

201123020A

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

地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性  
インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の  
改良および流行把握に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成24(2012)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

研究代表者： 小田切孝人 \_\_\_\_\_ P2

### II. 分担研究報告

1. インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

皆川洋子 \_\_\_\_\_ P10

研究協力者：池田辰也、水田克己、長島真美、新開敬行、林志直、加瀬哲男、森川佐依子、廣井聡、高橋和郎、戸田昌一、調恒明、吉富秀亮、千々和勝己、駒込理佳、長野秀樹、川上千春、小淵正次、滝澤剛則、内野清子、田中智之、平良勝也、山下和予、安井善宏

2. インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)の外部精度管理(EQA)評価について

影山努 \_\_\_\_\_ P16

研究協力者：高山郁代、中内美名

3. 抗インフルエンザ薬剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出と薬剤感受性試験系の改良について

高下恵美 \_\_\_\_\_ P33

4. インフルエンザウイルス蛋白質の機能的構造変化解析系の構築と変化予測

佐藤裕徳 \_\_\_\_\_ P38

研究協力者：横山勝、本村和嗣

5. 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析

藤田信之 \_\_\_\_\_ P44

6. 地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

齋藤玲子 \_\_\_\_\_ P52

研究協力者：菖蒲川由郷、鈴木宏、樋熊紀男、高橋キイ子、布施克也

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P60

- IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添)

## 地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

研究代表者 小田切孝人 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  
第 1 室室長

### 研究要旨

全国地方ブロックごとのコア地衛研 6 機関およびサポート地衛研 5 機関からなるコア・サポート地衛研を組織し、感染研との迅速な連携体制を導入した。この連携をもとにコア・サポート地衛研で PCR 検査の外部精度管理評価試験（External Quality Assessment Program, EQAP）を実施し、問題点の改良を行った。また、全国規模で EQAP を実施するための実施案の策定へと展開させた。インフルエンザ薬剤耐性株検出サーベイランスを実施し、B 型ウイルスで新たな耐性マーカー変異の同定に成功した。さらに、2010/11 シーズンのインフルエンザワクチンの効果をヒト血清を用いて血清学的に評価した。

研究組織		ター室長
研究代表者		影山努 国立感染症研究所インフエ
小田切孝人	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第 1 室室長	ンザウイルス研究センター第 2 室室長
研究分担者		高下恵美 国立感染症研究所インフエ
皆川洋子	愛知県衛生研究所所長	ンザウイルス研究センター主任研究官
齋藤玲子	新潟大学大学院医歯学系教授	
藤田信之	製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター・次長	A. 研究目的
佐藤裕徳	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究セン	2009 年にブタ由来のインフルエンザ A/H1N1 ウイルス(A/H1N1pdm09)によりパンデミックが起こった際には、わが国では全国地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）とが連携し、感染者が国

内に侵入する前に、1-2週間という驚異的なスピードで全地衛研でのPCR検査系の構築に成功した。これによって、わが国では原因ウイルスを迎え撃つ体制でパンデミックに対する初動対応ができた。この様な全国規模で迅速な準備対応に成功した例は、諸外国では無く、わが国のサーベイランス体制は諸外国から高く評価されている。この成功の背景には、高病原性H5N1鳥インフルエンザを前提とした新型インフルエンザ対策があり、その一環として、事前に感染研から地衛研へリアルタイムPCR検査技術の移転がパンデミック発生9ヶ月前に完了していたという幸運な点がある。また、技術移転研修をとおして地衛研-感染研相互協力が密になっていたことも成功要因と思われる。

このような地衛研-感染研連携は、緊急対応時ばかりでなく、通常のインフルエンザ感染診断検査、株サーベイランスの効率化と質の向上へと発展させることが重要である。現在、インフルエンザ株サーベイランスを実施している地衛研は77ヶ所あり、個々の地衛研に感染研が個別に対応することは多くの時間を要し効率が悪い。また、感染研から一方向で地衛研へ技術移転することは、必ずしも地衛研側の実情に沿ったものでないため、地衛研によっては実施に困難を伴うこともある。このため、感染研-地衛研双方向での事前の検討ステップを経て、全国規模へ拡大するという2ステップ法を取ることが、現実的かつ効果的と考えられた。そこで、本研究班では第1ステップに相当する特定の地衛研と感染研との

事前協議システムを構築するために、6地方ブロックからコア機能を果たすコア・サポート地衛研を地衛研全国協議会感染症対策部会から推薦してもらい、コア・サポート地衛研-感染研共同研究体制を立ち上げた。

本研究班初年度(H22年度)には、インフルエンザ薬剤耐性株検出サーベイランスの効率化と地衛研での検出検査の負担軽減を目的として、感染研で新規にリアルタイムPCRで薬剤耐性株を検出する検査法を開発した。これをコア・サポート地衛研で事前に試験運用し、地衛研側の視点から抽出した問題点を改良したマニュアルの作成と標準化を行った。この標準化マニュアルを全国地衛研へ普及させ、それを用いて2009/10シーズンは薬剤耐性株サーベイランスが実施された。約6000株のA/H1N1pdm09ウイルスについて、検出検査を実施し、69株(検出率1.2%)の耐性株を捉え、週ごとに集計して関連機関へ感染研HPから情報提供した。

2010/11シーズンはA/H1N1pdm09が季節性インフルエンザウイルスとしてヒト社会に定着し、パンデミック騒ぎが一段落したことから、各地衛研におけるサーベイランス・PCR検査系の自己精度チェックおよび検査系の自己修正を行う時期に来ている。このため、今年度は外部精度管理評価試験(External Quality Assessment Program, EQAP)を企画し、コア・サポート地衛研で試験的にEQAPを実施した。これをとおして、全国地衛研でEQAPを実施するための問題点の把握と実施要綱作成への戦略を検討し

た。

一方、基礎研究面では、耐性株検出サーベイランスで新たに捉えた B 型耐性変異株について、遺伝子構造計算科学を応用して、新しい耐性マーカー変異の同定に成功した。これにより、新たな薬剤耐性株検出チェックマーカー情報を耐性株サーベイランスに提供することができた。さらに、A 型、B 型ウイルス遺伝子の大量解析に基づいた進化系統樹解析により、流行株の遺伝的なトレンドを捉えて、その情報をワクチン株選定に反映させた。これら大量の遺伝子解析情報は、ウイルス遺伝子の機能的構造変化予測技術の開発へ直結し、インフルエンザ株サーベイランスの改良に貢献できる。また、ワクチン接種後の抗体応答を各年齢層別に把握し、現行のワクチンの有効性を血清学的側面から評価した。この成果は、次シーズンに向けて、ワクチン株の変更の必要性を判断する上で重要な情報提供となる。

## B. 研究方法

1. 地方衛生研究所全国協議会感染症部会と連携し、コア地衛研（レファレンスセンター）6 機関に加え、助言者（サポート地衛研）5 機関 計 11 機関からなるコア・サポート地衛研組織を初年度に組織した。この組織で、本年度は EQAP を実施した。

2. EQAP の実施要項および結果報告フォーマット、アンケートを作成し、パネル検体（H5N1 亜型の標準 RNA、未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA 7 検体、濃度の異なる不活化 A/California/7/2009 ワクチン株 2 検体および陰性検体 1 検体）と共に参加地衛研

へ配布した。

3. 2010/11 シーズンの A/H1N1pdm09 分離株について、NA 遺伝子の部分塩基配列の決定または TaqMan RT-PCR 法により、H275Y 耐性マーカーの有無を検索し、薬剤耐性株のスクリーニングを行った。H275Y 耐性マーカーをもつ分離株については、詳細な遺伝子解析を行い、さらに NA-Star または NA-XTD 基質を用いた化学発光法あるいは MUNANA 基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施した。

4. 変異蛋白質の分子モデリングを、Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) に搭載されているプログラムでホモロジーモデリングを行った。

5. 地衛研等を通して国立感染症研究所に集積されたインフルエンザウイルスの 5-10% を目処に、重要な遺伝子分節の全塩基配列を決定した。感染研インフルエンザセンターから提供を受けたウイルス RNA を材料として、NA (A 型および B 型) と M (A 型のみ) 分節の全塩基配列を決定したのに加え、HA 分節の HA2 領域の塩基配列決定を行って感染研インフルエンザセンターに提供した。

6. 新潟県内の高齢者施設の医療従事者と入所者、一般病院の従事者でインフォームドコンセントが得られたものに対して 2010 年 10-11 月に 2010-11 年シーズンインフルエンザワクチン（三価）を接種し、その前後で血清採血を行った。抗体価の評価

にはワクチン接種前後の有意抗体保有率（40倍以上 HI 抗体保有率）、および幾何平均抗体価（GMT）を用いた。接種後の抗体価の上昇幅の評価は抗体有意上昇率（ワクチン接種前後で4倍以上の抗体価上昇があった人の割合）を用いた。

### C. 結果

#### 1. コア・サポート地衛研による EQAP の実施

感染研 EQAP 実施担当者（影山研究分担者）から提示された実施要領および配布された試験サンプルを用いて、EQAP を実施した。参加地衛研から EQAP を行って出てきた問題点を感染研に情報還元した。

#### 2. 増殖性の低下した A/H1N1pdm09 ウイルスの増殖性改善の試み

赤血球凝集活性の低い A/H1N1pdm09 ウイルスが全国規模で広がっているとの情報提供が各地衛研からあった。これはウイルスの増殖性が低下していることに起因したため、増殖性の改善をコア・サポート地衛研メンバーの堺市地衛研で試みた。感染研から情報提供されたウイルス増殖培地、従来の培地、感染研使用の培養細胞、それぞれの組み合わせを検討して、ウイルス増殖性の改善に成功した。

3. コアおよびサポート地方衛生研究所で行った試験結果を集計し、詳細な解析を行った（解析結果については添付資料 2 を参照）。また、各地衛研ごとの解析結果については個別にフィードバックした。

#### 4. 2009/10 シーズン薬剤耐性株サーベイランス

2009/10 シーズンには、37 都道府県、53 地衛研/保健所と限定した規模で実施された薬剤耐性株サーベイランスが、2010/11 シーズンには、47 都道府県、71 地衛研/保健所に拡大し、日本全域における薬剤耐性株の発生状況を迅速により正確に把握することが可能になった。

A(H1N1)pdm09 分離株 3,844 株を解析し、そのうち 78 株が H275Y 耐性マーカーをもっており、耐性株検出率は 2.0%であった。すべてのオセルタミビルおよびペラミビル耐性株はザナミビルとラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

#### 5. B 型インフルエンザウイルスの新しい薬剤耐性変異マーカーの構造解析

B 型インフルエンザウイルスの薬剤感受性試験から、1 株の耐性株を検出した。このウイルスはタミフル、ペラミビル、ザナミビルに耐性であった。しかし、既知の耐性マーカー変異は、このウイルス NA 蛋白には無く、新たに E105K が耐性となる変異であることを同定した。そこで E105K 変異をもつ NA 分子の構造モデルを構築し、変異の位置と構造への影響を調べた結果、この変異は NA 四量体において、単量体間の境界面に位置し、四量体構造の安定性の変化を惹起および隣接する W438 との相互作用の変化を介して、間接的に抗ウイルス薬の結合部位の一部（R116）の立体配置に影響を与える可能性が示された。

#### 6. A 型、B 型ウイルス NA および M 遺伝子の大量解析

A/H1N1pdm09、A/H3N2、B ウイルスについて、それぞれの NA および M 遺伝子全長の塩基配

列を決定した。それぞれについて、進化系統樹解析を行い、最近の流行株の遺伝的な進化傾向をまとめた。これらの情報は、WHO インフルエンザワクチン株選定および国内のワクチン株選定会議に提供され、ワクチン株決定に重要な役割を果たした。

一方、8本のゲノム全ての塩基配列の決定ができるプライマーセットを開発しておくことは、ウイルスのリスク評価や緊急時の検査の際のPCRプライマー、プローブ設定にとって重要な情報提供となる。このため、A/H1N1pdm09およびA/H3N2ウイルスの全8ゲノム塩基配列決定用プライマーセットを開発した。B型用のセットを今後は進めていく。

7. 2010/11シーズンのインフルエンザワクチン接種前後のA(H1N1)pdm、季節性A(H1N1)、A(H3N2)、Bに対する血清抗体価の測定

高齢者施設と一般病院の医療従事者(成人)532人と高齢者施設の入所者47人(高齢者)についてワクチン接種前後の抗体価をHI試験で測定した。A(H1N1)pdmに対する抗体は、成人・高齢者とも接種前30%未満と低かったものの、ワクチン接種による抗体価上昇が認められた。

A(H3N2)、B型では接種後でおおむね70%に達する有効抗体保有率を達成していたが、高齢者ではやや反応が悪く、特にA(H3N2)では接種後も38.3%と低い保有率であった。

#### D. 考察

わが国のインフルエンザ株サーベイランス網および診断検査をこれまで以上に強化し、

さらに精度、レベルを向上させるために、全国77地衛研の地方ブロック代表であるコア・サポート地衛研ネットワークが組織された。この組織を活用して、感染研ーコア・サポート地衛研共同でインフルエンザサーベイランスおよび検査に新しい企画を導入する際には、事前協議、試験運用という第1段階をへてから全国規模の地衛研へ普及させるという効率的、効果的な運用の仕組みができた。当該年度は、PCR検査系のEQAPをコア・サポート地衛研で実施し、全国規模で実施するための問題点とそれを改良する第2段のEQAPを実施する必要性を認識した。EQAP実施者と試験者双方が過負担にならず、かつ効果的な実施をするための戦略の模索を次年度も継続する必要がある。また、全国規模でEQAPを実施するための厚生労働省からの援助が必要で、最終年度は、本研究班からの国への提言としてまとめる予定である。

初年度に感染研ーコア・サポート地衛研共同研究体制から共同開発したインフルエンザ薬剤耐性株検出法を用いて、今シーズンも耐性株の全国的な検出サーベイランスが順調に続けられている。耐性変異マーカーを検索する地衛研での1次スクリーニング、それに引き続く感染研での薬剤感受性試験による確定診断という連携で、効率よいサーベイランスが実施されている。また、地衛研から提供された流行株の遺伝子大量解析を通して、ワクチン株選定のための情報としてWHOワクチン選定会議および国内ワクチン選定会議に貢献した。

本研究班で開発構築を試みているインフ

ルエンザウイルス遺伝子機能的構造解析を応用して、薬剤耐性株サーベイランスから見つかった B 型インフルエンザ薬剤耐性株が持つ新たな耐性変異マーカーの同定に成功し、薬剤耐性株サーベイランスに新たなチェック項目を提言でき、大きな貢献となった。

わが国では、インフルエンザワクチンの製造販売承認を得るためには、抗原ウイルス蛋白含量の規程はあるが、ワクチンの免疫原性を評価する規程はない。しかし、国産ワクチンの免疫原性はどの程度なのかを、ワクチン接種後の血清抗体で評価することは今後のワクチン改良にとって重要な情報となる。本研究班で毎年実施している各年齢層でのワクチン接種後の抗体価測定の結果は、ワクチン効果の評価と見直し政策にとって大きく貢献している。

## E. 結論

- ・ 全国ブロックごとのコア・サポート地衛研ネットワークが組織され、感染研との連携を強化したサーベイランス体制ができた。
- ・ コア・サポート地衛研で PCR 検査系の EQAP を実施し、問題点や改良点の検討を行った。
- ・ EQAP 実施によりコア・サポート地衛研での検査系の問題点が明らかになったケースでは、トラブルシューティングで検査精度の向上につながった。
- ・ 従って定期的な EQAP の実施はインフルエンザウイルスの核酸検出検査の精度管理および精度維持には必須。

- ・ 2010/11 シーズンに日本国内で検出されたオセルタミビル/ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 株は総解析株中 2.0%であり、シーズン毎にわずかながら検出率の増加傾向が認められた。
- ・ コンピュータを用いて HA と NA 蛋白質の構造解析を実施し、A 香港型と B 型のエンベロープ蛋白質の構造と変異の影響に関する情報を迅速に提供する基盤ができた。
- ・ A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型においても、2011 年前半から後半にかけて、NA 分節に特定のアミノ酸置換を持つ株の顕著な増加が見られた。M 分節はいずれの型においても特定の変異の増加傾向は認められなかった。
- ・ インフルエンザワクチン接種の必要性について血清疫学の観点から解析し、今後のワクチン接種の必要性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1121-1127
- ・ Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses



broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*, 2011 Oct 26;29(46):8330-8337

• Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(3):237-41.

## 2. 学会発表

• E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, M.Tashiro and T.Odagiri : Surveillance of antiviral drug-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 viruses in Japan Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions, May 2011

• 小田切孝人、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、金南希、田代真人 : 国内外で分離された 2010/11 シーズンのインフルエンザ流行株について 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011 年 6 月

• 江島美穂、高下恵美、藤崎誠一郎、金南季、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ : 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスおよび耐性株検出状況について 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011 年 6 月

• 川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、岩田真美、豊澤隆弘、高下恵美、江島美穂、小田切孝人、田代真人 : 2010/2011 シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性ウイルス 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011 年 6 月

• E.Takashita, M.Ejima, I.Takayama, M.Nakauchi, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, T.Kageyama, M.Tashiro and T.Odagiri : Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A(H1N1)pdm0909) viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in Japan XV International Congress of Virology, September 2011

• H.Xu, N.Kishida, E.Takashita, S.Fujisaki, R.Ito, T.Doi, H.Sugawara, M.Ejima, N.Kim, M.Tashiro, T.Odagiri, and the influenza virus surveillance group of Japan : Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in Japan XV International Congress of Virology, September 2011

• N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Ito, T.Doi, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Ejima, N.Kim, R.Saito, H.Ikematsu, M.Tashiro and T.Odagiri : Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells XV International Congress of Virology, September 2011

・C.Kawakami, E.Takashita, M.Ejima,  
S.Fujisaki, N.Kim, S.Usuku, E.Kurata,  
M.Iwata, T.Toyozawa, T.Odagiri and  
M.Tashiro: Neuraminidase inhibitor-resistant  
influenza A viruses detected in the 2010/11  
season in Yokohama, Japan XV International  
Congress of Virology, September 2011

・I.Takayama, E.Takashita, M.Ejima,  
M.Nakauchi, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida,  
H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, T.Kageyama,  
T.Odagiri and M.Tashiro: Improved  
surveillance system to detect antiviral-resistant  
influenza A(H1N1)pdm0909 viruses in Japan  
Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance,  
November 2011

・岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕  
徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、高下恵美、  
菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、  
金南希、佐藤彩、田代真人、小田切孝人：  
インフルエンザワクチン接種後のヒト血清  
抗体の交叉反応性をもとに評価した  
2010/11 シーズン A/H3 および B 型ワクチン  
の効果 第 15 回日本ワクチン学会学術集会、  
2011 年 12 月

・高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南  
希、岸田典子、徐紅、今井正樹、菅原裕美、  
伊東玲子、土井輝子、佐藤彩、田代真人、  
小田切孝人：抗インフルエンザ薬耐性ウイ  
ルスの検出と性状解析 First Negative  
Strand Virus-Japan Symposium、2012 年 1  
月

・小田切孝人：インフルエンザワクチン株  
選定プロセスとワクチンの問題点 First  
Negative Strand Virus-Japan Symposium、

2012 年 1 月

#### G. 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

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）  
地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬  
剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究  
平成 23 年度分担研究報告書

## インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間 および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

研究分担者 皆川 洋子 愛知県衛生研究所 所長

### 研究協力者

池田辰也、水田克己	山形県衛生研究所（コア地衛研）
長島真美、新開敬行、林 志直	東京都健康安全研究センター（コア地衛研）
加瀬哲男、森川佐依子、廣井聡	高橋和郎 大阪府立公衆衛生研究所（コア地衛研）
戸田昌一、調 恒明*	山口県環境保健センター（コア地衛研）
吉富秀亮、千々和勝己	福岡県保健環境研究所（コア地衛研）
駒込理佳、長野秀樹	北海道衛生研究所
川上千春	横浜市衛生研究所
小渕正次、滝澤剛則	富山県衛生研究所
内野清子、田中智之	堺市衛生研究所
平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
山下和予	国立感染症研究所 感染症情報センター
安井善宏	愛知県衛生研究所（コア地衛研）

\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長

### 研究要旨

2009/2010 シーズンに発生した A/H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミックインフルエンザを契機に、国立感染症研究所（以下：感染研）と地方衛生研究所（以下：地衛研）の緊密な連携に基づく全数検査診断実施とその後到来した第 1 波対応の経験をふまえ、地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会と緊密な連絡調整を行いつつ 22 年度に構築したコア・サポート地衛研体制を軸とした国内におけるインフルエンザウイルス・サーベイランスの維持強化を図った。

23 年度は、22 年度に引き続き

- (1) 抗ウイルス剤感受性や抗原性変化などのハイリスク変異株サーベイランスの維持強化や検査手法の検討・改善に努める一方で、
- (2) 影山分担研究者（感染研）によるウイルス遺伝子検出試験における精度管理試行に協力した。また
- (3) 2011 年 1 月以降各地で発生した鳥インフルエンザ対応における地衛研の役割について検討を開始した。
- (4) 協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供及び関連調査研究に努め、研究会・学会発表や雑誌等への論文投稿を積極的に行った。

## A. 研究目的

2009/2010 シーズンに発生した A/H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミックインフルエンザは、わが国の公衆衛生・医療体制に対する試練となった。国立感染症研究所（以下：感染研）と地方衛生研究所（以下：地衛研）の緊密な連携に基づいて、国内発生前に全自治体をカバーする全数検査診断体制が確立・実施された。その後当研究班長より地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会に、地方自治体との連携による新型・季節性インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究への参画要請があり、国内におけるインフルエンザウイルス・サーベイランス体制の維持強化に必要な連携体制として各地方ブロックのコア地衛研を基軸とした連携網が構築された。

平成 23 年度の研究目的は、22 年度の研究成果を踏まえて、

(1) 国立感染症研究所・地方衛生研究所間インフルエンザ連携検査研究体制の維持強化は、わが国における鳥インフルエンザを含むインフルエンザ疑い患者の検査診断及びサーベイランスの強化。

(2) サーベイランスに用いる遺伝子変異検出手法や精度管理手法の開発・改良により、わが国におけるインフルエンザウイルス検出精度の向上を図り、効果的なサーベイランスを実施。

さらに本研究から期待される主な効果は

(1) 国立感染症研究所・地方衛生研究所間のインフルエンザ連携検査研究体制の維持強化。

(2) わが国におけるインフルエンザウイルス検出精度の向上。

(3) わが国におけるインフルエンザウイルスの重大な変異（例：抗原性、薬剤耐性）の迅速・正確な把握。に集約される

## B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症部会と連携し、

- 1) レファレンスセンター（コア地衛研）6 機関に加え、助言者（サポート地衛研）5 機関 計 11 機関が研究協力者として参画し、感染研とともに、ハイリスク変異の出現や現行検査系の精度について情報収集及び相互情報交換を密に行い、国内における mutant 検出感度を高める。
- 2) 影山博士らが新たに開発したリアルタイム PCR 試験法の導入により地衛研のワークロードの軽減ができないか検討する。
- 3) 高下博士らの準備したマニュアルを研究協力地衛研において検討するとともに、各地衛研において試験運用し、標準化に必要なデータを提供する。
- 4) インフルエンザに関する種々の病原体サーベイランスを積極的に実施するとともに、インフルエンザウイルス関連情報の迅速な提供に努める。

（倫理面への配慮）

本研究で用いる臨床検体及び患者情報は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施する。症例の分析においては、個々の症例が特定できないよう配慮して行う。

## C. 研究結果

1) 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制強化：22 年度に構築した全国ブロックごとのコア地衛研 6 機関、インフルエ

ンザ研究を長年実施し地域の特徴を有するサポート地衛研5機関合計11機関を主な研究協力者とした体制は円滑に機能した。

2) 影山研究分担者によるインフルエンザウイルス遺伝子検出試験外部精度管理の実地試行に上記11機関が協力した。

3) 堺市衛生研究所においては、国立感染症研究所から「インフルエンザウイルス分離・培養の際に使用する培地について」(平成23年11月15日)の情報提供に対してHA測定値に同様の課題があったため検討を行った。

(別添表1及び図1～3参照)

(材料および方法)表1のとおり。

(結果)①当所使用のMDCK細胞を用い、従来培地と感染研から情報提供された分離培地との比較検討を行い、その結果を図1に示す。分離培地によるHA値に差は認められなかった。

②図2は分離株を用いて、従来から使用しているMDCK分離細胞と感染研分与MDCK細胞の2種類と、従来の培地と情報提供による培地による分離率をそれぞれ比較検討した結果である。分与MDCK細胞を用い従来の培地で分離する方法に良好な分離率が見られたが、HA値が十分に得られない株もあった。

③1年以上、 $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結保存していた臨床検体から分離を試み、HA値の比較検討を行った。検体量が少ないため、分与MDCK細胞のみを用い、2種類の分離培地による比較検討となったが、従来培地の方がHA値は高い結果となった。しかし、その差は僅かであった。

(考察)A(H1N1)pdm09はHA値が低く分離ウイルス株に抗原解析できないものがあった。従来使用のMDCK細胞および感染研から分離されたMDCK細胞との比較検討、さらに従来の分離培養液をD-MEM(シグマCat. D6429)に変更することによる比較検討を行った。その結果、感染研分与MDCK細胞で従来の分離培地を用いるコンビネーションに良好な結

果が得られた。しかし、十分なHA値が得られない株もあり更に改良が必要であった。

4) 協力地衛研からのサーベイランス関連情報提供は、文末の雑誌投稿・学会発表リストのとおり。

#### D. 考察

1) 協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供に努める傍ら、各ブロックの地衛研の意見や要望を拾い上げ、必要に応じて協力地衛研間および感染研担当者間で情報共有している。2009年以降インフルエンザウイルス検査法としてPCR法が一般的に認識され、検体採取後6時間以内の結果還元が当然と期待されている。このためウイルス分離と赤血球凝集価による型別によるサーベイランス主体であった数年前と異なり、顔の見える者の間でのみ可能となる高度な情報共有なしには、しばしば対応困難な場面に遭遇する。23年度はさらに影山分担研究者らにより検討中の精度管理の導入に向け、試行に協力した。

2) 高下博士らによる薬剤耐性サーベイランスに不可欠なウイルス株分離に積極的に取り組んだ。

#### E. 結論

地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会と緊密な連絡調整を行いつつ全国ブロックごとのコア地衛研6機関、サポート地衛研5機関合計11機関とともにインフルエンザウイルス・サーベイランス検査研究体制の維持を図り、感染研との迅速な連携体制を強化した。

リアルタイムRT-PCRを用いたインフルエンザウイルス検出試験制度管理の実地試行を担当した。試行後には、実施マニュアルの記載から結果の返し方にいたるまで協力者会議において詳細な検討を行い、現場担当として感染研に有用な情報を提供した。

協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供に努めており、地衛研現場の声を汲み取る形で、感染研より2010年から2011年にかけて国内各地で発生した高病原性鳥インフルエンザ検査対応に関する調査を実施予定である。24年度の課題は、(1)オセルタミビル耐性変異(H275Y)サーベイランス及びインフルエンザ遺伝子検出に関する精度管理を実施する。

(2)地衛研における鳥インフルエンザ検査体制に関する調査を全国規模で実施・解析する。  
以上。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe K, Fukano, R., Ichiyama, T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*, 54(2) 167-172, 2011

### 2. 学会発表

- 1) Kawakami C, Takashita E, (ほか7名), Odagiri T, Tashiro M. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2011/11 season in Yokohama, Japan. 15th International Congress of Virology PO-35-14 札幌 2011年9月
- 2) Nakata K, Kojimahara N, Ohfuji S, Hirota Y, Kase T. The association between viral load in nasopharyngeal-throat swab and clinical characteristics among patients with pandemic H1N1 2009 influenza infection. 15th International Congress of Virology PO-55-15 札幌 2011年9月
- 3) Xu H, Kishida N, Takashita E, Fujisaki S, Ito R, Doi T, Sugawara H, Ejima M, Kim N, Tashiro M, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in

Japan. 15th International Congress of Virology SY-53-1 札幌 2011年9月

4) Miyoshi M, Yoshizumi S, Ishida S, Komagome R, Nagano H, Kudo S, Okano M. Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens. 15th International Congress of Virology PO-38-1 札幌 2011年9月

5) 加瀬哲男 前田章子 中田恵子 入江伸 大藤さとし 廣田良夫 2010/11シーズンインフルエンザワクチンによって誘導された A(H3N2)野生株に対する抗体 第15回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日

6) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘 ペラミビル治療患者より検出された H275Y 遺伝子変異をもつ A/H1N1pdm インフルエンザの症例 第52回日本臨床ウイルス学会 津 2011年6月

7) 川上千春、七種美和子、岩田眞美、高下恵美 横浜市における A 型インフルエンザウイルスの薬剤耐性株サーベイランス 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会 山形 2011年10月

8) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘 2010/2011シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性変異ウイルス 第43回日本小児感染症学会総会・学術集会 岡山 2011年10月

9) 吉富秀亮、石橋哲也、田上四郎、世良暢之、松田健太郎 喘鳴を呈する乳幼児からの呼吸器系ウイルスの検出状況について 第58回福岡県公衆衛生学会 福岡県 福岡市 2011年5月

10) 安達啓一、安井善宏、(ほか7名)、皆川洋子 呼吸器系ウイルスの検出法に関する研究 平成23年度愛知県公衆衛生研究会 愛知県大府市 2012年1月

### 3. シンポジウム、講演等

1) 皆川洋子、秦 眞美、安井善宏、山下照夫、小林慎一。鳥インフルエンザ発生時に地方衛生研究所に求められるスクリーニング機能について。シンポジウム III インフルエンザウイルス 衛生微生物技術協議会第32回研究会 江戸川区 2011年6月30日

1. 特許取得なし。
2. 実用新案登録なし。
3. その他

G. 知的所有権の取得状況

(別添 堺市衛生研究所 研究成果図表)

表1 インフルエンザウイルス分離・培養における細胞および分離培地の検討

材料  
 AH1N1pdm 10株(100倍希釈)  
 AH1N1pdm陽性検体 14検体(主に鼻汁、-80°Cで保存)

方法  
 2種類のMDCK細胞と2種類の分離培地について材料を接種し、HA価をそれぞれ測定する

MDCK細胞 24穴マイクロプレートでフルシートになるよう作成  
 材料を接種→1時間吸着→分離培地に置き換え→CO2インキュベータ  
 接種後7日目にウイルス回収  
 HA価測定 0.75%モルモット赤血球使用

使用細胞 堺市MDCK細胞  
 感染研分与MDCK細胞

分離培地 堺市採用培地(従来培地)  
 情報提供培地(感染研培地)

図1 従来培地と情報提供培地比較  
 堺市衛研MDCK細胞使用(P-12)

分離株	HA価	
	従来培地	情報提供培地
A/Sakai/7/2011(H1N1pdm)v466	8	8
A/Sakai/12/2011(H1N1pdm)v470	2	2
A/Sakai/8/2011(H1N1pdm)v473	4	4
A/Sakai/14/2011(H1N1pdm)v484	2	4
A/Sakai/15/2011(H1N1pdm)v485	4	2
A/Sakai/16/2011(H1N1pdm)v486	4	4
A/Sakai/12/2011(H1N1pdm)v470	2	2
A/Sakai/8/2011(H1N1pdm)v473	8	8
A/Sakai/27/2011(H3)v541	128	128
A/Sakai/28/2011(H3)v542	128	128
B/Sakai/36/2011(Yamagata)v417	512	256
B/Sakai/40/2011(Yamagata)v428	512	1024

0.75% モルモット赤血球使用

測定値に殆ど変化なし → 細胞分与願い

図2 AH1N1pdm分離株のHA価比較

No.	インフルエンザ分離株	継代No	堺市MDCK(P-12)		分与MDCK(P2-4)	
			従来培地	情報提供培地	従来培地	情報提供培地
1	A/39/2010(H1N1pdm)	2	<1	<1	8	<1
2	A/40/2010(H1N1pdm)	1	<1	<1	1	<1
3	A/41/2010(H1N1pdm)	1	<1	<1	4	<1
4	A/42/2010(H1N1pdm)	1	2	<1	4	1
5	A/44/2010(H1N1pdm)	1	64	16	32	16
6	A/45/2010(H1N1pdm)	1	2	<1	4	<1
7	A/47/2010(H1N1pdm)	1	16	8	16	8
8	A/48/2010(H1N1pdm)	1	16	32	16	32
9	A/7/2011(H1pdm)	1	32	32	64	32
10	A/8/2011(H1pdm)	1	256	128	64	128

図3 感染研分与MDCK細胞を用いて、二種類の培地による分離株のHA価の比較

	sampleNo.	従来培地	情報提供培地
1	v395	4	<1
2	401	2	<1
3	402	64	32
4	411	4	4
5	416	128	64
6	418	<1	<1
7	419	4	<1
8	420	4	2
9	424	<1	<1
10	440	4	2
11	442	<1	<1
12	443	<1	<1
13	328	8	<1
14	359	64	32



## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)

### の外部精度管理(EQA)評価について

分担研究者：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第2室

研究協力者：高山 郁代 同上

中内 美名 同上

#### 研究要旨

現在、新型インフルエンザ対策の一環として策定された「新型インフルエンザ対策行動計画」の改定が予定されており、感染拡大防止策の実施のため、適切に新型インフルエンザの確定検査を全国で実施できるよう、インフルエンザ迅速診断キット及び PCR 等による検査体制の整備が急務となっている。全国の地方衛生研究所では新型インフルエンザ発生時にインフルエンザの診断検査を実施する事になっており、そのための技術的支援は重要である。本研究では地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査について、検査精度の客観的な評価、検査に関するトラブルシューティング、検査精度向上を目的として、外部精度管理(EQA)評価を 11 か所のコア・サポート地方衛生研究所に対して行った。

#### A. 研究目的

現在、新型インフルエンザ対策の一環として策定された「新型インフルエンザ対策行動計画」の改定が予定されており、感染拡大防止策の実施のため、適切に新型インフルエンザの確定検査を全国で実施できるよう、インフルエンザ迅速診断キット及び PCR 等による検査体制の整備が急務となっている。そのため全国の地方衛生研究所においては、新型インフルエンザ発生時に直ちに構築する予定の新型インフルエンザウイルスの核酸診断検査を用いて検査を直ぐさまに実施するた

めの技術的支援が必要である。近年は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスや H3N2 亜型豚インフルエンザウイルスなど、新型インフルエンザウイルスの起源となりうるウイルスの流行が海外で頻発し、これらのウイルスを由来とした新型インフルエンザ流行の可能性が年々高まっている。我が国で新型インフルエンザ発生時に検査対応を迅速かつ確実に行うためには、平時の間に地方衛生研究所において的確にインフルエンザの診断検査を直ぐにでも行える体制を構築しておかなければならない。本研究では

その体制づくりの一環として、11か所のコアおよびサポート地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査について、検査精度の客観的な評価、検査に関するトラブルシューティング、検査精度向上を目的として、外部精度管理(EQA) 評価を行った。

## B. 研究方法

コアおよびサポート地方衛生研究所(北海道衛生研究所、山形県衛生研究所、横浜市衛生研究所、富山県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、堺市衛生研究所、山口県環境保健センター、福岡県保健環境研究所、沖縄県環境研究所、愛知県衛生研究所、東京都健康安全研究センター)に対してリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査に対する外部精度管理評価を行うために、実施要項(添付資料1)、パネル検体(H5N1 亜型の標準 RNA、未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA 7 検体、濃度の異なる不活化 A/California/7/2009 ワクチン株 2 検体および陰性検体 1 検体)、試験方法等に関するアンケート、結果記入ファイル、ほか標準 RNA 希釈用の希釈用チューブと希釈用蒸留水、P200 用フィルターチップの配布を行い、実施要項に従い試験を実施するように依頼した。

## C. 研究結果

コアおよびサポート地方衛生研究所で行った試験結果を集計し、詳細な解析を行った(解析結果については添付資料2を参照)。また、各地衛研ごとの解析結果については個別にフィードバックした。

## D. 考察

標準 RNA の 10 倍階段希釈作成は同一

のチップ、チューブ、希釈液の使用および希釈液の作成は 200  $\mu$ l までを計測できるピペッターを 1 本のみを使用してもらい、各地衛研間での 10 倍階段希釈の濃度誤差が少なくなるようにした。標準 RNA の 10 倍階段希釈についてリアルタイム RT-PCR 法により Type A および H5 HA の検出を行ってもらい、標準 RNA 原液の Type A 検出時の Ct (Cp) 値を「20」として換算して、標準 RNA を用いた Type A、H5 HA の検出感度について各地衛研間で比較した。その結果、薄い濃度の標準 RNA で Type A および H5 HA が検出できなくなるケースが一部の地衛研で見られた。これらの結果解析から測定機器のトラブルあるいは試薬の劣化などに原因があると推定する事ができた。対象の地衛研には原因を報告しトラブルシューティングを行ってもらった。

未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA を用いた H1pdm、H3、H5 亜型の同定および検出精度の確認を行った。その結果、一部の地衛研で RNA 濃度の低い検体で正確に亜型同定ができないケースがあった。これらの結果から測定機器のトラブルや試薬の劣化など原因が推定できる場合については対象の地衛研に報告しトラブルシューティングを行ってもらった。また、偽陽性(本来は陰性のサンプルに対して何らかの原因により陽性となった)が出てしまったケースも一部の地衛研で見られたが、この場合はサンプルの分注過程におけるヒューマンエラーによる分注ミスが原因と考えられ、検査手順書の整備や検査手順の見直し等が必要な場合があると考えられた。

RNA の抽出については、今回は比較的ウイルス濃度の濃い検体を送付したため、地衛研間で RNA 抽出効率による検出感度の大きな差は出なかった。検査過程で

ある RNA 抽出効率が検出感度に影響するかどうかなど、検出精度に関する評価をしっかりと行うためには、さらにウイルス濃度の低いウイルス株を使用する必要があると考えられる。

## E. 結論

EQA の実施により地衛研が行うリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査の精度管理を行う事ができた。新型インフルエンザウイルスが出現した場合は、新たに開発された検出用試薬が全国の地衛研に直ぐに配布され、すぐさま検査できる態勢を整えなくてはならない。また、常日頃の検査においてはその検査精度が維持されていなければ、新型インフルエンザが発生した際にも、精度の高い検査ができず陽性例の見逃しや偽陽性例など誤った結果を出す可能性が非常に高くなる。従って、新型インフルエンザ発生時の感染拡大防止を行うための初動対応を確実にするためにも、各地衛研においては精度の高い検査体制を維持する必要がある。

どこの地衛研でも同じ精度・特異性・感度でインフルエンザウイルスの核酸検出検査を行えるようにするためには、各地衛研の検査精度を管理する事が重要である。本研究による EQA 実施により問題点が明らかになったケースではトラブルシューティングを行い、問題点を改善することで検査精度の向上につながった。従って定期的な EQA の実施はインフルエ

ンザウイルスの核酸検出検査の精度管理および精度維持には必須と考えられる。

しかし、我が国には 70 カ所以上の地衛研があり、本研究で実施した内容では対象施設が多すぎて解析も困難となるため、内容をもっと簡潔にした EQA を行う、あるいは EQA を外部機関へ委託する(検体などは感染研で用意する)など、まずは恒常的に EQA を行える体制づくりが必要である。また、研修等を行うなど各地衛研の検査技術のスキルアップも重要である。地衛研における検査体制整備のためには、これらの対策を恒常的に行う必要があり、そのための経費として経常的事業費の確保が必要である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

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

## 添付書類 1

# インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイムRT-PCR法)の外部精 度管理(EQA)実施要項(抜粋)

### 1. 実施スケジュール

- ・測定期間: パネル検体到着日ー平成23年9月30日
- ・結果報告の締切: 平成23年9月30日
- ・集計結果報告: 平成23年10月20日頃まで

### 2. パネル検体

EQA で使用するパネル検体は以下に示す通りです。

- ① 標準RNA: 1.5mL チューブ 5本 (サンプル 60 $\mu$ L/チューブ) ーA/H5N1 CL2.3.2 北海道株由来 RNA
- ② 亜型同定用 RNA: 未知濃度のウイルス RNA 7検体  
1.5mL チューブ シールラベル 赤, 青, 白, 黄, 緑, 橙, 無 (各サンプル 200 $\mu$ L)  
ーA/H5N1 CL2.3.2 (北海道株 RNA), A/H3N2 (A/Victoria/210/2009 ワクチン株 RNA),  
A/H1N1pdm09 (A/California/7/2009 ワクチン株 RNA) の各亜型について濃度の異なる2つ  
の RNA 検体および陰性 RNA 検体
- ③ 不活化ウイルス: 濃度の異なる A/California/7/2009 ワクチン株 2 検体および陰性検体  
1 検体セラムチューブ キャップ色 赤, 青, 白 (各サンプル 1.2mL)

他、標準 RNA 希釈用に希釈用チューブ、希釈用蒸留水、チップ (P200 用: MBP 社 ART フィルターチップ ART 200U を1箱(96本入り))を同時に送付します。標準 RNA の希釈方法については別紙方法を参照してください。なお、標準 RNA の希釈には、Gilson P-200 など 50-150 $\mu$ L が採取できるピペッターを1本使用しますので、各検査施設でご用意をお願いします。

### 3. パネル検体到着時の注意事項

輸送容器からパネル検体を取り出す際は、ドライアイスの残存および検体の凍結状態を確認し、検体が融解しないように素早く-70度以下に保存して下さい。検体到着時の状況及び保管状況は「アンケート記入シート」に入力して下さい。

### 4. 測定の際の注意事項