

2. プライマー、プローブについて
2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

図5 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

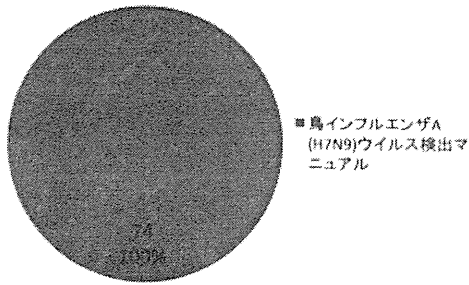


図6 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

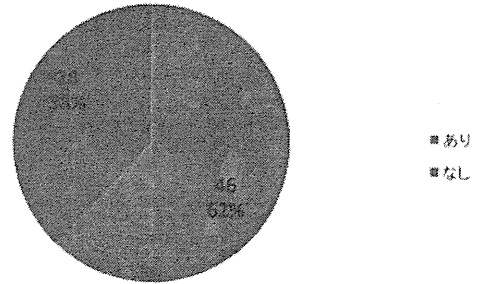


図7 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存温度

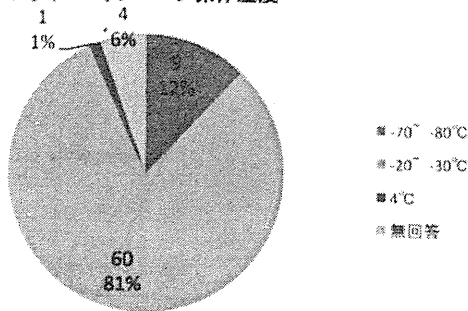
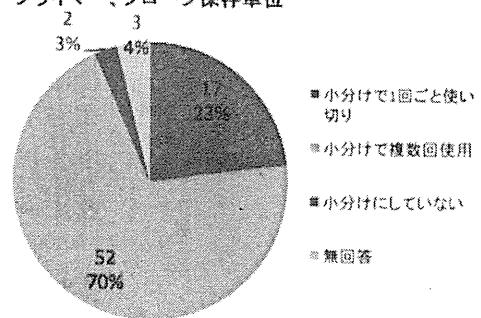


図8 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H7 検出系について

図9 H7検出系 記載マニュアル

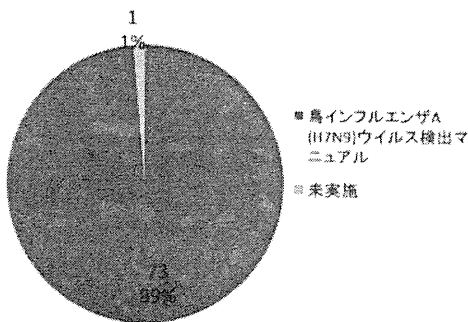


図10 H7検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

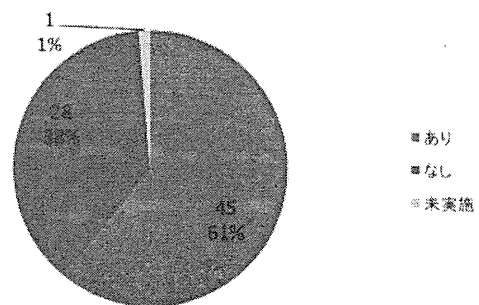


図11 H7検出系
プライマー、プローブ保存温度

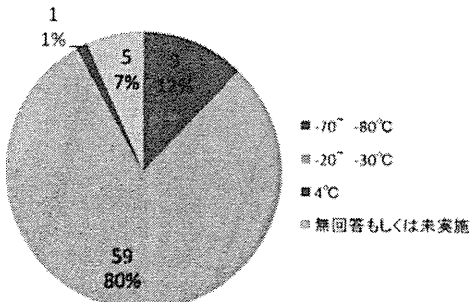
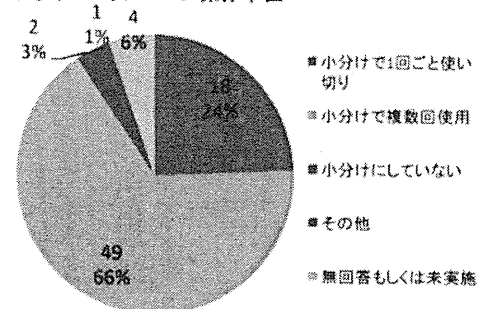


図12 H7検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H5 検出系について

図13 H5検出系 記載マニュアル

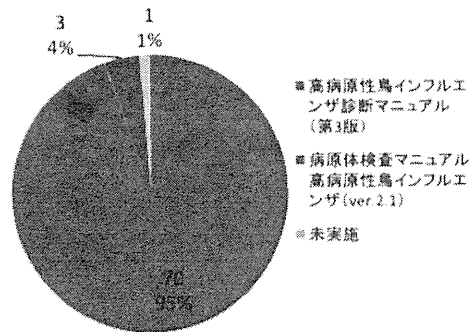


図14 H5検出系 プライマー、プローブプレミックスの有無

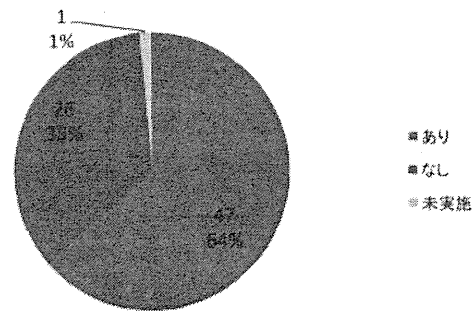


図15 H5検出系 プライマー、プローブ保存温度

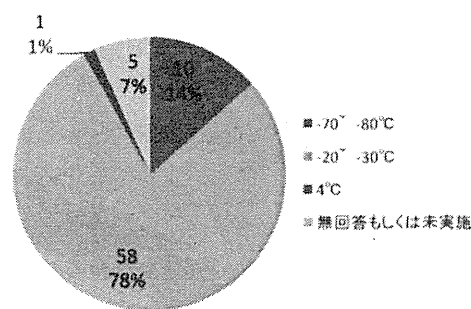
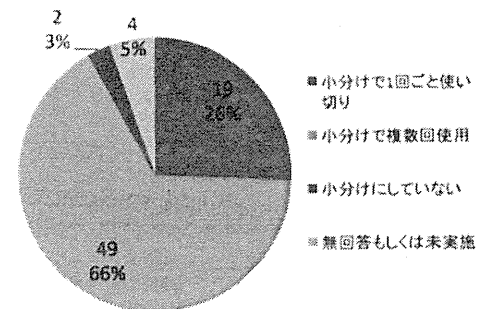


図16 H5検出系 プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

また、H5 検出系において、病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ(ver.2.1)記載の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。この検出系は、2010年10月以降に日本国内の野鳥や家禽で流行した clade2.3.2.1 に対して、H5 検出系が TypeA 検出系の Ct 値と比べ、大きく乖離するため、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)記載の検出系をご使用ください。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図17 使用キット名

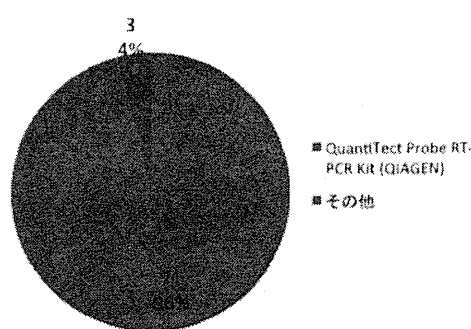
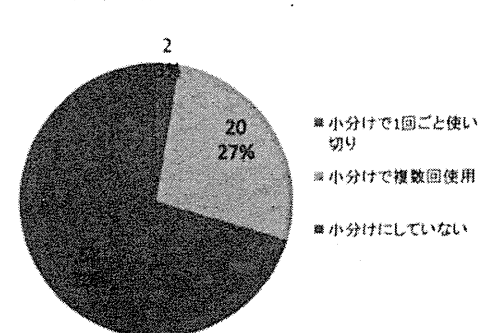


図18 試薬の保存単位



反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布したマニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化されたものです。反応条件、反応組成を最適化していないと、検出感度の低下につながる

可能性もあるのでご注意ください。

また、反応時間がより短い試薬をマニュアル内で使用してほしいというご意見をいくつかの地衛研よりいただきました。今後、検討させていただきます。試薬の保存については、小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、コンタミネーションが起きないようにご注意ください。また、凍結融解による劣化により検出感度の低下につながる可能性もありますのでご注意ください。

4. リアルタイムPCR機について

図19 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種(のべ77機種)

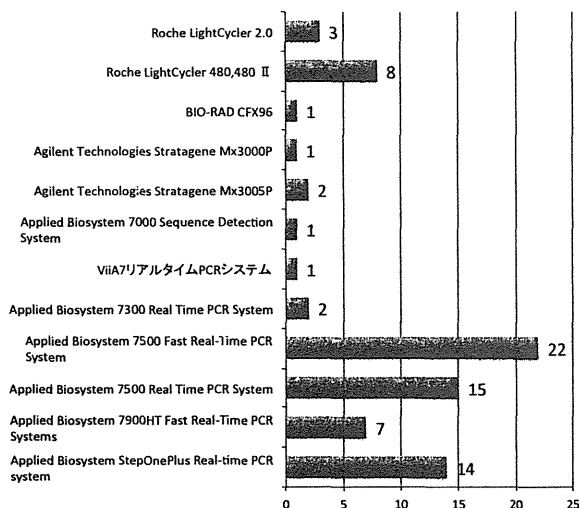


図21 通常検査のバックアップ用機器の台数

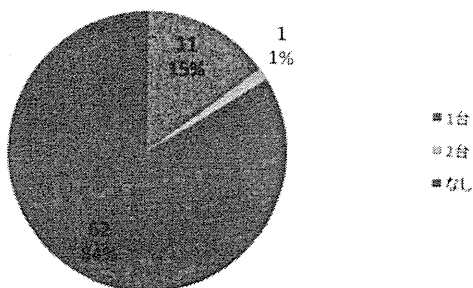


図20 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

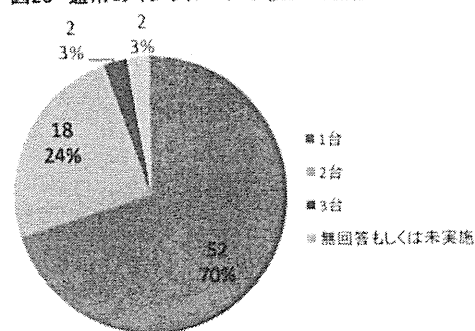
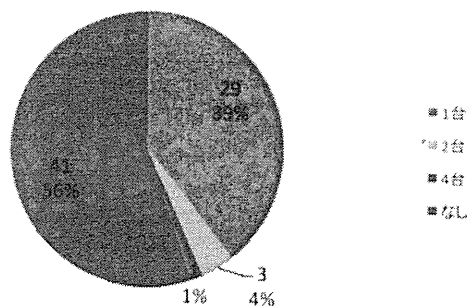


図22 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<コメント>

使用期間の長い装置については、蛍光フィルターの劣化、光学系のずれ、プレートの汚れなどにより正しく測定できない場合がありますので、定期的にメンテナンスを行うことをおすすめいたします。

5. 試薬調製方法について（結果記入ファイルから）

図23 試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時の温度

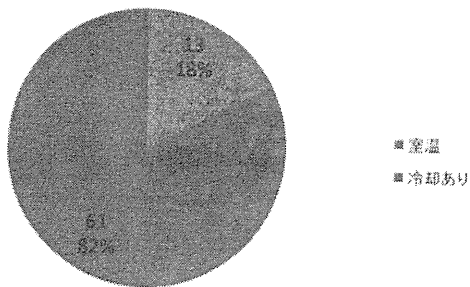


図24 試薬調製と陽性コントロール作製の順（一人で検査を行った54地衛研）

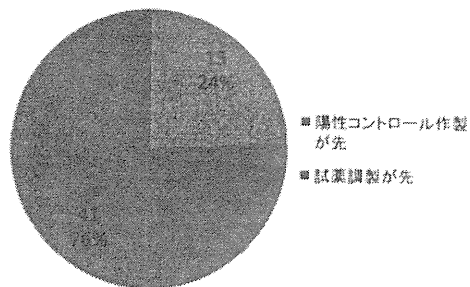
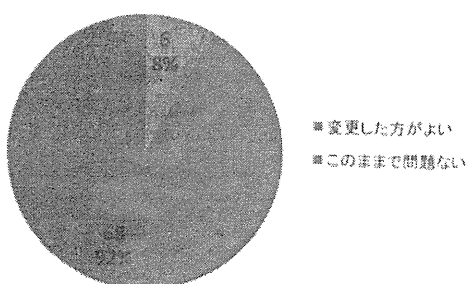


図25 試薬調製過程でのゾーニング



<コメント>

試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時に室温で行っていた地衛研が数カ所ありましたが、氷上での作業をおすすめいたします。

また、一人でEQAを行っていた54地衛研のうち、13地衛研については、陽性コントロール作製後に試薬調製を行っていました。通常の検査でも、同様の順で作業を行っている場合には、反応試薬調製後、陽性コントロール調製を行った方が、陽性コントロールの反応試薬へのコンタミネーションの可能性が低くなります。

試薬調製過程でのゾーニングについては、コンタミネーションの危険性を低減させるうえで、レイアウトの変更をした方がよいと思われる地衛研が数カ所見られました。もし、レイアウトの変更ができない場合には、1回ごとの検査後にクリーンアップを徹底するなどご留意ください。

6. 陽性コントロールの希釈方法について（地衛研数で集計）

図26 10¹希釈液作製の方法

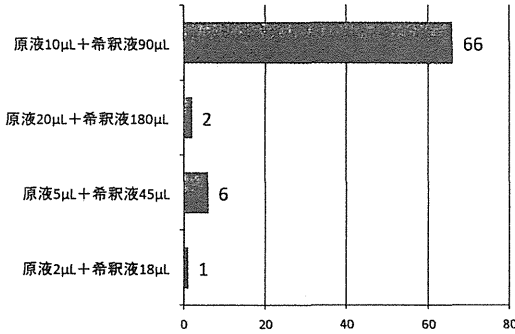
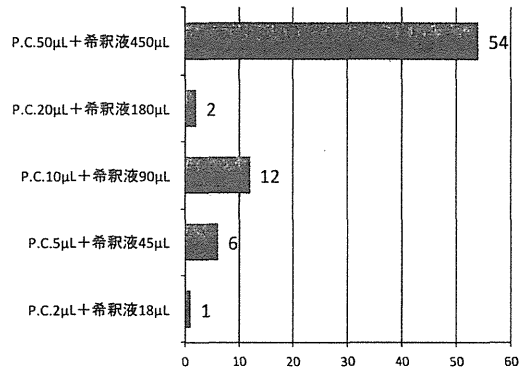


図27 10²希釈液以降の作製方法



陽性コントロールの希釈を特に 10² 希釈液以降で、50 μL + 希釈液 450 μL よりも少ない容量で行っている場合、ピペッター由来の誤差が影響しやすく、正確に希釈系列の作製ができなくなる可能性が高くなります。

7. 各所で作成した検査に関する標準業務(作業)手順書(SOP)等や H5, H7 亜型等同定検査の作業指示書等および検査記録書等の整備状況について（地衛研数で集計）

図28 検査に関するSOPの整備状況

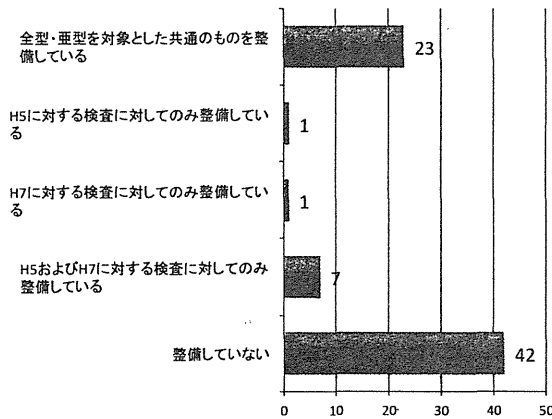
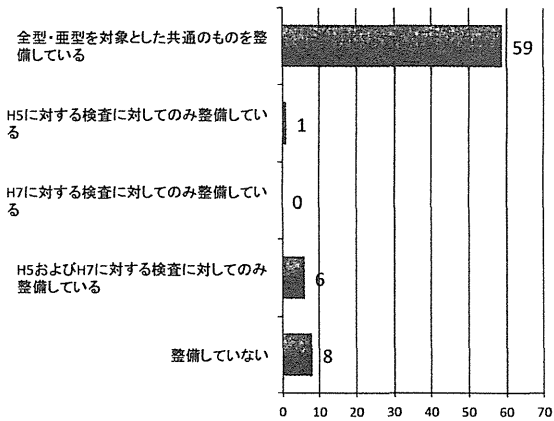


図29 作業指示書等および検査記録書等



<コメント>

作業手順書および検査記録書等は、ほとんどの地衛研で整備されているが、SOPを整備している地衛研は比較的少ない。

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

分担研究者 今井 正樹 岩手大学農学部共同獣医学科・准教授

協力研究者 岸田 典子 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 地方衛生研究所（地衛研）のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するために、全国の73カ所の地衛研を対象にアンケート調査を実施し、72カ所の地方衛生研究所から回答が得られた。過去3シーズン（2010/11、2011/12、2012/13）におけるインフルエンザウイルスの分離効率をたずねたところ、3シーズン連続して分離効率の低い研究機関が幾つかあったが、ほぼ半数の研究機関が高い効率で分離していた。また、分離効率が経年的に下降している傾向もみられなかった。ほぼ全ての研究機関がウイルス分離に用いる培養細胞を概ね適正に維持管理していることがわかった。一方、人事異動によって担当職員が定期的に入れ替わることから、地衛研でのウイルス検査技術に関する知識や技術の継承が非常に困難であるとの意見が多数寄せられた。現段階では日本のインフルエンザウイルス株サーベイランスは有効に機能している。しかし、今後地衛研組織の弱体化が一層進行すれば、そのシステムが機能しなくなる可能性は十分にある。日本の病原体サーベイランス体制を維持させていくには、国による強力な支援措置が必要である。

A. 研究目的

インフルエンザ流行株の抗原性状、遺伝子性状、抗インフルエンザ薬に対する感受性を解析し、その動向を把握するためには、患者検体からのウイルス分離は不可欠である。さらに、毎年のワクチン製造株を的確に選定するためにはウイルス分離は必須の要件である。

全国約5,000カ所のインフルエンザ定点医療機関でインフルエンザ様疾患の患者から採取された臨床材料は、各地方の衛生研究所に送付され、ウイルスの分離と同定が行なわれている。全国の地方衛生研究所（地衛研）によって毎年5千株近くのウイルスが分離され、迅速に解析されている現在の株サーベイランス体制は、世界的に見ても非常に高いレベルにある。一方、インフルエンザ対策に充てられる予算と人員の削減が進められ、地衛研組織の弱体化が進行していることから、地衛研における病原体サーベイランス業務の遂行が困難になりつつある。

本研究では、地衛研のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するこ

とを目的に、全国の地衛研を対象にアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

日本の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（添付資料1の「アンケート調査用紙」を参照）。各地衛研における過去3シーズン（2010/11、2011/12、2012/13）のインフルエンザウイルスの分離効率について質問した。また、ウイルス分離の成否に直接影響する培養細胞の維持管理法についてもたずねた。

平成25年11月8日付けで都道府県および政令都市衛生研究所長に調査票を郵送し、平成25年12月13日締め切りで返信を依頼した。また、調査票は、メーリングリストで直接インフルエンザ担当者宛てにも送付された。

C. 研究結果と考察

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）からアンケート調査に

対する回答が得られた（回答内容の詳細については、別添資料2を参照）。

各地衛研における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ところ、70%以上の高い効率で分離している研究機関が全体の半数（34機関：全体の51%）を占めた。残りの半数は、50～69%（18機関：全体の27%）、25～49%（4機関：全体の6%）、または25%未満（10機関：全体の15%）の効率でウイルスを分離していた。この傾向は、残りの2シーズン（2011/12、2012/13）についても変わらなかった。このように過去3シーズンの結果を見る限りにおいては、分離効率が下降している傾向はみられなかった。一方、3シーズンとも分離効率が50%をきった機関が1割程度存在していた。これらの機関に対しては、分離効率を改善するための何らかの手立てを早急に講じる必要がある。

ウイルスを臨床材料から効率よく分離するためには、分離に用いる培養細胞を適正に維持管理する必要がある。アンケート調査から全ての研究機関が培養細胞のストックを作製していることがわかった。ごく少数の機関を除き、ほとんどの機関は定期的に細胞を廃棄し、新しい細胞を培養細胞ストックから起こすなど、概ね適正に培養細胞を管理していた。

培養細胞の継代法とインフルエンザウイルスの分離法に関する講習会・技術研修会の開催要望について尋ねたところ、半数以上の研究機関がその実施を要望した。検査担当者が数年毎に交代するので、技術研修会はその度に開催してほしいとの声も多く聞かれた。

臨床材料中に感染性ウイルスが含まれていなければ、ウイルス分離は不可能である。医療機関での臨床材料の採取法や保管法、保健所での保管法に問題があったために、ウイルス分離効率が大きく低下したとの意見が多数の研究機関から寄せられた。限られた人員と予算でウイルスを効率よく分離するためには、質の高い材料を医療現場から得なければならない。今後は、医療従事者と保健所職員を対象にした臨床材料の採取法・保存法に関する教育啓発活動が必要になってくる。

今回のアンケート調査から、分離に用いる培

養細胞はごく一部の研究機関を除いて、概ね適正に維持管理されていることがわかった。また、3シーズン連続して分離効率の低い機関が幾つかあったが、ほぼ半数の研究機関が高い効率で分離しており、分離効率が経年的に下降している傾向もみられなかった。この調査結果と一致して、感染症サーベイランスシステム（NESID）に登録された過去3シーズンの分離株数も減少している傾向はみられなかった（図1）。したがって、日本のインフルエンザウイルス株サーベイランスは、現段階では概ね有効に機能していることが判明した。しかし、人員・予算の削減と数年毎の担当者の交代によりウイルス検査技術に関する知識や技術の継承が非常に困難になっているとの意見が多く、多くの機関から聞かれた。今後もこのような状況が続けば、地衛研組織の弱体化がより一層進行し、近い将来日本の株サーベイランスシステムが機能しなくなる可能性がある。その結果、毎年の流行株から適切なワクチン製造株を選択することが困難になり、さらには、新型ウイルスや薬剤耐性ウイルスの発生や国内侵入を迅速に検知できなくなる事態に直面するかもしれない。実験室担当者の実験室診断に関する知識や技術レベルを向上させ、一定水準に保つには、定期的な講習会・技術研修会の開催が不可欠であり、それを実行するには、国からの強力な支援措置が必要である。

D. 結論

日本のインフルエンザウイルス株サーベイランスは、現時点では概ね有効に機能していることがアンケート調査から判明した。しかし同時に、検査担当者が数年毎に入れ替わるなど地衛研組織の弱体化が徐々に進行していることも伺えた。今後国からの継続的な支援がなければ、現行の株サーベイランスシステムを将来にわたって維持させていくことは困難である。

E. 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, R.P., 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, A.J., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E.A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J.C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y.: Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501:551-555, 2013.

Yang, T., Kataoka, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Kishida, N., Shirakura, M., Imai M., Asanuma, H., Takeda, N., Wakita, T., Li, T.: Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 94:2647-2656, 2013.

Kishida, N., Imai, M., Xu, H., Taya, K., Fujisaki, S., Takashita, E., Tashiro, M., Odagiri, T.: Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:549-551, 2013

Wilker, P. R., Dinis, J. M., Starrett, G., Imai, M., Hatta, M., Nelson, C. W., O'Connor, D.H., Hughes, A.L., Neumann, G., Kawaoka, Y., Friedrich, T.C.: Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat. Commun.* 4:2636, 2013

Imai, M., Herfst, S., Sorrell, E.M., Schrauwen, E.J., Linster, M., De Graaf, M., Fouchier, R.A., Kawaoka, Y.: Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Res.* 178:15-20, 2013

2. 学会発表

今井正樹 中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)について 第47回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、北海道奈井江町、7月(2013)

F. 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
3. その他
なし

添付資料 1

都道府県および政令都市衛生研究所長 殿
インフルエンザ担当者 殿

平成 25 年 11 月 8 日

インフルエンザウイルスの分離培養検査に関するアンケート調査協力をお願い
(依頼)

平素より大変お世話になっております。

厚生労働科学研究（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』において、インフルエンザウイルスサーベイランス技術の強化に関する感染研-地衛研連携について検討しております。

つきましては、地方衛生研究所におけるインフルエンザウイルスの分離培養検査の体制の現状を把握する目的で、アンケート調査を行いたいと思います。御多忙中恐縮ですが、別紙アンケートにご回答いただきますよう、ご協力のほど宜しくお願い申し上げます。

なお、アンケート記入用のエクセルファイルは、担当者宛てにメーリングリストで直接お送りいたしますので、それに記入の上、平成 25 年 12 月 13 日（金）までに下記宛に FAX で返送いただきますようお願い申し上げます。

返信先：

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
FAX:042-561-6149

研究代表者

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 室長 小田切孝人

研究分担者

岩手大学農学部共同獣医学科 今井正樹

研究協力者

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 岸田典子

「インフルエンザウイルスの分離培養検査に関するアンケート調査ご協力をお願い」

平成24年度に実施されました厚生労働科学研究費補助金（課題名：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）による「インフルエンザ検査体制に関するアンケート調査」にご協力いただきありがとうございました。昨年度の調査は、地方衛生研究所におけるインフルエンザ検査体制全般の整備・運用状況について、その実態を把握することを主眼として実施しました。本年度は、ウイルス株サーベイランスにとって必要不可欠なウイルス分離に焦点を当て、その検査体制の現状と問題点を詳細に把握することを目的に調査を実施します。本調査で得られた結果は、今後のウイルス分離検査に関する技術研修会・講習会等を企画・立案する際の参考にさせていただきます。ご多忙のところお手数をおかけいたしますが、調査の趣旨をご理解いただき、ご協力いただきますようお願い申し上げます。

【アンケート調査票の記入方法】

回答は、該当する番号を○で囲んでください。「その他」を選ばれた場合、お手数ですが()内に、なるべく具体的に内容をご記入下さい。調査票は、Faxにて、下記宛平成25年12月13日（金）までにご返送ください。ご不明な点やご質問がありましたら、下記宛にご連絡をお願いします。

調査票の返送先：

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一室

Fax: 042-561-6149

調査票の問い合わせ先：

今井正樹 e-mail: maimai@iwate-u.ac.jp TEL: 019-621-6207

岸田典子 e-mail: kishidan@nih.go.jp TEL: 042-561-0771

回答者の連絡先：

名前

所属

職名

TEL

e-mail

問1 貴所におけるインフルエンザウイルス分離体制について、該当する番号に○をお付けください。

1. インフルエンザウイルスの分離を行っている。
2. インフルエンザウイルスの分離を行っていない。
3. 以前はインフルエンザウイルスの分離を行っていたが、今は行っていない。

問1-1 番号2あるいは3を選択された方は、問1-3にお進みください。また、ウイルス分離を実施しない理由について、差し支えなければご記入ください。

問2 細胞培養のマニュアルについて、該当する番号に○をお付けください。

1. 培養細胞の維持継代は、感染研のインフルエンザ診断マニュアルに従って実施している。
2. 培養細胞の維持継代は、貴所で作成したマニュアルに従って実施している。
3. その他（具体的に： _____）

問3 インフルエンザウイルスの分離に使用している培養細胞の種類について、該当する番号に○をお付けください。

1. MDCK細胞を使用している。
2. Caco-2細胞を使用している。
3. その他（具体的に： _____）

問4 問3でMDCK細胞を選択された方は、該当する番号に○をお付けください。

1. 感染研から分与された細胞を使用している。
2. 感染研以外の機関から分与された細胞を使用している。
3. ATCCなどの細胞バンクから購入した細胞を使用している。
（バンク名： _____）
4. MDCK細胞の入手先は不明である。
5. その他（具体的に： _____）

問5 培養細胞の継代頻度について、該当する番号に○をお付けください。

1. 週に一回程度継代している。
2. 週に二回以上継代している。
3. その他（具体的に： _____）

問6 培養細胞の継代で使用している培地の組成について、お答えください。

（例：感染研の診断マニュアルに記載されている培地を使用している。10%FBS、100単位/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、0.5 μg/mlファンギゾンを含むDMEM培地）

問7 培養細胞の保存用ストックについて、該当する番号に○をお付けください。

1. 培養細胞ストックを作製し、液体窒素容器に保存している。
2. 培養細胞ストックを作製し、超低温フリーザーに保存している。
3. 培養細胞ストックを作製していない。

問7-1 問7の番号1あるいは2を選択された方は、次の設問にお答えください。

ある一定以上の継代数を超えたら、細胞は必ず廃棄して継代数の若い細胞を起こし直している。該当する番号に○をお付けください。

(1) はい (2) いいえ

問7-2 問7-1で「はい」選択された方は、細胞を起こしてから廃棄するまでのおおよその継代数について、お答えください。(例：30代)

問7-3 問7-1で「はい」選択された方は、細胞を起こしてから廃棄するまでのおおよその期間について、お答えください。(例：3ヶ月間)

問7-4 問7-1で「いいえ」を選択された方は、どのような理由から細胞を廃棄し、新しい細胞を起こし直しているのか、ご記入ください。

問7-5 問7の番号3を選択された方で、培養細胞ストックを作製していない理由について、ご記入ください。

問8 培養細胞の継代法と凍結保存に関してご質問やご意見がありましたらご自由にお書きください。

問9 インフルエンザウイルス分離のマニュアルについて、該当する番号に○をお付けください。

1. ウイルス分離は、感染研のインフルエンザ診断マニュアルに従って実施している。
2. ウイルス分離は、貴所で作成したマニュアルに従って実施している。
3. その他(具体的に：)

問10 インフルエンザウイルスの分離で使用している培地の組成について、お答えください。(例：感染研の診断マニュアルに記載されている培地を使用している。100単位/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、0.5 μ g/mlファンギゾン、5 μ g/mlトリブシンを含むDMEM培地)

問11 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合(ウイルス分離数の臨床検体数に対する比率)はどのくらいですか? 過去3シーズンについて、お答えください。概算で構いません。

2010/2011シーズン (1) 25%未満 (2) 25~49% (3) 50~69% (4) 70%以上

2011/2012シーズン (1) 25%未満 (2) 25～49% (3) 50～69% (4) 70%以上

2012/2013シーズン (1) 25%未満 (2) 25～49% (3) 50～69% (4) 70%以上

問1 1-1 何れかのシーズンで50%未満(番号1または2)を選択された方は、次の設問で該当する項目がありましたら○をつけてください。

1. 分離効率はシーズンを通じて50%未満であった。
2. 分離効率の高い時期と低い時期があり、シーズンを通じての分離効率に大きなバラツキがあった。

問1 1-2 何れかのシーズンで50%未満(番号1または2)を選択された方は、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお答えください。

問1 2 インフルエンザウイルスの分離培養に関して、ご質問やご意見がありましたらご自由にお書きください。

問1 3 培養細胞の継代法とインフルエンザウイルスの分離法を対象とした技術研修について、ご要望やご意見がありましたらご記入ください(開催頻度、時期など)。

添付資料2

「インフルエンザウイルスの分離培養検査に関するアンケート調査」結果のまとめ

アンケートの調査対象・回答率

- a) 対象：73の地方衛生研究所（47都道府県、26の政令指定都市・中核市・特別区）
- b) 回答機関：72の地方衛生研究所（46道府県、26の政令指定都市・中核市・特別区）

問1 貴所におけるインフルエンザウイルス分離体制について、該当する番号に○をお付けください。

- a) ウイルス分離を行っている機関：67機関（93%）
- b) ウイルス分離を行っていない機関：3機関（4%）
- c) 以前はウイルス分離を行っていたが、今は行っていない機関：2機関（3%）*（*両機関とも遺伝子検査でウイルスを検出している）

問1-1 番号2あるいは3を選択された方は、問1 3にお進みください。また、ウイルス分離を実施しない理由について、差し支えなければご記入ください。

- 現状の予算・人員・施設では、ウイルス分離検査を行うことは、不可能である。
- 2013/2014シーズン以降、インフルエンザキットではウイルスの同定しかできなくなったため。

問2 細胞培養のマニュアルについて、該当する番号に○をお付けください。

- a) 感染研のインフルエンザ診断マニュアルを使用：30機関（45%）
- b) 各機関で作成したマニュアルを使用：37機関（55%）

問3 インフルエンザウイルスの分離に使用している培養細胞の種類について、該当する番号に○をお付けください。

- a) MDCK細胞のみ：53機関（79%）
- b) MDCK細胞とCaco-2細胞の両方：13機関（19%）
- c) MDCK細胞とAX-4細胞の両方：1機関（2%）

問4 問3でMDCK細胞を選択された方は、該当する番号に○をお付けください。

- a) 感染研から分与された細胞：31機関（46%）
- b) 感染研以外の機関から分与された細胞：14機関（21%）
- c) ATCCなどの細胞バンクから購入した細胞：10機関（15%）
- d) 不明：12機関（18%）

問5 培養細胞の継代頻度について、該当する番号に○をお付けください。

- a) 週に1回：53機関（79%）
- b) 週に2回：13機関（19%）
- c) 2週に1回：1機関（2%）

問6 培養細胞の継代で使用している培地の組成について、お答えください。

- a) 感染研の診断マニュアルに記載されている培地を使用：12機関（18%）
- b) a)以外の培地を使用：55機関（82%）

問7 培養細胞の保存用ストックについて、該当する番号に○をお付けください。

- a) 液体窒素容器に保存：30機関（45%）
- b) 超低温フリーザーに保存：37機関（55%）
- c) 培養細胞ストックを作製していない：該当無し

問7-1 問7の番号1あるいは2を選択された方は、次の設問にお答えください。

ある一定以上の継代数を超えたら、細胞は必ず廃棄して継代数の若い細胞を起こし直している。該当する番号に○をお付けください。

- a) はい：49機関（73%）
- b) いいえ：18機関（27%）

問7-2および問7-3 問7-1で「はい」選択された方は、細胞を起こしてから廃棄するまでのおおよその継代数と期間について、お答えください。

- 週1回・20代から40代・3ヶ月から半年間：（34機関）
- 週1回・50代前後・約1年間：（11機関）
- 週2回・25代から50代・2ヶ月から半年間：（12機関）
- 2週に1回・15代前後・半年間：（1機関）

問7-4 問7-1で「いいえ」を選択された方は、どのような理由から細胞を廃棄し、新しい細胞を起こし直しているのか、ご記入ください。

- 流行期が終了し検体の搬入が無くなったり、取扱者が休暇等によって定期的に継代出来なくなったりした時
- 培養細胞の形態が変化した時や増殖速度が低下した時など。
- ウイルスの感染価が上がりにくくなった時。
- 分離効率が低下した時。

問8 培養細胞の継代法と凍結保存に関してご質問やご意見がありましたらご自由にお書きください。

- 超低温フリーザーでの保存から液体窒素容器での保存に切り換えるべきか。そのためには予算措置が必要である。
- 液体窒素容器での保管は財政上厳しい。
- 培地の種類（DMEMとMEM）の違いは、培養細胞の増殖に影響するのか。
- 培養細胞を超低温フリーザーで長期間保管することは可能か。
- 市販の保存液やDMSO/血清培地等を用いた場合、保存可能な期間はどのくらいか。

- どのくらいの継代数で細胞を更新したらよいのか。
- 継代による細胞の劣化を確認するための簡単なチェック方法はあるのか。
- 血清有り無しと無しの保存液があるが、それぞれの特徴は何か教えてほしい。
- 感染研マニュアルに記載されている液体培地は高価であるため使用できない。粉状培地から調整しているが、何か注意する点はあるのか。
- 感染研からMDCK細胞の分与を受けたい場合の手続きについて教えてほしい。
- 希望する地衛研にはMDCK細胞の分与はできないのか。
- 細胞の保存方法や定期的な細胞の入れ替えについて病体マニュアルに記載してほしい。
- 培養細胞の継代する場合、遠心する方法としない方法があるが、その違いは何か。

問9 インフルエンザウイルス分離のマニュアルについて、該当する番号に○をお付けください。

- a) 感染研のインフルエンザ診断マニュアルを使用：31機関
- b) 各機関で作成したマニュアルを使用：35機関

問10 インフルエンザウイルスの分離で使用している培地の組成について、お答えください。

- a) 感染研の診断マニュアルに記載されている培地を使用：16機関
- b) a)以外の培地を使用：50機関

問11 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合（ウイルス分離数の臨床検体数に対する比率）はどのくらいですか？

- ◆ 2010/2011シーズン
 - (1) 25%未満：10機関 (15%)
 - (2) 25～49%：4機関 (6%)
 - (3) 50～69%：18機関 (27%)
 - (4) 70%以上：34機関 (51%)
 - (5) 不明：1機関 (2%)
- ◆ 2011/2012シーズン
 - (1) 25%未満：6機関 (9%)
 - (2) 25～49%：7機関 (10%)
 - (3) 50～69%：14機関 (21%)
 - (4) 70%以上：39機関 (58%)
 - (5) 不明：1機関 (2%)
- ◆ 2012/2013シーズン
 - (1) 25%未満：6機関 (9%)
 - (2) 25～49%：5機関 (7%)
 - (3) 50～69%：16機関 (24%)
 - (4) 70%以上：40機関 (60%)
 - (5) 不明：0機関 (0%)

- ◇ 3シーズンとも70%以上：30機関（45%）
- ◇ 3シーズンとも50%以上：46機関（67%）
- ◇ 3シーズンとも25%未満：4機関（6%）
- ◇ 3シーズンとも50%未満：8機関（12%）

問1 1-2 何れかのシーズンで50%未満（番号1または2）を選択された方は、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお答えください。

- 職員の異動によって、ウイルス分離に関する知識・技術が伝達されていない。
- うがい液からの分離効率が非常に低かった。
 - うがい液中のウイルス量が少ないことをリアルタイムRT-PCR法等で確認している。
- 医療機関のフリーザーで1週間程度保管した検体からウイルス分離を行うことがある。そのような検体では、ウイルスが失活していた可能性がある。
- 保健所での検体の保存期間が長かった。
- インフルエンザの迅速診断で利用された調整液が搬入されてきたため。
- 抗インフルエンザ薬投与後の患者検体からウイルス分離を行う機会が多かった。
 - リアルタイムRT-PCRの結果では検出限界に近い。
- 検体採取者の手技に問題があった。
- リアルタイムRT-PCRでCT値が30を超える臨床検体は、分離効率が低い傾向にある。
- 検体採取法に問題があったかもしれない。
- 約半数の検体はウイルス遺伝子が検出されなかった。
- 細胞のウイルスに対する感受性が低下したため。
- 感染研マニュアルに従って実施しているが分離できない検体が多い。原因については不明であり、どのように対処すればいいのか教えてもらいたい。

問1 2 インフルエンザウイルスの分離培養に関して、ご質問やご意見がありましたらご自由にお書きください。

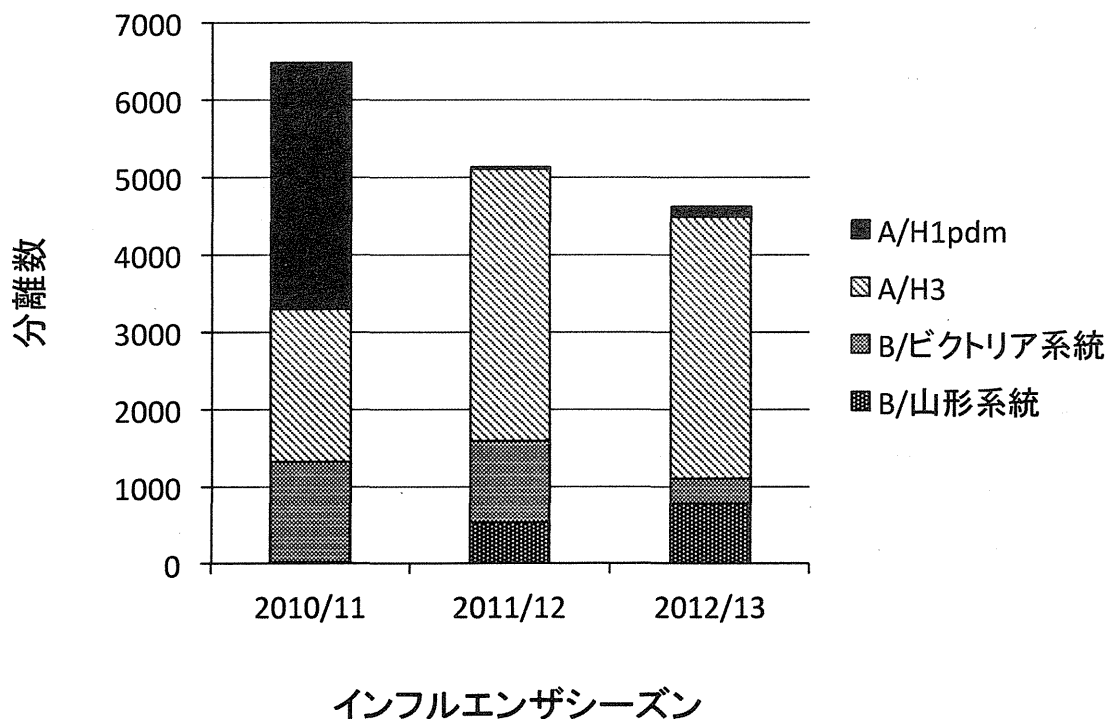
- 分離検査に関する手法が各施設で適切に行われているのかどうかを判断できる仕組みがあればよい。
- MDCKの由来や培地の種類によって分離率に差が出るエビデンスがあれば教えてほしい。
- 同定用ではなく、抗原解析に利用できるフェレット感染血清を配布してほしい（2機関）。
- HA価の上昇がみられない株の対処法について教えてほしい。
- 厚生労働省に基本的な対策をしてもらわないと、このままでは他のウイルスを含め分離をしている余裕がなくなる。
- ウイルス輸送培地の組成が分離効率に大きく影響する。
- 費用の削減により、以前のように分離培養に力を注げない。
- リアルタイムPCRの結果を見て、その後の分離検査の可否を決める。
- ウイルスの保存に適した培地は何か。

- インフルエンザとして診断された患者の検体からインフルエンザウイルスを検出できなかった場合、ほかのウイルスについても検査を行っていますか。
- 分離の継代は、何代目まで続けていますか。
- 現在すべての検体から分離を試みているが、検体数を減らすための選別基準があれば教えてほしい。
- 細胞の単層シート法と浮遊法では分離効率や分離されたウイルス株に差があるのでしょうか。
- 感染研から分与されたMDCK細胞を病原体マニュアルに記載されていたDMEM培地で培養したが、維持できなかった。また、病原体マニュアルに記載されていたDMEM培地でウイルスを分離したが培養できなかった。これらの問題は、MEM培地に変更することで改善できた。
- CPEが不明瞭な場合のウイルス分離の確認法について教えてほしい。
- HA価が低いまたはない場合のウイルス型・亜型同定法について教えてほしい。

問13 培養細胞の継代法とインフルエンザウイルスの分離法を対象とした技術研修について、ご要望やご意見がありましたらご記入ください（開催頻度、時期など）。

- 37機関が技術研修会の開催を要望した。
- 技術研修会は数年に1度、夏から秋の間に実施してほしい。（大半）
- 担当者が交代する毎に実施してほしい。（8機関）
- ブロック毎に研修会を開いてほしい。
- 技術研修会が定期的で開催されれば、精度管理的な手技の統一化が進む。地衛研のウイルス分離に対する強い動機付けとなる。技術研修会を通じて、ウイルス分離のノウハウを地衛研と感染研の間で共有できる。

図1. NESIDに登録されたインフルエンザウイルス分離数



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

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

インフルエンザ A(H1N1)pdm09 の予防および治療には抗インフルエンザ薬の NA 阻害剤が用いられる。NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつ NA 阻害剤耐性ウイルスは国内外で散発的に検出されており、我々は全国地方衛生研究所と共同で、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。札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制を強化したところ、2013 年 2 月中旬までに、490 株の解析株中 41 株の耐性ウイルスが検出され、検出率は 8% に達することが明らかになった。国内外の A(H1N1)pdm09 耐性ウイルス検出率は、過去数シーズンにわたって 1-2% 程度であり、8% の検出率は憂慮すべき事態である。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いるが、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。国内における耐性ウイルス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ために、耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

A. 研究目的

日本国内においてインフルエンザ 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 NA 阻害剤、オセルタミビル (商品名タミフル)、ペラミビル (商品名ラピアクタ)、ザナミビル (商品名リレンザ)、ラニナミビル (商品名イナビル) 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上記の抗インフルエンザ薬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・ペラミビル耐性ウイルスが検出されている。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ウイルス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めて重要である。そこで我々は全国地方衛生研究所と共同で、2009 年 9 月から、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ている。

札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制の強化を図った。

B. 研究方法

全国地方衛生研究所において、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、詳細な遺伝子解析および抗原性解析を行った。さらに、MUNANA基質を用いた蛍光法によって、H275Y耐性変異ウイルスのオセルタミビル、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、IC₅₀値を算出した。

C. 研究結果

2013年2月中旬までに、全国31都道府県の43地方衛生研究所で490株の

A(H1N1)pdm09ウイルスが解析され、そのうち41株のH275Y耐性変異ウイルスが検出された。H275Y耐性変異ウイルスはいずれもオセルタミビルおよびペラミビルに対して著しく感受性が低下していた。一方で、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

オセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出された患者のほとんどは検体採取前に抗インフルエンザ薬の投与を受けておらず、薬剤により患者の体内で耐性ウイルスが選択された可能性は否定される。国内における薬剤未投与例からの耐性ウイルスの検出率はシーズン毎に増加傾向にあり、海外の状況も同様である。2013/2014シーズンには、米国および中国においてもH275Y耐性変異ウイルスの検出が相次いで報告されている。日本国内で検出された耐性ウイルスの詳細な遺伝子解析から、国内の耐性ウイルスは中国の耐性ウイルスと共通の祖先に由来する可能性が示唆された。また、2009年の(H1N1)2009パンデミックの際にヨーロッパの重症患者の一部で報告された、鳥型レセプターへの結合性を高めるようなヘムアグルチニン(HA)遺伝子の変異(D222G、Q223R)は起こっておらず、耐性ウイルスの病原性が増強している所見はない。

国内で分離されたオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスについて抗原性解析を行った結果、2013/14シーズンのワクチ

ン株A/California/7/2009の抗原性と一致していることが明らかになった。したがって、今シーズンのワクチンは、オセルタミビル・ペラミビル耐性A(H1N1)pdm09ウイルスに対する有効性が期待される。

D. 考察

国内外におけるH275Y耐性変異ウイルスの検出率は、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%となる。しかし、札幌市を訪問後に居住地で発症し、札幌で流行する耐性ウイルスと遺伝的に同一の耐性ウイルスが検出される症例が増えており、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。

E. 結論

国内では、札幌市を中心にH275Y耐性変異ウイルスの検出が続いている。H275Y耐性変異をもつインフルエンザウイルスに関して、小児ではオセルタミビル投与群と非投与群の間で有熱期間に差がなかったという報告があり、抗インフルエンザ薬の投与に際しては、各地域での耐性ウイルスの検出状況に注意を払う必要がある。したがって、国内における耐性ウイルス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ために、引き続き全国地方衛生研究所と国立感染症研究所における耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表