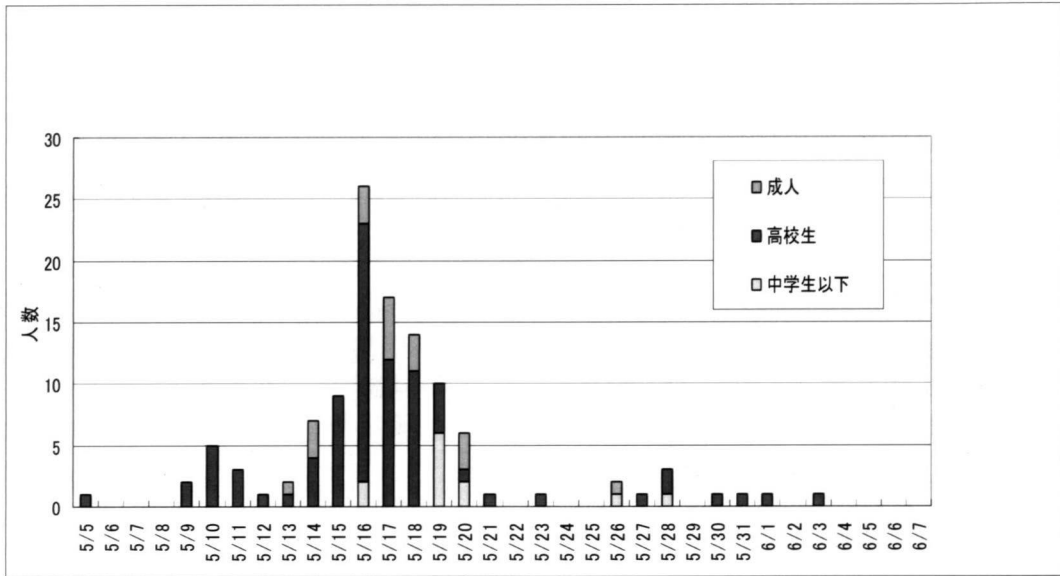


図3 神戸市における新型インフルエンザ発症日による推移

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の県内侵入に対する検査体制構築の検証とウイルス性状解析:
特に“健康危機発生時における近畿2府7県地方衛生研究所の協力
に関する協定”を踏まえた検査協力の実施

研究協力者 北堀 吉映 (奈良県保健環境研究センター)
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 岡山 明子 (奈良県保健環境研究センター)

研究要旨:本研究は、新型インフルエンザの県内侵入に対して、奈良県保健環境研究センターがとった初期の検査体制構築の総括と、今後の健康危機管理体制構築に関する課題の提唱、更にウイルス性状サーベイランスへの移行に伴いウイルスの遺伝子変化を検討した。初期対応について、「患者情報用紙の事前配布および簡易キット添付の依頼」あるいは「人員配置と作業区分の整備」についての検証からは、検査体制の構築には正確な患者情報の収集と担当部所等における情報の共有化、人的支援を含んだ機能的な作業環境の整備が重要であることが明らかとなった。また、「地方衛生研究所の協力に関する協定」の実施では、ダブルチェックを含んだ検査精度確保のための協力、緊急時の事務手続に関する簡素化等を盛り込んだ協定書の見直しの課題が浮かび上がった。ウイルス性状サーベイランスでは、異なる期間(全数把握期間と入院サーベイランス期間)に採取されたウイルス株のHA1領域(349bp)の配列を比較しアミノ酸置換を伴わない変異であったが2ヶ所に点突然変異を見出した。これは、ウイルス遺伝子変異が生じている可能性を示唆させる結果であった。

A 研究目的

2009年4月22日、米国疾病管理予防センター(CDC)はメキシコと米国との国境周辺のカリフォルニア、テキサス両州において複数の小児がブタ由来インフルエンザに感染していることを公表した。小児はブタとの接触歴がないことから、ヒトから感染したものと考えられた。その病原体は、同年3月から4月上旬にかけて、メキシコ¹⁾で多くの死亡者を出しているインフルエンザ様疾患の病原体²⁾と同一である可能性が指摘され、一挙に国際的な緊張が高まった。また、4月29日にはニューヨーク市内の高校で大規模な集団感染の発生が報じられ、その時点でカナダ、英国を含む数カ国(スペイン、ドイツ、ニュージーランド、イス

ラエル、オーストリア)に感染は広がっていた。わが国では、世界にウイルス感染の広がりがみられたころから空港ならびに船舶での水際対策の様子が連日報道されるなど国民の強い関心事となった。

このような状況下で、5月16日に神戸市の高校生が国内初の感染者と確認された後、大阪府、滋賀県、京都府など近畿地区に拡大し、やがて全国に広がった。流行は10月から急激に拡大したが12月中旬から減少に転じ、2010年1月にはやや落ち着きを見せた。

本報告の前半では、奈良県保健環境研究センター(研究センター)の新型インフルエンザに関する初期検査体制の構築過程において、人員確保と

作業区分の整備、患者等の情報収集および健康危機発生時における近畿2府7県地方衛生研究所の協力に関する協定“を踏まえた検査協力要請の経緯について有効性検証と問題点の考察を述べ、後半ではウイルス流行の疫学的検討およびウイルス性状解析の結果について記載する。

B. 研究方法および結果

新型インフルエンザの初期検査体制構築の経緯

1. ウイルス検査体制の構築

1) 初期対応

5月1日に横浜市で疑似症例(カナダからの帰国者:最終的には季節性Aソ連型と判定)が発生し、5月2日には国立感染症研究所(感染研)から地方衛生研究所等へ病原体検査マニュアルが電子メールで送付された。新型特異的プライマーなどの検査試薬(プローブ、陽性コントロールRNA)等は5月4日までに届けられた。

研究センターでは、当時保有していた唯一のリアルタイムPCR機(ABI PRISM 7000)が遺伝子組み換え食品検査業務に使用されていたため、RT-PCR法のみで検査を開始した。リアルタイムPCR法による検査は、およそ2週間後の5月22日から採り入れた。当初のRT-PCR法では新型、A共通、香港型およびソ連型の4項目の検査を実施したが、リアルタイムPCR法への移行後は新型およびA共通の2項目の検査を実施した。

2) 患者情報用紙、検体採取キットの事前配布

奈良県では、“患者情報用紙”による疑似患者情報収集が有効であったことが特筆に値すると思われる。この“疑似症例患者情報用紙”(図1)は、医療機関名、主治医名、患者氏名、年齢、性別、住所、連絡先、検体種別(咽頭ぬぐい液、鼻汁)、検体採取日、簡易キットの診断結果、臨床症状(発病日、発熱の有無)および渡航歴などを医師が記入するものである。この様式は2008年の11月ごろにH5N1鳥インフルエンザウイルスの発生を想定して当センターが作成し保健所に配布したもので、今回の検査開始当初から利用された。この様式により、医療現場からの情報伝達がスムーズ

に行われ、高い有効性が確認された。また、初期に検体採取キット(ハンクス液、綿棒、検体採取および保存方法を記載した資料など)を十分に準備し各保健所に配布したことも、その後の対応に有益であった。

3) 人員配置と作業区分の整備

ごく初期の検査体制はウイルスチーム職員3名が作業区分に関係なく、入り乱れ対応する場面がしばしば見受けられたが、やがて個々の職員個人の得意業務と役割の分担とが結びつく状態が出来上がった。検査の主要部は遺伝子増幅であることから、コンタミネーションには最大の注意を払ったが、数度のトラブルを経験した。コンタミネーションを防止する対策として、患者検体のサンプリング、PCRの試薬調製と陽性コントロールの調製は別々の安全キャビネットで行うこと、また、各作業に従事する職員も完全に専門化する体制を整備し、その後も維持している。図2には経験から得られた、検査の流れと必要最低限と考えられる人員配置数を示した。

4) 他部署からの人的支援

— 4名の臨時増員と細菌チーム3名の兼務 —
5月中旬には24時間オンコールによる検査体制を強いられたことでウイルスチーム3名では対応困難で、リアルタイムPCRあるいはRT-PCRを扱った経験がある職員の支援を求めることとした。そこでウイルスチームでの勤務経験がある職員を中心に支援を要請し、5月21日に環境部局から1名、25日に農林部局から1名、更に細菌チームからの1名を臨時に増員した。また、ほぼ同時期に中核市である奈良市保健所から臨時的な職員2名が派遣された。県内の感染者増加が著明になった7月初旬以降は、更に細菌チームの2名に兼務辞令が発令され、全数把握体制が終了した7月末までの検査にあたった。現在は、他部所からの支援は解消されたが細菌チーム2名の兼務は継続している。

このように人員配置は、今後の健康危機管理体制構築を考える上で貴重な経験となった。医療機関の簡易キット偽陽性判定や緊急検査依頼の多発

から検査数が想定を上回るものとなり、職員は深夜を問わない長時間勤務を余儀なくされた。より早い段階で検査のための人員確保と検査以外の人的支援（検体受付、結果の報告書作成・発信など直接検査業務に関係しない業務）を要請し、総合的な検査応援体制を整えるべきだったと考えている。

2. 患者確認までの1カ月間に対処した事柄

渡航歴のない神戸市・大阪府の高校生が新型コロナウイルスに感染していることが確認された5月16、17日以降、近畿地方ではマスク姿が目立ち、社会全体がやや混乱した状況となった。研究センターでは5月の検査開始以降、県内6ヶ所（奈良市保健所を含む）の保健所から1日に数件から10数件の検体が五月雨式に搬入され、連日深夜におよぶ検査が行われることとなった（図3）。この長時間にわたる検査は担当者に緊張の維持を強いるものであった。

1) 簡易キットと遺伝子検査結果の乖離と、キット添付の依頼

奈良県は流行が確認された大阪府のベッドタウンとして隣接し、いつウイルスの県内侵入があってもよい状況であった。標的を国内疑似患者に絞った5月15日から奈良県初発患者が確認された6月15日までの1か月の間に簡易キット陽性47例を含む108例の遺伝子検査を行った。この間、近畿地区の患者発生状況は5月16日神戸市で国内初の患者を確認、翌日の17日は大阪府で、その後20日に滋賀県、21日に京都市、27日に和歌山市と次々に感染者が確認された。当時は、簡易キット検査の陽性報告に対し、インフルエンザウイルス遺伝子検査は陰性という乖離状態が見られた。そこで、RT-PCR法およびリアルタイムPCR法の検査手法の確認、検体採取法の技術的統一、更には、他の地研から陽性患者の検査情報収集など行い、様々な点について再検討を重ねた。奈良県を囲むように患者が発生しているなかでの陰性報告が続いたことから、県が情報を隠しているのではないかとの憶測を呼び、マスコミから取材を申し込まれるなど、関係者の疲労はピークに達し

た。

このような中、我々は簡易キット検査の陽性報告に疑問を抱き、5月21日に県新型インフルエンザ対策室を通じ“検体への簡易キット添付”（図4）を医療現場に依頼した。添付されたキットは微弱的な反応が大半で、なかにはA型、B型ともに微弱的なバンド（図4）がみられるなど、判定者のオーバー・ダイアグノーシスの可能性が示唆された。結果として添付キットは遺伝子検査にとって重要な情報を与えることが明らかとなった。添付された簡易キットは、Severe(S)、Moderate(M)、Weak(W)、Most weak(MS)の4段階に分類し、参考情報として記録した。県内での発生が確認された6月15日以降の感染者増加時期には微弱(MS)なものは見られず、MあるいはS判定のみとなった。この事からも初期の陽性報告にはオーバー・ダイアグノーシスが含まれていたと推察される。

2) “健康危機管理発生時における近畿2府7県地方衛生研究所の協力に関する協定書”を踏まえた検査協力の実施

平成18年8月に、近畿2府7県の地方衛生研究所を有する自治体（大阪府、京都府、兵庫県、奈良県、和歌山県、滋賀県、三重県、福井県、徳島県、大阪市、京都市、堺市、東大阪市、神戸市、姫路市、尼崎市、和歌山市）では、健康危機が発生し当該自治体の衛生研究所のみでは対応が困難な場合、協力が迅速かつ円滑に図れるよう協定を締結している。

今回、神戸市の国内初発患者の確認から、奈良県での患者確認までの大よそ1ヶ月間は、①本県を囲むように患者発生地域が広がった、②患者情報として簡易キット検査の陽性例が増加したにも拘わらず、感染者が確認されない（図5）などの状況であった。このことから、我々が実施している検査は精度よく行われているのか？ 見落としは無いのか？ など職員自身が自問自答しつつ検査過程を再点検すると同時に、陽性患者の検査経験のある大阪府、滋賀県、京都市、堺市、神戸市などの地方衛生研究所に検査所見などの詳細な情

報を収集する日々が続いた。5月18日から20日(18日:16例、19日:10例、20日:14例)の間には搬入された40例中13例が簡易キット検査陽性患者(患者情報用紙の簡易キット陽性の報告でキットの添付はなし)で、臨床的には39℃台の発熱が3例、上気道炎と診断された患者が8例とウイルス感染を疑われる症例ばかりにも拘わらず結果はすべて新型インフルエンザ陰性で、わずかに1例に季節性A香港型ウイルスが確認されただけであった。更に、5月26日には(7例搬入)には同様に簡易キット陽性、39℃台の発熱、上気道炎等の患者検体が2例あったが遺伝子検査結果は陰性となったという状況であった。

このように、簡易キット陽性報告と遺伝子検査結果の乖離から、職員にも焦りが生じて精神的にも、肉体的にも疲れていた頃であった。当時、衛生微生物技術協議会の理事を務めていた堺市衛生研究所の田中智之所長に我々の不安な心の内を伝え、簡易キット陽性症例のダブルチェックを依頼したところ、堺市も連日多くの検体が搬入される状態であったにも拘わらず快く引き受けていただいた。その結果我々の検査結果は正しかったことが実証された。このダブルチェックは、一時的な安堵感が得られた検証行為であったが、今振りかえると検査に必要な精度管理をあの慌ただしいなかで行ったという意味で大変貴重なチェックであったと高く評価されるべきであると感じた。近畿2府7県の協力に関する協定書には、試験検査等の実施、試験検査職員の派遣、施設、設備および機器の使用又は貸与などの協力が規定されているが、自県の検査に追われる状況では、我々の事例の様に精度管理的な技術サポートが有益であった。更に、近畿圏内のほぼ全域にわたる流行では、それぞれの府県が自県の検査に追われこの協定がうまく機能しないことも想定される。今後、協定に規定された事項以外の事態にも対応できるよう協議されることを望む。

3. 奈良県初の感染者の確認

初発の感染者の検体は、6月15日17時25分に研究センター搬入されたもので、患者は奈良市

内の民間病院で受診した23歳の女性であった。添付された簡易キットは明らかに陽性像を示し、臨床的にも39.0℃の発熱、咽頭痛を呈しており感染を強く疑う患者であった。検査は速やかにリアルタイムPCRとRT-PCRを同時に行い、約3時間後にはリアルタイムPCRで明らかな遺伝子増幅が観察された。RT-PCRは、翌日16日に遺伝子産物の電気泳動を行い目視で適正なサイズの遺伝子断片の確認をおこなった。最終判定はリアルタイムPCRとのダブルチェックのかたちで陽性確認を担当職員全員で行い、新型対策本部への正式な報告は6月16日午前中で、患者は奈良県立医科大学付属病院感染症センターに入院となった。

ようやく陽性患者の遺伝子検査を経験したことで、これまでの様々な操作上の懸念が一挙に解消した。その達成感と安堵感は今もありありと思いきこすことができる。周囲近県で感染患者が確認され本県のみが取り残されたような状況では大変心細く、日々、不安な状態であった。課題の一つとして感染研による、陽性検体の遺伝子検査データ(リアルタイムPCR、RT-PCR)等の積極的な開示を強く求めるものである。

県内発生 of 新型インフルエンザの疫学および分子生物学的検討

1. 新型インフルエンザの流行疫学

研究センターで陽性確認を行った症例数は、全数把握期間112例、クラスターサーベイランス117例、入院サーベイランス317例である。近畿地区から始まった感染拡大は、概ね6月末をピークとし、その後減少に転じ、再度10月初旬から急激に流行拡大し全国的な流行となり、明らかな二峰性の流行形成がみられた。今回、県内で確認した感染者の年齢分布について10代および10代未満に注目し、疫学的検討を行った。

1) 患者年齢分布(図6、7、表1)

5月初旬から7月24日までの全数把握期間に確認された112例の患者の年齢分布を表1、上段に示した。感染者の分布は、10歳代が53例47.3%、20歳代が32例28.6%、30歳代が9例8.0%と続き、中年から老年層と年齢が増すごとに感染率は低く、

好発年齢層は10代から20代であった。また、クラスターサーベイランス（表1、中段）（7月25日から8月25日）で確認された117例で最も多数を占めた年代層は、10代で85例72.6%と全数把握期と同様な傾向であったが、20歳代は明らかに減少し7例0.9%で、30歳代以上の年齢層においても一様にさらに減少傾向が観察された。しかし、全数把握時には見られなかった10歳未満の増加傾向が見られた。この傾向は、入院サーベイランス（表1、下段）（8月26日から12月14日）期間の患者で堅調に観察され、63.7%（202例）の感染者が10歳未満であった。図6では県内で確認された全患者の、上段が10歳代、下段が10歳未満の患者発生推移を示すもので早期の流行は10歳代が主体で、また入院サーベイランス期の全国的流行拡大期では10歳未満が主体であったことが観察される。

2) ヘマグルチニン領域の遺伝子配列解析

流行の主体が10歳代と10歳未満とでは明らかに異なることから、ヘマグルチニン領域（HA1）の遺伝子解析を行い、その差異を解析した。解析方法は感染研が示したH1F1とH1R1プライマーで遺伝子増幅を行い、その後に産物の配列判読を行った。10歳代から5株、10歳未満から3株を解析し結果は図8に示した。10歳代のNara/sw238/2009株と比較し、10歳未満（Nara/sw519/2009、Nara/sw546/2009）では2箇所の点突然変異（AGG→AGA、GGT→GGC）が観察されたが、アミノ酸置換を伴う変化ではなかった。しかし、10歳代の5株は全てが検索した領域で同一配列であったが、10歳未満から解析された株では3株すべてで変異が認められ流行の初期と入院サーベイランス期のウイルスでは軽度ながら変化が生じていることを示唆させる結果であった。

C. 考察

奈良県保健環境研究センターの検査体制構築の検証および今後の課題

今回の新型インフルエンザはメキシコで発生し、瞬く間に多くの国々と地域に広がりを見せたなか、我々と同じ様に、多くの地方衛生研究所ではウイ

ルス検査体制の構築は検査を実施しながら整えるという状態ではなかったかと思っている。確かに、素早い感染研からの検査マニュアルの提示はあったものの、人員確保、検査の流れに沿った人員配置、患者情報収集などなど、実に多くの様々な問題に直面しながら何とか対応することができたという状況であった。特筆すべき事柄として、近畿2府7県地方衛生研究所の協力に関する協定が既に締結されていたことは、極めて重要なことで今回の様な広域的流行のなかでの一部とは言え検査協力関係が機能したことは今後の危機管理における対応に有意義であると考えている。

幸いウイルスは弱毒性ウイルスであったが、最も危惧される高病原性鳥インフルエンザに由来した新型ウイルスの発生・侵入に備え、今回明らかとなった数多くの問題点について、地方衛生研究所、県対策本部、保健所、医師会等がそれぞれ今回の対応を総括・検証し、新たな対応策を講じる必要性を強く感じている。例えば、地方衛生研究所と感染研との連携では定期的な技術研修、情報発信などをさらに推し進めることである。現在、実施されている近畿地域ブロック内での模擬訓練、定期的意見交換などを継続維持し、更には周辺ブロック（中国・四国ブロック、中部東海ブロック）とも定期的意見交換を行い、総合的な見地に立って健康危機管理体制の整備を国、感染研、地方衛生研究所、感染症情報センターが連携を密にし緊急時の検査体制を整備することが大切な事であると改めて認識させられた結果であった。

ウイルス性状解析

流行の初期と入院サーベイランス期におけるウイルスのHA1領域を比較することで、新型インフルエンザのウイルス性状を解析した。標的としたヘマグルチニン蛋白は感染に関与する領域で、今回の解析はその一部であるがわずかな遺伝子変異を確認した。しかし、いずれの遺伝子変異もアミノ酸置換を伴うものではなかったが変異が入院サーベイランス患者から観察されたことは重要と考える。