

患者が多数報告された。

我々は、過去 3 年間にわたり、富山県における非流行期のインフルエンザサーベイランスを行い、その調査方法等についてこれまで検討してきた。今回は、pandemic (H1N1) 2009 後の状況の中で、これまでと同様の方法でサーベイランスを行ったので、その結果を報告する。

## B. 研究方法

非流行期のインフルエンザ患者サーベイランスは、感染症発生動向調査による県内 48 定点医療機関からの患者報告数を利用した。病原体サーベイランスは、病原体定点として県内の感染症発生動向調査の定点から 11 か所の医療機関（内科 2 か所、小児科 9 か所）に調査協力を依頼した。病原体定点の選定に際しては、県内全域を網羅するよう配慮し選出した。調査期間は、2010 年 8～11 月（第 31～48 週）とした。検体は、病原体定点を受診した患者でインフルエンザ様の症状があり、かつ、迅速診断キットで陽性になった患者から鼻腔拭い液を 1 人 1 検体ずつ採取した。検査は国立感染症研究所から提示された「病原体検査マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009 年 5 月 ver.1)」及び「病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ (2008 年 8 月改定)」を元に遺伝子検査 [リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) および One-step RT-PCR] を行い、インフルエンザウイルスの遺伝子を検出・同定した。検出対象インフルエンザウイルスは、次のとおりである。

### 1. 新型インフルエンザウイルス

### AH1pdm (AH1pdm)

2. A ソ連型インフルエンザウイルス (A ソ連型)
  3. A 香港型インフルエンザウイルス (A 香港型)
  4. B 型インフルエンザウイルス (B 型)
- 一方、ウイルス分離用として、検体を MDCK 細胞に接種して、ウイルス分離を試みた。

## C. 研究結果

調査期間中、感染症発生動向調査による県内のインフルエンザ患者報告数は 19 人で、10 か所の患者定点から報告された。9 月下旬～10 月上旬（第 39～40 週）に数人報告されたが、ほとんどは 11 月以降の報告であった。報告のあった定点には地域的な偏りは無かった。

病原体定点での検体採取は、9 月下旬～11 月初旬にかけて、2 か所の病原体定点（いずれも砺波市）にて鼻腔拭い液 5 検体が採取された。この内、インフルエンザウイルスが検出されたのは 1 件であり、検査の結果 AH3 型であった。

## D. 考察

富山県における非流行期のインフルエンザサーベイランスは、今年で 4 年目になる。これまでの結果では、非流行期のインフルエンザの動向は、11 月上旬から低いレベルで患者報告が続く傾向があり、また、同一県内であっても地域によって流行するウイルス亜型が異なることが確認されている。調査方法は、流行期のサーベイランスと同じく定点把握で行ったが、患者報告数が少ない上に、散発的に

発生する集団感染に際しては、早期に患者を採知するには限界があることが示唆された。そのため、現行の定点把握によるサーベイランスに追加して、学校での発生状況等を把握するシステム等を組み合わせることが必要と考えられた。

また、2009年には pandemic (H1N1) 2009 も経験している。富山県では、6月28日に全数報告として最初の患者が確認され、その後全数報告が中止となる7月24日まで、散発的に患者報告があったが、7月中は患者定点からの報告はほとんど無かった。しかし、8月に入ると散発的に患者が報告されるようになり、しばらくはくすぶり流行の期間が続いた後、10月中旬から本格的な流行が始まった。この時の調査期間は8～11月と設定していたが、10月中旬には既に本格的な流行期に入っていた。インフルエンザの流行期間を予測することは困難であり、非流行期から流行期へとどのタイミングでどのように対応を切り替えるかが課題として挙げられた。

今回は、pandemic (H1N1) 2009 後の初めての調査となった。2009年同様、夏季においてもインフルエンザの報告が増えることが予想されたが、結果として、夏季の報告はほとんど無く、11月に少数報告されただけにとどまった。

病原体定点では、調査期間中、鼻汁拭い液を5検体採取された。医療機関における迅速診断キットの結果では、A型が1件、B型が4件であり、ウイルス分離の結果は、キットA型陽性からはAH3型のインフルエンザウイルスが検出されたが、キットB型陽性の検体からはウイルスを

検出することが出来なかった。

今回の調査結果は、過去の季節性インフルエンザの非流行期の状況に類似していた。そのため、定点把握で行うサーベイランスでは早期に患者を把握することに限界があることなど、過去の調査で課題として挙げられたことが、今回も課題となった。

今後はこれまでの課題点の改善を検討し、より効果的・効率的なサーベイランス体制のあり方について検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

インフルエンザの非流行期においても患者発生を的確に採知するために、富山県において2010年8～11月にインフルエンザサーベイランスを行った。今回は2009年に発生した pandemic (H1N1) 2009 後の初めての調査となったが、過去の季節性インフルエンザの非流行期の状況に類似していた。これまでの調査結果同様、定点把握によるサーベイランスには限界があるという課題は引き続き残っており、学校での発生状況等を把握するシステム等を組み合わせるなどの組織的な取り組みが必要であると思われた。課題点の改善を検討し、今後もより効果的・効率的なサーベイランス体制のあり方について模索する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報 無し。

G. 学会発表等 無し。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

研究報告書

*Legionella* 属菌に関する病原体サーベイランスに関する研究

研究分担者 倉田 毅 富山県衛生研究所長

協力研究者 磯部 順子

研究要旨 2010年に富山県で報告されたレジオネラ症患者は23名であった。これらの内、患者からレジオネラ属菌が分離されたのは2名のみで、他はすべて尿中抗原検査で診断されていた。いずれも、感染源は特定されていない。報告される患者の疫学情報がきわめて少なく、担当医あるいは関係者がこれらの情報を簡単に記載できる報告書となるよう、フォーマットを改良する必要があると思われる。

A. 研究目的

レジオネラ症患者の発生状況を監視し、その動向を把握することでレジオネラ症の予防対策のために必要なサーベイランスの方法を考察する。レジオネラ症では、その原因菌である *Legionella* 属菌の病原性や感染機序が明らかになっていない。その解明のために患者から分離される菌株を収集するシステム等について検討し、病原体サーベイランスを稼働させる。

B. 研究方法

富山県における患者発生動向と病原体サーベイランス、感染源サーベイランスを比較することで、それぞれのサーベイランスの稼働状況を把握する。また、病原体を効果的に収集するために、ネットワークを構築する。

C. 研究結果

【患者発生動向】2010年に富山県で報告されたレジオネラ症患者は23名で、集団発生はなかった。その内訳は男性が21名、女性が2名で、男性が9割以上を占め、男性に多い傾向が続いている。報告のあった医

療機関は14で、2005年からの6年間で最も多かった。とりわけ、2009年、2010年の2年間は県の東部地域の医療機関からの報告が多かった。感染経路については、2010年に報告された23例はいずれも特定されていない。聞き取り調査により、10名が温泉あるいは銭湯等浴用施設を利用していることが判明したが、いずれも散发例であり、関連性の特定には至らず、推定にとどまっている。これ以外の患者については、スポーツ施設のプールあるいは浴用施設を利用していた人が1名（推定）、潜伏期間内にそのような浴用施設を利用していないことが明らかな患者が2名、残る10名は情報の記載がなかった。報告書には温泉などの浴用施設の利用に関する情報のみ記載され、患者の行動に関するその他の情報がほとんど記載されていない。感染源は浴用水以外の場合も考えられることから、より広い観点からの情報収集が必要である。また、レジオネラ症が全数把握対象疾患であることを理解していない医療従事者がいることが明らかとなった。

【病原体サーベイランス】このような患者発生状況の中、患者から *Legionella* 属菌が分離されたのは 2 例のみで、いずれも *L.pneumophila* SeroGroup1 (SG1) であった。このうちの 1 例で患者が利用した浴用施設から *Legionella* 属菌が検出されたが、バルスフィールド・ゲル電気泳動による分子疫学的解析をおこなったところ、患者から分離された SG1 と同一クローン株は認められなかった。他の 1 例では、浴用施設利用がなく、感染経路は不明である。

【感染源調査】患者発生の報告に基づき、関連性が疑われる浴用施設について、浴用水中の *Legionella* 属菌による汚染実態調査したところ、その多くから *Legionella* 属菌が検出された。しかしながら、患者からの分離株がほとんど得られていないため、分子疫学的解析など、感染源の特定に活用できない状況にある。また、感染源調査とは別に、温泉や銭湯等の公衆浴用施設について、富山県内 17 施設 45 浴用水を対象として *Legionella* 属菌による汚染実態調査をおこなったところ、9 施設 14 浴用水で *Legionella* 属菌が分離された。この結果は、浴用水が依然レジオネラ症の感染源となりうるリスクを抱えていることを示している。

#### D. 考察

これらの結果から、レジオネラ症のサーベイランスに関するいくつかの課題が明らかとなった。一つは 5 類感染症であるレジオネラ症が全数把握対象疾患であることを理解していない医療機関があり、すべてが報告されていない可能性が浮き彫りになった。一つは、以前から指摘されているとおり、患者から病原体が分離されていないことで

ある。これにより、感染源が特定されない事例が多い。一方、レジオネラ症においては解明されていないことが多く、患者から分離される病原体と疫学情報は極めて重要となっている。しかしながら、現在発生動向調査に使用されている報告書の形式は、自由な形式でいろいろな情報を記載することが可能であるある半面、サーベイランスとして、どのような情報を必要としているかが報告者に伝わりにくい形式である。したがって、現在は保健所の担当者が感染源調査のための聞き取り調査が重要な情報となっている。しかも、この情報は感染源疑い施設から *Legionella* 属菌が分離された場合のみ、菌株に付随して収集され、菌株の分離がない場合はほとんど情報がないに等しい状況である。したがって、担当医あるいは関係者が簡単に情報を記載できるよう、報告書のフォーマットを改良する必要があると思われる。サーベイランスとして必要な項目をわかりやすく記載し、チェックをいれるだけの形式にするなど、報告者の立場にたった工夫が必ず必要である。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

パンデミック(H1N1)2009 インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性株サーベイランスに関する調査研究

研究分担者	小淵正次	富山県衛生研究所・ウイルス部
研究協力者	安孫子千恵子	山形県衛生研究所・微生物部
	大金映子	栃木県保健環境センター・微生物部
	塚越博之	群馬県衛生環境研究所・保健科学係
	戸田昌一	山口県環境保健センター・保健科学部
	木村博一	国立感染症研究所・感染症情報センター
	野田雅博	国立感染症研究所・ウイルス第三部

**研究要旨** 2009/10 および 2010/11 シーズンに山形県、栃木県、群馬県、富山県および山口県内で分離された A/H1N1pdm インフルエンザウイルス株について、オセルタミビル耐性変異株の検出および遺伝学的解析を行った。その結果、変異ウイルスの検出率はそれぞれ 0.7%、0.9%であった。しかし、県によって検出率に大きなばらつきがみられた。これらの変異株は、いずれも抗インフルエンザ薬の服用中に生じた可能性があるとして推測された。したがって、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施する際は、市中流行株と抗インフルエンザ薬服用患者由来株を区別して調査する必要がある。

**A. 研究目的**

2007 年に欧州諸国において、オセルタミビルに耐性を示す A/H1N1 (ソ連型) インフルエンザウイルスが高頻度で検出され、わずか 1 年で世界中に蔓延した。この耐性はノイラミニダーゼ (NA) の 275 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換することにより起こる (H275Y)。一方、2009 年に出現したパンデミック(H1N1)2009 インフルエンザ (A/H1N1pdm) ウイルスも同じ亜型であることから、ソ連型ウイルスと同様に耐性ウイルスの出現とその伝播・流行が危惧されている。さらに、わが国は全世界のオセルタミビル生産量の 7 割以上を消費していることから、耐性ウイルスが最も発生しやすい環境にあると考えられる。このような背景から、国立感染症研究所は全国地方衛生研究所と共同で、A/H1N1pdm ウイルスのオセルタミビ

ル耐性株サーベイランスを実施してきた。2009/10 シーズンの調査では、275Y 変異ウイルスの出現頻度は 1.6% (2010 年 3 月現在)、米国など海外における発生頻度 (0.8%) と比べると高い数値となった。しかし、パンデミック初期には国内でオセルタミビルの予防投与が行われたことなどから、検体のサンプリングにバイアスがかかっている可能性も指摘された。そこで本研究では、富山県の他に北海道・東北・新潟地区 1 ヶ所、関東・甲信・静岡地区 2 ヶ所、中国・四国地区 1 ヶ所の地方衛生研究所の協力を得て、各県における 275Y 変異 A/H1N1pdm ウイルスの発生状況の詳細を調査した。

**B. 研究方法**

2009 年 5 月から 2011 年 2 月までの 2 シーズンにわたり、山形県、栃木県、群馬県、富山

県および山口県内で分離された A/H1N1pdm インフルエンザウイルスについて、NA 遺伝子のシーケンス解析あるいはリアルタイム RT-PCR 法により 275Y 変異ウイルスの検出を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 2009/10 シーズン分離株における 275Y 変異ウイルスの検出

A/H1N1pdm 分離株 1160 株について解析した結果、275Y 変異ウイルスは、山形県で 2 株、栃木県で 4 株、山口県で 2 株検出された。検出率は、山形県、栃木県および山口県でそれぞれ 0.9%、0.7%、8.3%であった。一方、群馬県と富山県では検出されなかった（表 1）。

#### 2. 2010/11 シーズン分離株における 275Y 変異ウイルスの検出

2010 年 9 月から 2011 年 2 月までに分離された 332 株について解析した結果、275Y 変異ウイルスは富山県で 2 株、山口県で 1 株検出された。検出率は、それぞれ 2.3%、2.1%であった。一方、山形県、栃木県および群馬県では検出されなかった（表 2）。

#### 3. 275Y 変異ウイルスが分離された患者のノイラミニダーゼ阻害薬（NAI）服用歴

2009/10 および 2010/11 シーズンに検出された 275Y 変異ウイルス 11 株について、患者の NAI 服用歴を調査した結果、いずれもオセルタミビル予防投与ないしは治療投与を受けていた（富山県の 1 例はペラミビル）。

### D. 考察

今回の調査では、2 シーズンの総解析株数 1492 株のうち、275Y 変異ウイルスが 11 株検出された。2009/10 および 2010/11 シーズンの変異ウイルスの検出率はそれぞれ 0.7%（8 株/1160 株）、0.9%（3 株/332 株）で、ほぼ同率であった。しかし、県によってその検出率には大きなばらつきがみられ

た（0～8.3%）。そこで、変異ウイルスが分離された患者の NAI 服用歴を調査したところ、いずれの患者も NAI の予防投与ないしは治療投与を受けていたことが明らかになった。したがって、これらのケースでは NAI の選択圧によって耐性変異ウイルスが発生したと考えられた。今回の調査では市中流行ウイルス中に 275Y 変異ウイルスは全く検出されなかった。

これまでのところ、国内外とも NAI 耐性 A/H1N1pdm ウイルスの発生頻度は極めて低く（<1%）、耐性ウイルスはソ連型ウイルスのように感受性ウイルスと同等の感染力を保持し、ヒト-ヒト間で効率よく伝播する性質を獲得するまでに至っていない。一方で、NAI 服用中には市中流行ウイルスで見られるよりもかなり高頻度で耐性変異ウイルスが発生することが知られている。今回の調査では、NAI 服用中に採取された検体由来の分離株数を正確に把握することはできなかったが、275Y 変異ウイルスはいずれも NAI 服用中の患者由来であった。したがって、抗インフルエンザ薬耐性サーベイランスを実施する際は、インフルエンザ病原体定点で採取された検体由来のウイルス（市中流行株）と NAI 服用患者由来株を区別して調査を行う必要がある。

### E. 結論

抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスでは、調査目的やその対象を明確にし、適切なサンプリングを行う必要がある。

### F. 健康危機情報

特になし

### G. 研究発表

小淵正次. 富山県におけるインフルエンザの流行. 平成 22 年度地方衛生研究所全国協議会 東海・北陸支部 微生物部会、福井、2 月（2010）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

表 1. 2009/10 シーズン分離株における 275Y 変異ウイルスの検出

都道府県	総解析株数	275Y変異株数	検出率(%)
山形県	235	2	0.9
栃木県	535	4	0.7
群馬県	61	0	0
富山県	305	0	0
山口県	24	2	8.3
5 県の合計	1160	8	0.7

表 2. 2010/11 シーズン分離株における 275Y 変異ウイルスの検出

都道府県	総解析株数	275Y変異株数	検出率(%)
山形県	163	0	0
栃木県	13	0	0
群馬県	21	0	0
富山県	88	2	2.3
山口県	47	1	2.1
5 県の合計	332	3	0.9

表 3. 275Y 変異ウイルスが検出された患者の NAI 服用歴

服用歴	山形県	栃木県	富山県	山口県
服用なし	0	0	0	0
治療投与	1	0	2	1
予防投与	1	4	0	2

## インフルエンザ病原体サーベイランス(案)

平成 23 年 2 月 25 日

富山県衛生研究所

1. 目的(病原体サーベイランスをいかに感染症対策に反映させるか)  
流行期、非流行期にかかわらず、インフルエンザの発生におけるウイルスの型・亜型を把握し、分離株の性状(抗原性、薬剤感受性等)を迅速に分析することにより、感染拡大の防止やワクチン候補株の選定等のインフルエンザ対策に役立てる。
2. 検体採取の対象
  - インフルエンザと診断された患者および疑い患者
  - 集団発生例
3. 目的を達成するためのサンプリング方法
  - 流行期では病原体定点(インフルエンザ定点の 10%)から従来通りに検体を採取する。
  - 非流行期では病原体定点の 2～3 倍の医療機関から検体を採取することが望ましい。
  - 集団発生では 1 事例から可能な限り複数の検体を採取する。
4. 目的を達成するための必要な検索方法
  - ウイルスの分離および赤血球凝集抑制(HI)試験による型、亜型の同定
  - 必要に応じて遺伝子診断の併用
  - 薬剤感受性サーベイランスでは遺伝子マーカーの検出
5. 健康危機と考えられる状況
  - 薬剤感受性の低下がみられたウイルスの蔓延
  - 新しい亜型ウイルスの出現



厚生労働科学研究補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究

埼玉県におけるインフルエンザ病原体サーベイランス体制整備に関する研究

岸本 剛 埼玉県衛生研究所 室 長  
山田文也 埼玉県衛生研究所 主任研究員

研究要旨

埼玉県では、地方におけるインフルエンザ病原体サーベイランスを効果的に実施するために、病原体定点医療機関における検体採取の対象及び件数を具体的に示した要綱を作成し運用を開始した。その結果、送付される検体数の増加とともに、全年齢階級の患者から採取された検体が送付され、病原体収集状況に改善が認められた。このことにより、地方レベルでのインフルエンザウイルスの型・亜型の把握が可能であった。

A. 研究目的

インフルエンザを含む五類定点把握対象疾患の病原体サーベイランスは、感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、各都道府県(政令指定都市を含む)単位で検体の収集が行われている。収集された検体からの病原体検索は地方衛生研究所で実施され、検査情報は NESID 病原体サーベイランスシステムにより国に報告され、国立感染症研究所で全国レベルの解析評価が行われている。その解析結果は、IASR により定期的に情報還元が行われているが、2009 年の pandemic (H1N1)2009 の流行が地域、自治体ごとに異なる時期に始まったことにより、地方レベルでも迅速な病原体の評価が求められるようになった。しかし、従来からの定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスの検体収集では、①地域レベルで評価するためには実施される検査例数が少ない、②検体を採取する対象者が不明である、③検査結果の還元の時

間がかかる、④報告される患者情報との統一性がない、⑤検体が計画的に収集されていない、などいくつかの問題点が指摘されていた(平成 17 年度厚生労働科学研究 新興・再興感染症研究事業「効果的な感染症発生動向調査のための国及び県の感染症発生動向調査の方法論の開発に関する研究」)。この様な背景のなか、地方自治体においてインフルエンザ病原体サーベイランスを効果的に実施するために、埼玉県では病原体定点医療機関における検体採取の対象及び件数を具体的に示した要綱を作成し 2009 年 7 月からその運用を開始した。そこで、要綱施行前後の病原体検査検体の収集状況を比較し、要綱施行の効果を検討した。

B. 研究方法

1. 病原体サーベイランス体制

施行した要綱は、計画的にサンプリングされた検体により流行しているインフルエンザウ

イルスの抗原性等を調べ、病原性変化の把握、診断・治療方針の見直し、予防接種計画等に役立てること。また、インフルエンザウイルスの亜型を調べることにより、県内で流行しているインフルエンザ全体における pandemic (H1N1)2009 及び季節性インフルエンザの状況(割合)を評価することを目的とし、病原体定点医療機関(小児科定点・内科定点)の役割、検体採取の対象、保健所の役割、衛生研究所の役割の 5 項目を明記した。

さらに、保健所管轄地域の変更等により生じた病原体定点分布の偏りを解消するために 2009 年 7 月から新たに内科定点から 2 か所、小児科定点から 1 か所の計 3 医療機関を新たに病原体定点として指定した。

## 2. 検体収集状況の比較

要綱の効果を検討するために、施行前の 2008-2009 年シーズンの分離同定による結果と 2009-2010 年シーズン及び 2010-2011 年シーズンの検出状況について、週別、年齢階級別に比較した。各流行シーズンは、インフルエンザの定点当たり報告数が 1.00 を超えた週から、1.00 を下回った週の前週までとしたが、2010-2011 シーズンは、2011 年第 5 週までの報告数を用いて比較した。

(倫理面への配慮)

採取した検体に付随する個人情報、性別、年齢のみが記載された埼玉県感染症発生動向調査実施要綱に定める様式 1 によるもので、個人を特定する情報は含まれていない。また、収集された情報はすべて埼玉県個人情報保護条例を順守し取り扱われた。また、検体の採取に関しては、検査を行うことについて本人又は保護者の同意が得られたことを前提することを要綱の検体採取対象に明記し

た。

## C. 研究結果

### 1. 病原体サーベイランス体制

要綱では、概ねインフルエンザ定点当たり報告数 3.00 を境に流行期と非流行期として、検体採取対象を明記した。非流行期では、小児科定点、内科定点ともに、インフルエンザと診断され、患者サーベイランスの報告がなされたすべての患者を検体採取対象とした。流行期は、小児科定点で 20 歳未満の 3 段階の年齢階級(5 歳未満、5～10 歳、10～20 歳未満)から各 1 検体/週、内科定点で 20 歳以上の 3 段階の年齢階級(20～40 歳未満、40～60 歳未満、60 歳以上)から各 1 検体/週とした。また、保健所の役割として、病原体定点医療機関との連携強化、検体の送付及び検査成績の還元について明記した。衛生研究所の役割として可能な限り迅速に RT-PCR 検査を実施し新型インフルエンザで有るか否かを判定し情報還元を行うことを明記し、さらに、参考として通常のインフルエンザウイルス遺伝子検査の実施周期及び成績通知までの期間を明記した(図 1)。

病原体定点医療機関の配置については、保健所管内別の病原体定点分布を考慮し、pandemic(H1N1)2009 県内発生の後に内科 2 医療機関、小児科 1 医療機関を新たに追加した 57 機関(内科 17・小児科 40)で、インフルエンザ患者定点の 22.7%を指定した。

### 2. 検体収集状況の比較

2009 年最初の要綱の通知は、7 月 24 日(第 30 週)「新型インフルエンザ(A/H1N1)に係る今後のサーベイランス体制について」(厚生労働省事務連絡)と同時に保健所を経由し各病原体定点へ周知した。さらに、定点

当たり3.00を超えた9月19日(第38週)に2回目の通知を行った。また、2010-2011年シーズンは、流行開始以前の11月1日(第44週)と定点当たり3.00を超えた2011年1月5日(第1週)の2回通知を行った。

2008-2009年シーズン(定点当たり1.00以上～)は、2008年第49週から2009年第19週の24週間であった。その間に検出されたインフルエンザは、AH1N1(Aソ連)が47例、AH3N2(A香港)が23例、B型が24例の計94例であった。そのうち、病原体定点でインフルエンザと診断され報告された患者の全例が検体送付対象となる定点当たり1.00から3.00を超えるまでの期間(流行前期)では、2008年第49週のAソ連が6例、A香港が2例の計8例が検出された(図1-1)。

RT-PCR検査を全例に採用した2009-2010年シーズンは、pandemic(H1N1)2009(SwH1)の検出が主流で2009年第33週から2010年第8週までの29週間であった。この間のインフルエンザ検出は、SwH1が1,177件、A香港が5例、B型が1例の計1,183例であった。その内流行前期の検出数は、2009年第33週から第36週の間で、A香港が3例、SwH1が155例の計158例であった(図1-2)。

2010-2011年シーズンは、2011年第5週までに検体が採取され6週までに送付された検体について検出状況をまとめた。2010-2011年シーズンは、2010年第48週から始まり、第5週までの検出は、SwH1が258例、A香港が171例、B型が11例の計440例であった(図1-3)。

その内流行前期の検出数は、2010年第48週から第50週の間で、A香港が54例、SwH1が20例、B型2例の計76例であっ

た。

非流行期の検出状況では、2008-2009年シーズン前の第47週にA香港1例が最初に検出され、以後第49週までの検体からA香港2例の計3例が検出された。2008-2009年シーズンから2009-2010年シーズンの間では、2009年第30週以降の検体で第33週までに、SwH1が53例、A香港が2例の計55例が検出された。

2009-2010年シーズンから2010-2011年シーズンの間では、2010年第9週以降第28週までに、SwH1が12例、A香港が2例、B型が2例の計16例が検出された。また、2010年第35週以降第47週まででは、SwH1が8例、A香港が22例、B型が5例の計35例が検出され、前の非流行期と異なる亜型分布が観察された。

年齢階級は、要綱に使用した5歳未満、5～10歳未満、10～20歳未満、20～40歳未満、40～60歳未満、60歳以上の6階級で集計し、各年シーズンの報告患者の年齢分布と検出例の年齢分布とを比較した。

年齢階級5歳未満の報告患者数は、3シーズンの当該期間の報告患者総数の20.8%～15.0%を占め検出件数では、22.2%～10.5%と各年ともほぼ同様の割合を示した。5～10歳未満は、報告患者総数の38.5%～33.0%で、検出件数の34.4%～24.4%を占めた。10～20歳未満は、報告患者総数の34.6%～18.8%で、検出件数の37.2%～20.2%を占めた。20～40歳未満は、報告患者総数の16.4%～11.0%で検出件数の15.2%～11.1%を占めた。40～60歳未満は、報告患者総数の8.7%～4.3%で、検出件数の2.2%～9.7%を占めた。60歳以上の年齢階級は、報告患者総数の2.4%～0.7%で、検出件数

の 5.2%~0.0%であった。10~20 歳未満と 20~40 歳未満の年齢階級では、各シーズンとも報告患者数と検出件数の割合がよく一致した。また、40 歳以上の年例階級では、要綱実施前後の検出数に大きな違いが認められ、検出数の少ない 2008-2009 年シーズンは、40~60 歳未満の検体はすべて 50 歳未満の患者から収集された検体で、60 歳以上の年齢の検体送付はなかったのに対し実施後は、60 歳以上の年齢階級からの検体も送付されるようになった。また、施行後の 2009-2010 年シーズンと 2010-2011 年シーズンを比較すると、2010-2011 年シーズンで報告患者数と検出病原体数の割合がよく一致した(図 2)。

#### D. 考察

pandemic (H1N1)2009 が発生する以前のインフルエンザ病原体サーベイランスでは、流行期においても送付される検体数が少なく地域で評価するための適切な病原体収集が困難な状況であった。そのため、流行期のインフルエンザウイルスの型・亜型の評価には、国の情報還元を待つ必要があった。しかし、pandemic(H1N1)2009 発生に伴い、地域単位での患者動向と病原体評価へのニーズが高まり、結果の還元についても一層迅速性が求められるようになった。このような背景のなか、効率的な検体収集を目的に、インフルエンザ病原体サーベイランスの実施要綱を作成し、運用前後を比較することにより、その効果を検討した。

運用前の 2008-2009 年シーズンは、pandemic (H1N1)2009 出現後に比べ収集される検体数が少なく、特にインフルエンザウイルスの型・亜型に注目が集まる流行前期で

は収集検体数の差が顕著であった。この収集検体数の違いは、pandemic(H1N1)2009 への関心の高さによるものが含まれると思われる。しかし、pandemic(H1N1)2009 が病原性、治療方針等について季節性インフルエンザと大差がないことが明らかとなった後の 2010-2011 年シーズンも継続した検体収集が実施できた。さらに、非流行期の検体送付により、2010 年の非流行期に、前の非流行期と異なる亜型分布が観察された。これは、要綱に検体採取対象者と件数を具体的に示したことによって、過去に指摘されていた病原体サーベイランスの問題点が改善されたものと思われる。

さらに、検体数の増加に伴い、年齢階級別でも、2008-2009 年シーズンに送付のなかった 50 歳以上の検体も収集されるようになった。pandemic(H1N1)の流行は、患者サーベイランスにより、若年層での流行が大きかったことが示唆されている。しかし、すべての年齢階級で患者が発生しており、地方レベルの病原体収集においても患者発生に応じた全年齢階級から検体が収集されるようになったことは大きな改善点であったと考える。

要綱では、すべての検体について RT-PCR を実施しその成績を速やかに病原体定点医療機関宛て還元することを明記している。この方法は、個別の結果還元の迅速化の他、病原体検出情報としての週単位還元が可能となった。一方、病原体サーベイランスの目的である病原性の変化、耐性ウイルスの監視などでは、ウイルスの分離・培養が必須である。要綱では、定点当たり 3.00 を超えた流行期には、1 病原体定点当たり 3 検体と収集検体数の選択を依頼している。このことで、今までに収集された検体については、RT-PCR 検査後す

べて培養検査の実施が可能である。しかし、全例についての培養検査は、検体数の増加に伴い以前よりその判定に要する時間が長くなった。もし流行期に病原体定点医療機関で届出のための基準を満たすすべてのインフルエンザ患者の検体が送付された場合、病原体サーベイランスに係る人的、時間的、費用的な負担が大きく増大し、還元までの時間もさらに延長すると考えられる。効果的な病原体サーベイランスを実施する上で、検査件数と検査方法の選択は精度管理上重要な意味を持つ。検体の選択については、検体収集時、スクリーニング検査実施後などいくつかの段階で選択が可能であるが、迅速に結果が出るが費用がかかる RT-PCR をスクリーニングに使う方法では、検体採取時における選択が意味あることと考える。今回試行した要綱で示した検体収集数は、収集された検体について全例で RT-PCR を実施することのほか、検体搬送ルート、搬送回数、検査回数等を勘案し設定したものである。これらの条件は、地方により異なることから、その実情に応じたサンプリングの計画を設定することが効果的な病原体サーベイランスを実施する上で必要と思われる。

#### E. 結論

インフルエンザ病原体サーベイランスを効果的に実施するために、病原体定点における検体採取の対象及び件数を具体的に示した要綱を作成し、2009年7月からその運用を開始した。要綱施行前後の検体収集状況を比較しその効果を検討した結果、検体収集件数の大幅な改善が認められ、迅速な情報還元が可能となった。今後も運用状況を確認・評価することで、継続性についての検証が必要

である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表なし
2. 学会発表なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし

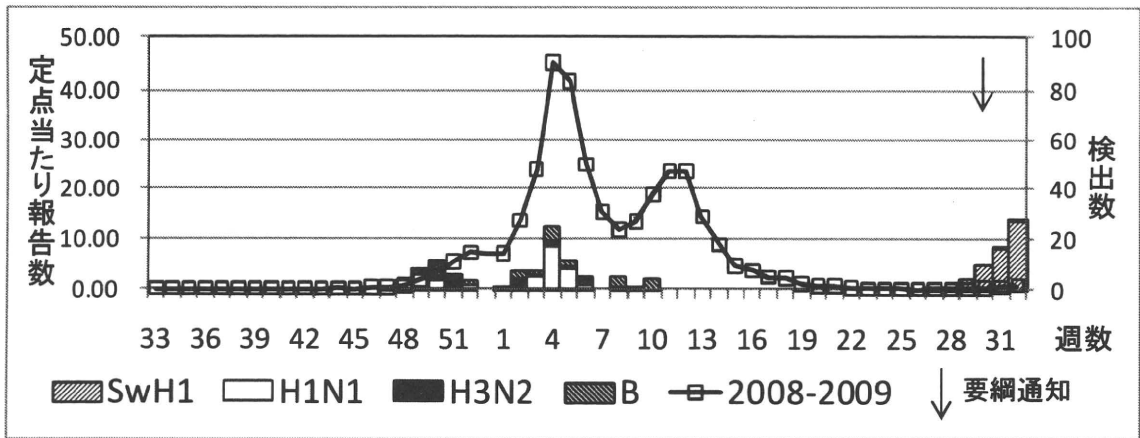


図 1-1 2008-2009 年インフルエンザ定点当たり報告数・ウイルス検出数

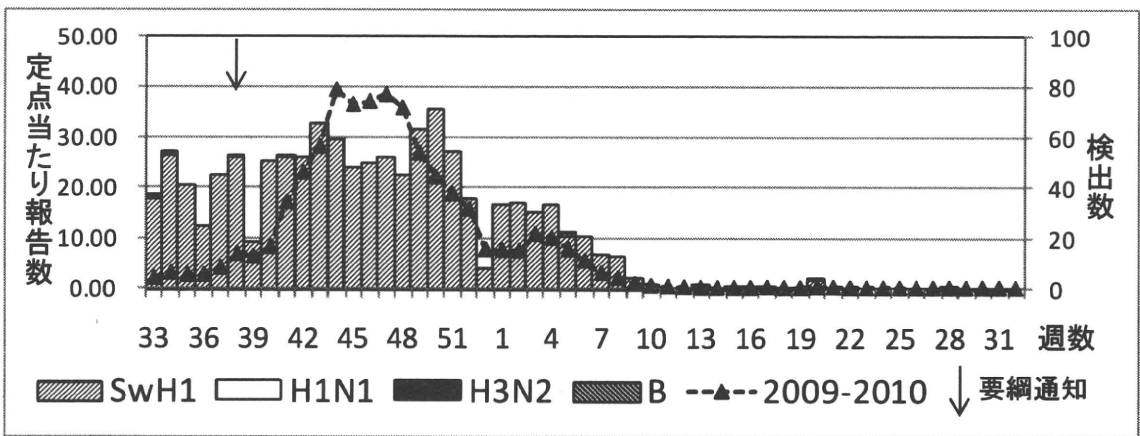


図 1-2 2009-2010 年インフルエンザ定点当たり報告数・ウイルス検出数

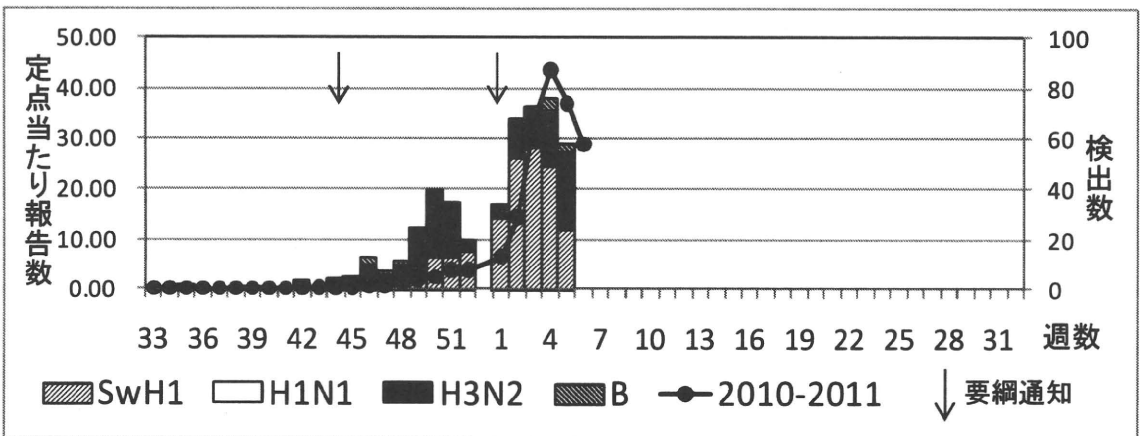


図 1-3 2010-2011 年インフルエンザ定点当たり報告数・ウイルス検出数

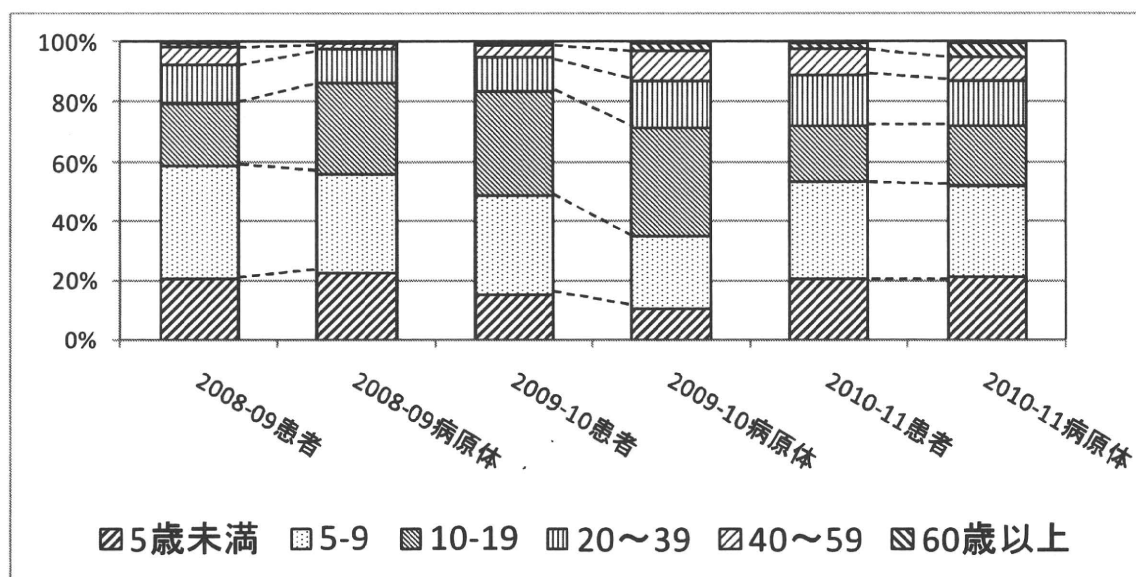


図2 シーズン別年齢階級別報告患者・ウイルス検出状況

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)研究報告書  
「アデノウイルス感染症病原体サーベイランスに関する研究」

研究分担者：藤本嗣人 国立感染症研究所感染症情報センター 第 4 室長  
研究協力者：中村 雅子 福井県衛生環境研究センター 主任研究員  
榎本 美貴 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター主任  
花岡 希 国立感染症研究所 感染症情報センター研究官  
全国地区アデノウイルスレファレンスセンター<sup>1)</sup>

**研究要旨：**

【目的】近年に新型アデノウイルス 52～56 型が報告された。特に 53 および 54 型が流行性角結膜炎の病原体として日本国内で流行していることが論文で報告され始めている。そこで、これら 53 および 54 型の同定法を開発するとともに、アデノウイルス地区レファレンスセンターと共に同定法の評価と流行状況を調べた。

【方法】新型アデノウイルス 53 および 54 型同定 LAMP 法を作製して評価した。その手法についてマニュアルを作成し、マニュアルおよび必要な LAMP 法関連試薬を全国地区レファレンスセンターに配布して評価した。

【結果】ほぼすべての地研で同様の検出感度で陽性コントロールを同一感度で検出することができ、非特異的な増幅は報告されなかった。合計 9 ヶ所の地方衛生研究所で実施したところアデノウイルス 53 型が 11 件、54 型が 80 件検出された。

【考察】我々が開発した LAMP 法による新型アデノウイルス同定法は、PCR-シーケンシング法より簡便で、手間と時間がかからない利点を持つ。今回の研究により新型アデノウイルス 53 および 54 型が多数検出された。これらのウイルスは流行性角結膜炎を引き起こしていた。

**【追加事項】**

- 1) 疾患別のサーベイランス案： 咽頭結膜熱
- 2) サーベイランス スタANDARD案（咽頭結膜熱）  
を作成した。 ⇒ 本報告に 1)および 2)の案文を記載した。
- 3) 本研究に伴い購入した Scepter™(ミリポア)をアデノウイルス分離に用いる A549 細胞の定量に用いた。



## A. 研究目的・背景

感染症発生動向調査における眼科定点の届出感染症は、流行性角結膜炎 (EKC) と急性出血性結膜炎の2つである。EKCを引き起こすのはアデノウイルスであり、アデノウイルスD種、ときにアデノウイルスB種による。これまで、アデノウイルスD種によるEKCは8、19および37型によるとされてきた。

アデノウイルスD種は、ウイルス分離に時間がかかることで知られ、中和反応で交差反応があることが知られている。アデノウイルスは、ウイルス分離および分離株の中和反応で同定されてきたが、

最近、アデノウイルスの全ゲノム配列 (約 35,000 塩基対) を同定することによって新しい型として 52、53、54 および 55 型が報告された。これらのうち、アデノウイルス 22 型近縁の 53 型および 54 型が新しい血清型 (いずれもD種) として報告された(1,2)。そして、これらのウイルスが日本国内において、流行性角結膜炎 (EKC) の病原体として流行していることが報告された(3)。

感染症発生動向調査における病原体検査において新型アデノウイルスの流行状況を正しく把握することは重要である。本研究においては、その同定法の開発と地方衛生研究所と実施した結果について述べる。

## B. 方法

### 試薬

本研究で最適化およびキット化した試薬等 1~6 をアデノウイルス地区レファレンスセンターおよび希望があった地方衛生研究所に送付した。

#### 1) Loopamp DNA 増幅試薬キット

(栄研化学) 192 回分

2) アデノウイルス 54 型同定用プライマーミックス(今回開発)150 反応分

3) アデノウイルス 53/22 型同定用プライマーミックス(今回開発)150 反応分

4) アデノウイルス 54 型 DNA 陽性コントロール 500 $\mu$ L (溶媒は水)

(Adenovirus DNA  $4.1 \times 10^4$  copy/ $\mu$ L)

5) アデノウイルス 22 型 DNA 陽性コントロール 500 $\mu$ L (溶媒は水)

(Adenovirus DNA  $1.48 \times 10^7$  copy/ $\mu$ L)

6) Loopamp 反応チューブ 8 連  $\times$  12 $\times$ 2 (栄研化学) 192 回分

### 反応条件：

反応組成：プライマー混合液 2.5 $\mu$ L、2 $\times$  Reaction Mix を 12.5 $\mu$ L、Distilled Water を 7.0 $\mu$ L 混合して合計 22 $\mu$ L とした。これにテンプレート 2 $\mu$ L、Enzyme Mix を 1 $\mu$ L 加えて 1 反応あたりで全量 25 $\mu$  とした。

なお、プライマー混合液は、最終濃度で、FIP, BIP を 1.6 $\mu$ M、F3, B3 を 0.4 $\mu$ M、LF, LB を 0.8 $\mu$ M とした。

反応温度： 65 $^{\circ}$ C 60min 反応し、80 $^{\circ}$ C 2 min で酵素を失活した。LAMP 用の機械を用いてピロリン酸マグネシウムによる濁度により判定した。

## C. 結果

### 検出感度および特異性

感度は 10 コピー/反応であった。54 型については、54 型に特異的であった。53 型については 53 型のほか 22 型も増幅した。8、19 および 37 型など他の流行性角結膜炎起因アデノウイルスは増幅しなかった。1~7、11、40 および 41 型アデノウイルスからの抽出ゲノムも増幅しなかった。

## 地方衛生研究所での 53 および 54 型アデノウイルスの検出

地方衛生研究所の検討によりアデノウイルス 53 型が東京都(3 件)、福井県(1 件)、大阪府(2 件)、広島市(5 件)の合計 11 件検出された。

同様に 54 型は福島県(2 件)、福井県(57 件)、大阪府(1 件)、神戸市(6 件)、広島市(14 件)の合計 80 件検出された。

## D. 考察

新型アデノウイルスである 53 および 54 型が日本各地で流行性角結膜炎を引き起こしていることが論文でも報告され、また我々の研究でも示された。

これまでアデノウイルスは血清型により分類されてきた。アデノウイルス 53 型は、中和反応による血清型で分類すると 22 型である。しかし、国際的に新型と分類されたのは、中和血清型を規定するヘキソン超可変領域以外の領域で 22 型と全く異なるためである。ペントン領域では 37 型、ファイバー領域では 8 型と相同性が高い。アデノウイルスは赤血球凝集阻害反応(HI)で同定される場合もあるが、53 型は HI 反応では 8 型と同定されると考えられる。

現在、アデノウイルスについて血清型としての考え方からペントン、ヘキソン、およびファイバーコード領域を含むフルゲノムの塩基配列の決定による「型」と呼称する考え方に変わりつつあり、国際的なコンセンサスが得られつつある。

しかし、サーベイランスでアデノウイルスのフルゲノムシーケンスを決定することは理論的には可能でも、現実的には不可能であり、この流れが現在の血清型による分類を覆すものではない。そこで、国際的にアデノウイルスの型別

法がどのように決定されるか今後も把握して、国内の同定法を整理して明確化する必要があると考えている。

現在、新型アデノウイルス 53 型および 54 型が日本で流行していることが示された(1,3)。サーベイランスの観点から感染症を引き起こしているウイルスを正確に把握することは重要である。54 型については血清学的にも新しい型である。

53 型については血清学的に 22 型である。そのため、現状では 53/22 型として、同定法を明記の上 NESID に登録するのが良いと思われる。

53、54 型は分離に長期間の継代培養を要する。ルーチンの培養は通常 21 日程度で終了するが、これらの分離、特に 54 型の分離にはより長期の培養を要したり、あるいは分離出来ないことも多い(4)。今回 LAMP 法で簡便に臨床検体から検出同定する方法を示した。これらで陽性になった場合に選択的に長期間培養することで、効率的にこれらウイルスが分離できると考えている。

## F. 文献

1) 藤本嗣人、花岡希、岡部信彦、渡部 香、五十嵐郁美、長谷川道弥、中村雅子、加瀬哲男、廣井 聡、榎本美貴、秋吉京子、須賀知子、阿部勝彦、山本美和子、三浦美穂、山本正悟：新型アデノウイルス 53 型と 54 型の同定について。31, 236-237, 2010.

2) Michael P. Walsh, Ashish Chintakuntlawar, Christopher M. Robinson, Ijad Madisch, Balázs Harrach, Nolan R. Hudson, David Schnurr, Albert Heim, James Chodosh, Donald Seto, Morris S. Jones: Evidence of molecular

evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. PLoS One. 3;4(6):e5635, 2009.

3) Hisatoshi Kaneko, Tatsuo Suzutani, Koki Aoki, Nobuyoshi Kitaichi, Susumu Ishida, Hiroaki Ishiko, Tsutomu Ohashi, Shigeki Okamoto, Hisashi Nakagawa, Rikutarō Hinokuma, Yoshimori Asato, Shinobu Oniki, Teiko Hashimoto, Tomohiro Iida, Shigeaki Ohno: Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan. 95, 32-36, 2011.

4) 中村雅子、平野映子、小和田和誠、石畝史、望月典郎、藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦、山岸善也：2004～2009年の6年間における流行性角結膜炎患者113名からのアデノウイルス検索—福井県。病原微生物検出情報，31，237-238，2010。

## F. 論文発表

1) 藤本嗣人、花岡希、岡部信彦、渡部 香、五十嵐郁美、長谷川道弥、中村雅子、加瀬哲男、廣井 聡、榎本美貴、秋吉京子、須賀知子、阿部勝彦、山本美和子、三浦美穂、山本正悟：新型アデノウイルス53型と54型の同定について。31，236-237，2010。

2) 榎本美貴、高井伝仕、藤本嗣人、近平雅嗣：兵庫県におけるポリオ感染源調査（2002年～2009年）—健常児の糞便からのウイルス分離—。兵庫県立健康生活

科学研究所健康科学研究センター研究報告.1, 5-8, 2010.

3) 藤本嗣人、花岡希、安井良則、小長谷昌未、岡部信彦、高崎智彦、清水博之：エンテロウイルス遺伝子が検出されEV71抗体上昇が確認された急性脳炎(辺縁系脳炎)症例、2010年4月。病原微生物検出情報. 31, 235, 2010.

4) 中村雅子、平野映子、小和田和誠、石畝史、望月典郎、藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦、山岸善也：2004～2009年の6年間における流行性角結膜炎患者113名からのアデノウイルス検索—福井県。病原微生物検出情報，31，237-238，2010。

5) 近野真由美、吉岡政純、杉江真理子、馬口敏和、中村剛、木澤正人、梅垣康弘、安武廣、木戸毅、三宅健市、石川和弘、藤本嗣人：14年間（1996年～2009年）におけるコクサッキーA群ウイルスの乳のみマウス、RD-18SおよびVero細胞による分離状況—京都市。病原微生物検出情報，32，20-21，2011。

6) Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, Hanaoka N, Chikahira M, Taniguchi K, Okabe N.: Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. Jpn J Infect Dis. 63(5), 338-341, 2010.

7) Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzales G, Koyanagi K, Watanabe H, Suzutani T: Complete genome analysis of

a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan. J Clin Microbiol, 49(2): 484-490, 2010.

8) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years surveillance of Coxsackie virus group A in Kyoto 1996-2009, by using mouse, RS-18S and Vero cells. Jpn J Infect Dis. in press.

#### G. 学会発表

- 1) 藤本嗣人：パネルディスカッション 1 感染症の遺伝子診断の進歩と今後の方向性：ウイルス疾患（アデノウイルスなど）の迅速疾患、第 84 回日本感染症学会総会学術集会、2010 年 4 月(京都市)
- 2) 藤本嗣人、小長谷昌未、清水英明、石丸陽子、谷口清州、岡部信彦：インフルエンザ AH1pdm の新規超高速 PCR (Hyper-PCR) による短時間検出同定、第 84 回日本感染症学会総会学術集会、2010 年 4 月(京都市)
- 3) 藤本嗣人、谷口清州、岡部信彦：インフルエンザ A H1N1 パンデミック時の

他項目ウイルス検索、第 51 回日本臨床ウイルス学会、2010 年 6 月(高松市)。

- 4) 藤本嗣人：日本のアデノウイルス感染症サーベイランス、第 11 回日本アデノウイルス研究会シンポジウム、2010 年 10 月(東京都)
- 5) 中村 雅子、平野 映子、小和田和誠、石畝 史、望月 典郎、藤本 嗣人、花岡 希、岡部 信彦：アデノウイルス 54 型と 53 型の福井県への侵淫状況、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、2010 年 11 月(徳島市)
- 6) 林 昌宏、藤本嗣人、小長谷昌未、モイ メンリン、小滝徹、倉根一郎、高崎智彦：近年のチクングニヤ熱の流行と迅速診断法の検討、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、2010 年 11 月(徳島市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし