

EQA の結果および結果報告時アンケートの集計

今回の EQA の結果を下記にまとめました。また、EQA に参加された 72 地衛研からの結果報告時アンケートにお寄せいただいた回答を集計し、いくつかの項目について下記にまとめました。なお、一部の項目についてはコメントを記載しましたので、今後の検査実施体制の整備や検査精度の向上のための参考資料としてご活用いただければ幸いです。

1. 今回の EQA の結果まとめ (地衛研数で集計)

今回の EQA では、ほぼ全ての地衛研が全ての検体に対して、亜型同定を正確に行う事ができていました。亜型同定方法に関しては、リアルタイム RT-PCR 法のみで全亜型を決定した地衛研が最も多く、いくつかの地衛研ではコンベンショナル RT-PCR 法を併用(使用)して亜型同定を行っていました。

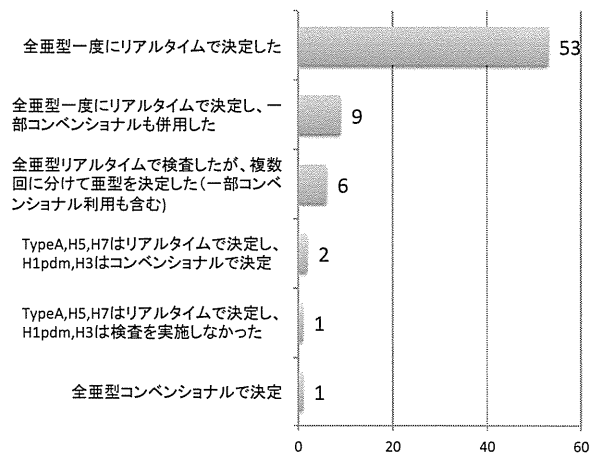
また、複数の作業員で EQA を実施した地衛研の中には、検査項目や作業内容等が作業員によって異なるケースも散見されました。作業員全員が同じ結果を得られるよう、また再現性良く正確で精度の高い検査を行うためにも、今一度、標準業務(作業)手順書や作業指示書等および検査記録書等を確認し、作業員間で統一した手順で検査を行う事をお勧めします。

図1 今回のEQAでの検査方法

パネル検体	亜型	濃度 (copies/μL)	正答数*	同定数**
A	H5N1	200	72/72 (100%)	72/72 (100%)
B	Negative		72/72 (100%)	72/72 (100%)
C	H7N9	20	72/72 (100%)	72/72 (100%)
D	H1N1pdm09	20	72/72 (100%)	71/71 (100%)
E	H5N1	20	71/72 (99%)	71/72 (99%)
F	H3N2	20	71/72 (99%)	70/71 (99%)

*正答数については、各パネル検体に対して、各所で実施した検査の範囲内で導き出される結果を正答として算出した。

**同定数については、各パネル検体に対して、亜型まで導き出されている結果を算出した。



*全亜型とは、H5,H7,H1pdm,H3 亜型を指します。

**リアルタイムはリアルタイム RT-PCR 法、コンベンショナルはコンベンショナル RT-PCR 法を指します。

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2 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

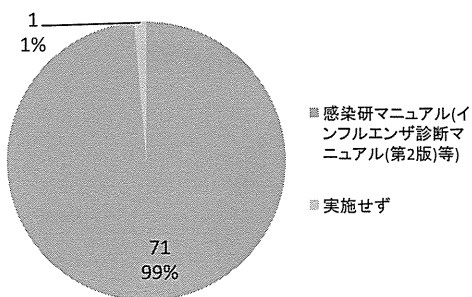


図3 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

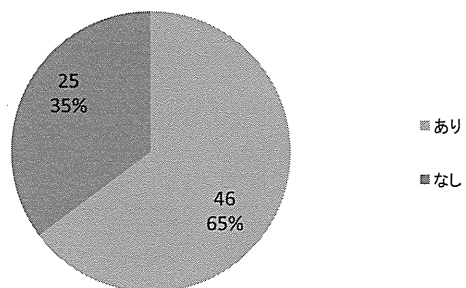


図4 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存温度

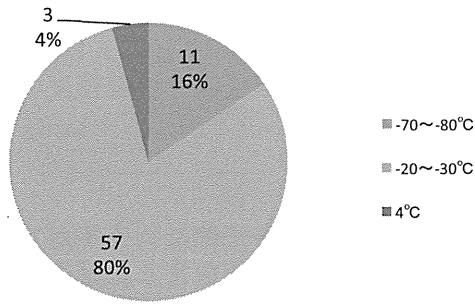
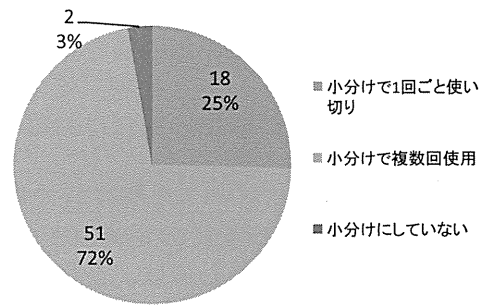


図5 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H5 検出系について

図6 H5検出系 記載マニュアル

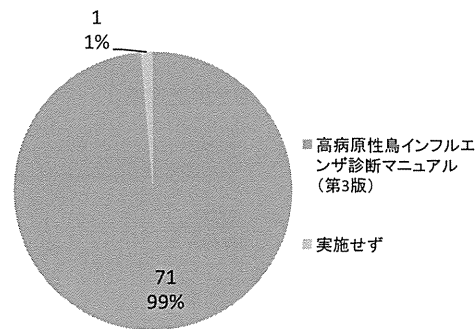


図7 H5検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

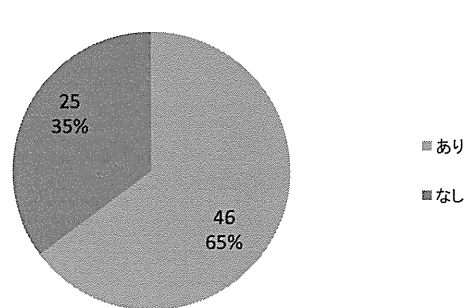


図8 H5検出系
プライマー、プローブ保存温度

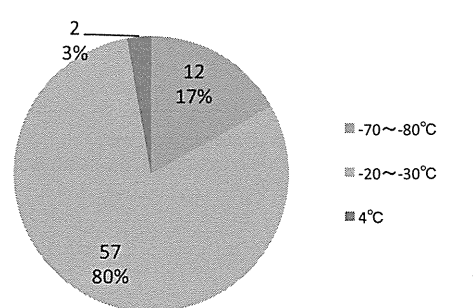
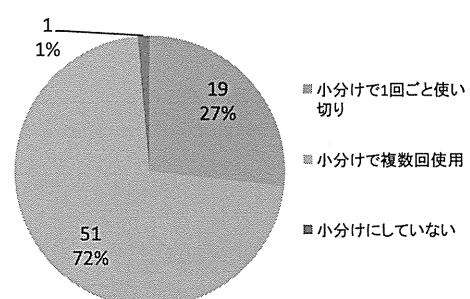


図9 H5検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H7 検出系について

図10 H7検出系 記載マニュアル

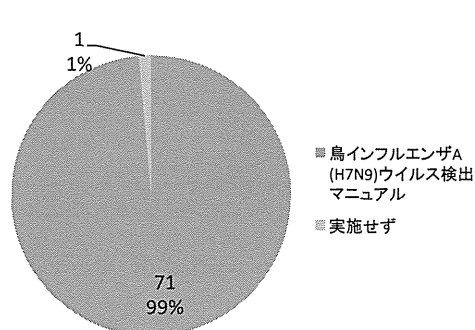


図11 H7検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

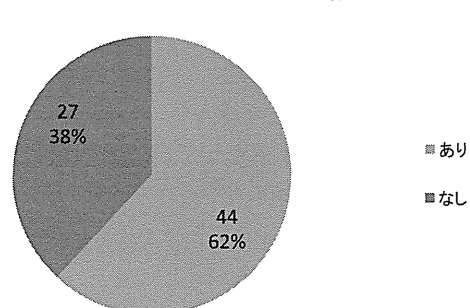


図12 H7検出系
プライマー、プローブ保存温度

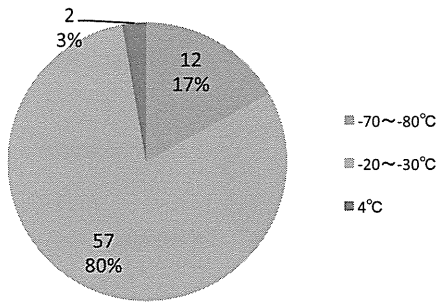
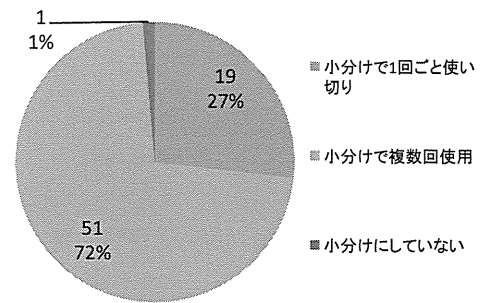


図13 H7検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-4. H1pdm 検出系について

図14 H1pdm検出系 記載マニュアル

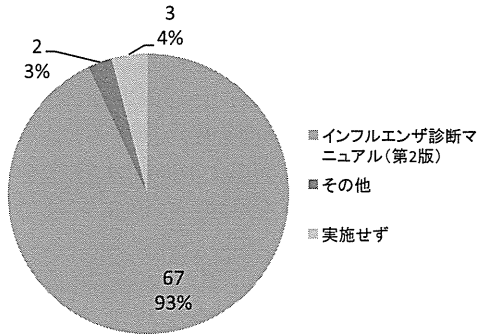


図15 H1pdm検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

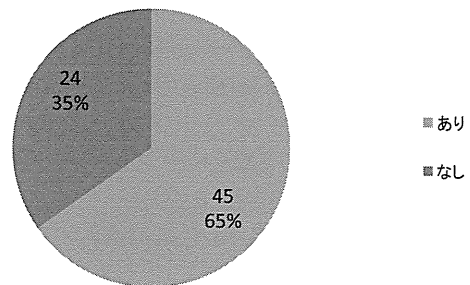


図16 H1pdm検出系
プライマー、プローブ保存温度

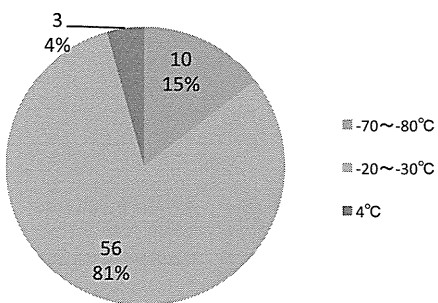
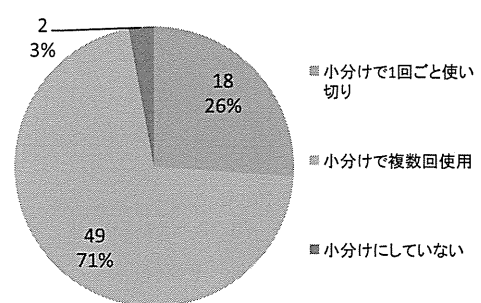


図17 H1pdm検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-5. H3 検出系について

図18 H3検出系 記載マニュアル

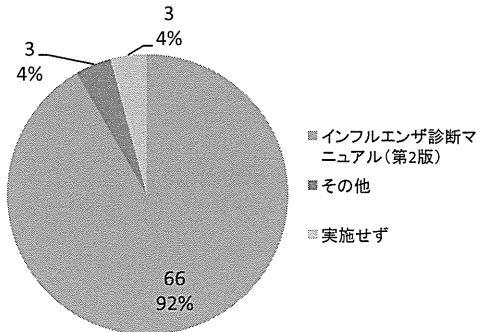


図19 H3検出系
プライマー、プローブプレミックスの有無

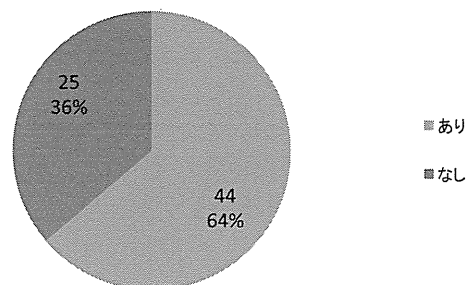


図20 H3検出系
プライマー、プローブ保存温度

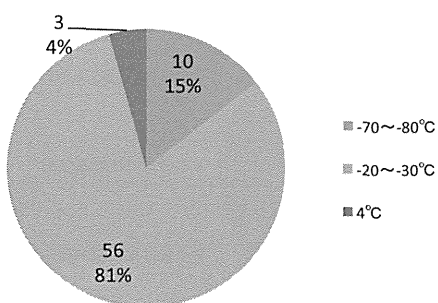
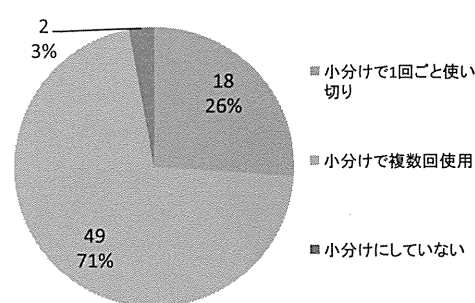


図21 H3検出系
プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

プライマー、プローブを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ので、小分けにして1回ごとに使い切りをする事をお勧めします。

また、プライマー、プローブプレミックスをあらかじめ作製していない場合には、極少量のプライマーやプローブを微量ピペッターで分取する事になりますので、最終的に反応試薬に対するプライマー、プローブ濃度が検査毎にばらつき、同じサンプルであっても検査結果が同じにならない可能性があります。プライマー、プローブのプレミックスをあらかじめ作製し、小分け分注をして自動霜取り機能のない冷凍庫(メディカルフリーザー等)で冷凍保管する事をお勧めします(できれば-70°C以下での保存を推奨します)。

また、H1pdm および H3 検出系において、インフルエンザ診断マニュアル(第2,3版)記載の検出系より以前の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。最近の流行株を検出できるようにするためにも、最新のバージョンの検出系を使用する事をお勧めします。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図22 使用キット名

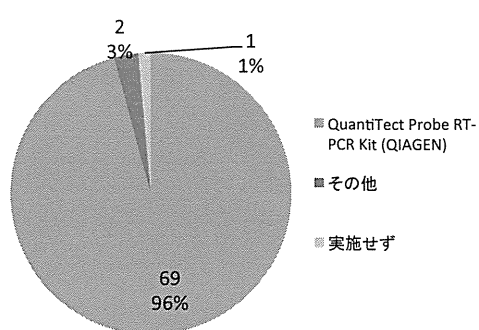
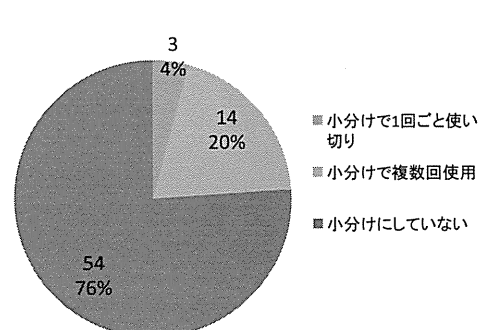


図23 試薬の保存単位



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 に最適化しています。他の試薬を同じ条件で使用した場合、検出感度や特異性が低下する可能性がありますので、反応条件、反応組成の最適化を行っていただく事をお勧めします。

試薬の保存と使用についてですが、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、凍結融解の影響で試薬の劣化による検出感度の低下やコンタミネーションが起きる可能性が高くなりますのでご留意下さい。

4. 陽性コントロールの保管について

4-1. TypeA/H5(マーカー入)の保管について

図24 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

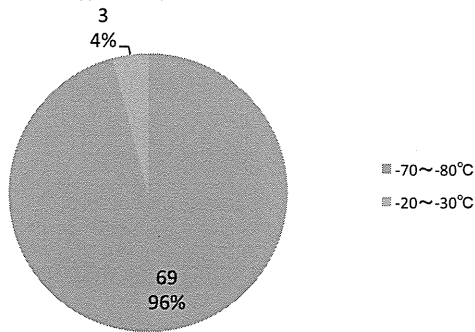
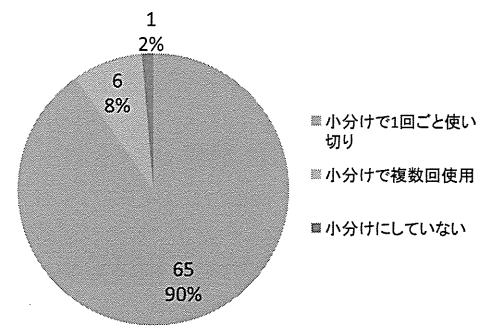


図25 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



4-2. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図26 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

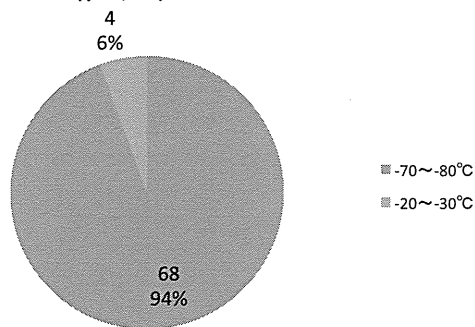
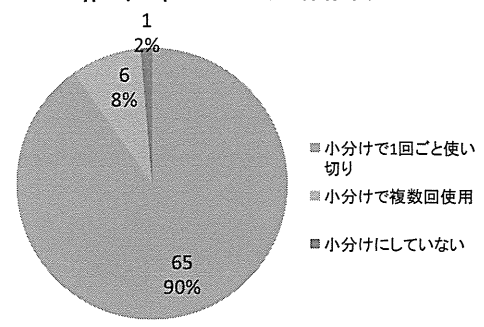


図27 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



4-3. TypeA/H1pdm の保管について

図28 TypeA/H1pdmの保管温度

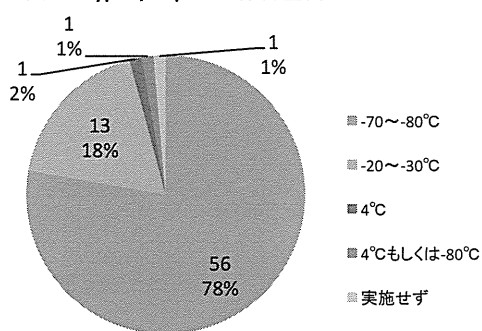
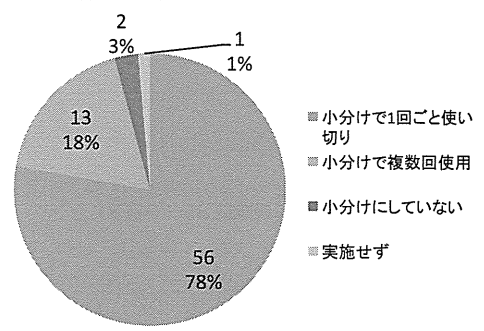


図29 TypeA/H1pdmの保存単位



4-4. TypeA/H3 の保管について

図30 TypeA/H3の保管温度

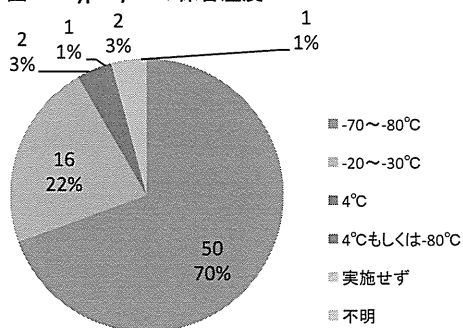
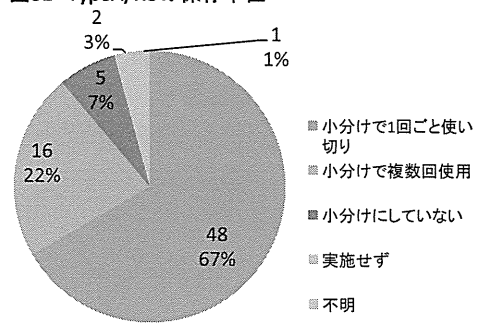


図31 TypeA/H3の保存単位



<コメント>

TypeA/H5、TypeA/H7(マーカー入)陽性コントロールは、必ず-70°C以下での保管をお願いいたします

す。また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解による劣化につながる可能性がありますのでご留意下さい。

TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA については、保存温度が-20～-30℃や 4℃である場合、また、小分けで複数回使用されている場合が多い傾向にありました。一般的に RNA は-70 度以下での保管が推奨されています。TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA につきましても、TypeA/H5、TypeA/H7 陽性コントロールと同様の方法で保管する事をお勧めします。

5. 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32 検査に関するSOPの整備状況

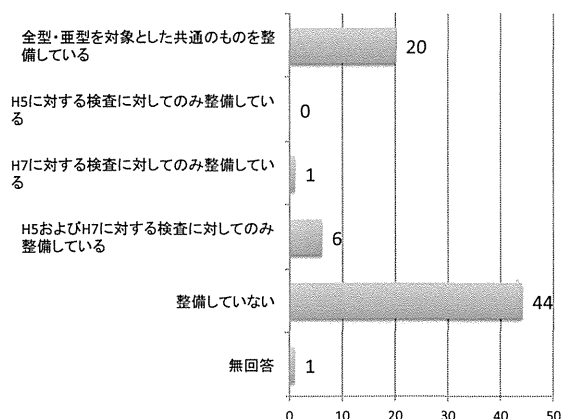
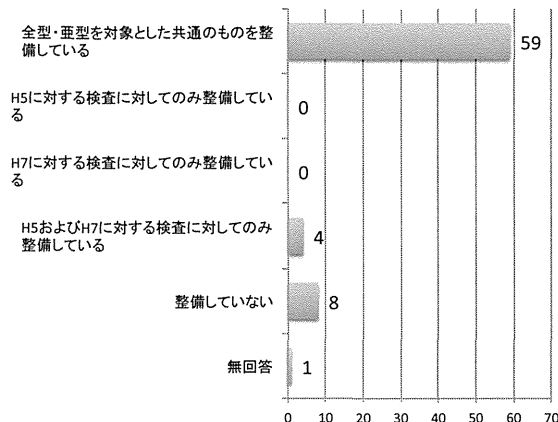


図33 作業指示書等および検査記録書等



<コメント>

作業指示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一方で、SOP を整備している地衛研は比較的少ない傾向にありました。

6. リアルタイム PCR 機について

図34 通常のインフルエンザウイルスの検査で使用しているリアルタイムPCR機の機種 (のべ76機種)

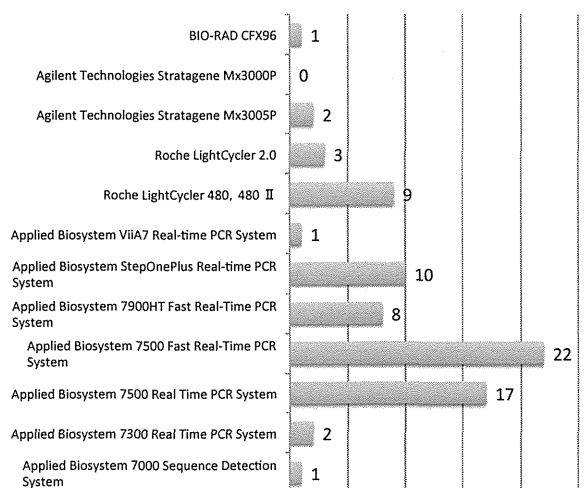


図35 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ74機種)

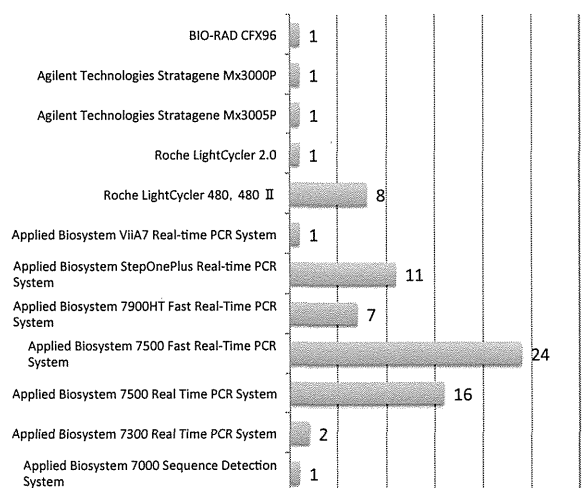


図36 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

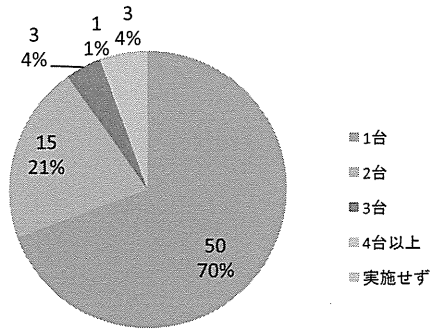


図37 通常検査のバックアップ用機器の台数

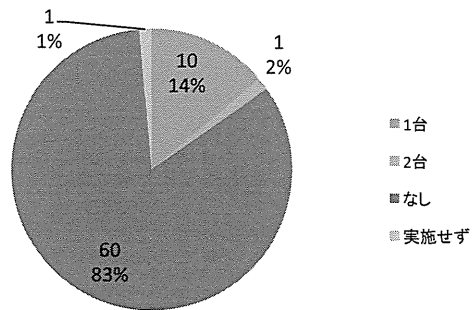
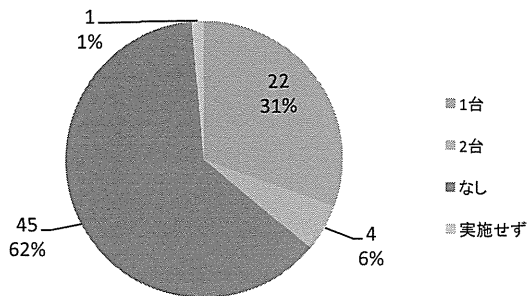


図38 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<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事をお勧めします。

ほとんどの地衛研で、今回のEQAを通常のインフルエンザ検査用機器で実施していました。通常検査のバックアップ用機器やパンデミック時用機器についても、通常のインフルエンザ検査用機器と同等の結果が得られることを定期的に確認する事をお勧めします。

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

研究分担者 今井正樹 岩手大学農学部共同獣医学科・准教授

研究協力者 渡邊真治 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

研究要旨

平成 25 年度は、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、全国の地方衛生研究所（地衛研）を対象にアンケート調査を実施した。その結果、過去 3 シーズン（2010/11 から 2012/13）にわたってウイルス分離効率の低い機関が 1 割程度存在することが判明した。本年度は、そのアンケート調査結果に基づいた実施体制改善策の一環として、分離効率の低かった地衛研を対象に個別の聞き取り調査を実施し、問題点の確認、改善方法等についての助言を行なった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルス流行株の抗原性状、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、臨床検体からのウイルス分離培養は不可欠である。また、新型インフルエンザウイルス等のリスクを的確に評価するには、ウイルス分離は必須である。

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、ウイルスの分離培養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。しかしながら一方で、インフルエンザ対策に充てられる予算と人員の削減が各自治体で進められており、地衛研組織の弱体化が進行して

いることから、地衛研における株サーベイランス業務の遂行が困難になりつつある。

平成 25 年度の当該研究において研究分担者らは、地衛研のインフルエンザウイルス分離培養検査実施体制の実情を把握するため、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た。この調査で 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、いずれのシーズンでも分離効率が 50%を下回った機関が 1 割程度存在することが判明した。そこで本年度は、分離・培養検査実施体制の改善を支援することを目的として、分離効率の低かった地衛研を対象に聞き取り調査を実施し、問題点の確認、改善方法等についての助言を行なった。

B. 研究方法

平成 25 年度に実施したアンケート調査

結果から、ウイルスの分離検査体制に不備があると考えられる 9 カ所の地衛研をヒアリング対象として選定した。平成 26 年 11 月 13 日付けで各衛生研究所長宛にヒアリング調査の依頼文を郵送した(添付資料 1)。依頼文は電子メールで直接インフルエンザ担当者宛てにも送付された。平成 26 年 12 月にインフルエンザ検査担当者に対して、以下の質問項目について電話による調査を実施した。

調査質問項目：

- 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

C. 研究結果

選定した 9 地衛研のインフルエンザ担当者から下記 4 項目についての回答が得られた(回答の詳細については、別添資料 2 を参照)。

- 1) インフルエンザ検査担当人員と検査業務の引き継ぎ

調査対象の 9 機関中 6 機関は複数名で、残りの 3 機関は 1 名のみでインフルエンザ検査業務を行っていた。複数体制機関の多くは、熟練職員が検査経験のない新任者を指導・育成することで、検査知識と技術が後任に継承されていた。しかし、このような機関でも状況によっては引き継ぎが文書のみで行なわれることがあり、検査技術が後任に十分に伝達されないことがあった。一人体制の機関は、制度上引き継ぎ期間を設けることができないために、後任への継

承が全く行なえず、新任者の育成に苦慮していた。

- 2) 培養細胞の凍結保存と管理について

9 機関全てがウイルス分離に使う培養細胞のストックを作製しており、その大半が市販の細胞凍結保存液を用いて、超低温フリーザー内に細胞を凍結保存していた。毎シーズン一定の効率でウイルスを分離するためには、定期的に細胞を更新する必要があることから、各機関はある程度の数の細胞凍結チューブをストックしておく必要がある。凍結チューブの保存数について尋ねたところ、約半数の機関が 10 本程度あるいはそれ未満の数しか保管していないことが明らかになった。また、フリーザーの故障による凍結細胞損失や細胞生存率低下のリスクを減らすために、複数のフリーザーに分散させて細胞を保管する必要があるが、大半の機関は 1 台のフリーザー内に全ての凍結チューブを保管していた。

- 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

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が低かった原因を明らかにするために、分離培養法、臨床検体の種類、2013/14 シーズンの分離効率などについて尋ねた。うがい液検体及び抗インフルエンザ薬投与患者から採取された検体に含まれるウイルス量は極めて少ない。このような臨床材料が検査対象に多く含まれていたために、3 シーズンにおける分離効率が低かった機関は 4 カ所あった。うがい液および抗インフルエンザ薬投与患者検体を除いて、分離効率を計算すると、4 機関全てが比較的高い効率でウイルスを分離していた。一

方、当該シーズンにおいて、当時の担当者が培養細胞の状態が悪化したことに気付かずにウイルス分離に用いていたために、分離効率の低下を招いた機関が2カ所あった。この2機関は外部機関から新たに培養細胞を入手することで2013/14シーズンにおける分離効率が大幅に改善された。その他、インフルエンザ様疾患以外の患者からの臨床検体を含めて分離効率を計算した、あるいはウイルス分離培養後の上精中において4以下のHA価が検出された検体（このHA価では型/亜型同定のための赤血球凝集阻止試験を実施することができない）をウイルス分離陰性として計算したことから、3シーズンにおける分離効率が低かった機関がそれぞれ1カ所あった。原因が特定できない機関は1カ所あった。

4) 感染研主催の技術研修会への参加の有無について

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に地衛研側の負担で参加することが可能かどうかを尋ねた。全ての機関が参加の意向を示したが、1機関を除いて自己負担での参加は困難であると回答した。

D. 考察

ヒアリング調査対象となった地衛研の約半数は、ウイルス量の少ない臨床材料を検査対象に多く含んでいたために、3シーズン（2010/11、2011/12、2012/13）における分離効率が低かったことが判明した。これらの機関は、ウイルス量が比較的多い臨床材料では高い効率で分離していたことから、分離培養検査を適切に実施していると判断した。

ウイルスを毎シーズン一定の効率で分離

するためには、質の高い培養細胞を適正に維持管理する必要がある。本調査から、全ての機関が適切な方法で細胞を凍結保存していることがわかった。しかし、約半数の機関は僅かな本数しか細胞凍結チューブを保管していなかった。また、大半の機関は1台のフリーザー内に全ての凍結チューブを保管していた。このような管理方法では、フリーザーの故障等により、一度にすべての細胞を失う危険性がある。適正な培養細胞の管理方法について、衛生微生物協議会などの機会を利用して、改めて各地衛に周知啓発を図る必要がある。

パンデミックを起こす恐れのあるインフルエンザウイルスは、いつ何時どこから国内に持ち込まれるのか予想することは困難である。その侵入を早期かつ的確に捉え、リスクを適正に評価するためには、全国の地衛研がウイルスを効率良く分離・培養できる体制を構築しておく必要がある。そのためには、ウイルス分離検査業務に関して一定レベル以上の知識と技術を持った人材がすべての地衛研に必要不可欠である。本調査から、自力による人材育成が困難な地衛研が少なからず存在することが明らかになった。今後は、このような地衛研を重点的に支援することで、我が国の株サーベイランス体制の維持と改善を図っていく必要がある。

E. 結論

ウイルス分離検査担当者が交代する際の引き継ぎに必要な期間を制度上設けることができない地衛研が存在することが今回のヒアリング調査から判明した。このような地衛研ではウイルス分離検査に必要な知識・技能を持たない職員が検査を実施したために、ウイルス分離効率が低くなったと

考えられる。我が国の株サーベイランス体制を維持していくには、それを担う人材すべてが分離検査に関する一定の専門知識と技能を身につける必要がある。自力による人材育成が困難な地衛研においては、感染研-地衛研が連携して担当者の育成に努めていくことが必要であり、これを実行するには国からの予算措置が不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fan S, Hatta M, Kim JH, Halfmann P, Imai M, Macken CA, Le MQ, Nguyen T, Neumann G & Kawaoka Y. Novel residues in avian influenza virus PB2 protein affect virulence in mammalian hosts. *Nat. Commun.* 5:502, 2014
- 2) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ & Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 15:692-705, 2014
- 3) Herfst S, Imai M, Kawaoka Y & Fouchier RA. Avian influenza virus transmission to mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385:137-155, 2014

2. 学会発表

小林知也、今井正樹、内藤郁慶、松山州徳、村上賢二 北東北地方のコウモリから検出

されたベータコロナウイルス遺伝子の解析
第157回日本獣医学会、札幌市、9月(2014)

G. 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

平成 26 年 11 月 13 日

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

インフルエンザウイルスの分離培養検査体制に関する調査結果に基づく今後の対応への
協力依頼

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』班では、平成 25 年 11 月に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株サーベイランス体制の現状把握と改善への試みを目的にアンケート調査を実施しました（平成 26 年 7 月 8 日付けで調査結果を報告）。

今回は、その調査結果に基づいた実施体制改善策の一環として、インフルエンザ担当者の方からより詳しく検査体制および実施法の現状についてお話を伺いたいと存じます。つきましては、ご多忙中まことに恐縮ではございますが、12 月上旬から 12 月下旬までの間、当研究班の担当者が電話をいたしますので、是非ご協力くださいますようお願い申し上げます。

なお、後日メールにて、電話調査の具体的な日程を担当者から提案させていただきますので、ご都合のよい日時を折り返しご指示いただければ幸いに存じます。

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
センター長 小田切孝人

研究分担者：

岩手大学農学部

准教授 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 室長 渡邊真治

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ヒアリング調査」結果のまとめ

◆ A 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルスを含む全てのウイルス検査を2名で担当
 - 担当者の交替：おおよそ数年毎
2. 培養細胞の凍結保存と管理について
 - 約10本の細胞凍結チューブを液体窒素に保管
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
 - インフルエンザ様疾患以外（エンテロウイルス感染症、RSウイルス感染症など）の患者からの臨床検体を含めて、ウイルス分離の効率を計算したため、3シーズンにおける分離効率の割合が低くなった。インフルエンザウイルス遺伝子検査陽性検体の中で、ウイルスが分離された割合を計算すると、少なくとも分離効率は50%以上であった。
4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ B 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルス専任が1名
 - 担当者の交替：おおよそ3年から4年毎
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて、液体窒素と超低温フリーザーに保管
 - 細胞凍結チューブの本数は不明である。
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
 - 培養細胞の状態に問題があったために、分離効率が低かったと考えている。
 - 感染研から分与された培養細胞を使用して分離したら、2013/2014シーズンの分離効率は60%から70%程度に改善した。
 - インフルエンザウイルス遺伝子検査陽性検体のみからウイルスを分離している。
4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ C 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルスを含む全てのウイルス検査を5名で担当

- 担当者の交替：おおよそ3年から5年毎
 - 検査業務の引き継ぎは口頭のみで行われることがある。
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて、2台の超低温フリーザーに保管
 - マスター用細胞凍結チューブ20本とワーキング用細胞凍結チューブ20本を保存
 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
 - 2011/12と2012/13シーズンは新任の職員がウイルス分離業務を担当していた。
 - 2013/2014シーズンに経験豊富な職員が培養細胞の状態の変化に気付いて、他県の研究所から細胞を新たに入手した。その細胞を使用したら、2013/2014シーズンの分離効率は40%程度に改善した。
 - 臨床検体がうがい液の場合の分離効率は29%程度であった。
 4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ D 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルスを含む全てのウイルス検査を4名で担当
 - 担当者の交替：おおよそ4年から5年毎
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて、細胞凍結チューブ50本を超低温フリーザーに保管
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
 - 臨床検体の約半数がインフルエンザウイルス遺伝子検査で陰性であった。ウイルス遺伝子検査陽性検体の中で、ウイルスが分離された割合を計算すると、2011/12および2012/13シーズンの分離効率は80%から90%であった。2013/14シーズンも同様の傾向であった。
4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ E 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルスを含む呼吸器系ウイルスの検査を2名で担当、そのうちの1名は30年間検査を担当している。
 - 担当者の交替：おおよそ3年から4年毎
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて、液体窒素に保管
 - 細胞凍結チューブの本数は不明である。
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
 - うがい液の検体を除いて計算すると、3シーズンの分離効率は50%以上であった。

2013/14 シーズンの分離効率は 70%から 80%で、うがい液を含めても 50%以上であった。

4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について

- 地衛研側の負担で参加することは可能

◆ F 研究所の回答

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

- 担当者数：インフルエンザウイルス専任が 1 名
- 現担当者の経験年数はおおよそ 1 年である。1 年前の交代では検査業務の引き継ぎは殆ど行われなかった。近隣のウイルス検査機関でインフルエンザウイルスの分離に関する研修を受けた。
- 担当者の交替：おおよそ 5 年毎

2. 培養細胞の凍結保存について

- 市販の細胞凍結保存液を用いて、細胞凍結チューブ 5 本を超低温フリーザーに保管

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

- 3 シーズンの分離効率が低かった理由は全くわからない。
- 近隣のウイルス検査機関で入手した培養細胞を用いてウイルス分離を行っている。2013/14 シーズンの分離効率は 80%であった。

4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について

- 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ G 研究所の回答

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

- 担当者数：インフルエンザウイルス専任が 1 名
- 担当者の交替：おおよそ 3 年から 5 年毎
- 引き継ぎ期間は長くても 1 週間程度である。

2. 培養細胞の凍結保存について

- 市販の細胞凍結保存液を用いて、細胞凍結チューブ 30 本程度を超低温フリーザーに保管

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

- ウイルス分離培養後の上精中において 4 以下の HA 価が検出された検体をウイルス分離陰性として計算していた。それらの検体を陽性として再計算した場合の分離効率は 50%以上であった。
- ウイルス培養液を希釈せずに、そのまま新しい培養細胞に接種して盲継代を行っていた。

4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について

- 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ H 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルスを含む全てのウイルス分離検査を2名で担当
 - 担当者の交替：1年毎もある。
 - 引き継ぎは、状況によっては文書のみで行う。
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて超低温フリーザーに保管
 - マスター用細胞凍結チューブ6本とワーキング用細胞凍結チューブ6本を保存
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
 - インフルエンザ患者の集団発生事例等では、抗インフルエンザ薬投与患者からうがい液が検体として採取されることが多い。このような検体に含まれるウイルス量は、非常に少ないことがウイルス遺伝子検査で確認している。
 - 抗インフルエンザ薬投与患者から採取したうがい液の検体を除いて再計算すると、A/H3 亜型およびB型ウイルスについては高い効率で分離できていた。A/H1 亜型ウイルスについては、その分離効率は50%程度であった。
4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

◆ I 研究所の回答

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
 - 担当者数：インフルエンザウイルス専任が2名
 - 担当者の交替：人事異動は研究所内のみで行われる
2. 培養細胞の凍結保存について
 - 市販の細胞凍結保存液を用いて、細胞凍結チューブ5本を超低温フリーザーに保管
 - 2010/2011 から2012/2013 シーズンの間に使用していた培養細胞の入手先は不明
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
 - 細胞浮遊法を用いてウイルス分離を行っている。
 - 2013/2014 シーズンの分離効率はおおよそ50%程度であった。
 - 抗インフルエンザ薬投与患者からの検体が3割程度含んでいる。このような検体に含まれるウイルス量は、非常に少ないことがウイルス遺伝子検査で確認されている。
 - 特定の亜型あるいは型のウイルスに限って、ウイルス遺伝子検査陽性であっても3割程度しかウイルスが分離されなかった。
4. 感染研主催の技術研修会への参加の有無について
 - 地衛研側の負担で参加することは不可能

遺伝情報からウイルスのリスクを予測する方法の研究

研究分担者 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
研究協力者 横山勝 国立感染症研究所 同上・主任研究官

研究要旨

計算科学を株サーベイランスの強化に活用する新しい方法論を研究した。株の遺伝情報から HA, NA 蛋白質の構造情報を抽出し、既知情報を取り入れて、未報告の変異株の感染伝播能を予測した。また、海外で発生したトリ由来新型コロナウイルスについて、ヒト感染伝播能を高める二次変異を予測した。これらの予測は、その後のサーベイランスで支持された。この手法はウイルス分離を必要としないため適用範囲が広く、迅速性に優れる。入手不可能な株の迅速リスク評価（宿主指向性、ヒト-ヒト伝播能力、薬剤抵抗性など）、及び動物由来株のヒト伝播能を高める二次変異の予測、など既存の方法では解析不可能な案件の解析に有効であり、株サーベイランスを強化する新しい技術として今後の発展が期待される。

A. 研究目的

カルタヘナ議定書の履行に伴い、新型コロナウイルスが海外で発生した時の分離ウイルスの迅速入手と性質決定は、ほぼ不可能となった。また、テロリズム勃発が懸念される社会情勢により、ウイルスの流行拡大や病原性亢進のリスクを高める変異を特定する実験は実施が困難な状況にある。さらに、未報告の変異をもつ株が出現した時にそのリスクを評価する手段は無い。このため、ウイルスを用いずに、任意の株についてそのリスクを調べる新しい方法を開発する必要性が急速に高まっている。

そこで本研究では、インフルエンザウイルス（IFV）をモデル病原体とし、このウイルスの宿主指向性、ヒト-ヒト伝播能力、薬剤抵抗性などの性質決定に直接関わる外被蛋白質 HA と NA の構造情報を取得し、構造特性の観点から流行が拡大するリスクを予測し、サーベイランスを継続するこ

とで予測の妥当性を検証する。これにより、入手不可能な株のリスク評価を迅速に行うための新しい技術・情報基盤の構築を進め、株サーベイランス体制の強化をめざす。

本研究では、蛋白質の構造情報を迅速に取得する技術として、計算科学に着目した。現在、蛋白質の基本フォールド（折りたたみ）の情報が急速に蓄積している。その結果、蛋白質の立体構造を再構築するホモロジーモデリング法の適用範囲が急速に拡大している。IFV の HA/NA 蛋白質は、既に多数の株の基本フォールドが公表されている。したがって、任意の IFV 株について、HA/NA 遺伝子配列情報を入手できれば、蛋白質の立体構造を高い精度で再構築できる状況にある。また、必要に応じて分子動力学解析を実施すれば、変異蛋白質の詳細な物性情報を取得できる。

我々は、約 10 年前、感染症対策研究における計算科学の重要性にいち早く着目

し、ホモロジーモデリングと分子動力学解析を実施する環境を整備してきた。このプラットフォームを利用して、変異ウイルスの遺伝情報から蛋白質の構造情報を迅速に取得し、ウイルス研究者に提供してきた。これには、ヒト免疫不全ウイルス、ノロウイルス、IFV、ピコルナウイルスなどの構造蛋白質と酵素の構造情報が含まれる。これにより、計算科学は、ウイルスのリスク判定に必須の性質（宿主指向性、感染力、複製能、免疫逃避能、薬剤耐性、病原性など）の理解に極めて有用であることを実証してきた。

そこで本研究では、この技術を IFV の株サーベイランスの強化に活用する。本体研究により未報告の変異株が検出された時に、その株の遺伝情報から HA, NA 蛋白質の構造情報を迅速に抽出し、既知情報を取り入れて流行拡大のリスクを予測した。また、海外で発生した新型ウイルスについて、流行拡大のリスクを高める二次変異を予測した。結果を研究代表者に提供し、監視を続けた。現時点（2015.2.10）までの監視結果は、全ての予測を支持している。

B. 研究方法

（1）HA 蛋白質、NA 蛋白質の配列情報

A(H7N9) HA 蛋白質、H1N1pdm09 NA 蛋白質の配列情報は、研究代表者より入手した。

（2）分子モデリング

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。モデリングは、Molecular Operating Environment (MOE) の 'MOE-Align' と 'MOE-Homology' を用いた。H1N1pdm09 NA モデリングの鋳型には H1N1pdm09 NA 結晶構造 (PDB code:4B7R、解像度 1.9

Å)、A(H7N9)HA-シアル酸複合体モデリングの鋳型には A(H7N7)HA 結晶構造 (PDB code:4DJ6、解像度 2.61 Å) を用いた。

（3）構造安定性の解析

構造安定性の解析は、MOE の 'Protein Design Application' を用いた。HA 三量体境界面周辺、あるいは NA 蛋白質の残基 386 など、特定のアミノ酸を置換し、もとの残基の自由エネルギーとの差 ($\Delta\Delta G$: kcal/mol) を計算した。 $\Delta\Delta G$ を構造安定性の変化の指標とした。

（4）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。A(H7N9)HA 蛋白質とヒト型受容体の一部 (SA α 2,6-Gal β 1-4GlcNAc)、あるいはトリ型受容体の一部 (SA α 2,3-Gal β 1-4GlcNAc) との複合体モデルを構築し、受容体結合部位周辺のアミノ酸を置換し、 $\Delta\Delta G$ を指標として構造安定性が昂進するアミノ酸を包括的に探索した。

（倫理面への配慮）

本研究では、全て計算機を用いた解析のみを実施した。遺伝子組換え生物等を用いる実験、並びに動物実験は行わなかった。リスク変異の情報は、倫理的観点から、株サーベイランス関係者のみに提供し、論文による公表はしなかった。

C. 研究結果

1. 未報告の変異をもつ薬剤耐性株のリスク評価と監視

（1）背景：平成 25 年 11～12 月、札幌で H1N1pdm09 のオセルタミビル／ベラミビル耐性株が 6 株検出された。これらは全て 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。このため、この耐性株の全国的拡散が危惧され、早急に流行拡大のリスクを判断する必要に迫られた。しかし既存の方法では解析不可能のため、計算科学の技術を用いて解析することにした。

(2) リスク評価：研究代表者より薬剤耐性株の NA 遺伝子配列情報を入手し、MOE を用いて N386K 変異が NA 構造安定性に与える影響を解析した。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。

(3) 監視：この予測を研究代表者に伝え、薬剤耐性株の監視を続けた。その後2年間の監視により、この札幌耐性株の全国的拡散は起こらず、現在ではヒト集団でほぼ消失していることがわかった。すなわち予測を裏付ける結果となった。

2. 新型 IFV のリスクを高める二次変異の予測と監視

(1) 背景：平成 25 年 5 月に中国で検出されたトリ IFV A (H7N9) は、ヒト伝播能が低く、流行には至らなかった。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、早急に二次変異の種類と位置を調べて監視を強化する必要に迫られた。しかし既存の方法では解析不可能のため、計算科学の技術を用いることにした。

(2) リスク変異予測：トリ IFV A (H5N1) でヒト伝播効率を高めうる HA 変異として、ヒト型感染受容体指向性の亢進につながる適応変異と適応変異に伴う HA 安定性低下を解消する補償変異が報告されている。

MOE を用いてこの2つのタイプの変異を包括的に探索した。

研究代表者より中国 H1N1pdm09NA 株の HA 遺伝子情報を入手し、MOE を用いて HA 蛋白質単量体、及び三量体構造を構築した。結合シミュレーションと変異導入解析を組み合わせて、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。

(3) 監視：特定した変異の種類と位置情報を研究代表者に提供して監視を続けた。その後、中国で新たに A (H7N9) の感染症例が複数報告された。感染者のウイルスは、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おきていないことがわかった。すなわち一連の予測を裏付ける結果となった。

D. 考察

計算科学を取り入れた新しいリスク評価法、及びリスク変異の予測法は、適用範囲が広く、迅速性に優れる。特に既存の方法で解析不可能な案件の解析に有効で、サーベイランスを補完する手段として今後の発展が期待される。一方で課題も残されている。課題の解消に向けて、引き続き、サーベイランス組織と一体になった研究の継続が必要と考えている。

1. 優れた点

第一に、本法は適用範囲に優れる。例えば、従来法では、未報告の変異をもつ株が新たに出現した時、その伝播能力の迅速判定は難しい。ウイルス入手が困難な株についても、同様である。IFVの易変異性、並びに現在の社会情勢を踏まえると、上述の困難に直面する状況は、今後、頻繁に生じうる。現行のサーベイランスの致命的な弱点となりうるので、この弱点を解消する技術の開発が極めて重要となる。

本法はウイルスの性質と直接リンクする蛋白質構造の情報に基づいて評価するため、任意の変異株に対応できる。すでにHA/NA蛋白質の基本フォールドは代表的亜株について多数判明している。このため、新たに出現した変異株について、遺伝情報が入手できれば高精度のHA、NA蛋白質構造を構築できる。これにより、構造の安定性、及び感染受容体や薬剤との親和性などを定量的に解析できる。本報告書で示したように、既知の情報を取り入れれば、その株の伝播能力を予測できる。より高い精度が要求される時は、分子動力学計算を実施すれば良い。

第二に、本法は、迅速性に優れる。予測に必要な一連の解析（HA、NAの高精度分子モデルの構築、変異導入解析、及び感染受容体や薬剤との親和性解析）は、原則、約1週間程度で終了する。ただし、実際には、マンパワーの問題、解析条件の予備的検討と改良、複数の解析法による妥当性の検証、等があるため、より時間がかかる。しかし実験（ウイルス分離と性質決定）よりは速く結果が出る。現在も計算機の性能は刻々と向上し、解析ソフトウェアの改良も間断なく進んでいる。従って、リスク判定に要する時間は短縮し、予測精度の向上も間断なく進むと期待できる。

2. 課題

一方、本法には特に解決すべき重要な課題が残されている。いずれも計算科学に特有の課題ではなく、リスク評価全般の課題であり、IFV研究分野全体で取り組む課題と考えている。

第一の課題として、予測の妥当性を実験で検証することが難しい点が挙げられる。これは技術的な困難ではなく、倫理的な観点から生じる問題である。我々が予測するのは感染伝播能の亢進など、IFVのリスクを高める変異である。ハイリスク変異株の創成はデュアルユース問題に拮抗し、倫理的な観点から現状では実施が不可能である。

そこで、時間はかかるが、予測結果をサーベイランスで得られる自然界でのリアルタイムの感染動態情報と照合し、予測の確度を検証することが極めて重要と考えている。今のところ、今回実施した予測については、全てサーベイランスの結果と矛盾しない。予測は一定水準の確度があると考えている。しかし引き続き予測と監視を継続し、方法の改良を積み重ねることが重要と考えている。これにより予測法の確度が向上し、計算科学を取り入れた新しい株サーベイランス体制の強化が進むと期待される。

第二の課題として、IFVの病原性を予測する方法がまだ無い点が挙げられる。これは、病原性を規定するウイルス・宿主の要因が明確ではないためである。病原性の予測は、伝播能の予測と共にウイルスのリスクを評価する上で非常に重要な作業となる。現在、IFV感染の際の致死性を高める要因として、サイトカインの過剰産生（サイトカインストーム）による急性肺障害、並びに多臓器障害の合併症が想定されて