

201225005A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成25（2013）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

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 _____ P1

II. 分担研究報告書

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 _____ P7

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(その2)

影山努 _____ P21

研究協力者：高山 郁代、高橋 仁

3. 抗インフルエンザ薬剤耐性ウイルス監視体制の強化について

高下恵美 _____ P36

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 _____ P40

研究協力者：横山勝

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 _____ P47

研究協力者：小口晃央、花巻朝子、山崎秀司

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 _____ P56

研究協力者：菖蒲川由郷、鈴木宏、樋熊紀男、高橋キイ子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P63

1. 総括研究報告書

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

全国地方ブロック代表のコア地方衛生研究所（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・サポート地衛研と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（感染研）および協力機関による共同研究グループの連携体制が円滑に機能し、地衛研の実情が見える検査、株サーベイランス体制の改善と強化を行った。昨年度にコア・サポート地衛研で試験実施した PCR 検査の外部精度管理評価試験（External Quality Assessment Program, EQAP）の結果を踏まえて、全国地衛研へ展開させる場合の問題点と EQAP パネルの組み直し、実施案の改訂を行い、第 2 回目の EQAP をコア・サポート地衛研で実施した。その結果、PCR 感度と精度の目覚ましい改善が見られ、全国地衛研での実施の有用性が明確になった。また、全国地衛研に対する検査、サーベイランス体制の現状把握のためのアンケート調査においても、EQAP の実施を要望する地衛研が多く、EQAP の全国規模での実施が期待されている。インフルエンザ薬剤耐性株検出サーベイランスを継続的に実施し、A(H3N2) 亜型でオセルタミビル/ペラミビル交叉耐性ウイルス 1 株を同定した。また、新規の耐性遺伝子変異を持つ B 型薬剤耐性株を計算科学技術を応用した分子動力学法で同定した。さらに、2012/13 シーズンの 3 価インフルエンザワクチンの有効性を免疫原性を基準に評価した。

研究組織

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

影山努

国立感染症研究所インフエ
ンザウイルス研究セン
ター第 2 室室長

高下恵美

国立感染症研究所インフエ
ンザウイルス研究センター
主任研究官

研究分担者

皆川洋子

愛知県衛生研究所所長

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

佐藤裕徳

国立感染症研究所病原
体ゲノム解析研究セン
ター室長

A. 研究目的

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発生して以来、3 シーズンが経過し、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たことから、一般国民や国の新型インフルエンザに対する関心が薄れてきている。この結果、国や地方自治

体のインフルエンザ対策にかける予算や人員の削減が始まり、検査、サーベイランスの最前線である地衛研組織の弱体化が進んでいる。さらに、地衛研担当者の定期異動により、これまで培った技術やノウハウを地衛研に定着させ継承させることが困難になりつつあり、これらの維持、強化が課題となっている。この問題を解決するためには、地衛研と感染研の強固な連携と共同研究体制が必須である。そこで、この連携体制の基盤を構築するために、平成22年度に全国6地方ブロック代表地衛研とインフルエンザに特に造詣の深い5サポート地衛研を基軸としたコア・サポート地衛研連携網を構築し、コア・サポート地衛研-感染研共同研究体制を発足させた。本研究では地衛研の検査、サーベイランス機能を維持し、改善するために感染研を中心とした基礎研究グループが開発した検査法や解析法を地衛研に技術移転して、検査、サーベイランスを効率的に運用するための技術支援を行った。

これまでの年度では、この共同研究体制で試験運用したりアルタイムPCRを用いた薬剤耐性変異株の検出法を全国規模に展開させ、今季で3シーズン目を迎え順調に稼働している。一方、PCR検査精度の検証と改善のための External Quality Assessment Program (EQAP) を立ち上げ、前年度、今年度とコア・サポート地衛研で2度にわたる試験運用を行い、全国地衛研で実施するための問題点や試験パネルの見直し、実施要綱の修正などを行い、PCR感度の大幅な向上と精度の改善が期待できることを確認した。また、コア・サポート地衛研代表による検査、サーベイランスの現状把握のためのアンケート調査でも、全国地衛研からEQAPの要望が多いことが分かり、全国規模でのEQAPが実現することが期待されている。

本研究は、基礎研究グループが立案開発した検査、サーベイランス手法をコア・サポート地衛研で試験運用し、問題点を改訂

して標準化し、その後に全国地衛研で運用するという2ステップ戦略を取っており、基礎研究と検査、サーベイランス体制がうまく噛み合った効率的で精度の高い全国規模の検査、サーベイランス体制の維持を目指している。

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組織し、前年度に引き続き感染研グループと共同研究体制で第2回目の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、パネル検体と共にコア・サポート地衛研へ配布した。

3. 全国地衛研を対象に、インフルエンザウイルス検査体制、株サーベイランスの現状、要望に関するアンケート調査を実施した。

4. 2011/12シーズンのA(H3N2)およびB型分離株のうち、感染症サーベイランスシステム(NESID)登録株の約5-15%をコンピュータでランダムに選択して、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、薬剤耐性株のスクリーニングを行った。

5. 2011年B型ヴィクトリア系統の薬剤感受性株と耐性株のNA蛋白質四量体を解析対象として、ホモロジーモデリング法によりNA蛋白質の機能構造モデル(四量体構造)を構築した。モデリングには、MOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada)に搭載されているプログラムを用いた。さらに、分子動力学計算により、NA蛋白質にE105K変異を導入した薬剤耐性株のNA蛋白質の分子動力学解析を行った。

6. 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。得られた塩基配列もしくはアミノ酸配列をもとに、近隣結合法および最尤法で分子系統解析を行い、薬剤耐性変異等の出現や変遷について分析を行った。さらに、今年度は新型のウイルスの出現も視野に、次世代型シーケンサーを用いたウイルス型に依存しない全セグメント解析の手法について検討を行った。

7. 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、2012年10-11月にデンカ生研社製の2012-13年シーズンインフルエンザワクチン（三価）接種者の接種前後のペア血清を用いて、各ワクチンウイルスに対する抗体応答を赤血球凝集抑制試験（HI）法にて評価した。また、成人群では前年度のインフルエンザ罹患または周囲の罹患の有無の情報により、前シーズン（2012-2013）にインフルエンザに罹患した群（罹患群）、インフルエンザに罹患しなかったが周囲に罹患者がいた群（接触群）、本人罹患・周囲の罹患ともになかった群（非罹患非接触群）の3群に分けて比較を試みた。

C. 結果

1. コア・サポート地衛研による第2回EQAPの実施

H23年度に第1回目を実施し、EQAPパネルや評価法の複雑さなど、全国地衛研で実施するための問題点や評価フォーマットの改善を行った。試験成績について、担当者（影山研究分担者）からトラブルシューティングが個別になされ、それを反映させて行われたEQAPにより、全参加コア・サポート地衛研のPCR検査感度、精度の劇的な改善が見られた。このことから、EQAPを全国規模で実施することの有用性が実証され。

2. 全国地衛研を対象とした検査、株サーベイランスの実態把握のためのアンケート調査

79機関中99%から回答があった。多くの地衛研が人員や予算の面で2009年より厳しい状況にあり、翌シーズン用ワクチン株決定に不可欠な流行ウイルス株の分離の意義について、今後自治体等関係者の理解を得る努力が必要であることが示された。また、EQAPの実施については、積極的に参加の意向を示す地衛研が多く、感染研による全国規模のEQAPが実現することが期待された。

3. 2011/12 シーズン薬剤耐性株サーベイランス

各型、亜型のインフルエンザウイルスについて耐性株マーカー遺伝子検出および感受性試験を実施した。A(H1N1)pdm09およびB型ウイルスでは、耐性株は検出されなかったが、A(H3N2)ウイルスでR292K変異をもつ耐性株が1株検出された。

4. 分子動力学解析の実施環境の構築と2011年B型ヴィクトリア系統の薬剤感受性株と耐性株のNA蛋白質四量体の構造解析
薬剤結合部位から離れた場所に生じる変異（E105K）をもつB型ヴィクトリア系統のインフルエンザウイルス株の薬剤耐性機序を分子動力学で解析した。この変異は、境界面の荷電環境の変化を介して、四量体構造の安定性の変化を惹起しうること、また、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うることが示唆された。また、E105は隣接するNA分子との境界面に位置するアミノ酸残基G141との間に水素結合を形成することを見出した。

5. 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、A/H3N2およびB型ウイルスの全8ゲノム塩基配列決定用プライマーセットを開発し、プロトコルを整備した。

さらに、ベンチトップ型の次世代型シーケンサーであるイルミナ社のMiSeqを用いて、全8セグメント解析を行うためのプロトコルの検討を行い、4日間で20株程度について、全セグメントの全長解析が可能な暫定プロトコルを作成した。

6. 2012/13シーズンのインフルエンザワクチンのA(H1N1)pdm、A(H3N2)、Bに対する血清抗体応答の評価

成人群97名、高齢者群50名について、当該シーズンワクチン接種前後のペア血清を用いて、40倍以上の抗体価保有率、幾何平均抗体価(GMT)、および応答率(抗体有意上昇率)について調べた。成人群、高齢者群ともにそれぞれの評価項目については、国際基準値をクリアする抗体応答が見られ、両群に優位の差は見られなかった。

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の精度をこれまで以上にレベルアップするために、全国79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を組織し、感染研ーコア・サポート地衛研共同体制が順調に稼働している。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、コア・サポート地衛研と事前協議、試験運用の第1段階を経ることにより、地衛研の現場の実情が反映された実施プランが策定できるようになり、効率的、効果的な運用の仕組みができた。当該年度は、PCR検査系の第2回目の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試験パネルの修正や評価法の簡便化を検討した。また、トラブルシューティングを行うことで、格段にPCR感度や精度が改善されることが分かったことから、全国規模でのEQAPの実現が期待される。このことは、アンケート調査においても、EQAPの実施を希望する地衛研が多く、関心の高さと各地衛研の検査系の改善に対する意気込みが感じられる。本研究期間では、コア・サポート地衛研での試験運用で終了したが、新規に予定している研究班で継続して全国規模での実施を推し進めたい。このためには、国からの実施予算措置が必須であり、国からのサポートを要望する。

E. 結論

- ・ コア・サポート地衛研ー感染研共同研究体制が効率的に稼働した。
- ・ コア・サポート地衛研で第2回目のPCR検査系のEQAPを実施し、トラブルシューティングにより、PCR感度および精度が顕著に改善された。
- ・ 全国地衛研を対象とした検査、株サーベイランス体制のアンケート調査で、実情把握を行った。
- ・ 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを行い、2011/12シーズンは、A(H3N2)で1株耐性株を検出した。
- ・ A(H1N1)pdm09、A(H3N2)およびB型の全ゲノムRNAを解析するプライマーの設定が完了した。また、次世代型シーケンサーを用いて、短期間に一定の株数を解析する暫定プロトコルを作成した。
- ・ サーベイランスで捉えた変異株のリスク評価に分子動力学を実行する環境(ハードとソフト)を整備した。
- ・ 今シーズンワクチンの抗体応答を成人層、高齢者層で評価して、両群とも良好な抗体応答を確認した。

F. 研究発表

1 論文発表

・Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. Clin Vaccine Immunol. 19(6):897-908 (2012)

・Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs Biochem. Biophys. Res. Commun. 429: 51-56 (2012)

・Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011 Vaccine. 30(45):6461-71 (2012)

・Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya

Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokot. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. Jpn.J.Infect.Dis. 65: 19-27 (2012)

・Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. Antiviral Res. 94(2):139-46 (2012)

・Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. ACS Chem Biol. 16;7(3): 552-62 (2012)

・Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 84(2): 336-44 (2012)

2 学会発表

・T. Odagiri Influenza activity in the northern hemisphere. Sixth Meeting of National Influenza Centres in the Western Pacific and South-East Asia Regions. Hanoi, Viet Nam May 2012

・藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人「新しい薬剤耐性変

異を持つB型インフルエンザウイルスの性状」第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 「3シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」 第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 「2011/12シーズンのインフルエンザ流行株と平成24年度のワクチン株」 第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代真人 「免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄されたA(H3N2)インフルエンザウイルスの解析」 第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人 「孵化鶏卵分離、馴化に伴うインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点」 第16回日本ワクチン学会 横浜、2012年11月

・鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 「インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析」 第16回日本ワクチン学会 横浜、2012年11月

・小田切孝人、岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、田代真人 「インフルエンザワクチン株の卵馴化による2012/13 シーズンワクチンの効果におよぼ

す影響およびブタ由来 A/H3N2 variant(v) ウイルスに対する邦人の抗体保有状況 Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

II. 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、水田克巳

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（サポート地衛研）

川上千春

横浜市衛生研究所（サポート地衛研）

小淵正次、滝澤剛則

富山県衛生研究所（サポート地衛研）

内野清子、田中智之

堺市衛生研究所（サポート地衛研）

平良勝也

沖縄県衛生環境研究所（サポート地衛研）

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対応にあたり国立感染症研究所（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が実施され、その後到来した第1波ではウイルスサーベイランス及びオセルタミビル耐性遺伝子マーカーのサーベイランスが実施された。これらの経験をふまえ、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。

24年度は、22-23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。

(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。さらに

(3) 全国の地方衛生研究所を対象に、インフルエンザウイルス検査体制に関するアンケート調査を実施した。

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。その後到来した第 1 波ではウイルスサーベイランス及びオセルタミビル耐性遺伝子マーカーのサーベイランスが実施された。小田切研究班長より地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症対策部会に、当研究計画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を図る目的で、6 地方ブロックのコア地衛研、及びインフルエンザに特に造詣の深い 5 サポート地衛研を基軸とした連携網が構築された。

平成 24 年度の研究目的は、22-23 年度の研究成果を踏まえ、

- (1) 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ウイルス検査診断体制の維持強化を見据えた感染研・地衛研間及び地衛研相互連携の強化。
- (2) 感染研による上記検査の精度管理手法の開発・改良への参画。

に加えて、

- (3) パンデミックから 3 年を経過しインフルエンザサーベイランスに対する自治体の関心低下及び地衛研人員・予算等の削減が進むなかでの鳥インフルエンザ対応を含む検査体制の現状を把握し、今後のサーベイランス体制を考える基礎資料とするため、地全協会員に対するアンケート調査の実施とした。

B. 研究方法

本研究にはレファレンスセンター（コア地衛研）6 機関及び助言者（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、以下の活動を実施した。

- 1) 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た。感染研との連携では、とくに抗ウイルス剤耐性、抗原変異と関連する赤血球凝集活性に関する動向について株分与を伴う相互情報交換を密に行った。
- 2) 感染研による検査系の精度管理に参画し、データを提供した。
- 3) 地全協会員に電子メール添付ファイル（表 1）を送付し、回答も電子メール添付ファイルで受領する形でアンケート調査を実施した。

（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

本研究から期待される主な効果は

- (1) わが国においてヒトが感染す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・正確な把握の前提となる、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) 地衛研におけるインフルエンザウイルス検査体制の現状把握及び問題点の抽出に集約される。以下に 24 年度の研究結果を述べる。

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機関を研究協力者とした体制は24年度も円滑に機能した。2月の時点で新型インフルエンザ海外発生や国内の鳥インフルエンザ発生はなく、主に地域流行株サーベイランスに端を発する病原体検出情報提供やウイルス性状解析を行った。なお3年間の実績を踏まえて25年度以降は各ブロック及び研究機関の実情に合わせて協力地衛研の入れ替え等が予定されている。

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) 地全協を対象としたアンケート調査は、インフルエンザ流行中の12月実施となってしまったが全79機関中78機関から回答協力を得られた。概要（速報）を別添1に記す。今後さらに詳細な分析を実施し、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対策実施に向けた基礎資料とする。

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。これらに加えて、感染研の発行する病原微生物検出情報(IASR)に、随時最新の情報を提供した。また、病原体検出マニュアル全体の見直し改訂にあたり、高病原性鳥インフルエンザウイルス、及びインフルエンザウイルスのマニュアル改訂に協力した。

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、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

も積極的に取り組んだ。感染研と協力地衛研との情報共有は、新型インフルエンザ発生直前の4年前に比較してスピード、質、量のどの点をとっても格段の向上がみられている。一方でレファレンスセンターとして各ブロックの地衛研の意見や要望を拾い上げ、必要に応じて地衛研相互での共有を推進するコア地衛研としての役割は、各ブロック内でさらに機能すべき点があるように思われる。

2) 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、試行に協力して現場の実情を伝えた。インフルエンザウイルス検出に関する外部精度管理を希望する地衛研は多く、今年度の成果に基づいた感染研による全国規模の精度管理が、近い将来実現することを期待する。

3) 2009年4月北米における新型インフルエンザ発生から数ヶ月の間全国地衛研に遺伝子検出用検体が連日搬入され、2010年全国各地での高病原性鳥インフルエンザ発生と終息から約2年が経過した現在、多くの地衛研が人員や予算の面で2009年より厳しい状況にあり、翌シーズン用ワクチン株決定に不可欠な流行ウイルス株の分離の意義について、今後自治体等関係者の理解を得る努力がさらに必要となっている。

E. 結論

地全協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。研究協力機関は、3年間の研究期間を通じて流行中のインフルエンザウイルスを分離するのみならず薬剤耐性や抗原変異を中心に性状変化を解析し、積極的に学会、論文等の形で情報を発表した。

感染研によるリアルタイムRT-PCRを用いたインフルエンザウイルス検出試験精度管理の実地試行を担当し、現場担当として感染研に有用な情報を提供した。

全国の地衛研に対して、鳥インフルエンザを含むインフルエンザウイルス検査体制に関する調査を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakai E, Yamamoto T, Yamamoto K, Mizoguchi Y, Kaneno H, Ihashi M, Takano M, Anzai K, Kase T, Shimotsuji T A case study of IgG3 deficiency regarding the severity of Influenza H1N1pdm 09. *Pediatric International* 54 (6)758-761, 2012.

2) Hamada N, Imamura Y, Hara K, Kashiwagi T, Imamura Y, Nakazono Y, Chijiwa K, Watanabe H Intrahost emergent dynamics of oseltamivir-resistant virus of pandemic influenza A(H1N1)2009 in a fatally immunocompromised patient *Journal of Infection and Chemotherapy* 18 865-871, 2012.

3) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、岡野素彦 北海道におけるインフルエンザウイルスの流行状況—2011/12 シーズン—北海道立衛生研究所報 62 (印刷中) 2013

4) 小淵正次、堀元栄詞、名古屋(小原)真弓、板持(岩井)雅恵、滝澤剛則、大井哲夫、南部厚子、馬淵俊輔、川越久美子、星山典江、關口健治 インフルエンザ流行予測調査(平成23年度)富山県衛生研究所年報 35 68-73, 2012

5) 原田 幸子, 新開 敬行, 長島 真美, 吉田 勲, 尾形 和恵, 長谷川 道弥, 林志直, 甲斐 明美 インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検索(2011/2012 シーズン) 東京都健康安全研究センター研究年報 63

901-906, 2012.

6) 森川佐依子、加瀬哲男 ウイルス感染症検査診断の新しい展開 インフルエンザの診断 臨床と微生物 39 (6) 663-667, 2012

7) 前田章子、森川佐依子、加瀬哲男、入江伸、廣田良夫 インフルエンザウイルス抗体価測定に関する問題点—2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) の非特異的凝集抑制物質(nonspecific inhibitor) 感受性に関する検討— 感染症学雑誌 86 (4) 400-404, 2012

8) 川上千春 渡邊寿美 清水英明 山崎雅彦 市川正孝 三田村敬子 菅谷憲夫 呼吸器感染症のウイルス病原診断 インフルエンザウイルス 臨床とウイルス 40(3)104-112, 2012

9) 川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、池淵 守、蔵田英志 横浜市におけるインフルエンザの流行(2010年8月~2011年5月) 横浜市衛生研究所報 50 75-82, 2012

10) 川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、森田昌弘、水野哲宏 横浜市におけるインフルエンザの流行(2011年9月~2012年5月) 横浜市衛生研究所報 51 61-67, 2012

2. 学会発表

1) 原田幸子, 新開敬行, 吉田勲, 長島真美, 尾形和恵, 林志直, 甲斐明美 低凝集性インフルエンザウイルスのヘマグルチニンアミノ酸変異について 日本進化学会第14回東京大会 東京都 2012年8月

2) 吉田勲, 新開敬行, 原田幸子, 長島真美, 林志直 他4名 2011-2012 シーズンのA型インフルエンザウイルスの分離について 第27回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 山梨県甲府市 2012年9月

- 3) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、小田切孝人、田代眞人 免疫抑制患者において薬剤投与後持続感染がみられた A(H3N2)インフルエンザウイルスの解析 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年 11月
- 4) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で分離したインフルエンザウイルス AH3 の分子疫学的解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年 11月
- 5) 小淵正次、堀元栄詞、稲崎倫子、名古屋(小原)真弓、板持(岩井)雅恵、佐多徹太郎、滝澤剛則 A型インフルエンザウイルス市中株およびノイラミニダーゼ阻害薬投与患者由来株における薬剤耐性変異の検出 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年 11月
- 6) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 3シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ耐性株サーベイランス 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年 11月
- 7) 岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2011/12 シーズンのインフルエンザ流行株と平成24年度のワクチン株 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年 11月
- 8) 川上千春 七種美和子 豊澤隆弘 薬剤投与後長期間排泄された AH3 型インフルエンザウイルスの変異 第44回日本小

児感染症学会総会・学術集会 北九州
2012年 11月

3. シンポジウム、講演等

- 1) 川上千春、七種美和子、高下恵美、江島美穂 長期持続感染例のウイルス変異 第26回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 福島 2012年 5月
- 2) 安井善宏、ほか3名、皆川洋子、小田切班コア・サポート地衛研. インフルエンザ関連サーベイランスの問題点—地衛研の立場から—. 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33回研究会 横浜市 2012年 6月 29日
- 3) 水田克巳. 追加発言. 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33回研究会 横浜市 2012年 6月 29日
- 4) 田中智之、調 恒明、浅利誠志、村瀬充範、和山行正 教育シンポジウム: 本邦における感染症検査機関: 大学附属病院/民間検査機関/地方衛生研究所における BSL 整備状況、検査対象ウイルス及び検査内容の現状について 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年 11月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

平成24年12月20日

インフルエンザ検査体制に関するアンケート調査協力をお願い

地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会
インフルエンザ小田切班担当 愛知県衛生研究所

皆川洋子

連絡先電子メール：eiseiken@pref.aichi.lg.jp
fax 052-913-3641
TEL(代表)052-910-5618 (直通)052-910-5604

本調査は、厚生労働科学研究小田切班研究班活動の一環として、地方衛生研究所における鳥インフルエンザを含むインフルエンザウイルス検査体制の特徴を把握し、25年度以降の研究班活動に反映させることを目的に実施させていただきます。御多忙のところ申し訳ありませんが、2013年1月16日（水）までに電子メールにてご返答くださいますよう、御協力のほどよろしくお願いたします。本調査は検査体制構築維持状況の把握を主眼に実施しますので、検査実績数量は、概数で結構です。

1 はじめに、回答者についてお答えください。

研究所名：	
氏名：	
所内所属：	
職名：	
E-mail：	
電話番号：	

貴所において、現在インフルエンザウイルス検査を実施していない場合は、下欄に○を記して11に移ってください。

インフルエンザウイルス検査を実施していない：	
------------------------	--

2 貴所におけるインフルエンザウイルス検査要員について、お答えください。

ウイルス検査要員総数（通常業務として、ウイルス検査を実施している人数若しくは業務量から算出された定数）		名
インフルエンザ検査要員（平常時）		名
インフルエンザ検査要員（緊急時に所内で動員可能な最大数。所外応援は、既にマニュアル等に明記されている数に限定。）		名

2に関して補足情報、質問内容への御意見等ありましたら、こちらに記載してください。

例) 緊急時は受付連絡業務用に他部署より3名動員する。

--

3-1 H1及びH3以外の血清型別のA型インフルエンザウイルス（H5, H7, H9等）検査体制について、現時点における対応の可否を下記の表に記入してください。

	検査実施 可○否×	real time RT-PCRによる遺伝子検出	conventional PCRによる遺伝子検出	シーケンスによる型別同定	分離培養	家畜伝染病病原体所持申請の有無	備考・補足情報
例) H5	○	○	○	○	×	×	なし
H5							
H7							
H9							
H2他上記及びH1H3以外							

※http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e_koutei/kaisei_kadenhou/pathogen.html

3-2 H5若しくはH7インフルエンザ疑似検査について、以下の表に貴所における検査実施の可否、及びわかる範囲で検査実績件数（概数でも結構です。実績のない場合は0としてください。）を記入してください。

シーズン（9月～翌年8月） 2012年は判明分まで	検査実施 可○否×	real time RT-PCRによる遺伝子検出	conventional PCRによる遺伝子検出	シーケンスによる型別同定	分離培養	備考・補足情報
例 2008/2009	○	○	○	○	×	なし
○の場合件数	20	20	20	0		
2008/2009						
○の場合件数						
2009/2010						
○の場合件数						
2010/2011						
○の場合件数						
2011/2012						
○の場合件数						
2012/2013						
○の場合件数						
3-1, 3-2に関して補足情報、質問内容への御意見等ありましたら、こちらに記載してください。						

4-1 過去5年間に貴所において臨床検体（季節性、新型、鳥インフルエンザ疑似全て、上記3-2の回答も含む）からの遺伝子検査and/or分離培養実施の可否、及びわかる範囲で検査件数の実績（概数でも結構です。実績の無い場合は0としてください。）を記入してください。

シーズン（9月～翌年8月） 2012年は判明分まで	検査実施 可○否×	real time RT-PCRによる遺伝子検出	conventional PCRによる遺伝子検出	シーケンスによる型別同定	分離培養	備考・補足情報
例 2008/2009	○	○	○	○	○	なし
○の場合件数	900	700	700	300	900	
2008/2009						
○の場合件数						
2009/2010						
○の場合件数						
2010/2011						
○の場合件数						
2011/2012						
○の場合件数						
2012/2013						
○の場合件数						
4-1に関して補足情報、質問内容への御意見等ありましたら、こちらに記載してください。						

4-2 貴所には、現在インフルエンザウイルスの分離培養を実施する体制がありますか。

回答（有○、無×）：

--	--

4-3 過去5年間に貴所において、インフルエンザウイルスの分離培養、及び以下の手法による血清型別解析実施の可否、及びわかる範囲で件数の実績（概数でも結構です。実績の無い場合は0としてください。）を記入してください。

シーズン（9月～翌年8月） 2012年は判明分まで	分離培養 可○否×	分離株のreal time RT-PCRによる遺伝子型別	分離株のconventional RT-PCRによる遺伝子型別	分離株のシーケンスによる型別同定解析	赤血球凝集及び凝集抑制試験（HA, HI）	中和試験（NT）	備考・補足情報
例 2008/2009	○	○	○	○	○	×	
○の場合件数	900	700	700	300	900		
2008/2009							
○の場合件数							
2009/2010							
○の場合件数							
2010/2011							
○の場合件数							
2011/2012							
○の場合件数							
2012/2013							
○の場合件数							

4-4 血清型別・抗原性解析に、HA/HI, NT, PCR・シーケンス以外の解析手法（例：LAMP）を用いている場合は、その手法と実績を教えてください。

回答（手法の名称、年間実施件数等実績）：

4-2～4に関して補足情報、質問内容への御意見等ありましたら、こちらに記載してください。

5 インフルエンザウイルス分離培養は、ウイルスサーベイランスの実施に不可欠ですが、地衛研の一部には分離培養体制を縮小廃止する動きがあるとの情報があります。地衛研におけるウイルス分離培養実施について、御意見・コメント等をお願いします。

6-1 インフルエンザウイルスを検出するReal-time RT-PCRについてお尋ねします。 現在貴所においてインフルエンザウイルス検査に使用可能なReal-time PCR機の合計台数を記入して下さい。

リアルタイムPCR機器の台数：	台
-----------------	---

6-2 現在インフルエンザウイルスの検査で主に使用しているReal-time PCR機の機種名、メーカー名、解析ソフト名(バージョン)、当該機種の台数を記入して下さい(複数の機種を使用している場合は、主な機種について記載し、3機種以上の場合は新たな行を挿入のうえ回答してください)。

機種 機種名：
 1- メーカー名：
 1 解析ソフト名(バージョン)：
 台数：

機種 機種名：
 1- メーカー名：
 2 解析ソフト名(バージョン)：
 台数：

6-3 インフルエンザウイルスの検査で上記機種に加えてパンデミック時などに検査で使用する可能性がある機種がありましたら、記載してください。

機種 (他の機種がある場合、主な用途：)
 2 機種名：
 メーカー名：
 解析ソフト名(バージョン)：
 台数：

機種 (他の機種がある場合、主な用途：)
 2- 機種名：
 2 メーカー名：
 解析ソフト名(バージョン)：
 台数：

7-1 貴所ではインフルエンザウイルスにおける薬剤耐性マーカー検索(例：H274Y, H275Y変異の検出)を行っていますか。

回答(実施の場合○、未実施の場合×)：	
---------------------	--

7-2 薬剤耐性マーカー検索に関する補足情報、意見等がありましたら、下欄に記入して下さい。

--

8 PCR、ウイルス分離、耐性マーカー遺伝子検索等の諸検査に関する精度管理実施の有無と、実施している場合具体的な内容を記載してください。

検査手法	精度管理実施 有○無×	陽性対照	陰性対照	その他(具体的内容)
例) real time RT-PCR	○	○	○	小田切班でのEQA活動
real time RT-PCR				
conventional RT-PCR				
分離培養				
耐性マーカー				
HA, HI				
NT				
他(検査名)				

8に関して補足情報、質問内容への御意見等ありましたら、こちらに記載してください。
--

9 PCR, ウイルス分離、耐性マーカー遺伝子検索及び赤血球凝集抑制反応等によるワクチンとの抗原性比較解析以外に、貴所においてインフルエンザウイルス検出・解析に関して特に実施していることがありましたら、下欄に記入して下さい。

--

10 地衛研からの分与株について、感染研により実施されたHI試験及び薬剤感受性試験の成績は定期的に公表されています。これらの成績活用の有無、活用されている場合は方法や頻度（例：流行期は毎週）、フィードバックに関する意見や要望がありましたら、下欄に記入して下さい。

--

11-1 平成24年9月に感染研で実施された「高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1) 同定技術研究会」への参加の有無をお答えください。

回答（参加○、不参加×）：	
---------------	--

11-2 今後、上記のような研修開催が必要と思いますか？必要性があるとお考えの場合、望ましい開催間隔についてお答えください。

回答（必要○、不要×）：	
開催間隔（例：2年に1回、検査法変更時のみ）	

11-3 インフルエンザウイルス検査に関する技術研修の要望やご意見がありましたら下欄に記入して下さい。

--

12 地衛研におけるインフルエンザ検査体制全般や、地衛研相互及び国立感染症研究所をはじめとする他機関との連携等に関する御意見がありましたら、下欄に記入して下さい。

--

御協力ありがとうございました。