

別添 1 平成 24 年度「インフルエンザ検査体制に関するアンケート調査」結果概要（速報）

1 調査対象 地方衛生研究所全国協議会会員： 79 機関

回答率： 98.7% (78/79) ※1 月 26 日までに回答が寄せられた機関数。

うちインフルエンザウイルス検査を実施していない機関： 4 機関 (5.1%)

※以下の解析は、検査を実施している 74 機関からの回答について実施した。

表 1 に、都道府県、指定都市、中核市・特別区等その他、の自治体別回答数等を付す。

表 1 地全協加盟機関からの回答状況

	全体 (%)	都道府県	指定都市	その他
全会員	79(100)	47 (100)	19(100)	13(100)
回答	78(98.7)	46(97.9)	19(100)	13(100)
インフルエンザウイルス検査あり	74(93.7)	46(97.9)	19(100)	9(69.2)

2 検査要員

表 2 インフルエンザウイルス検査担当者数（平均値及び範囲）

	全体	都道府県	指定都市	その他
機関数	74	46	19	9
ウイルス検査担当者総数	3.5(1-10)	3.7 (1-10)	3.4(1-6)	2.7 (1-5)
平常時インフルエンザ担当数	1.7 (0-5)	1.8 (1-4)	2.0(1-5)	1.7 (0-4)
緊急時最大人員（1 機関は不確定）	7.3(3-18)	7.9(3-18)	7.0(4-15)	4.8 (3-6)

3 H1 及び H3 以外の血清亜型の A 型インフルエンザウイルス（H5, H7, H9 等）検査体制
検査体制のある機関： 66 機関 過去 5 年間に検査実績のあった機関： 28 機関

※H5, H7 及び H9 その他に明瞭に分けた形での追加調査が望ましい。

4 インフルエンザウイルス分離培養の実施状況

表 3 地全協加盟機関からの回答状況

	全体 (%)	都道府県	指定都市	その他
回答機関数	74(100)	46 (100)	19(100)	9(100)
分離培養体制あり	69(98.7)	46 (100)	19(100)	4 (44)
分離培養体制ありなし	5(93.7)	0 (0)	0 (0)	5 (56)

5 インフルエンザウイルス分離培養に関する意見、コメント(51 機関)

・ウイルス株サーベイランスの必要性、意義を認めるコメントが多く寄せられた一方、
遺伝子検出に比べ手間と時間を要し自治体として実施する根拠が弱く縮小（検査数の減少）
や廃止もやむを得ない、という声や、国でやってほしい、国による通知等人員確保の根拠
や予算増額等の要望があった。

技術的ポイントでは、

・HI 用抗血清がフェレットからウサギに変更され亜型内（ワクチン株等との）詳細な抗原
解析が困難になったことから、A 型ウイルスについては分離をせずとも HA 遺伝子 PCR によ
る型別で十分ではないか、との意見が複数寄せられている。

一方、分離数が多く、サーベイランス分は個別検体の結果通知を急かされない機関から
は、PCR 試薬が高価という理由で HA-HI による型別継続の意向が示された。

6 リアルタイム PCR 機器

表4 インフルエンザウイルス検査用リアルタイム PCR 機器数 (平均値及び範囲)

	全体	都道府県	指定都市	その他
機関数	74	46	19	9
インフルエンザ用機器数	1.95 (1-5)	2.0 (1-5)	1.89(1-3)	1.78 (1-2)

7 薬剤耐性マーカー検索の実施状況

薬剤耐性マーカー検索を実施している：69 機関 (93.3%)

※このうちウイルス分離培養を実施していないのは3 機関。

実施していない：5 機関 (6.7%)

8 精度管理

当班活動以外の外部精度管理には、九州ブロックにおける模擬訓練が実施されていた。

感染研による外部精度管理の実施希望が、複数の機関より寄せられている。今後精度管理を計画する場合は、事前に実施を希望する項目等に関する調査が必要である。

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以外に用いているインフルエンザウイルス検出・解析手法

以下に一部を記す。

(分子疫学、遺伝子解析)

- ・分離株の遺伝子解析 (HA, NA, MP 他)
- ・遺伝子塩基配列及び推定アミノ酸配列に基づく系統樹解析
- ・重症例等の内部遺伝子解析、
(ノイラミニダーゼ遺伝子)
- ・PCR 法による NA 亜型の同定
- ・A/H3 ウイルスの NA 遺伝子解析によるノイラミニダーゼ耐性遺伝子の検索
(検査法の検討、その他)
- ・LAMP 法による遺伝子検出
- ・インフルエンザ迅速診断キットの比較検討

10 感染研に分与した株の HI 試験及び薬剤感受性試験成績の活用やフィードバックに関する意見

特に活用していない、との回答も複数あったが、流行期には頻繁に活用している、という事例や感染研からのフィードバックに関するコメントが寄せられた。以下に一部を記す。

(活用例)

- ・公表されたものを閲覧し、HI 価及び薬剤感受性情報を業務の参考としている
- ・流行時は毎週参照している
- ・定点医療機関等への感染症発生動向調査情報フィードバック時に情報提供している
- ・年報作成時等に活用している
- ・ブロックにおけるインフルエンザ研究会の資料として活用している

(フィードバックについて)

- ・地衛研と感染研の HI 価に差異がある場合の理由、問題点等について情報がほしい
- ・HI 試験の結果と HA 遺伝子解析の関連が分かるようにしてほしい
- ・HI 試験結果については、各衛研の許可をとってフルオープンにしてはどうか

1.1 インフルエンザ検査研修の必要性・頻度

平成 24 年 9 月に感染研により実施された H5N1 ウイルス検査に関する研修への参加率は 98.6% (73/74) と高く、参加希望は 100% (74/74) であった。

表 5-1 研修実施頻度に関する要望

	全体 (%)	都道府県	指定都市	その他
変更時のみ	24 (32.4)	17	5	2
変更時+定期	13 (17.6)	9	2	2
定期	36 (48.6)	19	12	5
無回答	1 (1.3)	1	0	0
(小計)	74 (100)	46 (62.2)	19 (25.7)	9 (12.1)

表 5-2 研修実施間隔の要望：定期的実施を希望する 49 (=13+36) 機関のみ集計

全 49 機関中	全体 (%)	都道府県	指定都市	その他
1 年 1 回 (1-2 年含む)	8 (16.3)	1	3	4
2-3 年に 1 回 (3-4 年含む)	35 (71.4)	23	10	2
4 年に 1 回	2 (4.1)	2	0	0
定期 (間隔指定なし)	4 (8.2)	2	1	1
小計	49 (100)	28 (57.1)	14 (28.6)	7 (14.3)

研修に関する希望・意見の一部

(開催形態等)

- ・地全協加盟機関は全て参加を認められるべき
- ・平成 24 年 9 月のように旅費も支給する形で定期的実施してほしい (多数)
- ・旅費支給、若しくは自治体で予算を確保するなら前年度 9 月頃までに予告してほしい
- ・ブロック (地域) ごとにレファレンスセンターが主体となって技術研修を定期的開催すれば、旅費の節約にもなる
- ・一部の地衛研は人事異動周期が短くなっており、定期的に技術研修を受ける必要がある (専門的技術の供与・標準化)
- ・H7, H9 亜型検出に関する Real time PCR 法技術研修
- ・薬剤耐性 (IC50) に関する研修 (2 機関)
- ・細胞培養に使用する MDCK 細胞の検定および定期的な分与による更新
- ・HI 試験を継続する場合は、実技研修を実施して手技の統一化 (血球浮遊液の仕様濃度の統一と調整方法、凝集判定の目合わせ等) を図るべき
- ・国レベルで分離培養に用いる細胞およびマニュアルの標準化を踏るべき
- ・分離培養及び赤血球凝集試験と凝集抑制試験、中和試験等の技術研修
- ・MDCK 細胞培養およびインフルエンザウイルスの分離培養についての基礎的な研修
- ・遺伝子解析の研修
- (基礎的な技術指導)
- ・薬剤耐性検査やシーケンス検査に関する技術研修
- ・細胞培養の技術研修
- ・ウイルス分離・培養に関する知識技術の研修
- ・新任者対象の技術研修を少人数 (10 人前後) で定期的開催してほしい
- ・高病原性鳥インフルエンザおよび新型インフルエンザ発生時における P3 施設内でのウイルス培養および分離・同定方法
- ・人事異動で専門的な技術者が育ちにくいので、簡単で誰でもできるような検査法を

マニュアルに示してほしい

(その他)

- ・国立感染症研究所で日常行われている検査・研究の具体的な紹介
- ・今後も連携体制を取れるよう、研修会で交流を図ることが必要
- ・研修会における地研相互の意見交換もきわめて有用

1.2 その他意見、コメント

- ・シーズン毎に培養細胞の種類や HA・HI 試験の反応条件設定について、感染研を中心に多くの地衛研の情報を共有できれば、各機関では効率的に最適な反応条件を選択できるようになるのではないかと
- ・近年の衛生微生物技術協議会レファレンス関連会議は、感染研から地衛研に対して非常に有益な情報提供がなされており感謝している。地衛研相互の情報交換の時間帯も設けられるとよい
- ・GISAIDをもっと使いやすくしてほしい(講習会、マニュアルの配布等)
- ・可能なら、地方が人材を確保しやすくなるようインフルエンザを含むウイルス検査の必要性を盛り込んだ通知等を出す、等の策を国が講じてほしい
- ・H7 検出用の陽性対照配付の要望

1.3 総括

2012年12月に地方衛生研究所全国協議会会員を対象に実施した「インフルエンザ検査体制に関するアンケート調査」には、ほぼ全ての会員から協力が得られた。

インフルエンザ検査の精度管理に対する関心は、感染研による外部精度管理を希望する意見が寄せられていることから、低くないと思われる。

新型インフルエンザ PCR によるインフルエンザ遺伝子検出については、関心が高く研修の要望も高かった。

一方ウイルス分離培養をベースとするサーベイランス体制については、都道府県・指定都市に比べ、他の市及び特別区において分離培養を行う体制をとっている機関が少なかった。都道府県・指定都市においても、地衛研の重要な業務との認識は未だ健在であったが、予算と人員の削減が続くなかで法的根拠等の観点から業務を縮小(例:検体数減)せざるをえない、とのコメントがみられた。

過去5年間の検査数推移等に対する解析を加えた後に、改めて調査結果を報告する予定である。

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)

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室室長

研究協力者：高山 郁代 同上 研究員
高橋 仁 同上 主任研究官

研究要旨

新型インフルエンザの発生時は、感染拡大防止策の実施のため、全国の地方衛生研究所において新型インフルエンザに対する PCR 検査の実施が求められる事になり、全国で適切に新型インフルエンザの確定検査が実施できるよう、地方衛生研究所においては、その検査体制の整備が急務となっている。本研究では全国の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の精度向上を目的とする全国的な外部精度管理(EQA)評価導入を行うために、11 か所のコア・サポート地方衛生研究所に対して試験的に EQA を行った。

A. 研究目的

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」が平成 23 年 9 月 20 日に最終改定された。また、「新型インフルエンザ等対策特別措置法」が平成 24 年 5 月 11 日に公布され、新型インフルエンザの発生時は、感染拡大防止策の実施のため、全国の地方衛生研究所において新型インフルエンザに対する PCR 検査の実施が求められる事になり、全国で適切に新型インフルエンザの確定検査が実施できるよう、地方衛生研究所においては、その検査体制の整備が急務となっている。

近年は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスや H3N2 亜型ブタインフルエンザウイルスなど、季節性インフルエンザウイルス以外でも、海外においてはヒトへの感染が散発的に発生しており、これらのウイルスを起源とするヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイ

ルスの出現も危惧されている。わが国において、新型インフルエンザ発生時に、検査体制を速やかに構築するためには、地方衛生研究所において正確にインフルエンザ核酸診断検査を行える体制を平時の間に築いておく事が重要である。

昨年度の本研究では、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、外部精度管理(EQA)評価を行い、検査精度の客観的な評価をして、トラブルシューティングにより検査精度の向上を図ってきたところである。今年度は、EQA を全国 75 カ所の地方衛生研究所に拡大して実施するためのコア・サポート地衛研による試験的 EQA を実施し、EQA の全国拡大のための問題点の把握、およびそれに沿った戦略策定を行った。

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、実施要項(添付資料1)、10検体(うち4検体は核酸抽出済み、6検体は不活化ウイルス粒子またはウイルス核酸を含み核酸抽出を行う必要がある)、試験方法等に関するアンケート、結果記入ファイルの配布を行い、「H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染疑い例が含まれる検査依頼」として実施要項に従い検査を実施するように依頼し、検査結果を集計してリアルタイム 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った。

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および感染研で行った試験結果を集計し、詳細解析を行った(添付資料2)。解析した結果、問題が見つかった場合は個別にフィードバックを行った。

D. 考察

昨年度は、統一したチップ、チューブ、希釈液を用いて、各地衛研で標準RNAの10倍階段希釈の作成およびリアルタイム RT-PCRの標準曲線の作成を行った結果を解析したが、その操作が非常に煩雑で、また必ずしも同じ階段希釈ができるとは限らないため、今年度は、各地衛研に統一した4検体の標準RNA(H5N1亜型)を配布した。これら検体を含め、Type Aを含んだリアルタイム RT-PCR法を行ってもらい、最も濃度の濃い標準RNA原液に対するType AのCt(Cp)値を「20」として、全ての検体についてのCt(Cp)値を算出し、Type A(およびそれ以外の型・亜型)検出系に対する検出感度を各地衛研間で

比較した。その結果、後に測定機器および試薬に問題がある事が判明した一カ所の地衛研を除いて、10 copies/ μ Lまでの濃度のH5N1亜型ウイルスRNAについてType AおよびH5ともに同定する事ができた(うち1カ所では、2回目検査で同定)。昨年度は、サンプルの取り違いや、サンプルの混入によるコンタミネーションが見受けられたが、本年度はそのような事は起きなかった。

今回のH5同定検査では全ての地衛研でH1pdmとH3亜型の同定検査をH5亜型否定試験として、Type A検査と同時に進めていた。核酸抽出が必要な6検体(内訳は添付資料2を参照)については、先述した1カ所の地衛研を除き、濃度の薄いH1pdm(50 copies/ μ L)およびH3(43 copies/ μ L)についても同定する事ができていた。

今回のEQAにおけるType Bに対する検査実況であるが、7カ所で全てあるいは一部の検体に対して検査を実施している。H1pdmとType Bの重複感染モデルケース(サンプルE)については、1カ所でType Bが検出できなかった(同定率5/6(83%))。今回はEQAの目的は、H5亜型を確実に診断できるかどうかであり、Type Bの検出系についての必要性はそれ程ないが、インフルエンザを否定する意味でも、B型インフルエンザの診断系についても整備しておく必要がある。

核酸抽出方法については、地衛研毎に抽出に用いるサンプル使用量および核酸抽出量が異なる。核酸抽出後のCt(Cp)値は直接比較できないため、標準RNAの増殖曲線を参考にCt(Cp)値の換算を行う必要があった。換算後のCt(Cp)値の比較を行うと、1カ所で不活化ウイルスからの核酸抽出が効率よく行われていなかった可能性がある事が考えられた。

E. 結論

昨年度、実施したEQAでトラブルシューティングを行った地衛研が多かったためか、今年度は後に測定機器および試薬

に問題がある事が判明した一カ所の地衛研を除いて、各地衛研のリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 亜型同定に大きな問題はない事が今回の EQA により確認する事ができた。

新型インフルエンザウイルスの出現直後は、検出用試薬が間に合わなくて除外診断(例えば Type A 陽性、H1pdm 陰性、H3 陰性の場合、新型インフルエンザが疑われる)断が中心になる可能性もあり、日頃サーベイランス等で行っている亜型同定の検査精度を維持する事が非常に重要となる。

また、検出用試薬が全国に配布された場合は、すぐさま検査できる態勢を整える必要があるため、検査に関連する人員の技術向上を図っておく必要がある。常日頃の検査において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ため、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、各地衛研において精度の高い検査体制を常に維持するためにも、EQA の実施は非常に有効である。

しかし、我が国には 70 カ所以上の地衛研があり、現在の地衛研のキャパシティを考えると、昨年度行った EQA の実施内容では明らかに地衛研の負担が大きく、また、解析数も膨大となるため、全国的な EQA の実施は困難と考えられた。今回の EQA では検体数を大幅に減らして EQA の実施を行っているが、それでもリアルタイム RT-PCR の精度管理と核酸抽出の精度管理を同時に行う事が可能であったため、今回実施した EQA の内容であれば、全国的な EQA の実施も可能であると考えられる。しかし、今回の EQA は、昨年度の EQA 後のトラブルシューティングにより問題点を解消した後に行っているため、それ程大きな問題点が浮上しなかったと考えられる。

全国的な EQA を実施する際は、まずは

検査精度に問題点があるかどうか分かる EQA を先に実施して、次に問題があるのはリアルタイム RT-PCR の検出系なのか核酸抽出なのか分かる EQA を実施するなど、回数を分けて段階的に EQA を実施する事が効率的であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Japanese Journal of Infectious Diseases 65(1):19-27, 2012.
- 2) Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol, 86(19):10805-20, 2012
- 3) Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards.

- Biologicals, 40(1):96-99, 2012
- 4) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 188(1-2):73-75, 2013.
 - 5) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology*. (in press)
 - 6) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版) 国立感染症研究所 2012, http://www.nih.go.jp/niid/images/1ab-manual/avian_influenza_2003.pdf
 - 7) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. インフルエンザ診断マニュアル(第2版) 国立感染症研究所 2012, http://www.nih.go.jp/niid/images/1ab-manual/influenza_2003.pdf
- 学会発表
- 国内会議
- 1) 影山努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第33回研究会. 2012年6月
 - 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
 - 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の2例. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
 - 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
 - 5) 高橋仁、原田勇一、中村一哉、浜本いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村繁之、田代真人、山本典生. インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
 - 6) 原田勇一、高橋仁、中村一哉、浜本いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐奈美、浅沼秀樹、板村繁之、田代真人、山本典生. インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
 - 7) 浜本いつき、原田勇一、中村一哉、高橋仁、許斐奈美、浅沼秀

樹、田代 真人、山本 典生. 無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

- 8) 浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人. 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
- 9) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月

国内会議

10) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012

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)

第 2 回外部精度管理 (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 24 年 12 月 7 日
- ・結果報告の締切: 平成 24 年 12 月 7 日
- ・集計結果報告: 平成 24 年 12 月 21 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 RNA 抽出が不要な 4 検体(既に核酸抽出済み)
- ② RNA 抽出が必要な 6 検体

※ ②には不活化ウイルスを使用していますが、念のため安全面を考慮してウイルスと同じように取り扱って検査を行って下さい。

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「アンケート記入欄」に入力して下さい。検体の凍結融解は 3 回までとし、各検査結果記入欄に何回目の融解検体を使用したか記入して下さい(検体到着後、最初の融解を 1 回目とします。再度凍結保存する際も必ず-70度以下で保存して下さい)。

4. 測定方法

今回は、H5N1 感染疑いの検体が含まれるという前提で、各地衛研の SOP に沿ってインフルエンザウイルスの型・亜型の同定検査を行って下さい。なお、送付した 10 検体のうち、①の 4 検体は RNA 抽出を行う必要はありません。そのまま RNA 抽出液として検査に使用して下さい。②の 6 検体は各地衛研の SOP に従って RNA 抽出をしてから検査を行って下さい (使用した RNA 抽出キット、検体使用量、溶出量は「アンケート記入欄」に記入して下さい)。

また最初の検査の際には、必ず 10 検体を同時に、Type A の同定検査を入れて、一枚のプレート上で検査を行うようにして下さい (最初の検査は①だけ、あるいは②だけと、検体を分けて検査をする事のないようにお願いします)。

なお、測定した Ct (Cp) 値 (各地衛研で使用している陽性・陰性コントロールを含む) は小数第 1 位まで算出し、結果記入シートに検査のレイアウト (検体の位置、陽性・陰性コントロールの位置およびプライマー・プローブの型・亜型、また独自の検査を行った場合はそれが分かるように) と共に「結果記入欄」へ記入してください。

また、地衛研での SOP が Duplicate での検査となっていない場合は、1 連で検査を行って下さい。また、機器を複数所有していても、各機器に対して検査を行う必要はありません。あくまで、H5N1 感染疑いの検体が送付された場合を想定して、各地衛研の SOP に沿った検査を行うようにして下さい

い。

(注意点)検査を2回以上行う場合は、それぞれ「結果記入欄」の特記事項に必ずその検査の目的(何を調べるための検査なのか)を記載してください(3回以上行う場合は、「結果記入欄」をコピーして使用して下さい)。

5. 各地衛研で行っている試験方法等について、別紙のアンケートがありますので、入力例(Excelファイル「結果記入欄」の「アンケート記入入力例」シート)を参考にして「アンケート記入欄」シートにご回答下さい。

- ①研究所・担当者情報について
- ②検体輸送状況について
- ③検体からのRNA抽出について
- ④プライマー/プローブセットについて
- ⑤RNase Inhibitorの使用について
- ⑥リアルタイムRT-PCR試薬について
- ⑦反応組成について
- ⑧反応温度およびリアルタイムPCR機種名について
- ⑨反応プレートについて
- ⑩ピペッター・チップの使用について
- ⑪診断のフローチャート
- ⑫その他(特記事項、意見、コメント等自由記載欄)

添付書類 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)第 2 回 外部精度管理(EQA)実施結果(その2)

参加地衛研数: 11

① サンプル (A-J)の検査結果の集計表

サンプル毎の型・亜型同定率

サンプル名	型・亜型	濃度 (copies/ μ l)	各施設の H5 検査 SOP による同定数 (同定率)	再検査・追加検査 同定数/実施数 (最終同定率)
A	RNA 抽出液 (そのまま反応に使用)	H5N1	1.0×10^6	11/11 (100%)
B		H5N1	1.0×10^3	11/11 (100%)
C		H5N1	1.0×10^2	11/11 (100%)
D		H5N1	10	9/11 (82%)
E	不活化ウイルス及び RNA 抽出液 (RNA 抽出後使用)	H1N1pdm	1.0×10^5	11/11 (100%)
		TypeB	1.0×10^2	下記参照
F		H3N2	4.3×10^3	11/11 (100%)
G		Opti-MEM	—	11/11 (100%)
H		TypeB	1.0×10^5	下記参照
I		H1N1pdm	50	10/11 (91%)
J	H3N2	43	10/11 (91%)	1/1 (100%) ***

* 1 台目の機械では TypeA(+), H5(-)で判定保留。2 台目の機械で同定

** TypeA(+), H1pdm(-)で判定保留。2 回目の検査で同定

*** TypeA(+), H3(-)で判定保留。real-time PCR 法以外の方法により同定

今回の EQA における TypeB に対する検査実施内訳

TypeB に対する検査の実施について	地衛研数
全ての検体に対して実施	6
一部の検体に対して実施	1
今回は実施せず	4

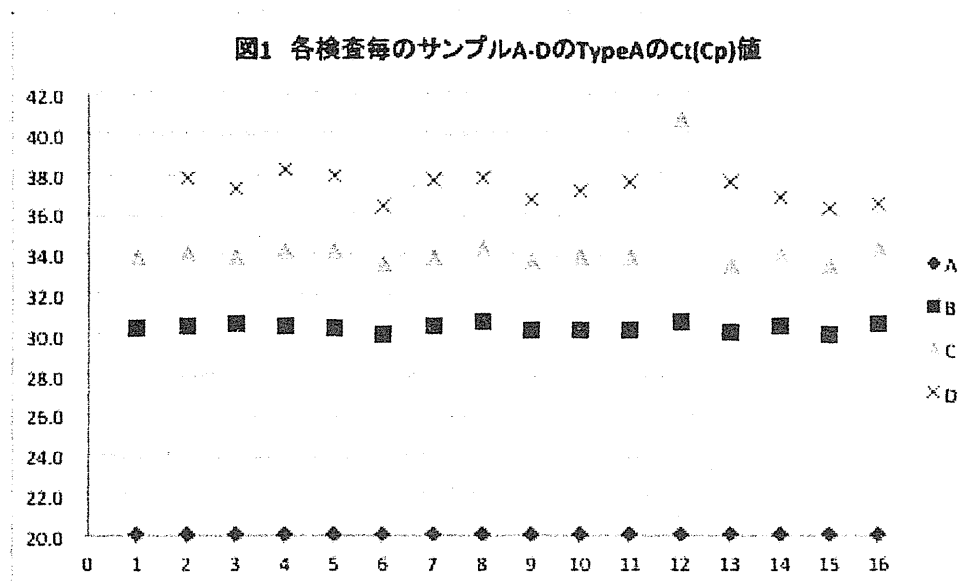
TypeB の同定率

	サンプル E	サンプル H
同定率	5/6 (83%)	7/7 (100%)

サンプルの取り違いによる判定違いや、コンタミネーションによる偽陽性は確認できなかった。

② サンプル A-D に対する Type A 検出系の Ct(Cp)値の比較

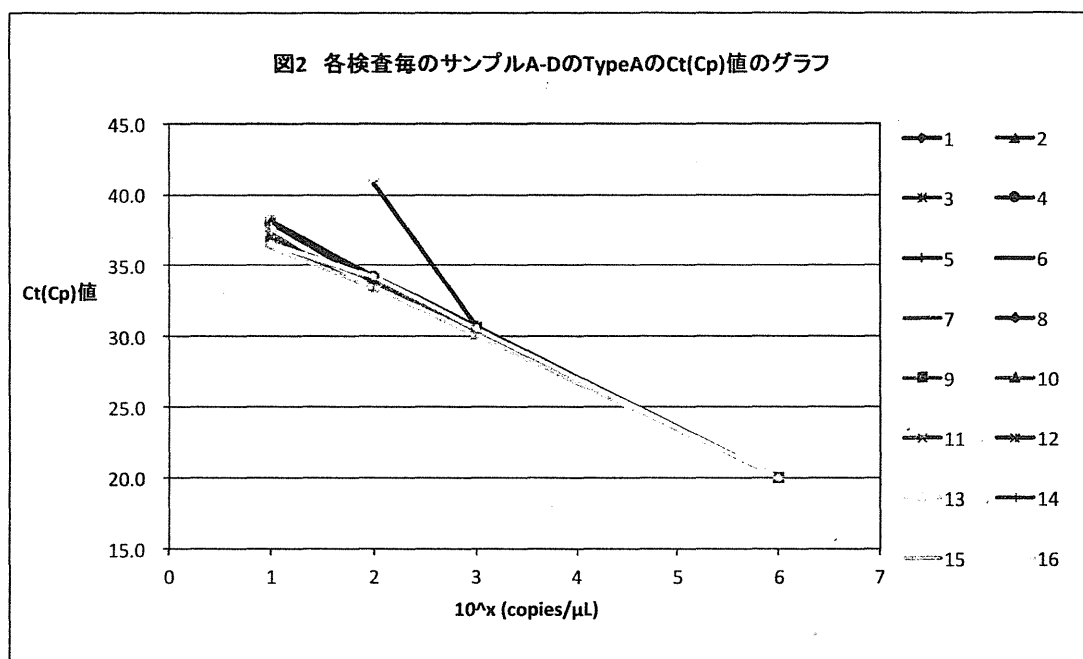
サンプル A の Type A 検出系による各地衛研の Ct (Cp)値を全て「20」に換算し、サンプル A-D の TypeA の Ct(Cp)値の散布図を図1に示した。



全ての地衛研で「感染研マニュアルの Type A 検査」を利用し、一カ所の地衛研ではその他のプライマーセットによる検査法も併用していた(その結果は各図には含まれていない)。

なお、検査整理番号「1」については、サンプルの送付ミスがあったため、サンプル D に対してのみ検査未実施となっている(参考までに、感染研の検査整理番号は「16」である)。

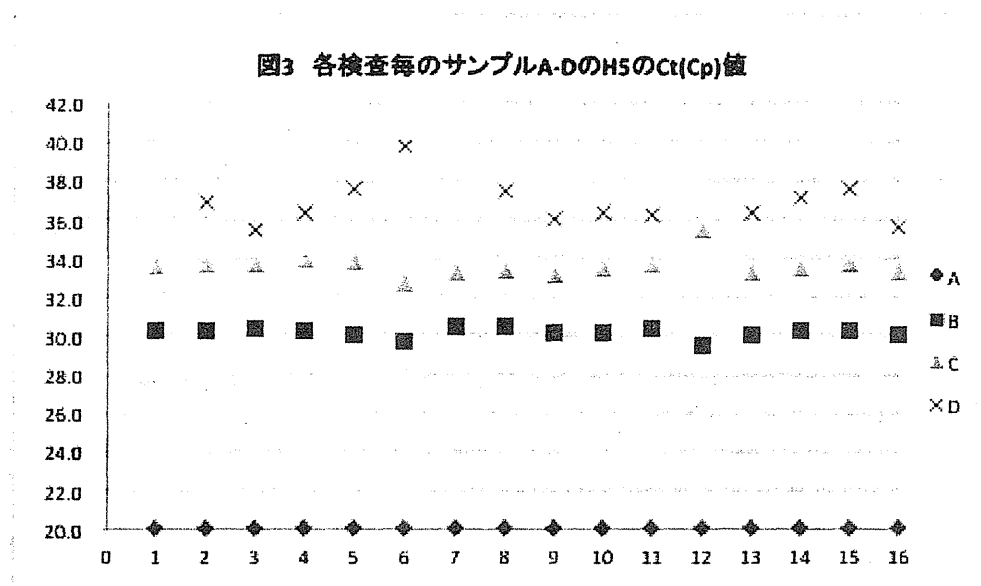
検査整理番号毎に、Type A の Ct(Cp)値をプロットして折れ線グラフを描いたものを図2に示した。



サンプル A, B, C に対する Ct(Cp) 値をプロットすると、整理番号は「12」以外はほぼ直線となった。サンプル C までの RNA 濃度であれば、Ct(Cp) 値の大きなばらつきは見られないが、サンプル D の RNA 濃度になると、Ct(Cp) 値に多少ばらつきが見られるが、この濃度のサンプルに対しては、概ね妥当な範囲内であると考えられる。

③ サンプル A-D に対する H5 検出系の Ct(Cp) 値の比較

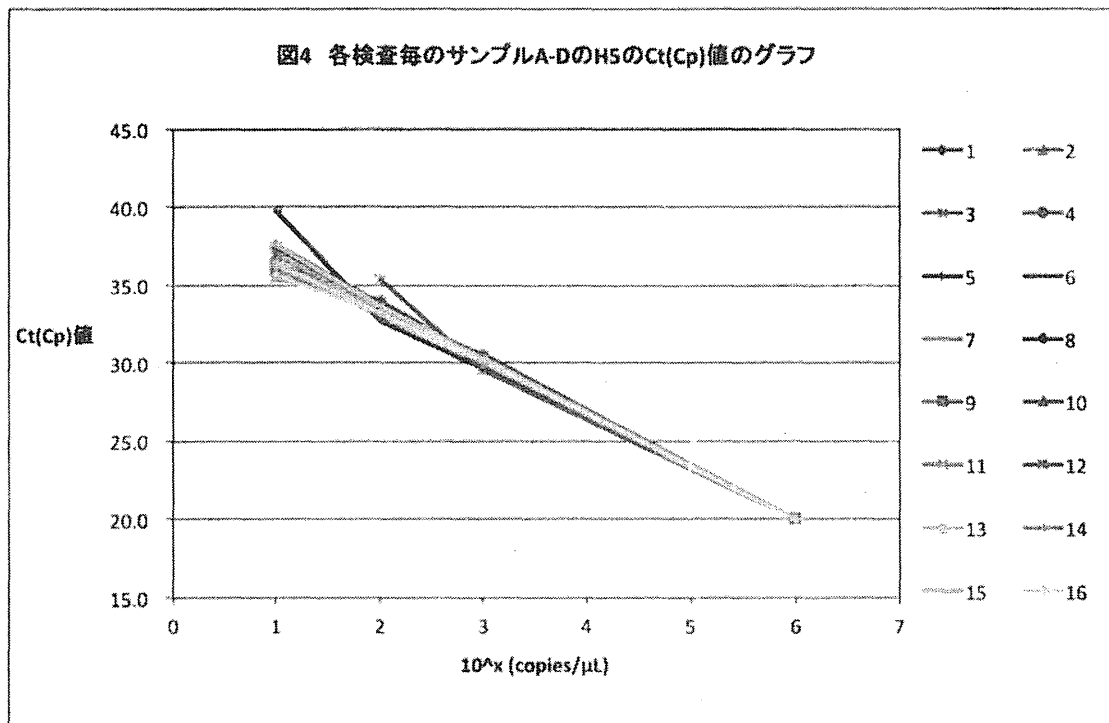
H5 の検出系に関しても、サンプル A の H5 検出系による各地衛研の Ct (Cp) 値を全て「20」に換算し、サンプル A-D の H5 の Ct(Cp) 値の散布図を図 3 に示した。



H5 の検査は全ての地衛研で「感染研マニュアルの H5 2011 年 2 月追加 ver.」を利用し、一カ所の地衛研ではその他のプライマーセットによる検査法も併用していた(その結果は各図には含まれていない)。

なお、検査整理番号「1」については、サンプルの送付ミスがあったため、サンプル D に対してのみ検査未実施となっている(参考までに、感染研の検査整理番号は「16」である)。

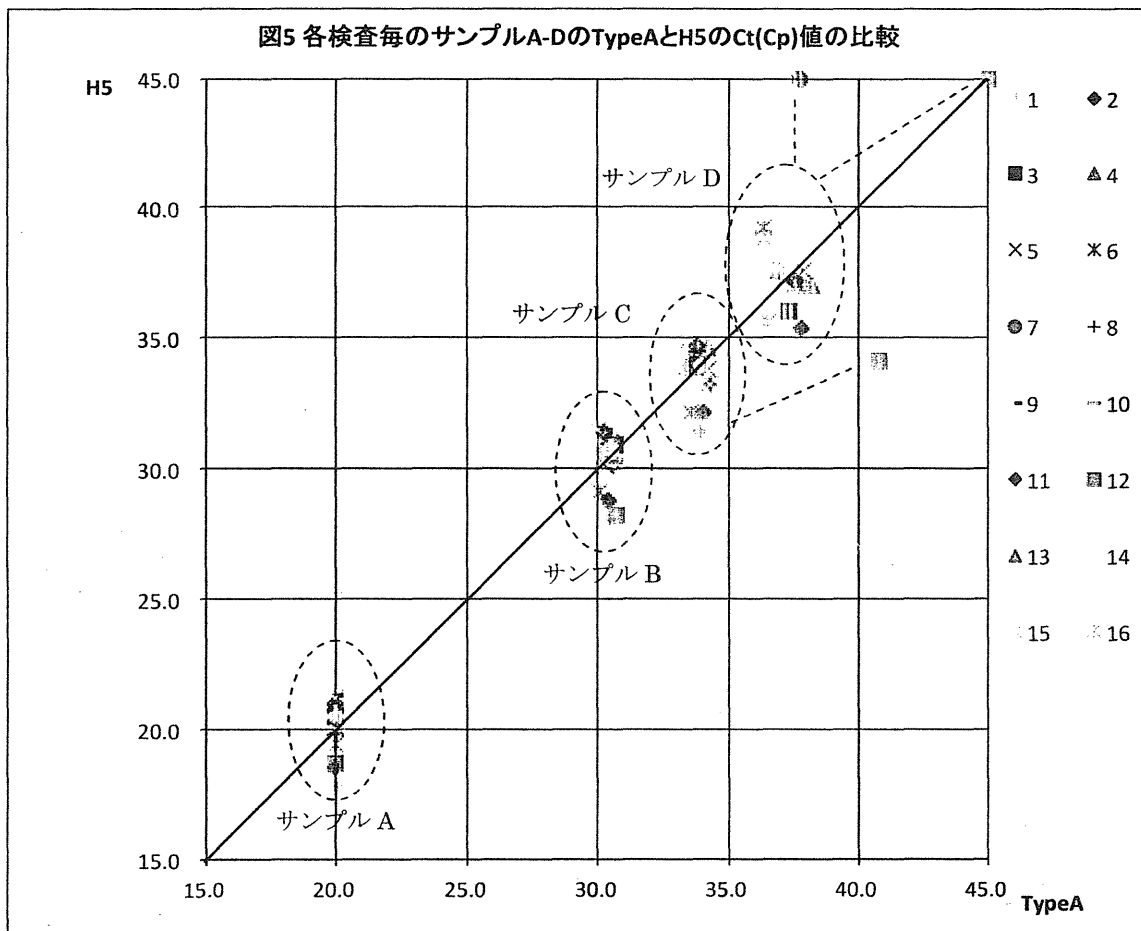
検査整理番号毎に、Ct(Cp)値をプロットして折れ線グラフを描いたものを図 4 に示した。



サンプル A, B, C に対する Ct(Cp)値をプロットすると、整理番号は「12」以外はほぼ直線となった。サンプル C までの RNA 濃度であれば、Ct(Cp)値の大きなばらつきは見られないが、サンプル D の RNA 濃度になると、Ct(Cp)値に多少ばらつきが見られるが、この濃度のサンプルに対しては、概ね妥当な範囲内であると考えられる。

④ サンプル A-D に対する TypeA 検出系と H5 検出系の Ct(Cp)値の比較

各検査で得られたサンプル A の Type A 検出系による Ct (Cp)値を全て「20」に換算した時のサンプル A-D の TypeA および H5 の Ct(Cp)値の散布図を図 5 に示した。なお、Ct(Cp)値 45 以上となった検査に関しては Ct(Cp)値 45 としてグラフを作成した。Type A の Ct(Cp)値 20 付近のプロットはサンプル A、Type A の Ct(Cp)値 30 付近のプロットはサンプル B、Type A の Ct(Cp)値 33 付近のプロットはサンプル C、Type A の Ct(Cp)値 36 以上のプロットはサンプル D を示す。(整理番号 12 を除く)



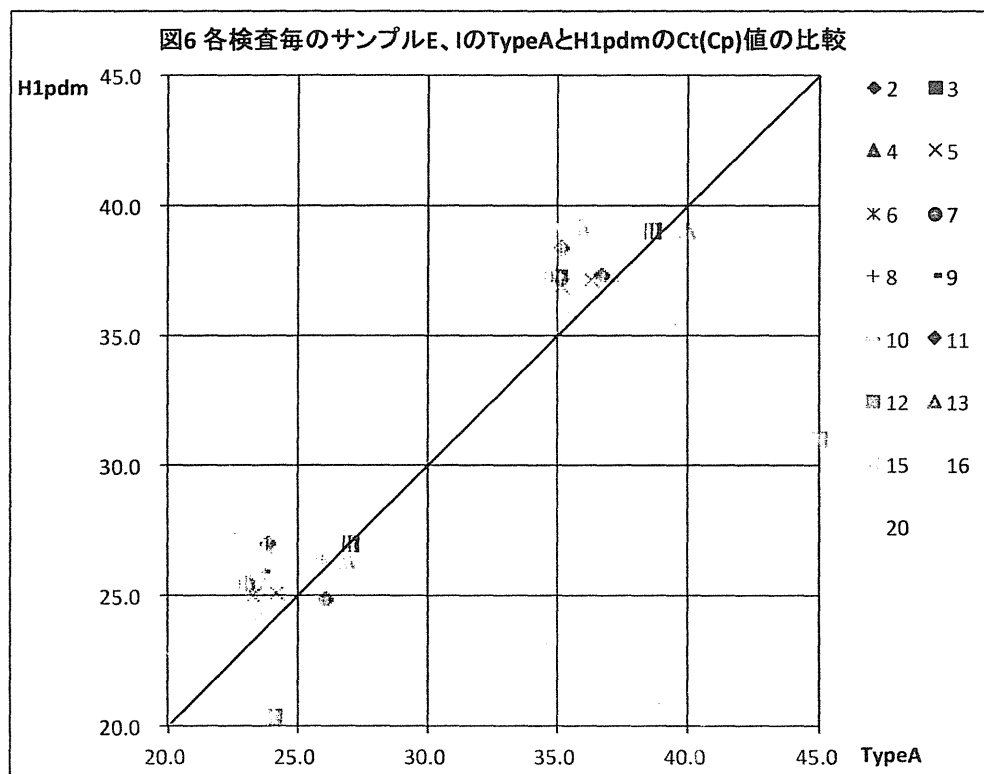
TypeAとH5のCt(Cp)値に全く乖離がなければ、グラフの対角線上にプロットされる。対角線より左上にプロットされると、H5のCt(Cp)値がTypeAのCt(Cp)値よりも大きくなり、対角線より右下にプロットされると、TypeAのCt(Cp)値がH5のCt(Cp)値よりも大きくなる事を表しており、これらCt(Cp)値の乖離が大きいほど、そのどちらかの測定系が悪くなっている可能性がある。

⑤ サンプルEおよびIに対するTypeA検出系とH1pdm検出系のCt(Cp)値の比較

各検査で得られたサンプルAのTypeA検出系によるCt(Cp)値を全て「20」に換算した時のサンプルEおよびIのTypeAのCt(Cp)値およびH1pdmのCt(Cp)値の散布図を図6に示した。同時にサンプルAの検査を行っていない場合は、同じ機器を使用して行った別検査のサンプルAのTypeAのCt(Cp)値を使用した。(整理番号17-20。以下⑥、⑦でも同様の方法で解析を行った。)Ct(Cp)値45以上となった検査に関してはCt(Cp)値45に、「undetected」となった検査に関してはCt(Cp)値0として、グラフを作成した。Ct(Cp)値25付近のプロットはサンプルE、Ct(Cp)値35付近のプロットはサンプルIを示す。

H1pdmの検査は全ての地衛研で「感染研マニュアル2009年11月ver.2」に記載の検出系

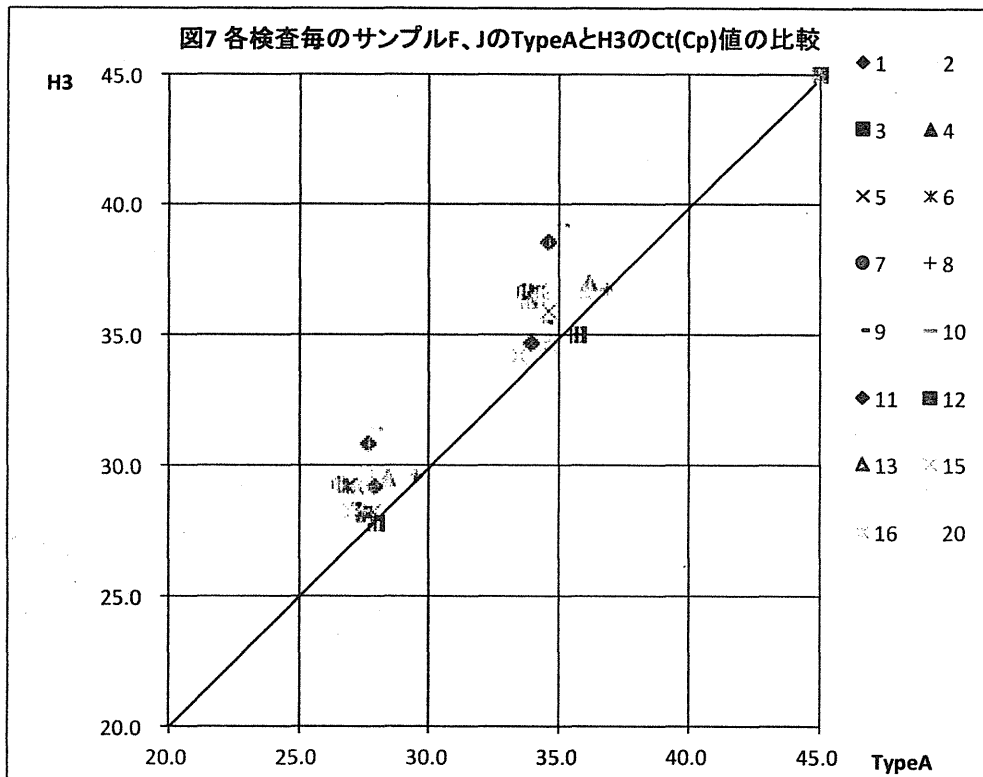
を利用していた。



⑥ サンプルFおよびJに対する TypeA 検出系と H3 検出系の Ct(Cp)値の比較

各検査で得られたサンプルAの Type A 検出系による Ct (Cp)値を全て「20」に換算した時のサンプルFおよびJの TypeA および H3 の Ct(Cp)値の散布図を図7に示した。Ct(Cp)値 45以上となった検査に関しては Ct(Cp)値 45として、グラフを作成した。Type A の Ct(Cp)値 25 付近のプロットはサンプルF、Type A の Ct(Cp)値 35 付近のプロットはサンプルJを示す。

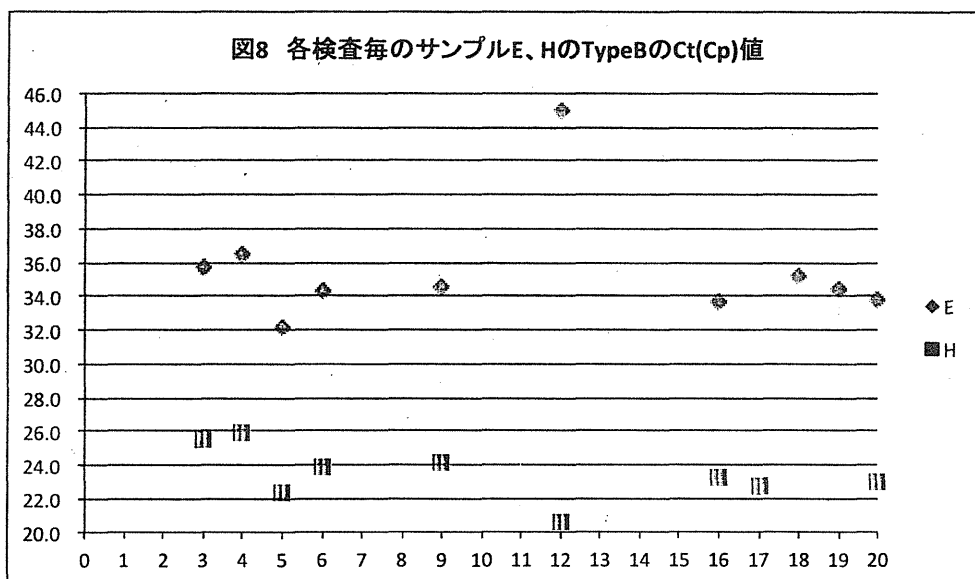
H3 の検査は、整理番号 12 ではオリジナルの検出系を使用し、整理番号 15 では以前の研修で感染研から情報共有した検出系を使用していた。その他の地衛研では「感染研マニュアル 2009 年 11 月 ver.2」に記載の検出系を利用していた。



⑦ サンプルEおよびHに対する TypeB 検出系の Ct(Cp)値の比較

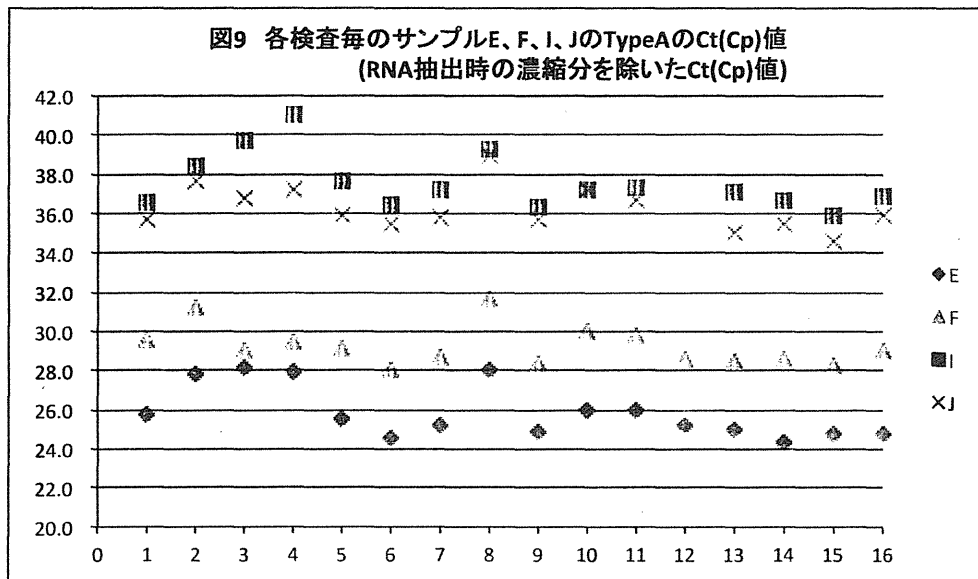
各検査で得られたサンプルAの Type A 検出系による Ct (Cp)値を全て「20」に換算した時のサンプルEおよびHの TypeB の Ct(Cp)値を図8に示した。

typeB の検査は、整理番号12ではオリジナルの検出系を使用し、その他の地衛研では「感染研マニュアル 2009年11月 ver.2」に記載の検出系を利用していた。



⑧ RNA 抽出による TypeA 検出系 Ct(Cp)値の比較

各検査で得られたサンプル A の Type A 検出系による Ct (Cp)値を全て「20」に換算した時のサンプル E、F、I、J の TypeA の Ct(Cp)値から各検査毎の RNA 抽出時のサンプル濃縮分(使用検体量 100 μ L で抽出が 50 μ L の場合は 2 倍濃縮されたことになる)にあたる Ct(Cp)値を差し引いたものを図 9 に示した。差し引きする Ct(Cp)値は、各検査でのサンプル A \sim C の近似直線(整理番号 12 については、サンプル A と B を結んだ直線)の傾きをサンプル濃度 10 倍差にあたる Ct(Cp)値として求めた。図 9 の値は、RNA 抽出時に生じるサンプル濃縮の影響のみを各検査結果から除いた場合の Ct(Cp)値を表している。



上記の値のサンプル E、F、I、J の平均はそれぞれ 25.9、29.2、37.6、36.2 となった。また、サンプル E、F、I、J での標準偏差はそれぞれ 1.4、1.0、1.4、1.1 となった。

今回送付したサンプルは、E と I は BPL で不活化したウイルス溶液、F と J は RNA 溶液であった。

抗インフルエンザ薬耐性ウイルス監視体制の強化について

研究分担者 高下恵美

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 主任研究官

研究要旨

2009 年に出現し、世界的大流行を引き起こした A(H1N1)pdm09 ウイルスは、その後も A(H3N2)および B 型ウイルスと混在して流行を続けている。A(H1N1)pdm09 の予防および治療には NA 阻害剤が用いられるが、NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつオセルタミビル耐性株が国内外で散発的に検出されている。我々は 2009 年 9 月から全国地方衛生研究所と共同で、A(H1N1)pdm09 ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施し、継続的に耐性ウイルスの監視を行っている。2011/12 シーズンは、国内の流行の主流は A(H3N2)および B 型ウイルスで、A(H1N1)pdm09 ウイルスの流行はほとんどみられず、全国での分離・検出報告数はわずか 15 例であった。昨年度の本研究の成果に基づき、すべての解析株について蛍光法による薬剤感受性試験を実施したところ、耐性株は検出されなかった。一方、流行の主流を占める A(H3N2)および B 型ウイルスについて耐性株サーベイランス体制の強化を図った結果、NA 蛋白に R292K 耐性変異をもち、オセルタミビルおよびペラミビルに対して交叉耐性を示す A(H3N2) ウイルスが 1 株検出された。以上の結果から、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスでは、A(H1N1)pdm09 ウイルスのみならず、A(H3N2)および B 型ウイルスに関しても、耐性株の発生状況について継続的な監視を行う必要性が示唆された。

A. 研究目的

2009年に出現したA(H1N1)pdm09ウイルスは、日本を含む世界全域に広がり、パンデミックを引き起こした。A(H1N1)pdm09ウイルスはその後も、A(H3N2)およびB型ウイルスと混在して流行を続けており、世界各国でウイルスが検出されている。A(H1N1)pdm09の予防および治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 蛋白を標的とする抗インフルエンザ薬、オセルタミビル (商品名タミ

フル) とザナミビル (商品名リレンザ) が使用されている。世界各国で分離されるA(H1N1)pdm09ウイルスのほとんどは両薬剤に対して感受性であるが、国内外で散発的に、NA蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であることから、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極