

201318038A

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等の早期検出お
よびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化
と技術開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成26(2014)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等の早期検出およびリスク評価のための
診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究

研究代表者： 小田切孝人 _____ P4

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 _____ P12

研究協力者：高橋雅輝、齋藤幸一、長島真美、新開敬行、林 志直、森川佐依子、
廣井 聡、加瀬哲男、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、喜屋武向子、仁
平稔、安井善宏

2. 研究協力者(堺市衛生研究所)レポート：内野清子、田中智之 _____ P44

3. 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1回全国地衛研外
部精度管理(EQA)実施結果について

影山努 _____ P46

研究協力者：高山 郁代、中内 美名、高橋 仁

4. 地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断
検査、株サーベイランス体制の強化に関する研究

今井 正樹 _____ P65

研究協力者：岸田 典子

5. 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行に関する研究

高下恵美 _____ P78

6. 遺伝情報からウイルスのリスクを予測する方法の研究

佐藤裕徳 _____ P82

研究協力者：横山勝

7. 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析

藤田信之 _____ P88

研究協力者：小口晃央、花巻朝子、大下龍蔵

8. 地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のため

の診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究：「2013-14年シーズンのインフルエンザワクチンの血清学的評価」

齋藤玲子 _____ P95

研究協力者：日比野亮信、菖蒲川由郷、近藤大貴、樋熊紀男、高橋キイ子

9. B型インフルエンザワクチン株の選定方法に関する研究

今井 正樹 _____ P106

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P110

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等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究

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

コア・サポート地方衛生研究所（地衛研）ネットワークは、全国地方ブロック代表 6 地衛研およびそれをサポートする 5 地衛研からなる。コア・サポート地衛研は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）と共同研究体制を構築し、この連携ネットワークで新規に開発した種々の PCR 検査系を試行し、問題点を修正後に全国地衛研に普及させ、PCR を用いた検査や薬剤耐性株サーベイランスを実施してきた。2013 年 4 月に中国で鳥インフルエンザ A(H7N9) が発生した際には、この連携ネットワークが中心的な役割を果たし、全国地衛研で A(H7N9) ウイルス検出検査ができる体制を 2 週間で完成させた。さらに、PCR 検査系の精度点検と改善を目指して、本年度は全国地衛研を対象にして A(H5N1)、A(H7N9) を含む PCR 検査の外部精度管理評価試験 (External Quality Assessment, EQA) を実施した。これにより、各地衛研の検査系の自己点検と改善がなされ、全国的な PCR 検査技術の向上に寄与した。一方、株サーベイランスの根幹であるウイルス分離・培養系の自己点検調査によって、大半の地衛研はウイルス分離・培養が上手く機能していることが示された。しかし、一部の地衛研には技術研修等で支援が必要であることもわかり、今後の予算措置を見据えた検討課題が残った。新型インフルエンザが海外で発生した場合は、その原因ウイルスを入手できるまでには 1-2 ヶ月を要する。この間の初動対応は、ウイルス遺伝子配列情報をもとにリスク評価を行うことになる。これには、バイオインフォマティクス技術を駆使したウイルスリスク評価法が強力な武器となり、本研究では A(H7N9) ウイルスおよび国内流行拡大を始めた A(H1N1) pdm09 薬剤耐性株のリスク評価を蛋白質立体構造情報をもとに行った。両ウイルスとも、ヒト社会で急速に感染伝播する遺伝的要素はまだ十分備わっておらず、近々に大規模な流行拡大するリスクは低いと推測された。一方、リスクを増大させる変異の推測もできたことから、これらの変異をチェックリストに加え、今後のウイルス変化の監視を継続する。また、次世代型シーケンサーが普及し、遺伝子配列情報に依存しない全ゲノム解析も可能となりつつあることから、本研究では新型インフルエンザ対応や薬剤耐性株サーベイランスに恒常的に応用できる標準手順書の作成や解析経費の圧縮戦略の策定にも着手した。一方、インフルエンザワクチン製造株の卵馴化による抗原変異は、ワクチン効果を低下させる深刻な問題で、その改善が国内外から要望されている。本研究では、B 型ワクチン株の卵馴化変異の原因は HA 蛋白の糖鎖の脱落であるが、これを防止する追加変異を導入し、卵馴化変異の回避を試みた。しかし、卵で 6-7 回継代を繰り返すと、やはり糖鎖は欠落し、根本的な改善はできなかった。インフルエンザワクチンを卵で製造する限り、解決法は無いことが立証された。また、2013/14 シーズンの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、成人層では良好であったが、老人層では、B 型ワクチンの抗体応答が低いことを示した。今後は、流行株との交叉反応性も調べ、ワクチンの有効性を総合的に評価したい。

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

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

今井正樹 岩手大学農学部共同獣医学科・准教授

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

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

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

A. 研究目的

本研究班では、新型インフルエンザ発生の際には、検出検査、株サーベイランスの最前線になる地衛研の技術支援と強化を目的に、コア・サポート地衛研―感染研共同研究体制を発足させた。コア・サポート地衛研―感染研連携体制は4年目に入り、その間に薬剤耐性株サーベイランスの標準化とPCRを用いた耐性株検出法の開発、それを全国地衛研へ導入し、一国としては世界最大規模の薬剤耐性株サーベイランスを進めている。また、PCR検査精度の向上と改善のために、外部精度管理評価試験（External Quality Assessment, EQA）を2段階に分けて導入した。すなわち、第1段階では、コア・サポート地衛研での試験的实施と問題点の改善を行い、第2段階では、その改善版を用いて全国地衛研で本格実施するという戦略である。本研究年度では、この第2

段階にあたる全国規模でのEQAを実施した。一方、2013年3月に中国で鳥インフルエンザA(H7N9)のヒト感染事例が多発し、世界的流行が懸念されたことから、本研究班では、コア・サポート地衛研―感染研連携体制が中心となって、A(H7N9)ウイルス検出検査系の緊急開発と全国地衛研へ技術の移転を2週間で完了させた。A(H7N9)ウイルスが国内に侵入する前に、迎え撃つ体制を迅速に構築できたことは、2009年のA(H1N1)pdm09でのパンデミック時の経験が活きており、世界的にも感染症危機管理対応の模範となっている。

新型インフルエンザの発生の場合は、原因ウイルスの入手までには長い時間がかかり、その間の初動対応は、遺伝子情報をもとにリスク評価を行うことになる。そのため、最新のバイオインフォマティクスの手法を導入してウイルス蛋白の動力学的な観点からのリスクファクター変異を同定し、これらをその後のサーベイランスでのチェックマーカースとして活用した。さらに、遺伝子情報が入手できない際には、次世代型シーケンサーで網羅的に遺伝子解析をし、迅速に原因ウイルスの遺伝子情報を収集して、PCR検査系構築へと応用させることができる。この基盤を本研究班で検討した。しかし、問題は、本システムを日常的に新規ウイルスの同定やサーベイランスへ応用するための経費圧縮策の検討である。本研究ではその検討段階にあり、次年度の課題として残った。

本研究班の各分担者の役割と検査、サーベイランス対応グループに基礎研究グループがどのように協力して、科学的でレベルの高い効率的な検査・サーベイランスを目指しているのかの詳細は、添付の図を参照されたい。

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、中国でヒト症例が発生した H7N9 鳥インフルエンザウイルス検査試薬配布直後より、H7 及び M 遺伝子検出感度チェックをコア・サポート地衛研及び一部の地衛研の協力を得て行い、全地研にフィードバックした。H7N9 発生以前にはわが国における検査ニーズが低かった喀痰検体に対応をした。

2. 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結果をまとめた。

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 74 カ所の地方衛生研究所に対して、実施要項、検査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、配布済みの H5 および H7 亜型検出用陽性コントロールを利用した H5 および H7 亜型定量的検査の EQA 評価を行った。

4. インフルエンザウイルス株サーベイランス体制の現状と問題点を把握するために、全国の地衛研を対象にアンケート調査を実施した。

5. A(H1N1)pdm09 ウイルスの NA 遺伝子解析による H275Y 耐性変異の 1 次スクリーニングを行った。検出された H275Y 耐性変異ウイルスに関しては、引き続き国立感染症研究所において、詳細な感受性試験を行った。

6. 分子モデリング解析:

HA 蛋白質、NA 蛋白質の立体構造は、ホモロジーモデリング法を用いて構築した。また、構造安定性の解析は、MOE の ‘Protein Design Application’ を用いた。

7. 受容体指向性の解析:

受容体指向性の解析も ‘Protein Design Application’ を用いた。

8. 24 年度に引き続き、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開始した。

9. 新潟市内の高齢者施設の医療従事者と入所者からワクチン接種前後のペア血清を採取。ワクチンに対する抗体応答を測定した。

10. B 型インフルエンザワクチン株の卵馴化変異を防止する変異導入ウイルスを作製した。卵での連続継代で糖鎖の欠落の性状を見た。

C. 結果

1. A(H7N9)鳥インフルエンザの発生への対応

リアルタイム RT-PCR 法による H7 及び M 遺伝子検出用の検査試薬が配布されたことから、コア・サポート地衛研に加え、一部地衛研の協力も得て速やかに検出感度の確認を行い、4 月 25 日付で全地研にフィードバックした。

2. 試験外部精度管理(EQA)への協力

全国地衛研で EQA を開始するために、説明書やアンケート内容の事前確認等をコア・サポート地衛研で行った。

3. 全国 74 カ所の地方衛生研究所に対して、EQA の実施要項、検査方法等に関するアンケート、結果記入ファイルの配布をした。既に配布済みの H5 および H7 亜型検出用陽性コントロールを利用した H5 および H7 亜型定量的検査を実施した。検査結果を集計して QA 評価を行った。

4. 72 カ所の地衛研(46 道府県、26 の政令指定都市・中核市・特別区)に対して、2010/11 シーズンのインフルエンザウイルス分離効率について質問した。70%以上の高い分離率でやれる研究機関が全体の半数(34 機関:全体の 51%)を占めた。しかし、分離効率が 50%を下回った機関が 1 割程度存在していた。これらの機関に対しては、改善の技術支援が必要がある。

5. 国内外における H275Y 耐性変異ウイルスの検出を行ったところ、過去数シーズンにわたって 1-2%程度であったが、2月中旬

までの 2013/2014 シーズンの国内における耐性ウイルスの検出率は 8%に達した。一方、札幌市における耐性ウイルスの検出率は 83%、北海道全体における耐性ウイルスの検出率は 79%であった。現在のところ、耐性ウイルスの検出は札幌市を中心とした地域流行にとどまっており、北海道以外の地域における耐性ウイルスの検出率は 3%であった。

6. 札幌市周辺で多発している A(H1N1)pdm09 薬剤耐性株の高発生の理由を NA 蛋白の構造解析から検証した。H275Y で NA 活性の低下を補填する追加変異として N386K が着目された。しかし、これは NA の構造安定性に寄与しないことが、構造解析系から明らかになり、耐性株が爆発的に全国流行する可能性は低いと判断された。

7. A(H7N9) のヒトでの流行の可能性を推測するために、HA タンパクのヒト受容体への親和性の増強を誘発するアミノ酸変異を推定し、44 種類のリストを作成した。また、HA 蛋白の安定性に寄与する変異として 14 種類を見つけた。

これらリスク評価チェックリストは、株サーベイランスに活用した。

8. 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ールの検討を行い、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ールを作成した。対費用効果やサーベイランスへの汎用性を検討するため、①シーケンスリード長の最適化、②二本鎖 cDNA 合成法の改良、③宿主由来配列の除去、およびデータ処理パイプラインの構築を行った。

9. 2013/14 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を行った。その結果、ワクチンの免疫原性の評価を行い、成人、高齢者共におおむね良好な結果が得られた。

10. B 型インフルエンザウイルスワクチン株は、卵馴化で HA タンパクの 197-199 部位

にある糖鎖が欠落し、原株から抗原性が大きく異なる。しかし、141 番目のアミノ酸をグルタミンからアルギニンに置換した B 型ウイルスは、孵化鶏卵で増やしても HA の糖鎖付加部位が維持されることが報告されていることから、卵継代を繰り返して糖鎖保持の安定性を調べた。継代 6 代目か 7 代目で HA の糖鎖が欠失することがわかり、さらに追加の変異が糖鎖の安定保持には必要であることが検証された。

D. 考察

わが国のインフルエンザ診断検査および株サーベイランスの精度を向上し、緊急時に迅速に対応できる連携網を維持するために構築した、コア・サポート地衛研-感染研共同体制が順調に稼働している。2013 年 3-4 月の A(H7N9) の流行においては、その連携が奏功して世界最速で全国規模での検査網を完成させることができた。これは、本研究班の最大の成果である。また、コア・サポート地衛研で試験的に実施した EQA を踏まえて、全国地衛研で EQA を実施し、問題が見つかった地衛研には、トラブルシューティングして全国的な検査対応のレベルアップを推進した。株サーベイランスの根幹となるウイルス分離・培養系の現状把握調査からは、大多数の地衛研は効率よくウイルス分離ができていることが分かった。むしろ問題は、地衛研組織の不安定性と予算措置の圧縮による現場担当者の育成が困難になっていること、それによる現場担当者のモチベーションの低下が懸念されることである。新型インフルエンザ発生など緊急事態では、高い精度で迅速対応が求められ、そのためには日頃からの準備と修練が必須である。そのような準備対応は、新規性のある成果物として表には出ないが、国の健康危機管理対策の要である。地衛研組織の強化と感染研検査・サーベイランス事業の強化を要望する。

ウイルスタンパク構造解析からのリスク評価系がタイムリーにサーベイランスへ情

報発信できる連携ができたことから、原因ウイルスの入手を待つことなく、新型インフルエンザ対策の初動対応が取れるようになった。本研究成果は、ウイルス入手までの待機時間の有効活用に大きく貢献している。

インフルエンザワクチンの有効性の血清学的評価研究やワクチン株の改良もサーベイランスと並行して継続することが重要である。

E. 結論

- ・ コア・サポート地衛研—感染研共同研究体制が4年目にはいり、効率的に稼働している。
- ・ 全国地衛研を対象としたEQAが実施され、検査技術の改善が進められた。
- ・ 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを行い、2013/14シーズンは、A(H1N1)pdm09の耐性株出現頻度が例年より高く、札幌市周辺では地域流行が見られた。
- ・ ウイルスタンパクの構造解析からリスク評価とサーベイランスへの応用ができるようになった。
- ・ 次世代型シーケンサーを用いた、プロトコールと経費圧縮策を立案した。
- ・ B型ワクチン株の卵馴化による変化は、追加変異を導入しても改善されない。
- ・ 2013/14シーズンワクチンの抗体応答は良好であった。

F. 研究発表

1 論文発表

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M,

Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y.

Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Jul 10. doi: 10.1038/nature12392. [Epub ahead of print]

Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza

A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan *Influenza Other Respi Viruses*. (2013) Jun 8. doi: 10.1111/irv.12132

Ainai A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults *Hum Vaccin Immunother*. 9(9): Jun 27 (2013)

Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System Vol 4 (3)*, (2013) doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009

Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M and Odagiri T
Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population
Jpn.J.Infect.Dis.66: 549-551, 2013
E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in japan, november to december 2013 Eurosurveillance, Volume 19, Issue 1, 09 January 2014

小田切孝人、田代真人 中国でヒトに感染した鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの性状、検査系の開発およびワクチン開発とその問題点 ウイルス 63(2), 233-240 (2013)

2. 学会発表

小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、金南希、江島美穂、高下恵美、今井正樹、田代真人、菖蒲川由郷、齋藤玲子 卵馴化によるインフルエンザワクチン株の抗原変異と2012/13シーズンのワクチン効果の評価 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷、2013年6月

小田切孝人 動物由来インフルエンザウイルス (A/H3N2 variant、A/H7N9) のヒト感染例とワクチン開発 第13回人と動物の共通感染症研究会学術集会 東京、2013年11月

岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に中国で分離されたA(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小

田切孝人 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつA(H7N9)およびA(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、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 2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

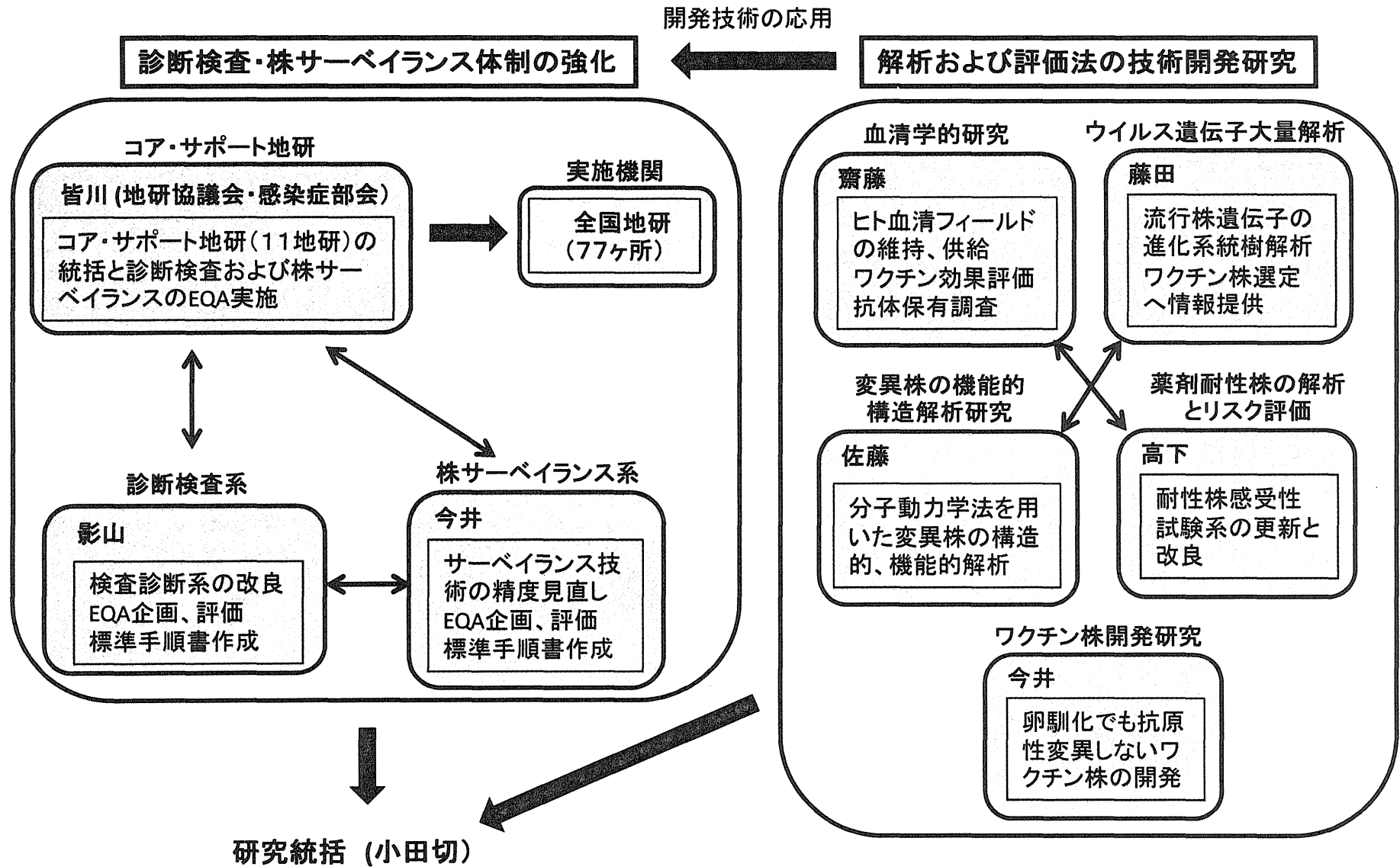
2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

研究項目の概要と役割分担および相互関連



本研究では精度管理された診断検査・サーベイランス体制に基礎研究で開発した技術を応用した、機能的で科学的なインフルエンザ検査・株サーベイランスを目指す。

II. 分担研究報告書

平成 25 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）
『地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断
検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究』（H25-新興-一般-002）
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

| | |
|-----------------|----------------------|
| 高橋雅輝、齋藤幸一 | 岩手県環境保健研究センター(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) |
| 森川佐依子、廣井 聡、加瀬哲男 | 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) |
| 喜屋武向子、仁平稔 | 沖縄県衛生環境研究所(サポート地衛研) |
| 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/H1pdmN1ウイルスによるパンデミック国内発生初期には国立感染症研究所（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、引き続き第一波以降現在まで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(H275Y)のサーベイランス体制が継続されている。

上記ウイルスサーベイランス体制維持強化の中核となるべく2010年に地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会（地全協）とともにコア・サポート地衛研体制が構築され、本分担研究を含む対応にあたっている。パンデミック対応に加えて野鳥及び家禽における鳥インフルエンザ発生時には、ヒト疑い事例の遺伝子検査対応は感染研-地研ネットワークが担当している。さらにアジア諸国における鳥インフルエンザヒト感染事例(H5N1, H7N9等)の継続的発生及び鳥インフルエンザA(H7N9)が指定感染症とされたこと、新型インフルエンザ等特別措置法施行を受けて、感染研-地研ネットワークには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維持強化が求められている。

平成25年度は

(1) 中国でヒト症例が発生したH7N9鳥インフルエンザウイルス検査試薬配布直後に、H7及びM遺伝子検出感度チェックをコア・サポート地衛研及び一部の地衛研の協力を得て行い、全ての地全協参加機関にフィードバックした。また中国症例における下気道からのウイルス検出報告を受けて、これまで対応する必要性が低かった「喀痰検体」への対応について感染研のマニュアル作成に協力した。H1pdm09インフルエンザの流行が拡大しつつある2013/14シーズンは、H275Yマーカーサーベイランスを中心とする抗ウイルス剤感受性監視の強化を図っている。

(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、及び今井分担研究者（感染研・岩手大）によるインフルエンザウイルス株サーベイランスに関するアンケート調査に協力した。

(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解析結果を報告した。

(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/H1pdm09N1 インフルエンザウイルスによるパンデミックにおいて、国内発生初期には国立感染症研究所（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、その後の第一波以降現在まで、ウイルスサーベイランス及びN1 ノイラミニダーゼにおけるオセルタミビル耐性遺伝子マーカー（H275Y）のサーベイランスを継続している。

平成 25 年度には新型インフルエンザ等対策特別措置法施行に伴い、政府及び各地方自治体において行動計画等が制定された。「新型インフルエンザ等対策政府行動計画（平成 25 年 6 月 7 日）」主要 6 項目の 2 番目に「サーベイランス・情報収集」が明記されており、6 月 27 日に示された「新型インフルエンザ等対策ガイドライン」では新たに「サーベイランスに関するガイドライン」が示され、新型インフルエンザ発生時のみならず平時より、病原体定点や集団発生等の検体検査により「インフルエンザウイルスの型・亜型や薬剤耐性等を把握する」こととなっている。

平成 22 年度に、上記ウイルスサーベイランス体制維持強化の中核となるべく地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症対策部会と緊密な連絡調整を行い、6 地方ブロックのコア地衛研各 1 機関、及びインフルエンザに特に造詣の深いサポート地衛研 5 機関を基軸としたコア・サポート地衛研体制が構築された。

上記パンデミック対応に加え、鳥イン

フルエンザ感染疑い患者の遺伝子検査対応は感染研-地研ネットワークが担当しており、未だ国内症例報告のないなかで、平成 24 年 12 月現在インフルエンザ検査実施地衛研の 92%（68/74）が検査体制を構築済、22 年度後半（2010/11 シーズン）には国内各地でみられた野鳥及び家禽の鳥インフルエンザ H5N1 発生等の機会に鳥インフルエンザ検査実績をもつ地衛研は 29 機関に達している（平成 24 年 12 月現在）。

近年アジア諸国における鳥インフルエンザヒト感染事例（H5N1, H7N9, H10N8 等）の継続的発生及び 2013 年 5 月に鳥インフルエンザ A（H7N9）が指定感染症とされたことを受けて、感染研-地研ネットワークには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さらなる強化が求められており、本研究ではサーベイランス体制の維持に不可欠な検査精度の担保、専門的人材育成等のうち、地衛研-感染研の連携に基づく検査精度の維持向上を主な目的に、遺伝子検査及びウイルス分離、薬剤耐性スクリーニングの精度維持管理に取り組むこととしている。

B. 研究方法

本研究には地全協 6 支部に各 1 機関のレファレンスセンター（コア地衛研）小計 6 機関、及び助言者（サポート地衛研）5 機関 合計 11 機関が研究協力者として参画し、初年度となる平成 25 年度は、以下の活動を実施した。

(1) 中国でヒト症例が発生した H7N9 鳥インフルエンザウイルス検査試薬配布直後より、H7 及び M 遺伝子検出感度チェックをコア・サポート地衛研及び一部の地衛

研の協力を得て行い、全地研にフィードバックした(表1)。H7N9発生以前にはわが国における検査ニーズが低かった喀痰検体への対応について、実際に検体を取扱う立場から、感染研によるマニュアル作成に協力した。

(2) H1pdm09 インフルエンザの流行が拡大しつつある 2013/14 シーズンは、H275Y マーカーサーベイランスを強化している。さらに H275Y マーカーサーベイランス強化への協力依頼を行い、抗ウイルス剤感受性サーベイランス体制強化を図った。

(3) 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、及びインフルエンザウイルス株サーベイランスに関するアンケート調査に協力した。

(4) 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解析結果を報告した。

(5) 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。

(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

本研究に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(例:抗原性、薬剤耐性)変異の迅速・正確な把握の前提となる、感染研-地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制、とりわけウイルス株サーベイランス体制の維持強化。

(2) 上記連携体制のなかで地衛研が実施

する、季節性及び鳥インフルエンザウイルス検査全般における、検査精度の維持向上。

(3) わが国で流行しているインフルエンザウイルスにおける薬剤感受性変異まん延状況の把握、抗原変異の迅速な探知の3点に集約される。

以下に25年度の研究結果を述べる。

(1) サーベイランス体制の維持強化: 研究班発足直後となる4月に厚生労働省からH7N9鳥インフルエンザウイルス検査試薬(リアルタイムRT-PCR法によるH7及びM遺伝子検出)が配布された。研究協力者であるコア・サポート地衛研に加え、一部地衛研の協力も得て速やかに検出感度の確認を行い(表1)、4月25日付で全地研にフィードバックした。配布陽性対照1000倍希釈(-3)以上の感度が得られなかった機関では、今回のマニュアルに特化した作業手順の見直し等を行った後に感度を再確認し、標準作業書書き換え等の対応が実施された。さらに全地研フィードバック後、複数の機関が陽性対照の再交付を受けたとのことである。大型連休入りを控えた時期に研究協力地衛研による速やかな感度確認を行うことにより、全国の地衛研における検査感度の確保に結びついたと考えられる。

(1-2) H7N9感染者では通常インフルエンザウイルス検出に汎用される上気道検体よりも下気道検体のほうがウイルス検出感度が高い、という情報に基づき感染研が準備した、喀痰マニュアルの作成に協力した。

(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(EQA)実施に際し、配布説明書やアンケート内容の事前確認等、現場の立場から協力した。さらに今井研究分担者によるインフルエンザウイルス株サーベイランスに関するアンケート調査にも同様に協力

した。インフルエンザウイルス分離培養に用いる MDCK 細胞の維持や、赤血球凝集活性(HA)について以下のとおり考察した。

※医療機関内の集団発生事例より MDCK 細胞上で AH3 ウイルスを 5 株を分離したが、初代では HA 価が低く(4:対照となる A/Texas/50/2012 の力価は 256)、HI 試験実施には継代が必要であった。集団発生の連絡当日に検体搬入があり、細胞を浮遊状態(subconfluent 以下)で検体と混合後培養している。経験的に分離感度及び事例発生に対する迅速な対応の面で浮遊細胞への接種は優れているが、細胞数が少ないため HA 価は confluent cell layer に劣り結果として HI 試験の実施が遅くなる。培地組成についても液体培地に比べ安価な粉末培地では分離感度がやや低い印象があり、今後地衛研間の標準化の要否も検討したい。

(3) 10 月以降、札幌市からオセルタミビル感受性低下変異(H275Y)を有する AH1pdm09 ウイルス分離報告が増え、その後他都県からも報告がある。当初 H275Y 検出報告が先行したため 2014 年 1 月には感染研ホームページ上の耐性サーベイランス情報の結果が、一時 H275Y/H275H(感受性)比率が 20%超となった。地全協感染症部会を通じて加入機関に H275Y マーカーサーベイランス強化を依頼したところ H275H 株報告が増え、耐性比率は 10%未満まで下がった。

(4) 平成 24 年 12 月に実施した地全協を対象としたアンケート調査結果(全 79 機関中 78 機関が協力)を、協力機関等にフィードバックした。今後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して活用したい。

(5) 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) 22 年度の立ち上げ以降、感染研と協力地衛研との情報共有はスピード、質、量とも格段の向上がみられた一方で、地衛研相互での情報共有推進が課題となっていた。2013 年 4 月の H7N9 検査体制立ち上げにおいては、初めて地衛研相互の速やかな情報共有に本研究による体制構築が役立った。

年度当初は異動間もない職員が多く、個人のつながりだけでは(例えば組織内の了解を得る等にも時間を要する、等障壁が多く)速やかな情報共有の実現は難しかった。さらに感染研だけでは、実際に検査を行う地衛研の実情を 100%把握し難いと思われる。以上よりコア・サポート地衛研体制は、新しい検査導入に際しての感度・精度の迅速な確認には不可欠と考える。

(2) 24 年度研究成果に基づき、感染研影山分担研究者らによる外部精度管理(EQA)の全国実施が実現した。今回は予算の関係で検体配布なし(各機関に以前配布された陽性対照を使用)、フィードバック説明会なし、であったが、理化学試験に比べ標準化等が困難な感染症検査において EQA の第一歩を踏み出せた意義は大きいと思われる。

ウイルス分離については、今後 MDCK 細胞(希望すれば感染研から分与していただける)及び培地の標準化の要否について、検討を要する。

(3) AH1pdm09 ウイルスは日本では 2011/12、2012/13 の 2 シーズンにわたり患者数が少なかったが、2013/14 シーズンは 3 シーズンぶりに各地で流行がみられている。H275Y 耐性マーカーサーベイランスを強化し、今後 2008/09 シーズンに AH1USSR 型でみられたような耐性株への置換が起こるのか、監視を継続する必要

がある。

(4) 2013 年は新型インフルエンザ等対策特措法施行という節目があり、鳥インフルエンザ H7N9 が指定感染症となったが、多くの地衛研が人・予算・設備においてパンデミック対応した 2009 年より厳しい状況にあることはインフルエンザウイルス検査の分野においても変わりはない。

(1), (3) に記したような迅速な対応は、見識あるベテラン技術職員が全国各地に散在してこそ可能であるが、アンケート結果からは自機関内での継承・人材育成が困難と回答した機関もあった。パンデミックや鳥インフルエンザなど健康危機の備えとしても重要なサーベイランス体制の維持について、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コア地衛研 6 機関、サポート地衛研 5 機関合計 11 機関による研究協力体制の成果として、25 年度は新たな検査導入時の感度確認、H275Y 耐性マーカーサーベイランス強化をはじめとするインフルエンザ検査体制維持強化の取り組みを実践することができた。

研究協力機関は流行中のインフルエンザウイルスに関する情報を積極的に学会、論文等の形で発表した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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—2012/13 シーズン—北海道立衛生研究所報 64 印刷中 2013

2) 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(2012 年 9 月

～2013 年 5 月) 横浜市衛生研究所報 52 69-75, 2013

3) 吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之 2012/13 シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの抗原性及び系統解析

福岡県保健環境研究所報 40 90-93, 2013

4) 安井善宏、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で 2013/14 シーズンに初めて分離された B 型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) の性状 病原微生物検出情報 34(12) 376-377, 2013

5) 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、今井正樹、伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、小田切孝人、田代真人、全国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 国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤体制株の検出状況 (途中経過) 病原微生物検出情報 34 (5)141-142, 2013

6) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、土井輝子、伊東玲子、佐藤彩、菅原裕美、江島美穂、金南希、三浦舞、今井正樹、小田切孝人、田代真人、小口晃央、大下龍蔵、藤田信之、全国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

2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株の解析 病原微生物検出情報 34(11)328-334, 2013

2. 学会発表

1) C Kawakami, H Ozawa, T Momoki, M Saikusa, S. Usuku, M. Morita, Y Tobita, K, Funayama, T. Mizuno, K Mitamura, M Yamazaki, M Ichikawa
Usefulness of nose-blowing specimens for cluster influenza surveillance in Yokohama city, Japan

Options for the Control of Influenza
VIII Cape Town South Africa 2013年9
月

2) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘
集団かぜ調査における鼻かみ検体の有用
性

第45回日本小児感染症学会総会・学術集
会 札幌 2013年10月

3) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、石田
勢津子、岡野素彦

オセルタミビル耐性H3N2インフルエンザ
ウイルスの迅速検出系の構築

第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸
2013年11月

4) 藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、高下恵
美、今井正樹、菅原裕美、土井輝子、佐
藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小
口晃央、花巻朝子、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

2012/13 シーズンのインフルエンザ流行
株と2013/14 シーズンのワクチン株

第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸
2013年11月

3. シンポジウム、講演等

1) 川上千春、小澤広規、百木智子、七種
美和子、宇宿秀三、森田昌弘、水野哲宏
AH3型ウイルスの増殖性とNAアミノ酸変
異

第27回インフルエンザ研究者交流の会シ
ンポジウム 札幌 2013年6月

2) 皆川洋子、安井善宏、山下照夫、平成
24年度小田切班コア・サポート地衛研
地衛研のインフルエンザ検査・サーベイ
ランス体制の現状と展望. 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34回研究会 名古屋
市 2013年7月12日

3) 川上千春、小澤広規、百木智子、七種
美和子、宇宿秀三、森田昌弘、飛田ゆう

子、船山和志、水野哲宏

集団かぜ調査における鼻かみ検体導入の
試み. 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34回
研究会 名古屋市 2013年7月12日

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

なし。

表1 H7陽性対照受領後4日以内に実施したコア・サポート及び一部協力地衛研の検出感度結果
(2013年4月15日に受領後、4月25日に全地衛研に情報提供)

| Real- Time | | | | Conventional | | | |
|----------------------|------|------------------|------------------|----------------------|------|------------------|------------------|
| 回答日 機器数 | 感度 | H7 | M | 回答日 機器数 | 感度 | H7 | M |
| (1日後) 10台 | -3以上 | 8/10 (80%) | 8/10 (80%) | (1日後) 6台 | -3以上 | 5/6 (83%) | 3/6 (50%) |
| | -3未満 | 2/10 | 2/10 | | -3未満 | 1/6 | 3/6 |
| (4日後) 26台 24機関 | -3以上 | 24/26 (92.3%) | 23/26 (88.5%) | (4日後) 17台 17機関 | -3以上 | 16/17 (94.1%) | 13/17 (76.5%) |
| | -3未満 | 2/26 | 3/26 | | -3未満 | 1/17 | 4/17 |

注：10倍段階希釈にて実施し、10倍（-1と記載）希釈では全機関が検出可能
配付された陽性対照は、1,000倍（-3と記載）希釈において検出可能の設定

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」結果報告

- 1 概要
- 2 調査結果
- 3 総括

参考資料

- 1 アンケート調査票（平成 24 年 12 月 21 日 地研 info を通じて送信したもの）
- 2 新型インフルエンザ等対策ガイドライン（平成 25 年 6 月 26 日）より
「I サーベイランスに関するガイドライン」

1 概要

1. 地方衛生研究所全国協議会会員を対象に、2012 年 12 月から 2 月にかけてインフルエンザ検査体制に関するアンケート調査を実施したところ、ほぼ全ての会員から協力が得られた。

2. インフルエンザ検査要員数について、ウイルス全般、緊急時最大動員数とともに調査した結果、国際空港を擁する都府県等を除く大半の機関において、インフルエンザ担当 1-3 名、ウイルス担当 2-4 名、緊急時最大数 4-6 名の範囲に集中していることが判明した。

3. 季節性インフルエンザ以外の H5, H7 鳥インフルエンザウイルス等への対応状況は、季節性インフルエンザウイルス以外の検査を 1 項目以上実施する体制をもつ機関でみると、インフルエンザウイルス検査実施 74 機関の 92%にあたる 68 機関にのぼった。このうち 2008 年から 2012 年の約 5 年間に検査実績のある機関は 68 機関中 29 と 43%を占めた。

※注：2013 年 3 月に中国から H7N9 発生が報告されたことに伴い、該当する H7 に対する検査体制は、全ての地衛研において 4 月下旬までに整っている。

4. インフルエンザ検査体制及び実績の推移：

2012 年現在のインフルエンザウイルス検査体制をみると、PCR のみを行い分離培養を実施しない機関は 5 機関（78 機関の 6%、インフルエンザ検査実施 74 機関の 7%）と少なく、分離培養を実施する機関は全て HA, HI による血清型別試験を実施していた。ウイルス分離培養体制は、都道府県及び指定都市については回答のあった全ての機関に整備・維持されていた。都道府県・指定都市に比べ、他の市及び特別区（以下、「その他」と記載）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。

比較検討を行った新型インフルエンザ発生（2008/09 シーズン後半）を含む 2008/09 以降 4 シーズンの間に実施体制整備状況に変化がみられたのは、臨床検体からの real time RT-PCR による検出（84%から 100%に上昇）、分離株の real time RT-PCR による遺伝子型別（80%から 90%に上昇）及びシーケンスによる型別同定（68%から 77%に上昇）の 3 項目であった。一方中和試験は、期間を通じて 4 機関（6%）のみが実施する状況に変化がなかった。

2008/09 シーズンから 2011/12 シーズンまでの検査実績の推移をみると、パンデミック第一波がみられた 2009/10 シーズンをピークに次シーズンから減少傾向にある。2010/11 シーズンは大きな流行波が観察されなかったため理解できるが、2011/12 シーズンにおけるわが国の定点あたり患者報告数は、新型インフルエンザによるパンデミックを経験した 2009/10 シーズンを除き 2002 年以来最大であったにもかかわらず、検査実績が減っている。今後、全数検査若しくは重症例や薬剤耐性疑い等の理由でウイルスサーベイランスの必要性が増す局面も予想されるが、速やかにスケールアップが可能な人的・物的基盤体制が維持できているか、懸念される。