

201420025A

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
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人
平成27年(2015)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 _____ 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 _____ P12

研究協力者：高橋雅輝、長島真美、新開敬行、原田幸子、林志直、森川佐依子、廣井 聡、加瀬哲男、山下育孝、芦塚由紀、千々和勝己、駒込理佳、長野秀樹、川上千春、宇宿秀三、森田昌弘、小淵正次、滝澤剛則、岡山文香、喜屋武向子、久場由真仁、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)：第2回全国地衛研外部精度管理(EQA)実施結果について

影山努 _____ P20

研究協力者：高山郁代、中内美名

3. 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 _____ P46

研究協力者：渡邊真治

4. 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 _____ P56

研究協力者：横山勝

5. 成人層および高齢者層に対する 2014-15 年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応

齋藤玲子 _____ P62

研究協力者：近藤大貴、菖蒲川由郷、日比野亮信、八神錬、尾ヶ井マサヨ、樋熊紀男

6. 培養細胞で増殖性を高めるマーカー遺伝子の特定に関する研究

今井正樹 _____ P70

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P72

I. 総括研究報告書

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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））
平成 26 年度総括研究報告書

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・
センター長

研究要旨

改正感染症法が平成 28 年から施行され、病原体サーベイランスおよび検査精度管理の強化がなされる。さらに、これらの実施機関として地方衛生研究所（地衛研）の法的位置づけと役割が明確化される。本研究では改正感染症法の施行に向けて、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・サポート地衛研ネットワークー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）との連携体制を基盤に、1）鳥インフルエンザ A(H5N8)国内発生への PCR 検査対応の再確認とウイルスの性状に関する情報共有、2）全国地衛研で季節性インフルエンザおよび鳥インフルエンザ（H5N1,H7N9）を高い精度を維持して鑑別診断できるように外部精度管理試験（External Quality Assessment, EQA）を 2 年間にわたり実施、3）全国地衛研におけるインフルエンザウイルスの回収技術体制の強化に向けた、ウイルス分離培養技術の再確認と改善への取り組み、4）ウイルス遺伝子情報から計算科学を駆使した構造学的解析によるウイルス変化予測、薬剤耐性株の伝播性のリスク評価の実施、5）ヒトの上気道細胞におけるウイルス増殖性を規定するノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の変異の評価、6）インフルエンザワクチン接種前後のペア血清を用いたワクチンの免疫原性の評価を 2 シーズンに亘り実施。これら各研究項目の実施により、地衛研の PCR 検査技術、精度の全国規模での均てん化が達成され、これは他の病原体検査体制の強化対策にとっても先導的モデルケースとしての役割を果たすことができた。また、ウイルス分離培養技術の強化は、原因病原体の確保およびウイルス性状からのリスク評価、ワクチン種株の開発にとって必須である。このため、PCR 検査体制強化と並行して取り組み、重点的に強化すべき地衛研を特定して改善への助言を行った。さらに、2014/15 シーズンの流行の主流となっている A(H3N2)ウイルスの性状変化による抗原解析の実施困難という新たな課題への取り組みとして、感染症法第 15 条および予防接種法第 23 条第 4 項に基づき、地衛研から感染研に臨床検体を分与できる仕組み

をコア・サポート地衛研ネットワークとの連携により整備した。一方、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可能となるまでには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、コンピューターによる計算科学技術を駆使したリスク評価法が強力な武器となり、本研究では A(H7N9)ウイルスのヒトでの伝播リスクを高める変異箇所のリスト化および北海道で地域流行を起こした A(H1N1)pdm09 薬剤耐性株のリスク評価とその後の感染拡大の可能性について、蛋白質立体構造情報をもとに評価した。構造解析からの流行予測と実際のサーベイランスによる流行動態が一致したことから、この手法は株サーベイランスを補強するツールとして積極的に取り入れるべきことが示唆された。

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センター長

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
今井正樹 岩手大学農学部共同獣医学准教授
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 室長

A. 研究目的

本研究班では、新型インフルエンザ発生に備えて地衛研-感染研の連携をスムーズにすること、また、季節性インフルエンザ株サーベイランスの強化と改善を効果的に実施する体制の整備をすることを目標としている。このため、ウイルス検出検査、株

サーベイランスの最前線になる地衛研のPCR 鑑別診断技術の強化は不可欠であり、これを感染研が支援して効率よく行うために、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5年目に入り、本研究班が目指す目的の大半は達成されつつある。本連携体制により、感染研から地衛研への情報提供の迅速化、検査・サーベイランスの実施施策の事前調整と効率的な運用が可能となった。また、原因ウイルスを効率よく確保するために、株サーベイランス技術の再確認と必要に応じて感染研からの技術改善への支援を実施した。これらの研究活動は、サーベイランス体制の強化と検査診断の精度管理が求められる改正感染症法の施行（平成28年度）の準備対応となっている。一方、流行ウイルスの性状変化に伴って起こる抗原解析の実施困難な問題解決に取り組むために、これまでの地衛研から感染研へのウイルス分離株の分与の仕組みに加えて、臨床検体も必要に応じて分与できる仕組みをコア・サポート地衛研と協議、事前調整により構築した。

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、コンピューターを用いた最新の計算科学による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、リスト化して、それらをその後のサーベイランスでのチェックマーカーとして活用した。さらに、この手法を応用したウイルス変化予測、ウイルス安定性のシュミレーションは、薬剤耐性株の地域流行の発生に際して、全国流行へ発展するか否かの流行予測にも有益に機能することが立証され、サーベイランス体制を補完する強力なツールとなることが本研究から明らかになった。

このように、本研究班では、精度管理された診断検査・株サーベイランス体制を維持するために、基礎研究で開発した技術を導入し、コア・サポート地衛研で試験実施、問題点の修正、改善による標準化を実施、その後全国展開するという戦略基盤を構築し、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す（別添資料の流れ図）。

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、2014 年に国内発生した H5N8 鳥インフルエンザウイルス検査対応の再確認、迅速な情報共有を行っ

た。

2. 全国の地方衛生研究所を対象に第 2 回 PCR 検査外部精度管理試験 (EQA) を実施。検査環境および検査実施状況おアンケート調査を実施。その調査結果を踏まえて、個別に改善対応の相談、アドバイスを実施。

3. 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、前年度実施のアンケート調査をもとに、ウイルス分離培養効率の悪い地衛研を特定して、改善への相談を行った。

5. 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。

6. ヒトの上気道細胞での増殖性を規定している変異の特定を RG 法で検証した。

7. 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。

C. 結果

1. インフルエンザウイルス検査の EQA が順調に進んでいることから、これと並行して内部精度管理に必要な書類について検討を開始した。病原体サーベイランス体制が平成 28 年 4 月より強化されることとなったため、個々の書式ひな形案の検討は次年度の実施課題とした。

2. H1pdm09 インフルエンザの流行が拡大した 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り、全国地衛研による約 5000 株のスクリーニング-感染研による確認試験実績が達成された。

3. 血球凝集活性の低い H3 インフルエンザが流行の主流となっている 2014/15 シーズンは、株サーベイランス実績の維持に向けて情報共有を図った。また感染研から要望された臨床検体の分与について地方衛生研究所全国協議会感染症部会と事前の調整を図り感染研および厚労省からの協力依頼を受けることになった（添付依頼文書）。

4. ウイルス分離効率の思わしくない 9 地衛研をアンケート調査から抽出し、下記 4 項目についてさらに詳細な電話協議を実施し、改善へのアドバイスを行った。

1) インフルエンザ検査担当人員と検査業務の引き継ぎについて、2) 培養細胞の凍結保存と管理について、3) インフルエンザウイルスの分離培養法と 2013/14 シーズンの分離効率について、4) 感染研主催の技術研修会への参加の有無について。

共通した要望は、感染研インフルエンザウイルス研究センター主催の技術研修会開催であるが、これには別途予算措置が必要で、今後の課題として残された。

5. 未報告の変異をもつ薬剤耐性株のリスク評価と流行動態予測への応用の試み

平成 25 年 11~12 月、札幌で H1N1pdm09 のオセルタミビル/ベラミビル耐性株の地域流行が発生した。これら耐性株は全て NA 蛋白質に既知の薬剤耐性変異 H275Y を獲得していた。さらに、NA 構造安定性向上を通じて流行拡大のリスクを高める効果があると報告された位置に、未報告の変異

(N386K) を獲得していたため、この耐性株の全国的拡散の可能性について計算科学の技術を用いてリスク評価を行った。その結果、この変異に NA 構造安定性を高める補償効果は無く、新たな二次変異を獲得しない限りヒトで大規模な流行を引き起こすリスクは低いことが示唆された。これは、その後の流行監視のサーベイランス結果と一致し、計算科学による流行予測がサーベイランスを補強する有用なツールになることを示した。

6. 新型 IFV のリスクを高める二次変異の予測と監視

平成 25 年 3 月に中国で検出されたトリ IFV A (H7N9) は、ヒト伝播能が低く、流行には至っていない。しかし、二次変異を蓄積することで、ヒト伝播効率の高い株が生じる可能性が危惧されたため、計算科学の技術でリスク変異予測を実施した。

MOE を用いて HA 蛋白質単量体、及び三量体構造を構築し、結合シミュレーションと変異導入解析を組み合わせ、ヒト型感染受容体指向性を増強する適応変異候補 44 種、三量体安定化に寄与する補償変異候補 14 種を特定した。中国で新たに A (H7N9) の感染症例からのウイルスは、HA の可変性ループ等に新たな変異を持っていた。しかし、いずれも我々の予測したリスク変異を持っていないこと、新たな変異は HA 受容体結合部位周辺や多量体形成の境界面近傍には位置していないために受容体指向性変化や三量体安定化への影響は小さいこと、などから、流行のリスクは低いと判断した。その後の継続的な監視により、

現時点までに、これら散発的に発生したトリ A(H7N9)中国株の大規模な流行は起こっておらず、計算科学での予測と実際の流行動態が一致していた。

7. 2014-2015 年シーズンのワクチン接種後、成人、高齢者に対する抗体応答を調べ、おおむね良好なワクチンによる抗体上昇効果が得られた。重篤な副反応はみられなかった。インフルエンザは毎年流行株が異なるため、今後もワクチン接種が必要である。調査を行った情報は、次のシーズンのワクチン株の選定のために有益であるため、今後も調査の継続が必要である。

8. A/H3N2 亜型の季節性インフルエンザウイルスがヒト呼吸器上皮細胞で効率良く増殖するための NA 変異について解析し、増殖効率の向上には NA の酵素活性が必須であることを確認できた。

D. 考察

改正感染症法が平成 28 年度から施行され、これによって法的にサーベイランス体制の強化が図られることとなった。それに伴って、検査の精度管理の実施も求められることになる。本研究班では、これに先駆けて過去 5 年にわたってコア・サポート地衛研組織の構築から始めて、PCR 検査体制の強化と精度管理の導入、それに応じて改善への取り組みを行ってきた。また、内部精度管理への取り組みも開始した。これらの施策の実施により、全国規模での PCR 検査体制のレベル向上と均てん化が実現され、新型インフルエンザ対策の初期対応の根幹は形成された。

新型インフルエンザ対策は毎年実施されている季節性インフルエンザ株サーベイランス体制の維持、強化があつてこそ成り立つ。検査体制の強化と質的向上が実現したことから、今後は、株サーベイランス体制の向上へと力点が移ることになる。全国地衛研での技術、体制は概ね良好で一部を除いては、現状維持で対応可能である。しかし、さらなる改善には、問題点解決への支援が必要である。問題を抱える施設の担当者からは、感染研からの定期的な技術研修を要望する声が多い。特に、担当者が移動、交代した際には、技術の伝承のためには研修による支援は不可欠である。しかし、本研究に対しては、研修を実施すべき予算処置はされておらず、別プロジェクトでの実施に期待するしかない。もし別プロジェクトで研修が実施されるのであれば、本研究班からも情報提供および技術的な支援をしたい。

株サーベイランスを補強する新たな取り組みとして、ウイルス遺伝子情報の計算科学を応用した構造変化シュミレーションが、ウイルスの変化予測、効率的なヒト-ヒト感染を誘発するリスク評価などに有効に機能することが立証された。本研究では北海道での薬剤耐性株の地域流行の際に、その後の全国流行の可能性を構造シュミレーションから評価し、地域流行にとどまることを早くから指摘した。それはその後の株サーベイランスで実証されたことか、PC によるウイルス遺伝子情報の計算科学はサーベイランスを補完する強力なツールとなる。今後は、より積極的にこの手法をサーベイ

ランスに取り入れ、効果的なサーベイランスを目指したい。

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5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 2 度実施され、PCR 検査技術の大幅な改善と均てん化が達成された。

・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。

・ウイルス NA 遺伝子に起こる変異とウイルス増殖性の関連を評価した。

・2013/14、2014/15—ズンワクチンの抗体応答について評価し、ワクチンの有効性評価への情報発信をした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Barr IG, Russell C, Besselaar TG, Cox NJ, Daniels RS, Donis R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Schultz-Cherry S, Shu Y, Smith D, Tashiro M, Wang D, Webby R, Xu X, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on

Northern Hemisphere Influenza WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. Vaccine. 2014 Aug 20;32(37):4713-25

2) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92777

3) Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Marilda M. Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong,

- Wenqing Zhang, Rod S. Daniels, Aeron C. Hurt Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013 Antiviral Research. 2014, Oct;110:31-41
- 4) Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. Euro Surveill. 2014 Jan 9;19(1)
- 5) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis. 3;14(1):362-, 2014
2. 学会発表
- 1) 小田切孝人 A(H7N9)インフルエンザとワクチン開発 第55回臨床ウイルス学会 札幌、2014年6月
- 2) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所. 2013/14 シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
- 3) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前中勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II型膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2はHA開裂部位にmono-basicなアミノ酸配列をもつA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
- 4) 内藤忠相、齋藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人 インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を生業するRNAポリメラーゼの機能領域 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
- 5) 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人 過去3シーズンに混合流行したB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
- 6) 浅沼秀樹、相内章、許斐奈美、佐藤佳代子、田代真人、小田切孝人 フェレットに対する免疫原性を基盤とした細

- 胞培養ワクチン用種株選定法の確立
第 62 回日本ウイルス学会学術集会.
2014 年 11 月 10-12 日 (月-水)、横浜
- 7) A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Nastri, Edith F Puruhito, 横田(恒次)恭子, 西村 研吾, 影山 努, 高原 悠佑, 堀田 博, 清水 一史. Comparative analysis for the detection of avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer(POCube) and real-time RT-PCR. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 8) 高山 郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内 美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切 孝人, 田代 真人, 影山 努. 2014 年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 9) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特異性 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月
- 10) 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 月
- 11) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 月
- 12) 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 月
- 13) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宣聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対する TLR アゴニストの影響 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014 年 12 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

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**
 (H25-新興-一般-002)

研究代表者 小田切孝人（感染研インフルエンザウイルス研究センター）
研究分担者 皆川 洋子（愛知県衛生研究所、地全協感染症対策部会）
 齋藤玲子（新潟大学医歯学系国際保健学講座）
 今井正樹（岩手大学農学部共同獣医学科）
 佐藤裕徳（感染研病原体ゲノム解析研究センター）
 影山努（感染研インフルエンザウイルス研究センター）

研究協力者

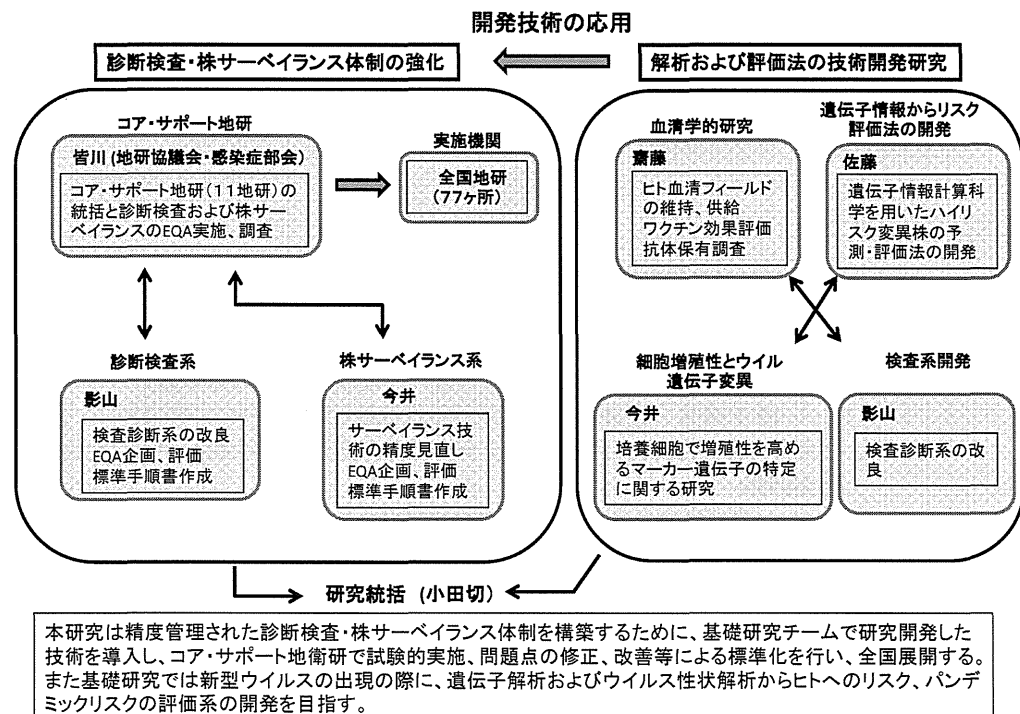
（コア地衛研： 6地衛研）

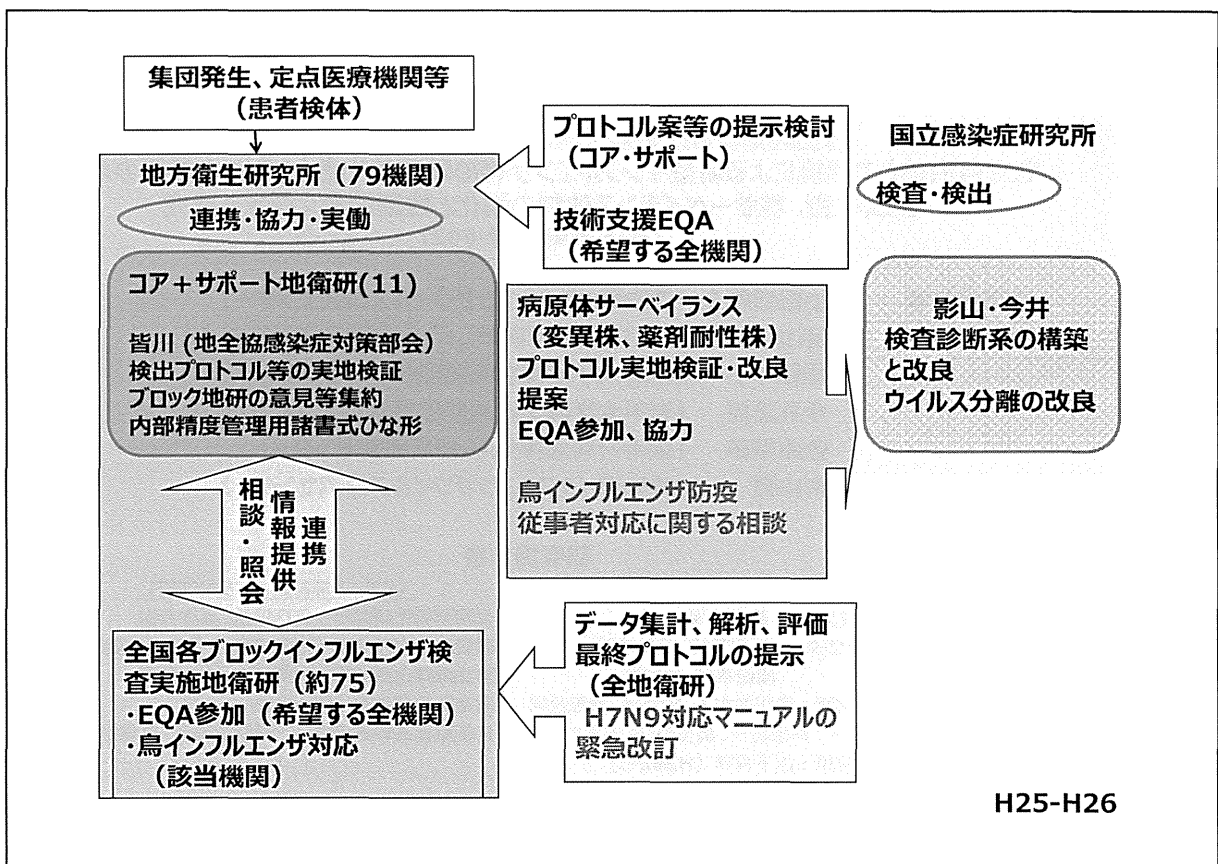
岩手県環境保健研究センター：高橋雅輝、
 東京都健康安全研究センター：新開敬行、長島直美、
 原田幸子、林志直
 大阪府立公衆衛生研究所：森川佐衣子、廣井聡、加瀬哲男
 山口県環境保健センター：戸田昌一、調恒明(H25まで)
 愛媛県立衛生環境研究所：山下育孝（H26から）
 愛知県衛生研究所：安井善宏
 福岡県保健環境研究所：戸塚由紀、千々和勝巳

（サポート地衛研： 5地衛研）

北海道衛生研究所：駒込理佳、長野秀樹
 横浜市衛生研究所：川上千春、宇宿秀三、森田昌弘
 富山県衛生研究所：小淵正次、滝澤剛則
 堺市衛生研究所：岡山文香
 沖縄県衛生環境研究所：喜屋武尚子、久場由真仁

研究項目の概要と役割分担および相互関連





本研究プロジェクトの意義と期待される成果

背景と意義

全国地衛研－感染研連携により、全国一律の精度によるPCR検査体制の維持のための定期的なEQAの実施、ウイルス分離技術の維持のための調査と技術支援、遺伝子解析情報をもとにしたウイルス変化予測、リスク評価法の確立。

- ・ パンデミック発生時に全国一律の精度で検査可能な基盤構築。
- ・ 原因ウイルス入手前にリスク評価、パンデミックリスク評価できる体制構築。

期待される成果

1. 全国地衛研での検査体制、ウイルス分離培養体制、人員配置等の徹底調査
⇒ 適切な全国版EQAの実施準備、サーベイランス技術改善へのアドバイス準備
2. 全国地衛研でのPCR検査EQAの実施
⇒ { 第1回目：問題点の認識と改善への取り組み (H25年度)
第2回目：正確性、精度の飛躍的改善が実現 (H26年度)
3. 薬剤耐性変異株、H5やH7亜型ヒト分離株の遺伝子情報の構造的、機能的解析基盤構築
⇒ { 原因ウイルス入手までの初動対応として、遺伝子情報からのリスク評価、パンデミック評価が可能
注意すべき重要変異のリスト化、検査やサーベイランスでの要注意マーカーとして活用
耐性株の地域流行、拡大リスクの予測

地衛研側の対応と成果

(1) コア・サポート地方衛生研究所連携網を活用した、検査法実地検証及び株サーベイランス技術の強化

- 平成25年4月：H7N9鳥インフルエンザウイルス検査試案（リアルタイムRT-PCR法によるH7及びM遺伝子検出）の検出感度確認、4月25日付で全地研にフィードバック。
- 平成25年11月以降オセルタミビル耐性サーベイランス強化。
- 平成26年に国内発生したH5N8鳥インフルエンザへの対応
 - 4月に熊本県内養鶏場、12月宮崎県・山口県における発生時、
 - H5遺伝子におけるRT-PCR検出感度変異等について感染研に照会、必要な情報を地研間で情報共有。
- 感染研におけるワクチン株検討に必要な分離ウイルス株・臨床検体の活用が円滑に行われるよう、事務手続きを含む全地研の実態把握・情報提供。

(2) 全地研を対象とした「インフルエンザ検査体制に関するアンケート調査」結果を報告。

(3) 各研究機関における内部精度管理に関する書式案等を提示し、コア・サポート地方衛生研究所連携網を通じて検討を図っている。

今後に残された課題と対応計画

1. インフルエンザウイルス（季節性に加えて再興、新型を含む）検査関連情報の迅速かつ正確な伝達を担保するには、コア・サポート地衛研—感染研連携ネットワークでの研究班活動は必要。
2. 全国規模での検査EQAを定期的実施。次年度は改訂版試験パネルによるEQA実施に向けた戦略策定を行う。
3. ウイルス分離検査技術の精度が低い地衛研に対して、感染研に招聘して研修を計画する。これらの実施は予算措置依存される。
4. インフルエンザウイルス遺伝子解析情報をもとに、構造変化予測の観点から、未報告のリスク変異候補のリスト化。それらをチェックマーカーとして株サーベイランスの実施に役立てる。計算科学の最新の進展を取り入れながら、構造特性解析の精度向上を進める。
5. 研究費予算の減少に伴い、研究班の規模を縮小し、不可欠な重点項目については継続的に対応する。

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

高橋雅輝	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、原田幸子、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）
山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所（コア地衛研）
芦塚由紀、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	北海道立衛生研究所（サポート地衛研）
川上千春、宇宿秀三、森田昌弘	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）
岡山文香	堺市衛生研究所（サポート地衛研）
喜屋武向子、久場由真仁	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）

研究要旨

インフルエンザ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（地全協）感染症対策部会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の理解のもと、コア・サポート地衛研体制が構築され、ネットワークが可視化された。本ネットワークはウイルスサーベイランス並びにパンデミック対応に加え、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を担当する。中国で 3 シーズン目に入った鳥インフルエンザ A(H7N9)の二類感染症指定等を受けて、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 26 年度は

- (1) インフルエンザ内部精度管理に必要な書類について検討した。
- (2) H1pdm09 インフルエンザの流行が拡大した 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り、全国地衛研による約 5000 株のスクリーニング-感染研による確認試験実績が達成された。血球凝集活性の低い H3 インフルエンザが流行の主流となっている 2014/15 シーズンは、株サーベイランス実績の維

持に向けて情報共有等を図っている。

(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の外部精度管理(External Quality Assurance)実施にあたり、現場としてプロトコルの検討や結果の検討に協力した。

(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/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。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。本ネットワークはウイルスサーベイランス並びにパンデミック対応に加え、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を担当する。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 等)の継続的発生及び中国で 3 シーズン目に入った鳥インフルエンザ A(H7N9)の二類感染症指定、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 26 年度は、検査体制強化の一環とし

てインフルエンザウイルス検査に関する内部精度管理(internal quality control)の重要性が増しており、地衛研においても各研究室レベルで書類等の整備が必要となる。この他、研究分担者の影山室長による外部精度管理の効率的な実施には現場として地衛研の協力が必須であり、家禽における鳥インフルエンザ発生に伴う殺処分が実施された場合には、現検査体制の適合性等に関する情報をいち早く共有することが求められる。

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、平成 26 年度は、以下の活動を実施した。なお今年度より中国四国ブロックのコア地衛研が、山口県環境保健センターから愛媛県衛生環境研究所に変更された。

(1)過去 3 年間にわたり実施されてきた外部精度管理に加えて新たに内部精度管理体制の強化を図るため、衛生検査所精度管理等の経験を踏まえて主に愛知県の書式を参考にして、必要な書類のリストを検討・作成した。

(2)一部地域で H1pdm09 インフルエンザの

流行拡大がみられた 2013/14 シーズンは、全国地衛研に対して H275Y マーカーサーベイランス強化への協力依頼の周知を図るとともに、抗ウイルス剤感受性サーベイランス体制強化に寄与した。

(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。

（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) インフルエンザウイルス検査の内部精度管理に必要な書類について検討を開始した。必要と考えられる諸書式のリストを表 1 に示す。年度途中に感染症法が改正され、病原体サーベイランス体制が平成 28 年 4 月より強化されることとなった。関連する法令改正が 27 年中に行われることとなったため、個々の書式ひな形案の検討は次年度に実施することとした。

(2) H1pdm09 インフルエンザの流行が拡大した 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り、全国地衛研による約 5000 株のスクリーニング・感染研による確認試験実績が達成された。血球凝集活

性の低い H3 インフルエンザが流行の主流となっている 2014/15 シーズンは、株サーベイランス実績の維持に向けて情報共有等を図っている。

(3)影山分担研究者（感染研）により、ほとんどすべての地方衛生研究所に対して実施されたウイルス遺伝子検出試験の外部精度管理(External Quality Assurance)に協力し、現場としてプロトコル等送付書類の事前検討等に当たった。

(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。

D. 考察

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。

今年度は EQA に加えて 28 年度に施行される病原体サーベイランスの強化への対応準備の端緒として、内部精度管理の強化に着手するとともに、赤血球凝集活性の低い季

節性インフルエンザウイルスへの対応検討を始めた。法令改正に伴いインフルエンザウイルスサーベイランスの国内均てん化が求められ、臨床検体を取扱う試験検査の担い手として各自治体の地方衛生研究所の体制確保が新たな急務として浮上した。

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、26年度前半はAH1pdm09におけるH275Y耐性ウイルスの地域流行を受けてマーカーサーベイランス強化に取り組み、後半はAH3における赤血球凝集活性低下への対応を模索し、全般を通じて家禽鳥インフルエンザ発生時には当該ウイルスに関する情報の確認と迅速な共有を図り、インフルエンザ検査体制維持強化の取り組みを実践した。

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。

インフルエンザウイルス試験検査に関する内部精度管理に必要な書類のひな型については、法令改正に対応しながら平成28年4月施行時に全国地衛研の体制準備が間に合うよう、次年度の適切な時期に提示を図る。

F. 研究発表

1. 論文

1) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H,

Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T.

Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic.

Viral Immunology 27(8):368-374, 2014.

2) Hiroi S, Morikawa S, Nakata N, Maeda A, Kanno T, Irie S, Ohfuji S, Hirota Y, Kase T

Trivalent influenza vaccine-induced antibody response to circulating influenza A (H3N2) viruses in 2010/11 and 2011/12 seasons.

Human Vaccines & Immunotherapeutics (in press)

3) Morikawa S, Hiroi S, Kase T

Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. Journal of Clinical Virology (in press)

4) 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—2013/14 シーズン—

北海道立衛生研究所報 65 印刷中 2014

5) 高橋雅輝、岩渕香織、梶田弘子、佐藤直人、齋藤幸一 感染症発生動向調査事業における病原体検出状況（平成25年度）—インフルエンザ 2012/2013 シーズン及び2013/2014 シーズン—

平成25年度版岩手県環境保健研究センター年報 第13号 71-79 2015

6) 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 横浜市におけるインフルエンザの流行

(2013年9月～2014年5月)

横浜市衛生研究所報 53:59-67, 2015

7) 吉富秀亮、吉山千春、濱崎光宏、石橋哲也、堀川和美

福岡県における2013/14シーズンのインフルエンザウイルス検出状況

福岡県保健環境研究所年報 第41号 印刷中 2015

8) 久場由真仁、喜屋武向子、高良武俊、新垣絵理、加藤峰史、岡野祥、久高潤、新垣あや子、大野惇

2013/14シーズンにおけるインフルエンザウイルスの流行ー沖縄県

病原微生物検出情報 35 (11) 262-263, 2014

9) 安井善宏、中村範子、安達啓一、尾内彩乃、廣瀬絵美、伊藤雅、小林慎一、山下照夫、皆川洋子

愛知県におけるインフルエンザウイルス流行状況と分子疫学的解析ー2009/10～2013/14シーズンー

愛知県衛生研究所報 65 印刷中 2015

10) 中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、岸田典子、徐 紅、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、江島美穂、三浦舞、今井正樹、田代真人、渡邊真治、小田切孝人、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

2013/14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 35 254-258, 2014

2. 学会発表

1) Kawakami C, Takeuchi M, Mitamura K, Takashita E, Odagiri T

Analysis of influenza virus responsible for persistent infection after drug administration in an immunosuppressed patient

Third isirv-Antiviral Group Conference Tokyo 2014年6月

2) 高橋雅輝

呼吸器ウイルスを対象とした病原体サーベイランスについてーインフルエンザウイルスとその他の呼吸器ウイルスー

もりおかこども病院カンファランス 盛岡市 2013年5月27日

3) 高橋雅輝

小児呼吸器ウイルス感染症の疫学的特徴について

第30回岩手Farm to Tableフォーラム研究会 盛岡市 2013年5月28日

(<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~fams/kenkyukai.html>)

4) 高橋雅輝、佐藤直人、岩渕香織、五日市恵理、齋藤幸一

岩手県における呼吸器ウイルス検出状況についてーインフルエンザウイルス及びその他の呼吸器ウイルスー

平成26年度岩手県保健福祉環境行政セミナー 盛岡市 2014年2月13日

5) 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

横浜市における2013/14シーズンのインフルエンザ流行像

第28回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 鳥取 2014年7月

6) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下恵美