

1. 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、個人情報の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 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 - 2009/10～2013/14シーズン -

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 - インフルエンザウイルスとその他の呼吸器ウイルス -

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 - インフルエンザウイルス及びその他の呼吸器ウイルス -

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

入院・重症例における AH1pdm09 インフル
ルエンザウイルスの解析

第 46 回日本小児感染症学会 東京 2014
年 10 月

7) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下
恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、小田切孝人
3 シーズンにわたって混合流行した 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 横浜 2014 年
11 月

8) 森川佐依子、加瀬哲男：小児うがい液か
らの継続したウイルス検出の試み 第 57
回日本感染症学会中日本地方会学術集会
2014 年 10 月 岡山

9) 吉富 秀亮、吉山 千春、濱崎 光宏、
石橋 哲也

2013/14 シーズンにおけるインフルエンザ
ウイルスの検出状況

第 61 回福岡県公衆衛生学会 福岡 2014
年 5 月

10) 安井善宏、中村範子、小林慎一、山下
照夫、皆川洋子

愛知県で 2013/14 シーズンに分離した AH3
亜型インフルエンザウイルスの遺伝子多様
性と分子疫学的解析

第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜
2014 年 11 月

11) 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 横浜

2014 年 11 月

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 インフルエンザウイルス検査内部精度管理に必要な書類リスト

番号	分類		文書名
1 - 1	機器		機器使用記録簿（リアルタイム PCR 装置）
	機器		機器使用記録簿（コンベンショナル PCR 装置）
1 - 2	機器		検査機器保守管理作業日誌（リアルタイム PCR 装置）
			検査機器保守管理作業日誌（コンベンショナル PCR 装置）
			検査機器保守管理作業日誌（遠心分離機）
			検査機器保守管理作業日誌（微量遠心分離機）
			検査機器保守管理作業日誌（恒温槽）
			検査機器保守管理作業日誌（倒立顕微鏡）
			検査機器保守管理作業日誌（CO2 インキュベーター）
			検査機器保守管理作業日誌（オートクレーブ）
2 - 1	試薬		試薬管理台帳
2 - 2	試薬		培地・試薬作成に関する標準作業書
3 - 1	手順	核酸抽出	検査標準作業書
3 - 2	手順	リアルタイム PCR	検査標準作業書（季節性、鳥各々について必要）
3 - 3	手順	PCR	検査標準作業書（季節性、鳥各々について必要）
3 - 4	手順	細胞培養	検査標準作業書
3 - 5	手順	分離	検査標準作業書
3 - 6	手順	HA・HI	検査標準作業書
3 - 7	手順	シーケンス	検査標準作業書
3 - 8	手順	H275Y マーカー	検査標準作業書

他に、「検体運搬」、「検体受付」、「検体保管」、「検体廃棄」、「検査成績書発行」、担当職員
の「研修と職場経験記録」に関する書類が必要。

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

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・室長
研究協力者：高山 郁代 同上・主任研究官
中内 美名 同上・主任研究官

研究要旨

新型インフルエンザの発生時に、診断および感染拡大防止策を実施するため、全国の地方衛生研究所においては、新型インフルエンザに対する核酸検査の実施が求められている。全国で新型インフルエンザの確定検査を高い精度で実施するため、地方衛生研究所における検査体制の整備が急務となっている。本研究では、昨年度に引き続き、地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法による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した外部精度管理(EQA)評価を、全国 72 カ所の地方衛生研究所を対象に実施した。

A. 研究目的

「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。また、平成 26 年 11 月に改正感染症法が成立し、平成 28 年 4 月からは検体検査の質の向上を図るため、感染症に関する情報の収集体制の強化等が実施され、法に基づいた国家戦略として、全国の地方衛生研究所(74 カ所)や検疫所(16 カ所)では、新型インフルエンザ発生時に診断検査を的確に実施できる態勢を維持するなど、新型インフルエンザ発生時の感染拡大防止のための永続的対応が必要不可欠な状況となった。

近年、海外においては H5N1 や H7N7 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスや H3N2 亜型のブタインフルエンザウイルスなど、ヒトへの感染が散発的に発生している。2013 年 3 月には世界で初めて H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が中国で報告され、2015 年 2 月までにマレーシア、台湾、カナダでの輸入感染例を含め 489 の感染例が確認されている。また、2013 年 11 月には H10N8 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が同じく中国で、2013 年 6 月には H6N1 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が台湾で初めて報告された。

一方で、H5N1 亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルスが 2003 年以降、ヨーロッパ、中東、アフリカ、アジア地域で流行し、高い死亡率を伴ったヒトへの感染例も各地で報告されており、2015 年 1 月までに 16 カ国 694 人の感染者および 402 人の死者が確

認められている。日本ではこのウイルスを由来とする H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが野鳥および家禽で流行しているが、幸いにもヒト感染例は報告されていない。しかし、ウイルス遺伝子の変異の蓄積あるいは遺伝子再構成により、これらのウイルスを起源とした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おり、我が国においても、新型インフルエンザ発生時における早期検査体制の構築のため、平時の間に地方衛生研究所にてインフルエンザ核酸診断検査を正確に行える環境を構築しておく事が重要である。

本研究では、その検査態勢づくりの一環として、昨年度に引き続き、本年度は全国 72カ所の地方衛生研究所が行っているリアルタイム 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、検査精度向上を目的とした外部精度管理(EQA)評価を行い、トラブルシューティングによる検査精度の向上を図った。

B. 研究方法

全国 74カ所の地方衛生研究所に対して、2014年7月1日に「EQA2014実施要項」(添付資料1)および参加確認を兼ねたアンケートを配布した。次に本EQAへの参加を表明した72カ所の地方衛生研究所に対して、2014年7月28日～30日にかけて、パネル検体(RNA抽出が不要な6検体)を送付した。常温輸送でも劣化する事がないように、送付したパネル検体は抽出核酸の乾燥品である。今回は、H5およびH7亜型の鳥インフルエンザが流行している地域へ渡航歴がある患者検体が含まれるという前提で、地方衛生研究所の方法に従って、リアルタイム RT-PCR 法による A 型インフルエンザ

ウイルスの亜型診断検査を行うように依頼した。また、「パネル検体受領書」、「パネル検体の保存 溶解方法」、「結果記入ファイル」、「結果報告時アンケート」も同時に配布した。

各地方衛生研究所での検査結果は結果記入ファイルに記入して送付してもらい、それと引き替えに「パネル検体の内容(正解)」を送付した。同時に送付してもらった、結果報告時アンケートとともに結果集計と解析を行い、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)および鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の実施体制整備の確認と各診断検査の検査精度向上のためのEQA評価を行った。

C. 研究結果

全国 72カ所の地方衛生研究所で行った検査結果およびアンケートを集計し、「第2回全国地衛研外部精度管理 EQA2014実施結果について」(添付資料2)、「定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について」(添付資料3)、「「パネル検体の結果」シートの見方」、「EQAの結果および結果報告時アンケートの集計」(添付資料4)を本EQA評価に参加した全国72カ所の地方衛生研究所に送付した。また、各所へは解析結果およびトラブルシューティング等のアドバイスを個別に記入した「結果ファイル(地衛研名)」を各地方衛生研究所の検査結果については詳細な解析を行い、各地方衛生研究所向けに「解析結果」作成して送付した。また、結果解析において検出系等に問題がある事が推定された場合には、トラブルシューティングへの参考として、結果ファイルにコメントを記入して、個別にフィードバックを行った。

D. 考察

これまでに国立感染症研究所が示している「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル」および「鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出マニュアル」に記載の Type A(M 遺伝子)、H5 および H7 検出用のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件は、感染研の環境で一定の検出感度・特異性を担保しているが、各地方衛生研究所が使用している検出装置や試薬類は同一ではなく、検出装置のメンテナンス状況や試薬類の保管状況あるいは検査手技や検査手順の違いなどにより環境が大きく異なるため、検査結果も異なる可能性がある。そのため、各施設で行う検査結果の正確性、安定性評価などについては精度管理を行って、確認する事が重要であった。

リアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 および H7 検出検査は、検出装置、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査手技や検査手順に問題があると、正確な検査が行えなくなる可能性があるが、今回の EQA では、ほぼ全ての地方衛生研究所が全てのパネル検体に対して、正確に亜型の同定が行えていた(添付書類 4 ページ 1 表を参照)。今回の EQA では配布パネルの RNA 量がどの施設でも同じ濃度になるため、Ct 値を指標にすると、間接的に検査精度の比較を行う事が可能である。この Ct 値の比較により、恐らく配布済みの H5 および H7 検出用陽性コントロールの劣化や A 型・H1pdm09、H3、H5、H7 亜型検出用のプライマーもしくはプローブが劣化したことにより、一部の地方衛生研究所では検出精度が悪くなっている事も判明した。ただし、今回の EQA 評価では、最も RNA 濃度の薄いパネル検体で 20 コピー/ μL であり、5 μL をテンプレートに用いた場合、

リアルタイム RT-PCR の検出限界と考えられている 5 コピー/反応よりも 10 倍濃い濃度となるが、この濃度であれば、ほぼ全ての施設で検出可能な濃度であった。なお、この濃度のパネル検体 E(H5N1)について、1 つの施設が不正解となっているが、H5 が検出できなかったのではなく、解釈の違いにより、他の亜型も検出したとの報告だったため、不正解となったが、H5 と H7 亜型の検出に関していうと、この濃度であれば全ての地方衛生研究所が検出可能ということになり、昨年度の EQA 評価に比べると、全体的に検査精度が向上したのは明らかである。

E. 結論

アンケート結果により、検査手順を改善した方が良い施設がいくつかあったものの、昨年度に比較すると正しい手順で検査を行っている施設が明らかに増加していた。これは、昨年度行った EQA 評価で、問題が推定できた場合はトラブルシューティングを行うようにアドバイスをしており、問題点が改善された結果であると考えられる。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、精度の高い検査が行え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し、各地方衛生研究所において精度の高い検査体制を常に維持するためにも、今後も EQA 評価の実施は重要と考えられる。

新型インフルエンザウイルスが出現した直後は、まだ検査系が構築されていない可能性が高く、除外診断(例えば Type A 陽性、H1pdm 陰性、H3 陰性)の場合は、新型イン

フルエンザが疑われる)が検査の中心になる可能性があり、H5、H7 亜型の同定も大事ではあるが、日頃ウイルスサーベイランスで行っている亜型同定検査が正確に行えることが非常に重要である。今後は季節性インフルエンザウイルス検出系の精度管理も重要と考えられ、本 EQA 評価を継続的に行う事が精度管理に有用と考えられる。

なお、今回の EQA では精製した RNA を使用しており、核酸精製の評価は行っていない。そのため次回以降は、臨床検体の検査を行う際に必要な核酸精製のステップを入れた EQA 評価の導入が必要と考えられる。ただし、対象施設が 70 カ所以上もあるため、EQA 評価を実施する側で、膨大な量の EQA の準備および解析等の作業が必要で、負担が非常に大きいのが現状である。

もう少し細かく幅広い範囲で EQA 評価を行う事が望ましいが、地方衛生研究所での検査する負担と EQA を実施する側の負担を考えると、パネル検体数をこれ以上増やす事が難しいと考えられる。準備、解析作業の一部を外注化して省力化を図る事も必要と考えられた。

該当なし
3.その他
該当なし

F . 研究発表

1.論文発表

なし

2. 学会発表

国内会議

なし

3.国外会議

なし

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

添付文書 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 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施について

平成 25 年度に引き続き、本年度も「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)」について全国の地方衛生研究所を対象に外部精度管理(EQA)を実施いたします。昨年度は、配布済みの陽性コントロールを用いて、定量的な H5 および H7 亜型診断検査を行っていただき、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)および鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の実施体制の確認と各診断検査の精度向上を目的とした EQA を実施いたしました。本年度は感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 6 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が EQA の評価対象となります。

また、本年度はパネル配布を伴うことから、参加確認を兼ねた事前アンケートを送付します。本 EQA に参加する場合は、事前アンケートに必要事項をご記入の上、電子メールにてご送付いただきますようお願いいたします(事前アンケートの回答締切は平成 26 年 7 月 11 日です)。

本 EQA は平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金(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」(主任研究者 小田切孝人)により行います。

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(EQA2014)実施結果について

この度は、本 EQA にご参加いただきましてありがとうございました。核酸検出検査の精度管理を行う目的は、検査結果の正確性、安定性を担保する事です。国立感染症研究所が示した「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)および「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版)」に記載の Type A(M 遺伝子)、H5 および H7 検出用のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件については、弊所の環境にて一定の検出感度・特異性を担保しています(「インフルエンザ診断マニュアル(第 2, 3 版)」に記載の H1pdm および H3 検出系も同様です)。しかし、各地衛研で使用している検出装置や試薬類は弊所とは同一ではない場合があり、さらに検出装置のメンテナンス状況や試薬類の保管状況あるいは検査手技や検査手順も異なる可能性が高いため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、各所の検査に対する信頼性を高めるうえで、外部精度管理(EQA)が重要になります。

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 A 型および亜型の核酸検出検査は、検出装置、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査手技や検査手順のうち、どれか一つでも問題があると正確な検査が行えなくなる可能性が高くなります。今回の EQA では、RNA 抽出が不要な 6 検体を配布して、A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査をリアルタイム RT-PCR により行っていただき、お送りいただいた検査結果を詳細に評価して、精度の高い検査が行えているか、行えていないとすればどこに問題があるか、その原因を特定(特定できない場合は推定)し、トラブルシューティングにより検査精度の維持・向上を図っていただく事を目的としています。

別添の「2. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(PDF ファイル)」に、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、陽性コントロール、検査手技、検査手順に着目して問題があった場合のトラブルシューティングについて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、各所から送付された結果を解析し、検査結果や手順で何らかの問題があった場合やその問題となった原因を特定できた場合(特定できなかった場合は推定)は、「5. 解析結果 2014_地衛研名(Excel ファイル)」(複数回の検査を行っている場合は、1つのファイルにまとめました)の「パネル検体の結果」シート中の表および<判定結果について><その他のコメント>にコメントを記載しました。「パネル検体の結果」シートの見方については「3. 「パネル検体の結果」シートの見方(PDF ファイル)」に示していますのでご参照下さい。

なお、今回配布したパネル検体は、検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 量とな

っています。何らかの問題があってこれらが正確に検出できなかった場合は、コメントおよび「2. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(PDF ファイル)」を参考に、ご自身でトラブルシューティングを行っていただく事をお勧めします。また、これらが検出できていたとしても、検査系に何らかの問題がある可能性が高い地衛研においてはコメントにその旨記載しましたので、同様にトラブルシューティングを行っていただく事をお勧めします。

また、各所におけるインフルエンザ診断検査の実施体制の確認のため、ご回答いただいた結果報告時アンケートの結果を集計し、別添の「4. EQA の結果および結果報告時アンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。アンケート結果から、ほとんどの地衛研で作業指示書等および検査記録書等を整備している事が明らかになりましたが、検査毎や作業員毎に手順や作業場所が異なるケースが散見されました。正確で精度の高い検査を行う上で、作業員全員が共通した手順で検査を行い同じ結果を得られるよう、今一度作業指示書等および検査記録書等を確認し、改めて精度管理を行う事をお勧めします。また、その他にも精度の高い検査を行う上で留意すべき点をコメントとして記載しましたので、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。

本 EQA に関して、トラブルシューティングの方法が分からないなどご不明な点や、ご意見、ご要望などありましたら、下記にお問い合わせ下さい。なお、検査系のトラブルシューティングに必要なプローブやプライマーは少量であれば配布可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さい。

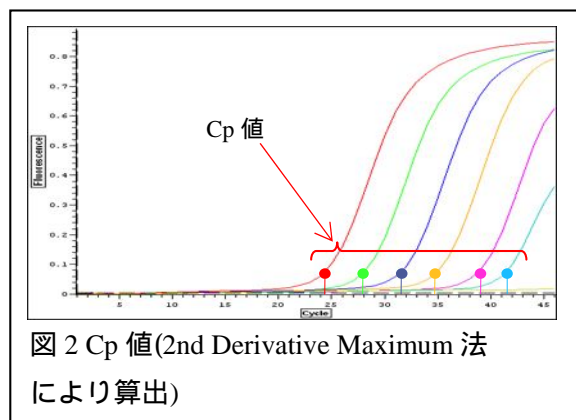
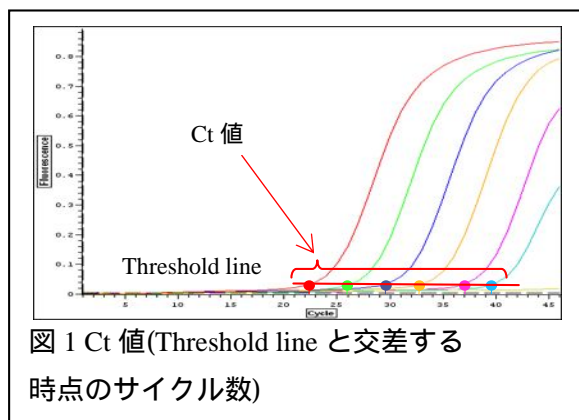
2014 年 12 月 26 日

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
E-mail : eqa_influenza@nih.go.jp
電話 : 042-561-0771 (代表)
(042-848-7166 直通)
担当 : 影山/高山/中内

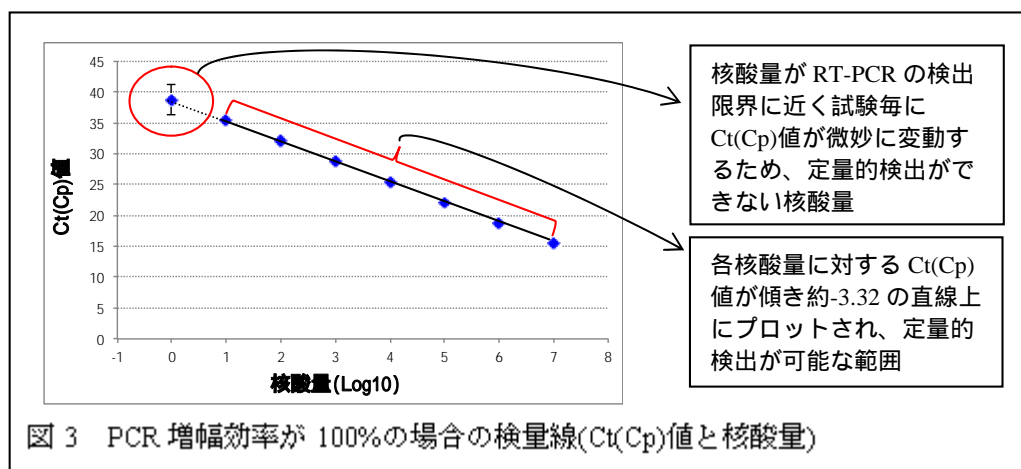
定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について (問題時のトラブルシューティングについて)

1. Ct(Cp)値について

リアルタイム PCR 反応においてサンプルからの蛍光シグナルが閾値(Threshold Line)と交差する時点のサイクル数を一般的に Ct 値(Threshold Cycle)と呼びます。Threshold Line は PCR の指数関数的増幅期に設定したラインで、ベースラインの蛍光値に対して統計的に有意な増加が見られる場所に設定して、Ct 値を算出します(図 1)。ABI のリアルタイム PCR 装置のソフトウェアでは、通常ベースライン蛍光値の標準偏差の 10 倍の値に Threshold Line が設定され Ct 値が算出されます。一方、Roche LightCycler システムの Auto 解析では、サンプルからの蛍光シグナルの増幅曲線が急勾配の上昇に切り替わる点(増幅曲線の二次導関数の最大値、すなわち変曲点)のサイクル数を Cp(Crossing point)値として算出(2nd Derivative Maximum 法)しているため、Threshold Line は存在しません(図 2)。



リアルタイム RT-PCR 法において反応試薬、プライマー、プローブ、機器、手技に問題がない場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10)との間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100%(1 サイクルで 2 倍に増幅)の場合は、理論上傾き約-3.32(10 倍増幅に理論上 3.32 サイクル必要： $2^{3.32} \approx 10$)の直線上に Ct(Cp)値がプロットされます(図 3)。



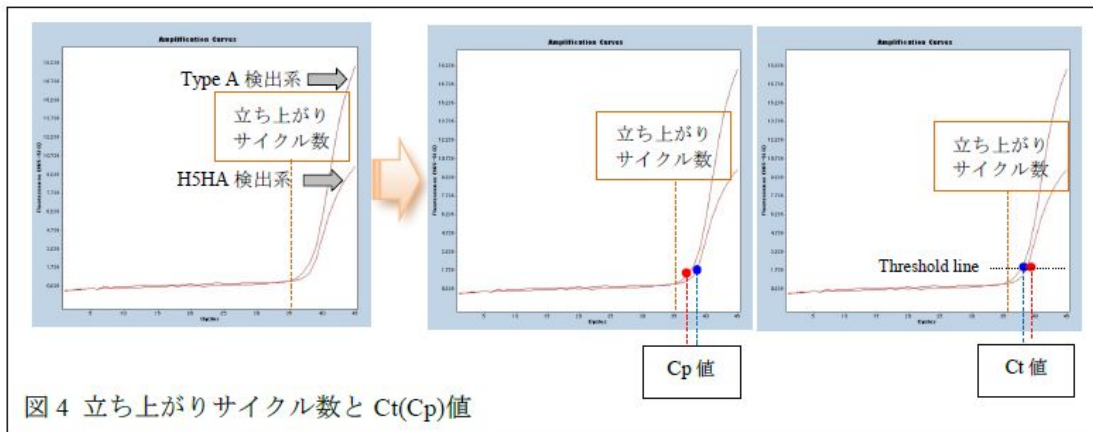
2. 精度管理について

リアルタイム RT-PCR 法を用いた検出系において、常に高い検査精度を維持するためには、例えば階段希釈した陽性コントロールに対する Ct(Cp)値やシグモイドカーブを確認し、毎回同じ精度で検査が行えているかどうか以前の結果と比較して確認するなどの精度管理を継続的に行う事が重要となります。検出系に何らかの問題が生じている場合、こうした精度管理により原因を明らかにできる場合がありますので、直ちにトラブルシューティングを行う事で、検査精度を維持する事が可能となります。

3. インフルエンザウイルス遺伝子の検出系について

インフルエンザウイルス遺伝子検出系(Type A(M 遺伝子)および H5, H7, H1pdm, H3 の各 HA 遺伝子)の PCR 増幅効率 は 100% に近く、各標的となる遺伝子のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりサイクル数がほとんど同じになるよう設計しているため、検査が問題なく行われた場合、どの検出系もコピー数が同じであればシグナルの立ち上がりサイクル数はほぼ同じになるはずですが、Ct(Cp)値は、それぞれの検出系間で若干乖離します。これはシグモイドカーブの形(曲線の変曲点)が各検出系によりそれぞれ異なるため、シグナルの立ち上がりサイクル数が同じであっても、計算により算出された Ct(Cp)値は異なるためです。図 4 は同濃度の核酸量に対する Type A と H5 検出系の波形です。Type A と H5 の立ち上がりサイクル数はほぼ同じですが、Ct(Cp)値は少し乖離しています。

従って、結果解析を行う際は Ct(Cp)値の確認だけでなく、シグナルの立ち上がりサイクル数とシグモイドカーブの形を確認する事も重要となります。



4. 検査手技や微量ピペッターなどの不備について

- リアルタイム RT-PCR 法では、微量ピペッターやマイクロチューブを用いて、
- 1) 反応試薬の調製(各試薬の分取・分注および混合)
 - 2) 陽性コントロール希釈液の作製(分取・分注および混合)
 - 3) 反応試薬、サンプル、陽性(陰性)コントロールの反応槽への分取・分注

の作業を行います。これらの作業を行う際に、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いが適切でないと、最終的には、反応試薬組成、サンプルもしくは陽性(陰性)コントロールの濃度が反応槽毎に異なる事となり、また、検査毎にもこれらの濃度がばらつく事となるため、再現性のない正確性に欠けた検査になる可能性が高くなります。

微量ピペッターは、一般的により少ない量を分取・分注する方が分取・分注量の誤差が大きくなります。例えば、検査時に毎回、高濃度のプライマーやプローブを極少量だけ分取し、希釈して反応試薬を調製する場合や、共通の反応試薬をまとめて作製せずに、極少量の酵素を各反応槽に分注する場合などでは、分取・分注量に大きな誤差が生じやすくなり、全く同じサンプルであっても、検査毎に Ct(Cp)値が大きく変動するなど、再現性が取れずに正確さに欠けた検査になる可能性があります。また、プライマー/プローブミックスをあらかじめ作製していない場合には、同様に極少量のプライマーやプローブを分取することになることから、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微妙にばらつく事となり、同じサンプルであっても検査結果が異なってしまう場合があります。プライマー/プローブミックスはあらかじめ作製して小分け分注にて冷凍保管(必ず自動霜取り機能のないフリーザーを使用して下さい。できれば-70度以下での保存を推奨します)し、検査時は小分け分注した分を使い切りで使用することを勧めます。また、試薬調製時は、たとえ少ないサンプル数でも、反応槽毎に調製するのではなく、共通の反応試薬をまとめて作製する事で、特に酵素などの必要量が微量な試薬の分取・分注時の誤差による検査結果のばらつきを少なくすることができます。

リアルタイム RT-PCR などの遺伝子検査で、常に精度の高い検査を行うための、最低限留意すべき点を以下に記します。

- 各作業者が正確な量を分取・分注できるように微量ピペッターの操作や特性について習熟する
- マイクロチューブは容量がとて小さく、内容物が混ざりにくいという特徴を理解するなど、マイクロチューブの取り扱いに習熟する
- 分取・分注量が正確ではない微量ピペッターを使用した際も、同様に正確性に欠けた検査になるので、微量ピペッターの精度を保つため定期的に点検する
- 各人が検査精度の維持・向上に努めようという意識を持つ
- 作業手順が統一されておらず、同じ作業であっても各人で手順が異なり使用する微量ピペッターが異なる場合などは、標準業務(作業)手順書の作成、作業毎に専用の微量ピペッター、マイクロチップ、マイクロチューブ等を用意するなどして、作業手順および機材等の統一・共用化を図る

常に正確な検査が行えているか、検査毎の検査精度を確認する手段の一つに、第2項で触れたように、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界が毎回の検査で変化がないかどうかを確認するという方法があります。後述するように、検査手技や微量ピペッターなどの不備によっても、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や

検出限界は変化します。原因が複数考えられると、検査精度管理が難しくなります。まずは検査手技の習熟と検査精度に関する意識向上に努める事が重要となります。

5. 検出系に何らかの問題がある場合

H5 および H7 陽性コントロール(識別マーカ入り)に含まれる Type A (M 遺伝子)および各 HA 遺伝子のコピー数は、同濃度になるように調製して各所に配布しています。検査が問題なく行われた場合、陽性コントロールの 10^3 希釈液までの Type A 検出系と HA(H5 もしくは H7)検出系の立ち上がりのサイクル数はほぼ同じサイクル数となるはずですが、Roche LightCycler 480 システムの場合では、第 3 項に記載した理由により、 C_p 値は正常な場合でも Type A と HA 検出系で 0.5~1.5 程度乖離します(どちらも概ね Type A の方が C_p 値は大きくなります)。

ただし、10 倍階段希釈を行った陽性コントロールに対する $C_t(C_p)$ 値の間隔は、検出系間で差はほとんど無く、検出系ごとで等間隔となり、効率よく PCR 増幅反応が進んだ場合は、概ね 3.2~3.5 の範囲内(100%の効率の場合は 3.32)となります(図 3 参照)。プライマー・プローブが劣化している、あるいは試薬調製または陽性コントロールの希釈系列が正確でない、など何らかの問題がある場合は、シグモイドカーブの形が大きく崩れて対数増幅期の傾きがそれぞれ異なる(図 5a)、各陽性コントロール希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔($C_t(C_p)$ 値も同様)が一定ではなくなる(図 5b)(図 3 で概説したように検出限界付近濃度の場合は当てはまりません)、などの現象が見られるようになります。

他にも、第 4 項で触れたように、試薬調製時の混合が不十分で反応試薬が均一ではない、陽性コントロールや反応試薬を反応槽に添加する際に分取・注入量が不正確だったなど、検査手技に不備がある場合もこれらの現象が見られる場合があります。

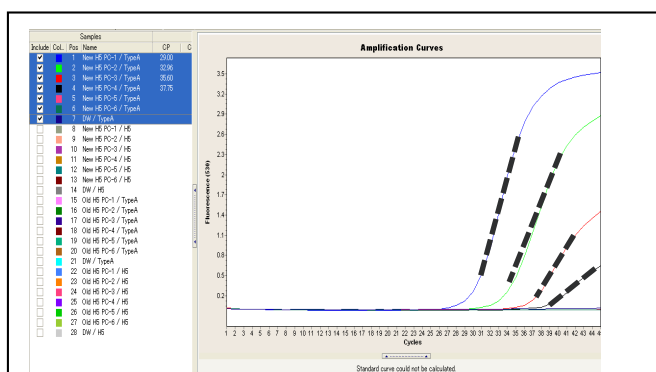


図 5a シグモイドカーブの形が崩れ、 $C_t(C_p)$ 値が理論値よりもずれた波形

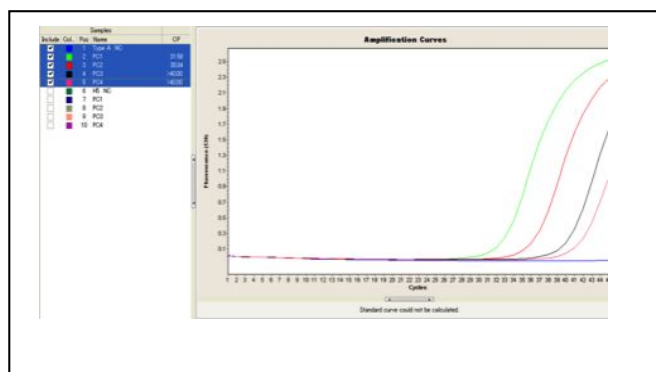


図 5b 各希釈陽性コントロール間のシグナルの立ち上がりサイクル数の間隔が一定ではない波形

従って、同一希釈濃度の陽性コントロールに対して、Type A と H5 もしくは H7 検出系の間で、シグナルの立ち上がりサイクル数を比較した際に、これらが大きく乖離する場合は、乖離した方の検出系に何らかの問題(手技に不備がなければ、プライマーあるいはプローブに問題がある可能性が高い)が生じている可能性を考えます。また、シ

グモイドカーブの形が以前の結果と異なる場合も、同様に何らかの問題がその検査で起きている可能性があります。

6. 検出系に何らかの問題がある場合の具体例およびそのトラブルシューティングについて

先述したように検出系に何らかの問題がある場合は、その原因により現れる現象も異なるため、その現象を解析する事でトラブルシューティングを行う事が可能になる場合があります。以下(1)~(6)に10倍階段希釈したH5およびH7陽性コントロールを用いて検査を行った結果を具体例として示し、原因特定の仕方とその対処方法について解説します。(今回はRoche LightCycler 2.0システムを使用した場合を例にしていますが、ABIやその他のメーカーの機器を使用した場合も同じ事がいえます)

(1) プライマー、プローブに何らかの問題がある場合の一例(図6)

現象: 同じ H7 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、波形を見ると H7 検出系の立ち上がりのサイクル数が Type A 検出系に比べると大きく遅れている (Cp 値も H7 検出系の方が Type A 検出系に比べ大幅に大きくなっている)。

原因: H7 検出系に何らかの問題があったため、シグナルの立ち上がりサイクル数が Type A 検出系よりも遅れたと考えます(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)。このようなケースでは、プライマー、プローブに問題がある場合がほとんどであり、その原因として次の可能性が考えられます。

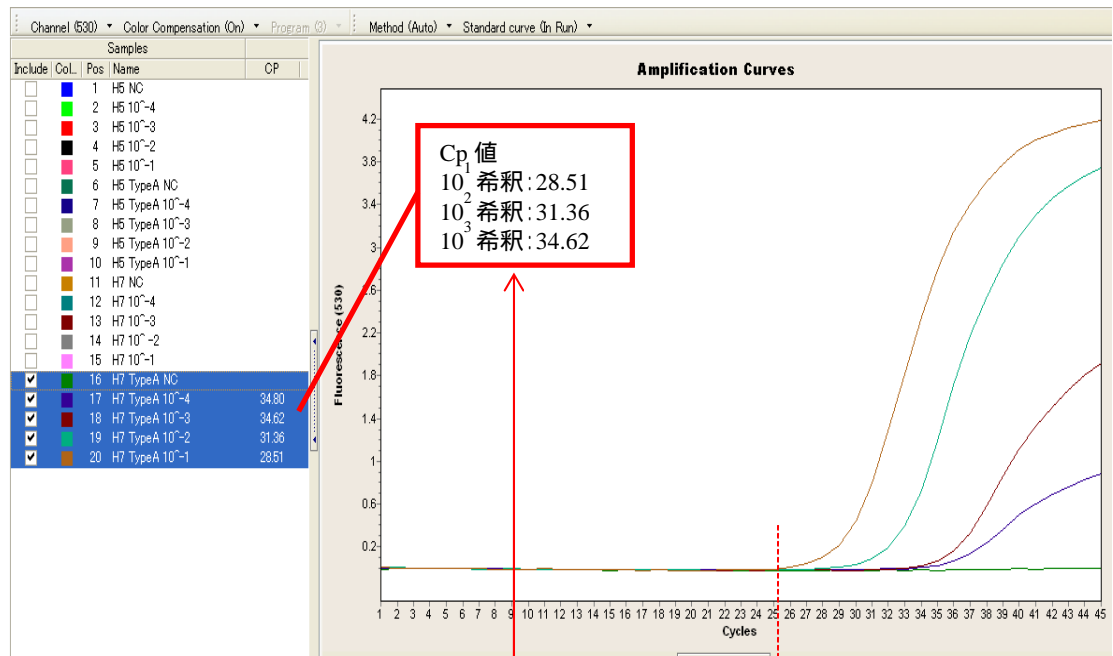
- 1) プライマー、プローブのワーキングストックの凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(4度で長期保管した場合や、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、-20度よりも高い温度で保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) プライマー・プローブミックスのワーキングストックを作製する際の濃度調整が不正確

対処方法: マスターストックのプライマー、プローブもしくは新たに合成したプライマー、プローブを用いて新旧のプライマー、プローブの性能を比較するなどして原因究明を行い、問題が認められた場合はそのプライマー/プローブを変更します。具体的には、まずはプライマーのみを新旧で並べて比較検討を行い、それで改善された場合はプライマーの劣化を疑い新たなプライマーへ変更します。少しの改善しか見られなかったあるいは全く改善されなかった場合は、今度はプローブのみを新旧で並べて比較検討を行います。それで改善された場合はプローブの劣化を疑い新たなプローブに変更します。プライマー、プローブの両方の劣化が疑われる場合は、両方とも新しいものに変更して比較検討を行い、それで改善された場合は両方を変更します。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理されたものを使用して下さい。また、新たに保管するプライマー、プローブが劣化

しないように、対策を講じて下さい(例：-70 度以下で保管する、凍結融解を繰り返さないように小分け分注を行い使い切りにする、自動霜取り機能がなくできるだけ開閉の回数が少ない冷凍庫で保管する、など)。

Type A 検出系(H7 陽性コントロールを共通に使用)



H7 検出系(H7 陽性コントロールを共通に使用)

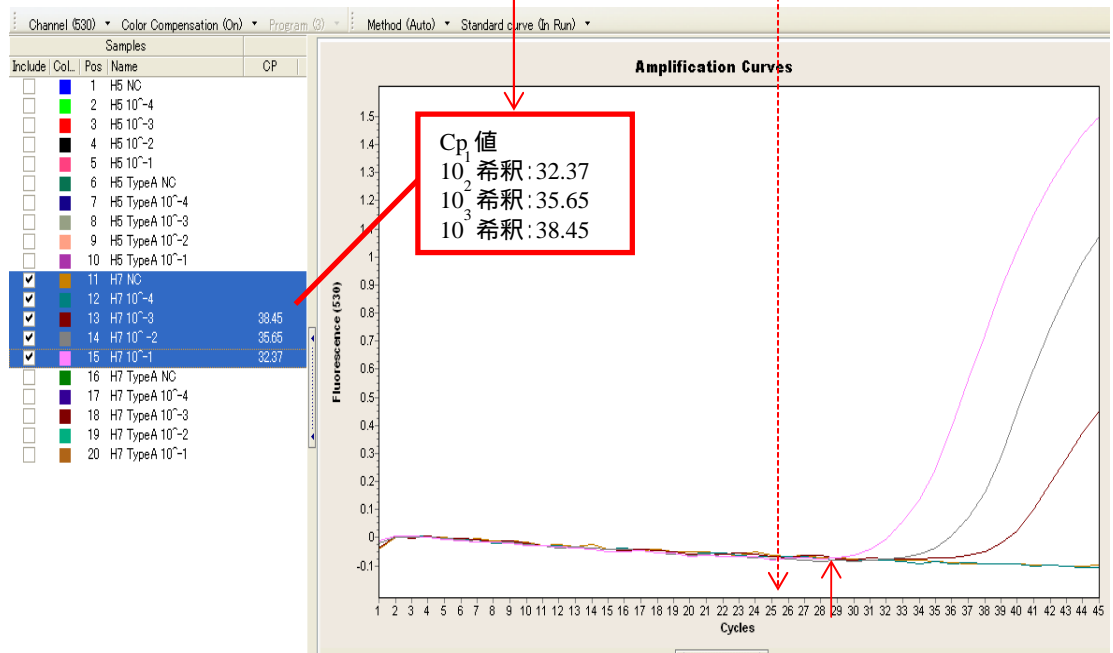
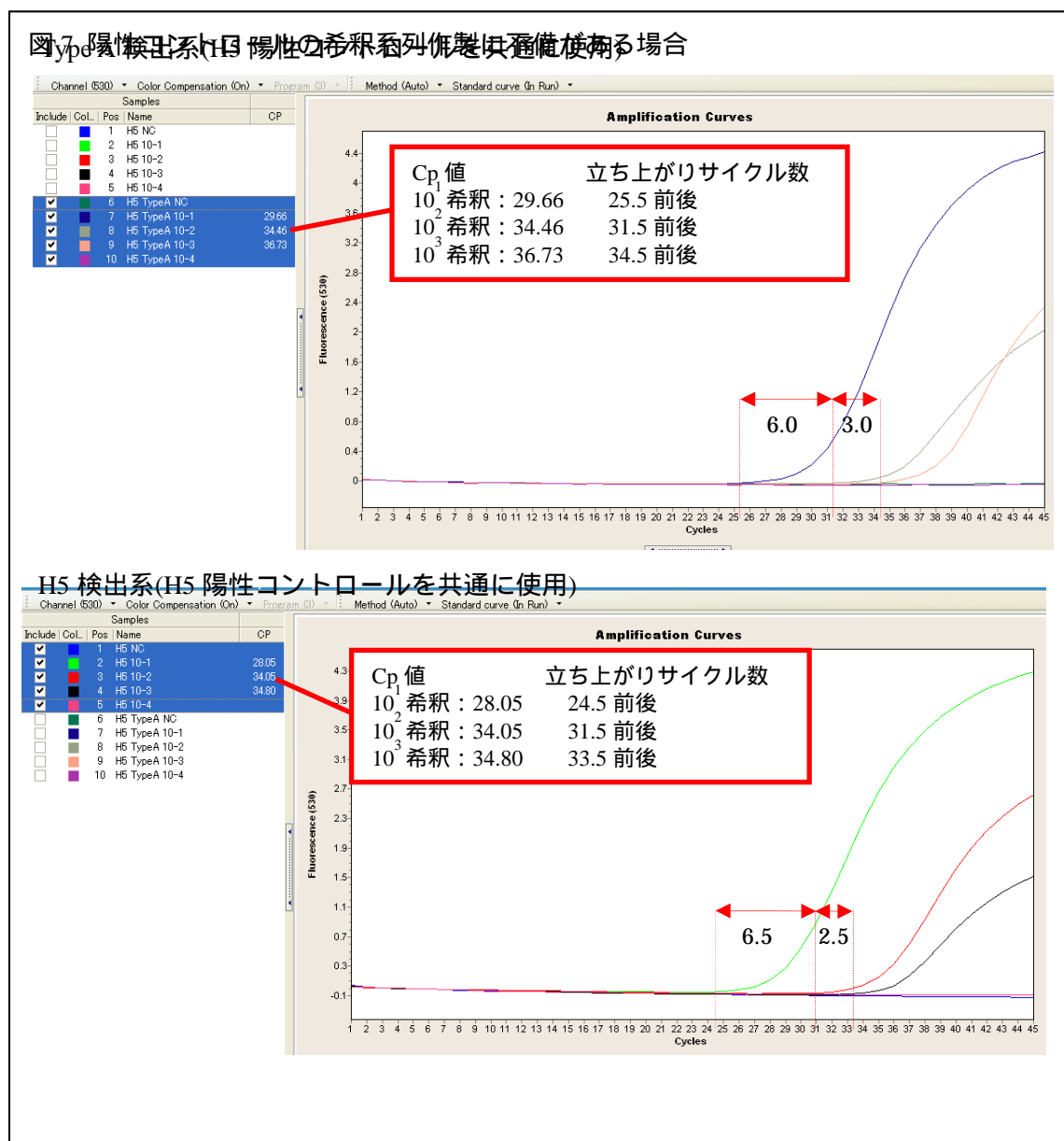


図6 プライマー、プローブに何らかの問題がある場合

(2) 陽性コントロールの希釈系列作製で不備がある場合の一例(図 7)

現象： H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて、Type A および H5 検出系の検査を行っています。どちらの系も 10^1 希釈液と 10^2 希釈液および 10^2 希釈液と 10^3 希釈液の間の立ち上がりサイクル数の間隔がそれぞれ一定ではなく、想定される範囲内(理想値は 3.32)になっていないにもかかわらず、同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔はどちらの系もほとんど一致している。



原因： 10 倍階段希釈の陽性コントロールであるにもかかわらず、それぞれの立ち上がりサイクル数*の間隔が一定ではなく、さらに Type A および H5 検出系間で同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔が同程度であることから(この例では、Type A および H5 検出系の 10^1 希釈液と 10^2 希釈液の立ち上がりサイクル数の間隔は約 6.0 および約 6.5、 10^2 希釈液と 10^3 希釈液の間隔は約 3.0 と約 2.5)、陽性コントロールの希釈が正確

にできなかった可能性が高いと考えられます。また、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が Type A 検出系とほぼ同じ値(この例では、Type A および H5 検出系の立ち上がりサイクル数は、 10^1 希釈液それぞれで約 25.5 および約 24.5、 10^2 希釈液でどちらも約 31.5)であるため、反応試薬調製時に何らかの問題があった、あるいはプライマー・プローブに問題があったとは考えにくく、単に陽性コントロールの希釈が正確ではなかったために、このような現象が見られたと考えられます。

* この例の場合、特に Type A の 10^2 希釈液の増殖曲線の形が、 10^1 希釈液と比べると、X 軸の方向に寝てしまったため、Cp 値は比較的小さく算出されます。このように、増殖曲線の形が通常とは異なる場合も、その Cp 値と立ち上がりサイクル数の間に相関性がなくなってしまうため、結果解析を行う際は Cp 値のみの確認ではなく、増殖曲線の形や立ち上がりサイクル数についても確認する必要があります。

対処方法：このような場合の多くは、第 4 項で解説したように、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いに不備があった可能性が高いため、まずは微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いに習熟する必要があります。なお、陽性コントロールの正確な希釈を行うには、少なくとも $10\mu\text{L}$ 以上の陽性コントロール液を分取・分注して、希釈液の作製を行う事をお勧めします。例えば、 $2\mu\text{L}+18\mu\text{L}$ の希釈よりも $50\mu\text{L}+450\mu\text{L}$ の希釈の方が、同じ希釈倍率でもより誤差の少ない分取・分注を行う事ができます。希釈を行う際はできるだけ大きなスケールで行う事をお勧めします。また、陽性コントロールの希釈手順や使用している陽性コントロールの濃度等が間違っていないかどうか、検査マニュアル等もご確認下さい。

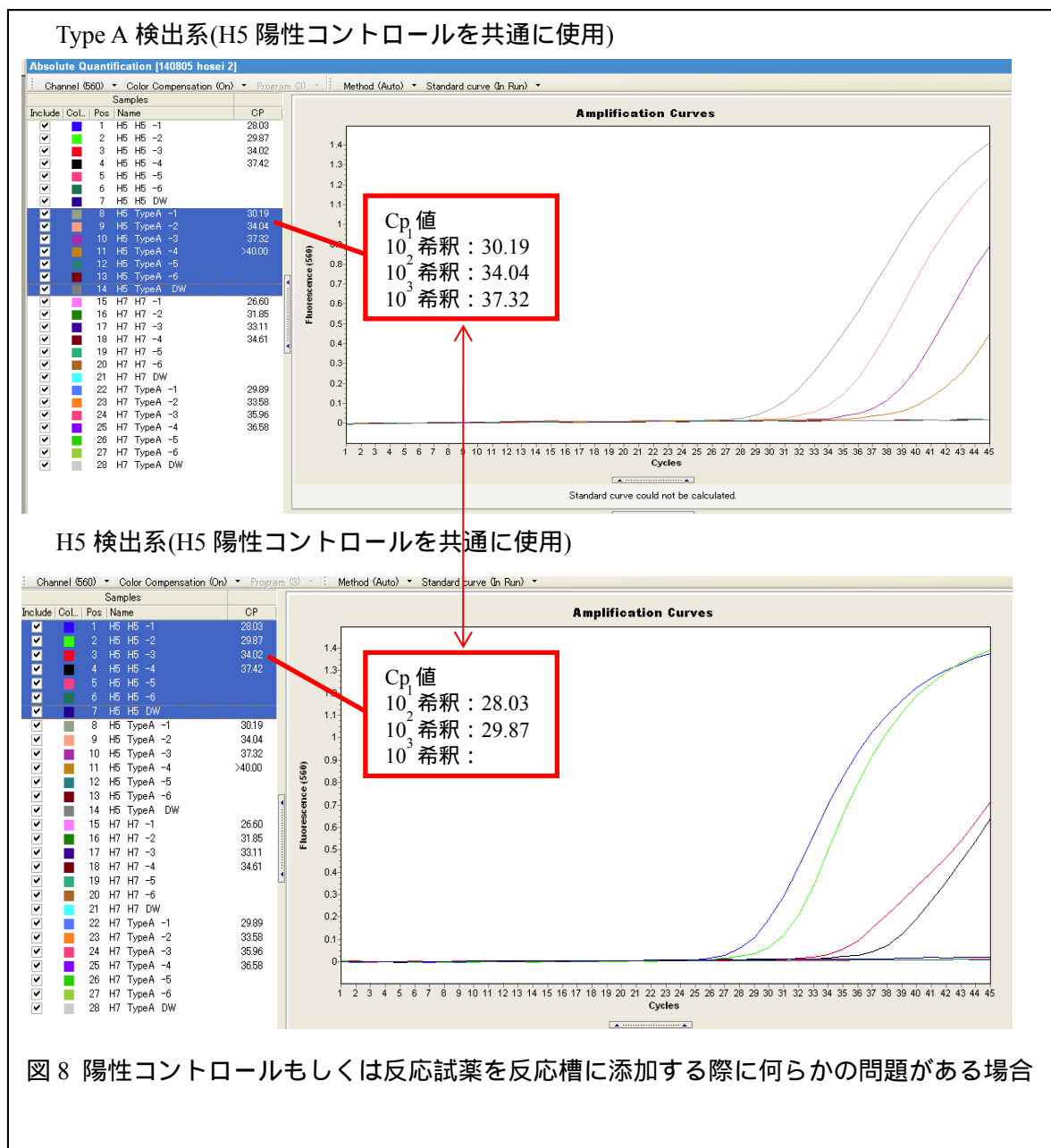
(3) 陽性コントロールもしくは反応試薬を反応槽に添加する際に不備がある場合の一例(図 8)

現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて検査を行ったにも関わらず、希釈した陽性コントロールの間の Type A 検出系の Cp 値の間隔は想定される範囲内であり、ほぼ等間隔であるにもかかわらず、H5 検出系の Cp 値は等間隔になっておらず、波形も少し乱れている。また、 10^1 希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数および Cp 値の間に若干乖離 (Type A が H5 検出系より遅れる) が見られる。

原因：Type A 検出系の結果から、陽性コントロールの 10^1 、 10^2 希釈液の Cp 値の間隔がほぼ理想値であるため、陽性コントロールの希釈については特に問題はないと考えられます。しかし、 10^1 希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数もしくは Cp 値の間で若干の乖離があり、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題があった可能性が考えられます。また、H5 検出系においては、 10^2 希釈以下で Cp 値やシグモイドカーブが乱れているため、陽性コントロールを反応槽に添加する際に正確な量の分注ができなかった、あるいは H5 検出系反応試薬調製時の混合が十分でなかったなどの可能性も考えられます。

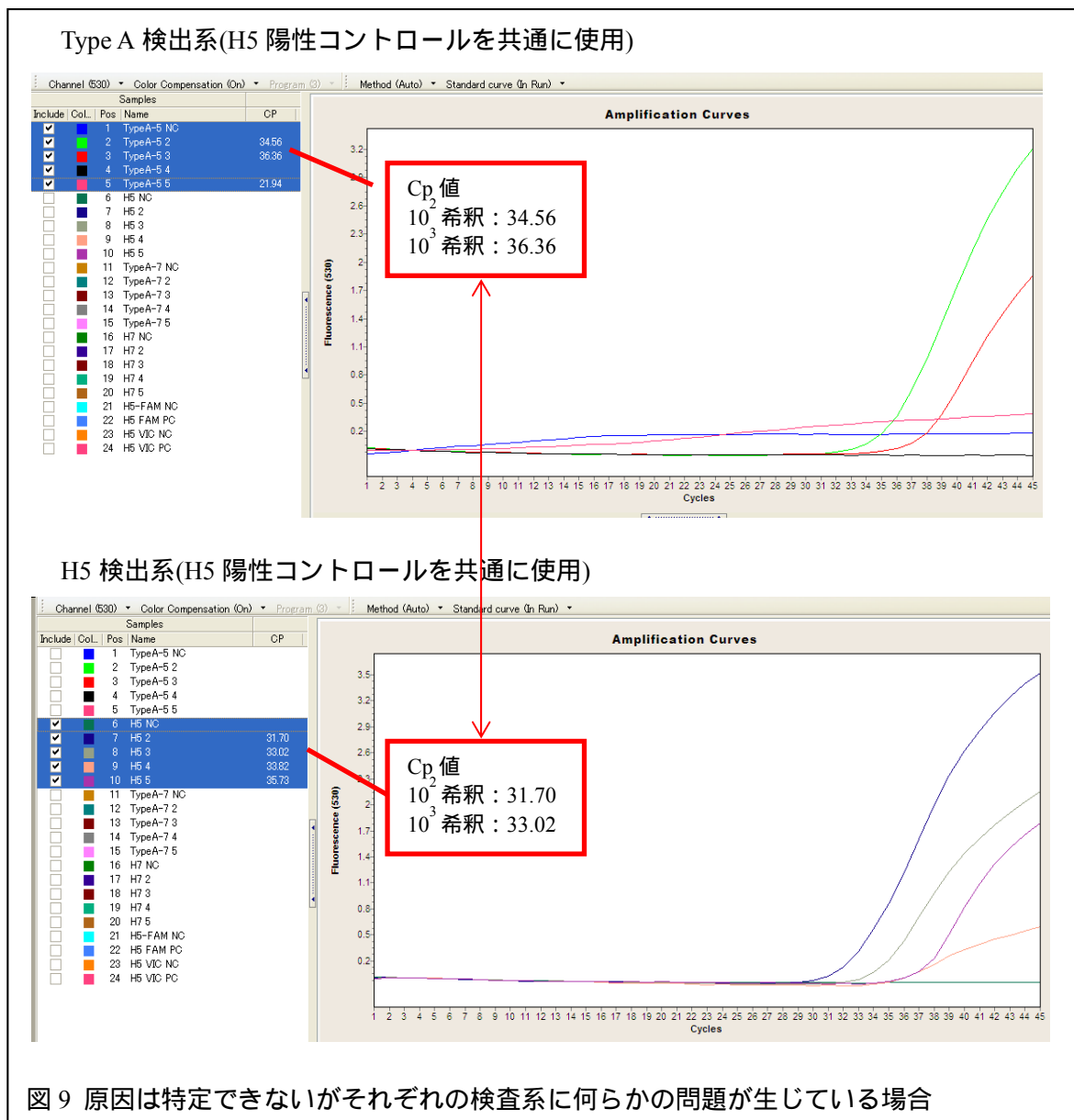
対処方法：この場合も、一部で微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取

り扱いに不備があったと考えられますので、まずは、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いに習熟する必要があります。また、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題がある場合は、第 6.(1)項で解説したような対応が必要になります。



(4) 原因は特定できないがそれぞれの検査系に何らかの問題が生じている場合の例 (図 9)

現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、同希釈の陽性コントロールに対し、Type A 検出系、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が揃っておらず、それぞれの波形も乱れている。



原因：反応試薬調製時に微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取り扱い等に不備があったのか、プライマー、プローブに何らかの問題があったのか、そのどちらか一方あるいはその両方が関連していると考えられるのか、この例だけでははっきりとした原因の特定が難しい。

対処方法：まずは、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いに習熟し、手技に問題がない状態で第 6.(1)項の要領でプライマー・プローブのチェックを行います。

(5) 作業者により結果がばらつく

同一の陽性コントロールと試薬を使用しているにも関わらず、検査結果が各人で異なる場合は、各人の手技の違いや手順の違いが大きく影響している可能性が考えられます。他にも、各作業で使用するマイクロチップ、マイクロチューブ、微量ピペッターが統一されていない場合や、作業手順が統一されておらず同じ検査であっても各人で検査手順が異なる場合、同じ作業でも各人が使用する微量ピペッターが異なる場合など、検査手順や使用する機材の相違が原因となっている可能性も考えられます。

特に、作業者毎に異なる微量ピペッターを使用している施設では、たとえ各人が同じ作業を正確に行ったとしても、各ピペッターの精度が異なっていれば、分取・分注量もピペッター毎に異なるため、作業者毎に結果がばらつく可能性があります。

各人が微量ピペッターの操作やマイクロチューブの取り扱いに習熟する事が前提になりますが、作業毎に専用の微量ピペッター、マイクロチップ、マイクロチューブ等を用意して共用するなど、機材等の使用に関しては統一・共用化を図る、作業者により検査手順が異なっているところがないか関係者全員で再確認を行う、標準業務(作業)手順書を作成して検査手順の統一を図る、等の対応が必要と考えられます。

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。

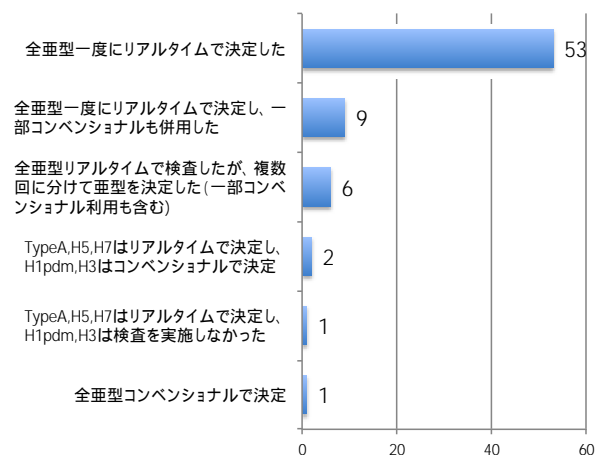
また、複数の作業員で EQA を実施した地衛研の中には、検査項目や作業内容等が作業員によって異なるケースも散見されました。作業員全員が同じ結果を得られるよう、また再現性良く正確で精度の高い検査を行うためにも、今一度、標準業務(作業)手順書や作業指示書等および検査記録書等を確認し、作業員間で統一した手順で検査を行う事をお勧めします。

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。

図1 今回のEQAでの検査方法



*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

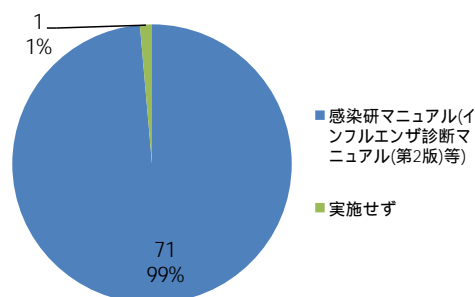


図3 Type A (M 遺伝子)検出系
プライマー、プローブレミックスの有無

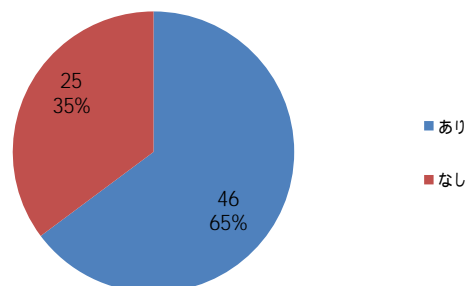


図4 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存温度

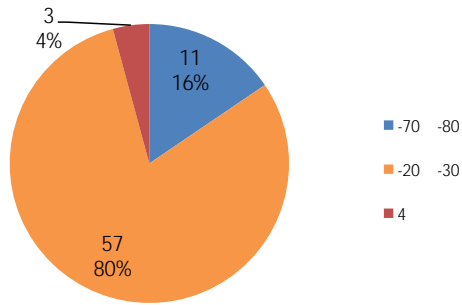
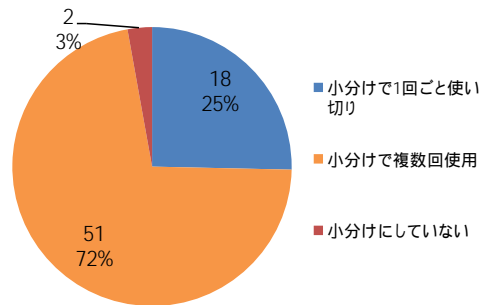


図5 Type A (M遺伝子)検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H5 検出系について

図6 H5検出系 記載マニュアル

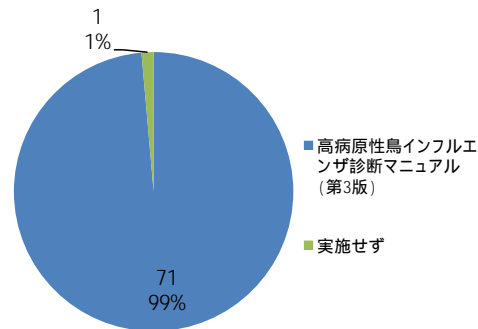


図7 H5検出系
プライマー、プローブレミックスの有無

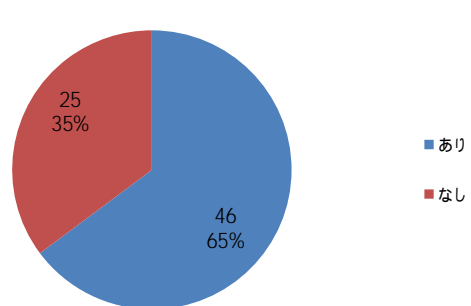


図8 H5検出系
プライマー、プローブ保存温度

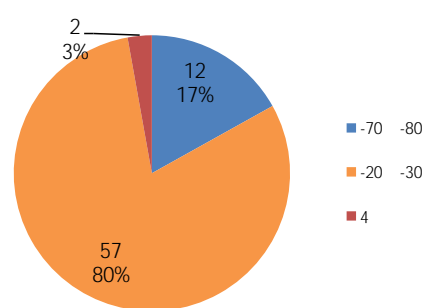
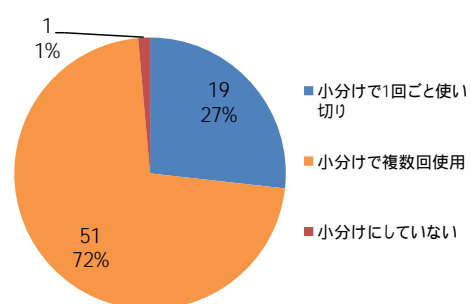


図9 H5検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H7 検出系について

図10 H7検出系 記載マニュアル

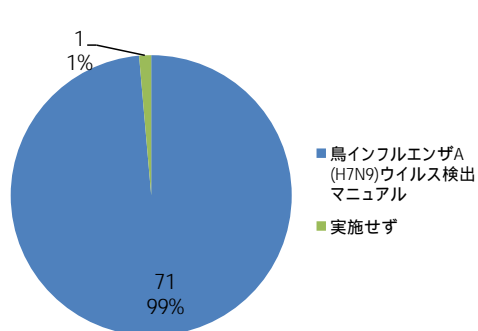


図11 H7検出系
プライマー、プローブレミックスの有無

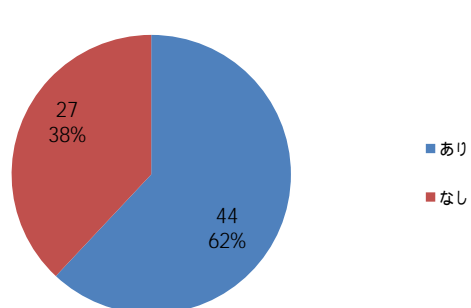


図12 H7検出系
プライマー、プローブ保存温度

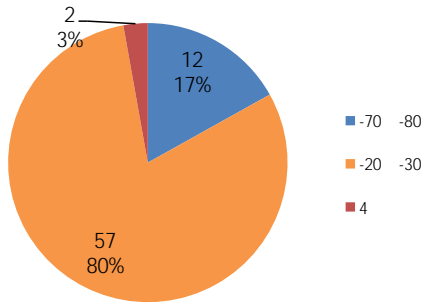
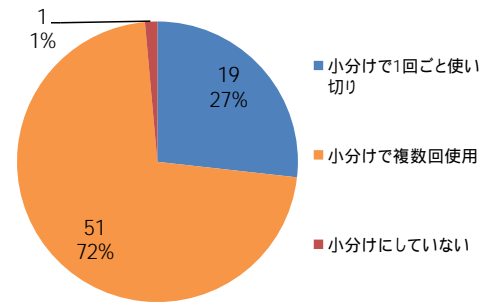


図13 H7検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-4. H1pdm 検出系について

図14 H1pdm検出系 記載マニュアル

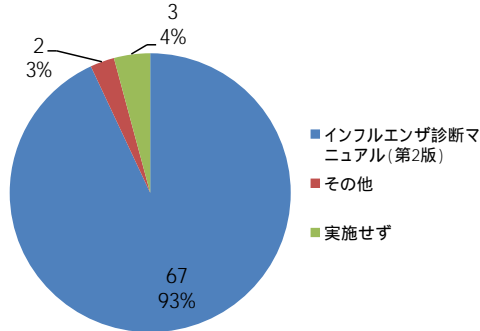


図15 H1pdm検出系
プライマー、プローブレミックスの有無

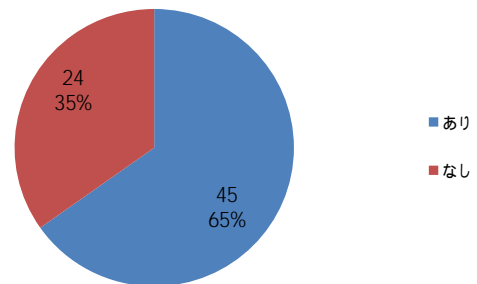


図16 H1pdm検出系
プライマー、プローブ保存温度

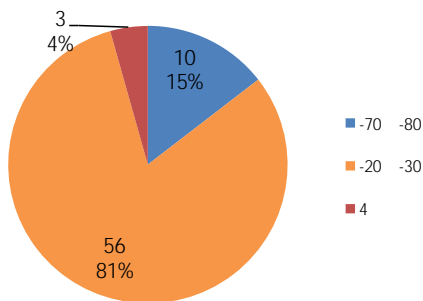
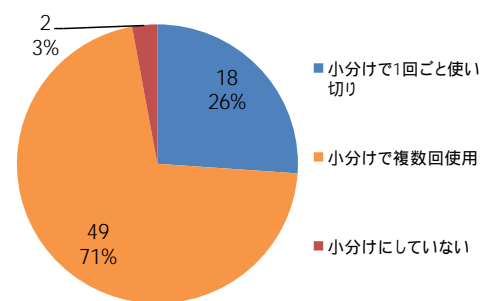


図17 H1pdm検出系
プライマー、プローブ保存単位



2-5. H3 検出系について

図18 H3検出系 記載マニュアル

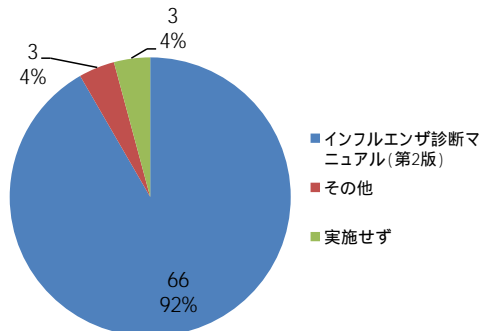


図19 H3検出系
プライマー、プローブレミックスの有無

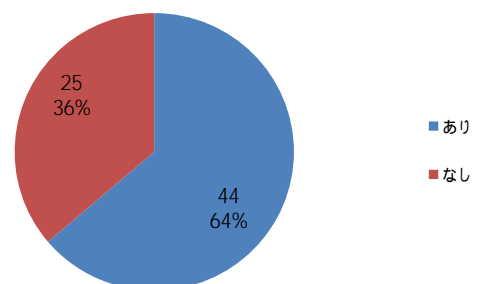


図20 H3検出系
プライマー、プローブ保存温度

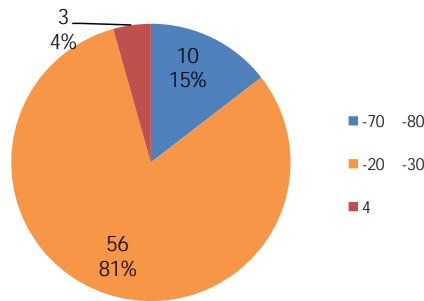
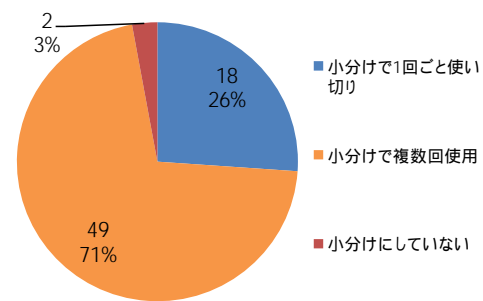


図21 H3検出系
プライマー、プローブ保存単位



<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

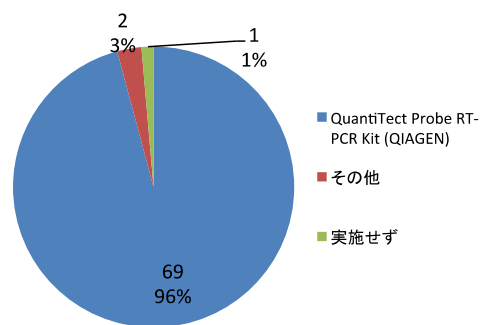
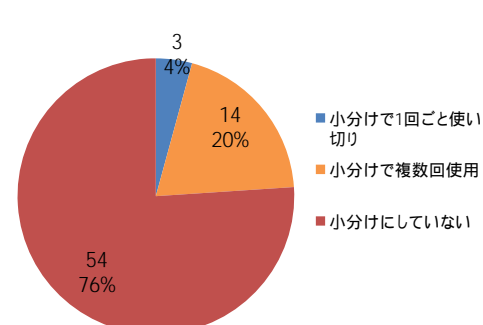


図23 試薬の保存単位



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

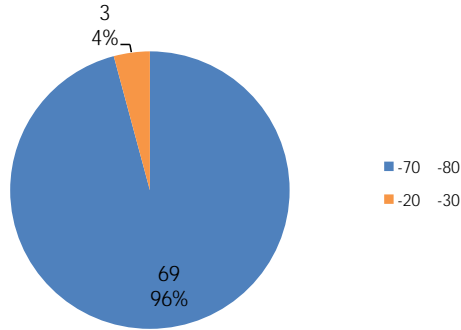
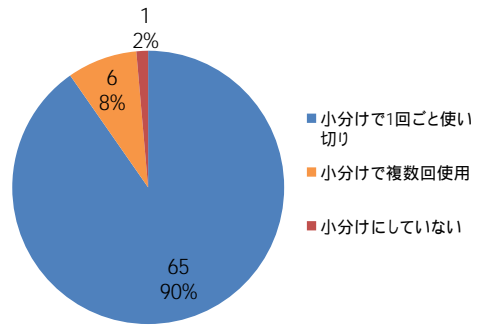


図25 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



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

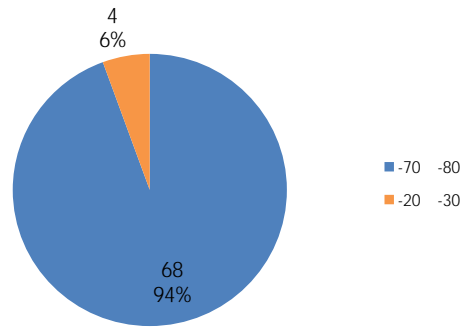
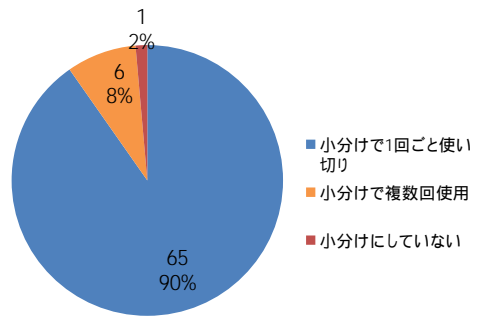


図27 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



4-3. TypeA/H1pdm の保管について

図28 TypeA/H1pdmの保管温度

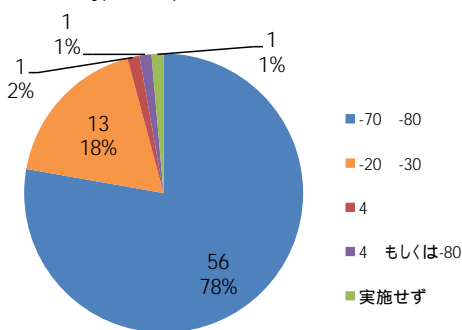
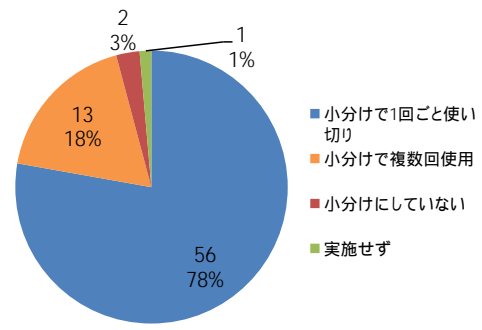


図29 TypeA/H1pdmの保存単位



4-4. TypeA/H3 の保管について

図30 TypeA/H3の保管温度

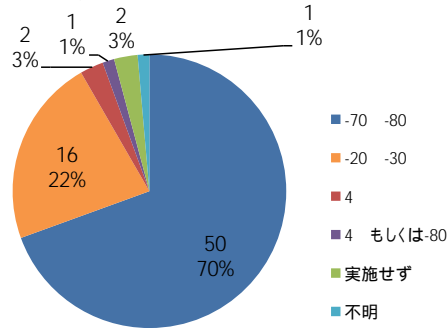
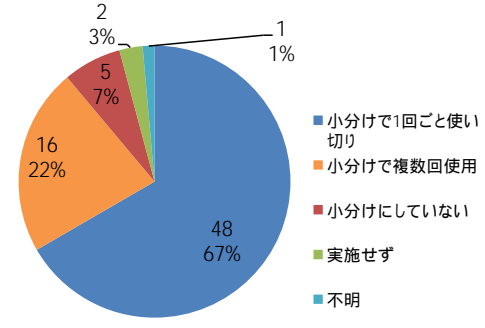


図31 TypeA/H3の保存単位



<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 以下での保管をお

願いたします。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

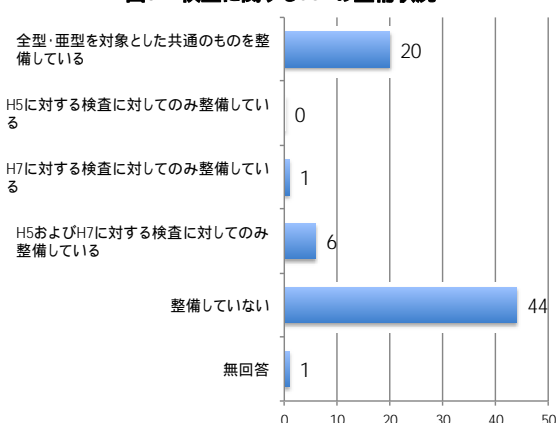
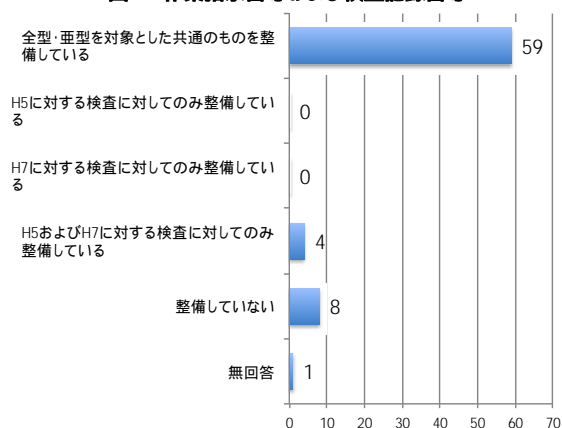


図33 作業指示書等および検査記録書等



<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)

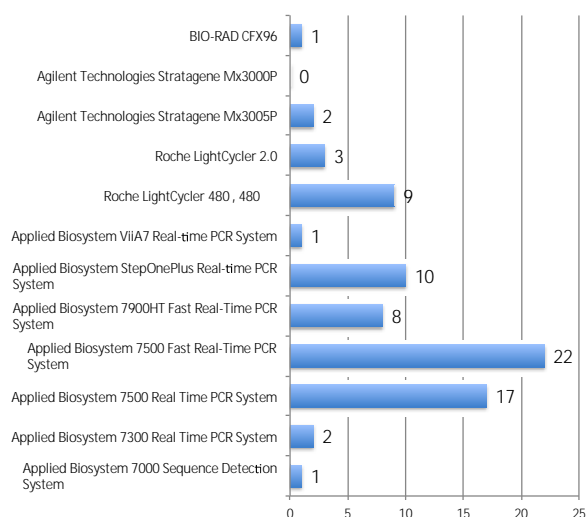


図35 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ74機種)

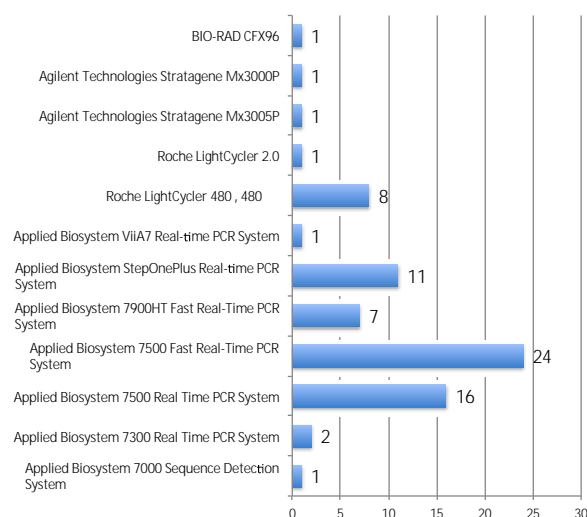


図36 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

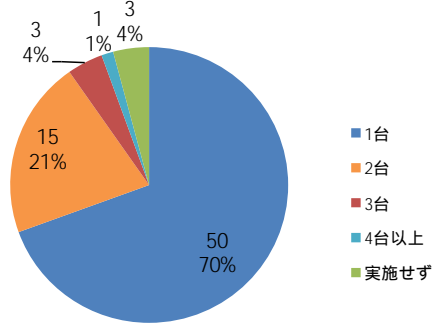


図37 通常検査のバックアップ用機器の台数

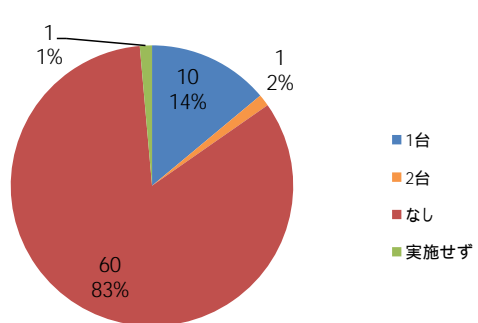
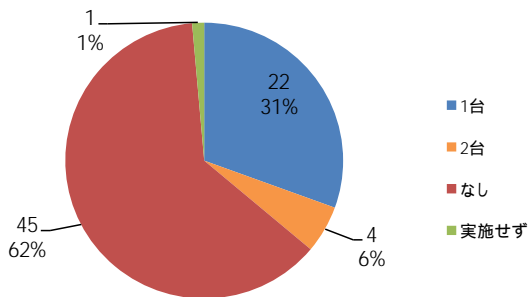


図38 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<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ことが必要である。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力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 モデリングの鑄型には 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鑄型には 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、ヒト伝播能力が低く、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抵触し、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

いる。このサイトカインストームを誘導する大元のウイルス因子とその特性が判明すれば、計算科学を用いた病原性予測が可能になると考えている。

E. 結論

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、未報告の変異株の感染伝播能の予測、及び動物由来の新型株のヒト伝播能力を高める二次変異の予測を行った。その後のサーベイランスの結果は予測結果を支持した。この手法は適用範囲と迅速性に優れる。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。

F. 研究発表

1. 論文発表 : IFV, 無印 : 計算科学

- 1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103–14 influenza season in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (in press)
- 2) Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 5:8185, 2015.
- 3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes Infect.* *Microbes Infect.* 16:936-44, 2014.
- 4) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 88:4145-60, 2014.
- 5) Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, and Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J.Virol.* 88:3598-604, 2014.
- 6) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, and Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes and*

Infection 16:320-7, 2014.

- 7) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. Retrovirology. 11:9, 2014.

2 . 学会発表

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.

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

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

研究分担者 齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者

近藤大貴、菖蒲川由郷、日比野亮信、八神錬 新潟大学大学院医歯学総合研究科

尾ヶ井マサヨ

女池南風苑・看護介護科長

樋熊紀男

女池南風苑・施設長

研究要旨

2014-2015 年シーズンの三価インフルエンザワクチン接種前後の成人・高齢者の A(H1N1)pdm09 抗原、A(H3N2)抗原、B(山形)抗原に対する血清抗体価の調査を行った。スタッフ 103 名(平均年齢 43 才)と、高齢入所者 46 名(平均年齢 86 才)のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集素阻害反応(HI 法)で測定し、ワクチン接種による変化を評価した。成人では A(H1N1)pdm, A(H3N2), B いずれも接種後には 70-90%を超える有意抗体価 (HI 抗体 40 倍以上) の保有率を認め、GMT の値も上昇した。高齢者では接種後に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)は、80%以上の有意抗体価 (HI 抗体 40 倍以上) の保有率を認めたが、B 型は接種後に保有率が 52%に上昇したものの、やや反応が悪い傾向があった。接種後の副反応については、当該施設の約半数が発赤を訴えたが、重篤な全身反応は認められなかった。全体的にみると今シーズンのワクチンは、免疫原性の国際的な評価基準を満たしていた。

さらに、前シーズン (2013-2014) において本人が罹患したと申告したスタッフの 6 名のうち 3 名は、A(H1N1)pdm の接種前の HI 抗体価が 160 倍以上と高く、A(H1N1)pdm に罹患したと推測された。

2015 年 1 月 29 日現在、当教室では全国 6 府県 (北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県、沖縄) の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を 331 件採集し、A(H3N2)が 98 件 (98.0%)、A(H1N1)pdm が 2 件 (2.0%)、B 型が 0 件 (0.0%) と、A/H3N2 がほとんど占めた。A(H1N1)pdm 2 件は全て薬剤感受性であった。

A. 研究目的

流行するインフルエンザウイルスは、抗原性や型・亜型が年ごとに変化するため、インフルエンザワクチンと流行するインフルエンザの抗原性が一致しないことがしばしばある。このため、WHO が 1 年ごとに

次のシーズンに流行するウイルス株を予測しその情報をもとに、次のシーズンのインフルエンザのワクチン株が決定される。2014-2015 年シーズンの日本のインフルエンザワクチンは、三価のインフルエンザワクチン、

* A/California/7/2009(H1N1)pdm09

* A/New York/39/2012(H3N2)

* B/ Massachusetts/2/2012(山形)

が使用されている。本調査では、高齢者施設のスタッフ(成人)、入所者(高齢者層)に対して、2014-2015 シーズンにおけるワクチン接種前後の抗体価の変化を赤血球凝集素阻害試験(HI 法)で測定し、ワクチン接種による HI 抗体価の変化を評価した。また、スタッフについては、聞き取り調査による前シーズンのインフルエンザの罹患の状況と HI 抗体価との関連性をみた。

さらに、ワクチン接種後の副反応を検討した。

B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、年齢、前シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。調査の参加者には、2014 年 11 月にデンカ生研社製の 2014-2015 年シーズン HA インフルエンザワクチン(三価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種 3-4 週間後の 2 回、血清を採血した。血清は採取後すぐに血清分離し、抗体価検査を行うまで-20℃にて新潟大学で保管した。ワクチン接種前後の抗体価は、赤血球凝集抑制試験(HI)法にて定法にのっとり、モルモット赤血球と、デンカ生研社製の A/H1N1pdm 抗原(A/カリフォルニア/7/2009)、H3N2 抗原(A/ニューヨーク/39/2012)、B 抗原(B/マサチューセッツ/02/201)を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設のスタッフを“成人群”とし、高齢者施設の入所者を“高齢者群”として、大きく 2 群に分けて評価した。さらに、スタッフについては、聞き

取り調査による前年度にインフルエンザに罹患した群(罹患群)と罹患しなかった群に分け、罹患したと答えた群で、罹患したと答えた型と、今回測定した HI 抗体価を比較した。

接種後 48 時間以内の副反応について自己申告(入所者の場合はスタッフの観察による)にて、「発疹、発赤、腫れ、痛み、その他(全身症状)」の有無を報告してもらい、スタッフ群と入所者群で副反応症状を訴えたものの割合を検討した。

(倫理面への配慮)

患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

C. 研究結果

成人群のペア血清は 103 件、高齢者群のペア血清は 46 件採取された。成人群の平均年齢は 43.2±11.7 歳、高齢者群の平均年齢は 86.4±8.2 歳であった(表 1)。

40 倍以上の抗体価保有率は、成人群で A/California/7/2009 接種前 85.4%、接種後 98.1%、A/New York/39/2012 接種前 85.4%、接種後 96.1%、B/Massachusetts /2/2012 接種前 74.8%、接種後 78.6%であり、3 種の抗原共に前値から国際基準の 70%を超していた(表 1、図 1)。

一方、高齢者では A/California/7/2009 接種前 80.4%、接種後 89.1%、A/New York/39/2012 接種前 71.7%、接種後 91.3%、B/Massachusetts/2/2012 接種前 39.1%、接種後 52.2%であり、A/H1N1pdm09 と A/H3N2 は前値も高く接種後の抗体価も国際基準の 60%を超していた。しかしながら、B 型は結果的に 52%に保有率が上昇したものの国際基準の 60%にはわずかに及ばなか

った。

成人群のワクチン接種前後のHI抗体価の幾何平均 (GMT) については、A/California/7/2009 接種前 94.0、接種後 146.6、A/New York/39/2012 接種前 68.1、接種後 130.7、B/ Massachusetts/2/2012 接種前 43.7、接種後 51.3 であった (表 1, 図 1)。

Mean fold increase は、A/California/7/2009 2.0、A/New York/39/2012 2.5、B/Massachusetts/2/2012 1.2 と、国際基準 (成人層 mean fold increase >2.5) の値と比べるとやや低めであったが、3種の抗原とも接種前が高かったため、接種後は抗体価の上昇が頭打ちになったと推察される。

一方、高齢者の HI 抗体価の幾何平均は、A/California/7/2009 接種前 80.0、接種後 116.6、A/New York/39/2012 接種前 47.2、接種後 98.8、B/ Massachusetts/2/2012 接種前 22.2、接種後 35.5 であった。

Mean fold increase は、A/California/7/2009 1.8、A/New York/39/2012 2.8、B/Massachusetts/2/2012 2.1 であった。A(H3N2) と B 型では、国際基準 (高齢者 mean fold increase >2.0) を満たす良好な反応であった。その一方、A(H1N1)pdm09 は、接種前の値が高かったため、接種後の反応が国際基準に及ばなかったと考えられる。

接種後の反応を、抗体価応答率 (抗体価 4 倍以上の上昇率) で評価すると、成人群では、A/California/7/2009 で 13.6%、A/New York/39/2012 で 20.4%、B/Massachusetts/2/2012 で 1.0% であった (表 1)。高齢者群では A/California/7/2009 で 15.2%、A/New York/39/2012 で 28.3%、B/Massachusetts/2/2012 で 10.9% と数値上、高齢者群のほうが反応は良い傾向にあったが、mean fold

increase と同様、成人層は高齢者層より接種前の HI 抗体価が高い為、抗体価反応率が低くなったと考えられる。

次に、成人群で、前シーズン (2013-2014) にインフルエンザに罹患したと申告した 6 名 (罹患群) の HI 抗体価を解析した (表 2)。自己申告で A 型に罹患したと申告した 2 名のうち 1 名 (No.1) は A/California/7/2009 の接種前抗体価が 320 倍と高かったが、もう 1 名は A/California/7/2009 と A/New York/39/2012 の HI 抗体価が、共に 80 倍でどちらに罹患したのか判断できなかった。一方、不明と答えた 2 名は A/California/7/2009 の抗体価が 160 倍以上と高く、先シーズンは H1N1pdm09 に罹患したと考えられた。B 型に罹患したと答えた 2 名 (No.4, 6) は両名とも HI 抗体価が 40 倍と上昇は認めなかった。

ワクチン接種後の副反応について、成人 103 名と高齢者 46 名で比較したところ、最も多い副反応は成人層、高齢者共に局所の発赤でそれぞれ 49.5%、28.3% であった (表 3)。次に多いのが局所の腫れで、成人で 35.0%、高齢者で 4.3% であった。成人では局所の痛みが 31.1% についても割合が高かった。その他、全身的な重度の副反応は認められなかった。

[追加情報]

2014-15 年シーズンの新潟大学国際保健学分野におけるインフルエンザ検出状況

新潟大学国際保健学分野では、全国 6 道府県 (北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県、沖縄県) の医療機関と連携し、インフルエンザの調査を行っている。2015 年 1 月 29 日現在では、インフルエンザ疑いの患者を、迅速診断キットでスクリーニングし、同意を得たのちに鼻腔・咽頭検体を 331 件

採取した。採取した臨床検体または MDCK 培養株から RNA を抽出し、cDNA を合成したのちに、Real-Time PCR (サイクリングアンプ法) にて A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型山形系統、B 型ビクトリア系統を判別した。

結果は A(H3N2) が 98 件 (98.0%)、A(H1N1)pdm09 が 2 件 (2.0%) と、ほぼ A(H3N2) のみの検出結果であった。A(H1N1)pdm 2 件は全て薬剤感受性であった。B 型はキット陽性が 1 例あったが、現在当教室で検査中である (表 4)。

D. 考察

成人群では、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B いずれに対してもワクチン接種後に 40 倍以上の HI 抗体保有率は 70-90% を超え、インフルエンザの罹患が予防できる可能性が高い。しかし 3 種類の抗原ともに接種前からすでに抗体保有率が高かったことも影響していると考えられる。該当施設ではほとんどのスタッフがワクチンを接種しており、接種前から抗体を保有していたことが原因と考えられる。

高齢者群においては、A/H1N1pdm09、A/H3N2 に対して、接種後 80-90% の高い HI 抗体保有率を認めたが、B 型では接種前 39.1% と低く、接種後も 52.2% とやや低めであり、高齢者層で B 型の抗体保有率が低い傾向は前年度の結果と変らなかった。B 型は、A 型に比べてなぜ HI 抗体価が低いのか疑問が残る。昨シーズンに B 型に罹患したと自己申告したスタッフの HI 抗体価前値も低めであったこともあわせ、HI 抗体で現在のワクチン株に対する免疫原性を正しく評価できているかわからず、今後検討すべきと考えられる。しかしながら、全体的にみると今シーズンのワクチンは、免疫原

性の国際的な評価基準を満たしていた。流行株の抗原性が一致すればワクチンによる一定程度の感染回避が見込まれる。

副反応については、約半数が局所の発赤を報告したが、その割合は例年とほぼ同様であり、かつ重篤な副反応はみとめられなかった。このため、インフルエンザワクチンは安全に接種できると言える。

当教室が行っている 2014-2015 年シーズンのインフルエンザ調査によると、全国的に A(H3N2) の流行がみられる。国立感染症研究所の発表でも全国的に A(H3N2) が優勢である。また、今シーズンの A(H1N1)pdm09 はオセルタミビル感受性であり、NA 蛋白は H275 である。昨シーズンにみられたオセルタミビル耐性株は検出されていない。

E. 結論

2014-2015 年シーズンのワクチン接種後、成人、高齢者共におおむね良好なワクチン効果が得られた。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。

謝辞：調査にご協力いただいた女池南風苑スタッフの方々に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 齋藤玲子、近藤大貴、日比野亮信、八神錬、菖蒲川由郷 抗インフルエンザ薬の現状と展望 化学療法の領域. 30 巻 12 号 96-102 頁, 2014 年
 - 2) 齋藤玲子、近藤大貴、日比野亮信、八

神鍊、菖蒲川由郷 抗インフルエンザ
薬の耐性とその対策 医薬ジャーナル
50 巻 10 号 101-105 頁, 2014 年

2. 学会発表

- 1) 近藤 大貴、日比野亮信、八神鍊、菖蒲川由郷 Clyde Dapat、川島崇、木村眞司、佐藤勇、真崎宏則、西藤岳彦、竹前喜洋、鈴木宏、齋藤玲子. 2013-14 年シーズンに本邦で検出されたインフルエンザ A(H1N1)pdm09 H275Y 変異株 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 神奈川県横浜市
- 2) 齋藤 玲子 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性ウイルス 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 2014 年 10 月 東京都

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

表1 . 2014-2015 年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

Titer of A/California/7/2009(H1N1) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	94.0	146.6	2.0	85.4	98.1	13.6
	User	N=46	86.4±8.2	80.0	116.6	1.8	80.4	89.1	15.2
Titer of A/New York/39/2012(H3N2) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	68.1	130.7	2.5	85.4	96.1	20.4
	User	N=46	86.4±8.2	47.2	98.8	2.8	71.7	91.3	28.3
Titer of B/Massachusetts/2/2012(Yamagata) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	43.7	51.3	1.2	74.8	78.6	1.0
	User	N=46	86.4±8.2	22.2	35.5	2.1	39.1	52.2	10.9

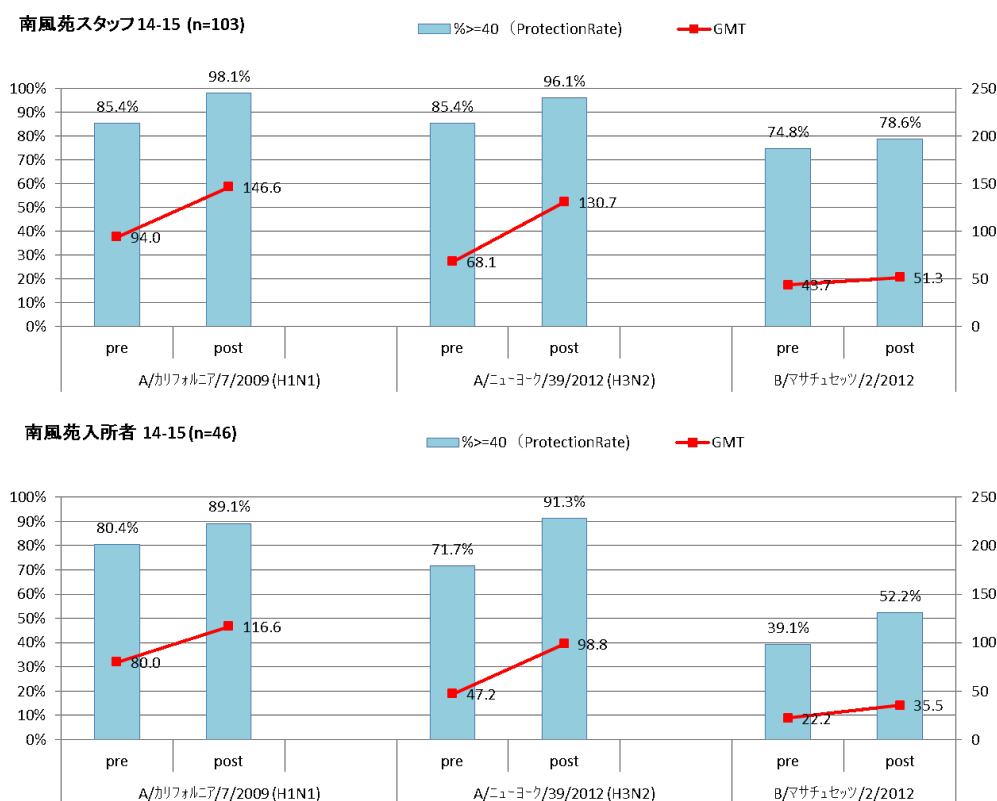


図1 . 成人層（スタッフ）と高齢者層（入所者）のワクチン接種前後のHI 抗体価の推移（40倍以上の抗体価保有率%と、抗体価幾何平均 GMT）

表2．昨シーズンにインフルエンザ罹患ありと回答したスタッフの HI 抗体価(n=6)

番号	自己申告インフルエンザ罹患	A/カフォルニア/7/2009 (H1N1)		A/ニューヨーク/39/2012 (H3N2)		B/マサチューセッツ/2/2012 (山形系)	
		pre	post	pre	post	pre	post
1	A	320	640	20	80	80	80
2	不明	640	640	160	320	40	40
3	A	80	160	80	160	40	80
4	B	40	40	10	20	40	40
5	不明	160	320	20	80	40	80
6	B	40	40	160	320	40	40

表3．インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

	発疹	発赤	腫れ	痛み	その他
スタッフ(n=103)	3	51	36	32	7
	2.9%	49.5%	35.0%	31.1%	6.8%
入所者(n=46)	0	13	2	0	0
	0.0%	28.3%	4.3%	0.0%	0.0%
全体(n=149)	3	64	38	32	7
	2.0%	43.0%	25.5%	21.5%	4.7%

表4．2014-15年シーズン新潟大学におけるインフルエンザ検出状況（2015年1月29日現在）

地域	初診時臨床検体	迅速診断キット結果			分離株						陰性	検査中	
		A	B	陰性	A/H1N1 pdm09 (%)	H275Y (%)	A/H3N2 (%)	B Victoria (%)	B Yamagata (%)	A+B (%)			合計
北海道	0	0	0	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0	0	0
新潟	235	170	0	65	1 (2.1%)	0 (0.0%)	47 (97.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	48	2	185
群馬	13	12	0	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12	0	1
京都	10	10	0	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10	0	0
長崎	72	71	1	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	29 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	29	1	42
沖縄	1	1	0	0	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1	0	0
合計	331	261	1	66	2 (2.0%)	0 (0.0%)	98 (98.0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100	3	228

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

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

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

研究要旨

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）は、そのウイルスのレセプターである糖鎖からシアル酸を切り離す作用を持つ酵素である。A/H3N2 亜型季節性インフルエンザウイルスの NA 蛋白質の 151 番目にアミノ酸変異を導入すると、その酵素活性が低下することが報告されている。本研究では、NA の酵素活性がインフルエンザウイルスのヒト気道上皮における増殖にとって必須であるのか否かを明らかにするために、NA の 151 番目のアミノ酸に変異を導入した A/H3N2 ウイルスを作成し、その変異ウイルスのヒト気道上皮細胞における増殖能を解析した。その結果、変異ウイルスは野生株よりもヒト気道上皮細胞における増殖能が著しく劣っていることがわかった。このことは、A/H3N2 ウイルスがヒト気道上皮細胞で効率良く増殖するには、NA の酵素活性が必須であることを示している。

A．研究目的

インフルエンザウイルスは宿主細胞表面上に存在するシアル酸を含む糖鎖をレセプターとして認識する。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）は、ウイルスが細胞表面から出芽する際、糖鎖からシアル酸を切断してウイルス粒子を細胞外へ遊離させる働きをもつ酵素である。最近、イヌ腎臓由来の Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞を用いて A/H3N2 亜型季節性インフルエンザウイルスを分離・継代すると NA の 151 番目のアスパラギン酸（Asp）に変異が入り、これによって NA の酵素活性が低下することが報告された。この成績は、NA の酵素活性が MDCK 細胞における H3N2 ウイルスの増殖にとって必須でないことを示唆している。一方、実際の季節性インフルエンザウイルスの感染の場であるヒト呼吸器上皮細胞において、NA の酵素活性がウイルス増殖にとって必須で

あるのか否かは明らかにされていない。

本研究では、インフルエンザウイルスの増殖における NA の酵素活性の役割を明らかにするために、NA の 151 番目のアミノ酸に変異を導入した H3N2 ウイルスを作成し、その変異ウイルスのヒト気道培養細胞における増殖性状を解析した。

B．研究方法

- (1) 分化したヒト気管 / 気管支上皮細胞：
市販のヒト気管あるいは気管支上皮細胞を *in vivo* のヒト気道と同様の形態になるように、分化誘導剤存在下、気相-液相境界面で 1 ヶ月間培養した。
- (2) A/H3N2 インフルエンザウイルス：
平成 24 年度（2012/13 シーズン）にインフルエンザワクチン株として選定された A/Victoria/361/2011(H3N2;Vic361)を用いた。

C . 研究結果と考察

MDCK 細胞で分離・継代した Vic361 株の NA 遺伝子の塩基配列を決定し NA のアミノ酸配列を推定したところ、151 番目のアミノ酸残基において野生型 (Asp) と変異型 [アスパラギン (Asn) またはグリシン (Gly)] が混在していることがわかった。

リバースジェネティクス法を用いて、NA 蛋白質 151 番目の Asp を Asn または Gly に置換した 2 種類の変異株を作出し、それら変異株のヒト気管 / 気管支上皮細胞細胞における増殖能を調べた。その結果、これら変異株は野生株と比較して、ヒト気管 / 気管支上皮細胞細胞における増殖速度が著しく低下していた。このことは、季節性 H3N2 ウイルスがヒト気道上皮細胞で効率良く増殖するには、NA の酵素活性が必要であることを示している。

D . 結論

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には、NA の酵素活性が必須である。

E . 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)

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

