

(添付資料5)

### 3. RNA 抽出キットについて

表8 各所でのRNA抽出

RNA抽出キット名	地衛研数	1回の抽出に使用する検体量	1回の抽出での溶出量
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	65	140 $\mu$ L 64地衛研	60 $\mu$ L前後 65地衛研
		138 $\mu$ L 1地衛研	
High Pure Viral RNA Kit (Roche)	6	200 $\mu$ L 6地衛研	50 $\mu$ L 6地衛研
RNeasy Mini Kit (QIAGEN)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	100 $\mu$ L 1地衛研
MagDEA viral DNA/RNA 200 (Precision System Science)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	50 $\mu$ L 1地衛研

#### <コメント>

RNA抽出キットについては、QIAamp Viral RNA Mini Kitを使用している地衛研が大多数でしたが、それ以外のキット(自動抽出装置を含む)を使用している地衛研もいくつかありました。抽出効率はキットにより異なることがあります。ウイルス RNA が高濃度の場合は RNA 抽出効率に問題がなくても、ウイルス RNA が低濃度の場合に、RNA 抽出効率が極端に悪くなるものもあります。反応試薬と同様、RNA 抽出キットについても感染研マニュアルに記載のキット以外を使用する場合は、そのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査に使用するかどうか、事前に検討していただく事をお勧めします。

(添付資料6)

<報告していただいた総合判定結果>

検体名	A	B	C	D	E	F
総合判定結果	A/H1pdm	A/H7	A/H3	A/H5	陰性(検出限界以下)	A/H5
その他の場合						
備考	conv PCR法での結果、A/H1 pdm	conv PCR法での結果、A/H7	conv PCR法での結果、A/H3	conv PCR法での結果、A/H5	conv PCR法での結果、陰性	conv PCR法での結果、A/H5

<総合判定結果へのコメント>

全てのパネル検体について、正しく判定できていました。

<報告していただいたパネル検体の結果>

\* 各検体の濃度は、500  $\mu$ Lの水で溶解後のおおよその濃度

パネル	RNA抽出必要なパネル					抽出不要パネル
	検体A	検体B	検体C	検体D	検体F	
パネルの亜型	H1N1pdm09	H7N7	H3N2	H5N2	H5N1	
copies/ $\mu$ L*	80	80	8	200	80	
データ1	Type A	31.1	32.1	35.5	30.5	32.5
	亜型	32.2	32.7	38.0	31.9	32.7
データ2	Type A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	亜型	0.0	32.4	35.0	30.9	31.8

<パネル検体の結果へのコメント>

・1回目の検査で、検体CのH3のCt値が陽性コントロールよりも高く出ていたため、再検査を実施されていますが、増幅曲線がきれいに確認できていた場合は、陽性として問題ありません。もし、再検査を実施する場合には、この検体は検出限界付近の濃度であると考えられるため、反応液中の検体濃度を上げて実施することをおすすめします。

・1回目の検査でH5およびH7検出系でスタンダードカーブを引けなかったため再検査を実施していますが、これらの検査に使用している陽性コントロールは検出限界付近の濃度の点も含むため、必ずしも全ての点が直線に乗るとは限りません。陽性コントロールで検出するべき希釈液で陽性となっていれば、検査の検出感度は担保できていると考えられます。今回、直線に乗らなかった理由としては、陽性コントロールの劣化や希釈液作製時の手技に起因する部分がある可能性もありますので、トラブルシューティングの必要性についてご検討ください。

<トラブルシューティングについて>

- 現時点で大きな問題は見受けられませんでしたので、トラブルシューティングの必要はありません。
- 現時点で見られた問題について、別添資料に従ってトラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。
- 現時点で見られた問題について、下記の方法に従って、トラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。  
方法：( )
- 現時点で問題は見られるものの、すぐにトラブルシューティングを行う必要はなさそうです。今後、検査結果を注視してください。

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

研究分担者 今井 正樹 東京大学医科学研究所・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  
第 1 室長

### 研究要旨

地方衛生研究所（地衛研）のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するための第 1 回目のアンケート調査から 2 年が経過し、また季節性 H3N2 亜型インフルエンザウイルスの性状変化（赤血球凝集活性の低いウイルスの出現や細胞変性効果[CPE]の確認困難なケースの増加）を鑑み、現在のウイルス分離検査環境を把握するため、第 2 回目のアンケート調査を実施した。全国 80 カ所の地衛研を対象に行い、77 カ所から回答が得られた。そのうち培養細胞を用いてウイルス分離している地衛研は 68 カ所であった。予想通り H3N2 亜型ウイルスに関してはウイルス分離・検査に関する意見が多数寄せられ、分離・同定の難しさが明らかとなった。しかしながら全体としてのウイルス分離効率については、第 1 回目のアンケート調査と同様、ウイルス分離を実施している地衛研の半数の機関で高い分離効率を有していた。一方で同様に分離効率の改善が見られていない研究機関も特定された。これらの機関から研修の要望のあった地衛研を対象に実地研修を行い、問題点を確認し、改善策を助言した。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルス株サーベイランスにおける変異ウイルスの出現の把握や新型ウイルスのヒトに対する病原体としてのリスク評価のためには、ウイルスの性状を解明する必要がある、そのためには分離ウイルスが不可欠である。日本においては、地方衛生研究所（地衛研）が、インフルエンザ様疾患患者から採取された臨床検体からのウイルス分離の中心的役割を担っている。したがって、サーベイランス体制を維

持、さらに強化するためには、一定期間ごとに地衛研におけるウイルス分離検査体制の現状を調査し、問題点を把握し改善することが重要である。そこで、2 年前の第 1 回目のアンケート調査に引き続き、ウイルス分離検査環境の現状を把握することを目的に第 2 回目のアンケート調査を実施した。

### B. 研究方法

全国 80 カ所の地衛研を対象にアンケート調査を実施した（添付資料 1 の「アンケー

ト調査用紙」を参照)。各地衛研におけるインフルエンザウイルスの分離効率について質問した。

平成 27 年 6 月 22 日付けで地方衛生研究所長に調査票を郵送し、平成 27 年 8 月 31 日締め切りで返信を依頼した。また、調査票はメーリングリストで直接インフルエンザ担当者宛にも送付された。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C. 研究結果および考察

#### 1) 第 2 回アンケート調査

全国 80 カ所の地衛研を対象に行い、77 カ所(46 都道府県、31 政令指定都市、中核市・特別区)から回答が得られた(回答内容の詳細については、添付資料 2 を参照)。

77 機関のうち、培養細胞を用いたウイルス分離を実施している地衛研は 68 機関であった。これらの機関に対し 2014/15 シーズン(平成 26 年 10 月 1 日から平成 27 年 5 月 31 日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査結果が確定したものを対象)におけるインフルエンザウイルス分離に関する質問を行った。

68 機関中 67 機関(うち 1 機関は B 型ウイルスに対してのみ)は細胞変性効果(CPE)を確認後、ウイルスの型・亜型を同定しており、そのうち 61 機関については、CPE が確認されなかった場合には盲継代を実施していた。

分離されたウイルスの型/亜型同定法に関しては「HI 試験」と「遺伝子検査(リアルタイム RT-PCR、Conventional RT-PCR など)」を併用している機関が最も多く 43 機関(63%)であった。続いて「HI 試験のみ」(14 機関、20.5%)、「遺伝子検査(のみ)」(10 機関、15%)であった。1 機関(1.5%)については型によって方法を変えていた。「HI

試験」と「遺伝子検査」を併用する機関が最多であった背景には、もともとそのような方法を採用していた地衛研もあったが、H3N2 亜型ウイルスの性状変化(赤血球凝集活性の低いウイルスの出現)に伴い、「遺伝子検査」も採用した地衛研が増えたことが挙げられる。また「HI 試験のみ」と回答した機関でも、培養上清中の HA 価が低い場合には「遺伝子検査」を採用している、あるいは採用予定であると回答している機関があった。

分離効率に関しては、75%以上の高い効率で分離している研究機関が 68 機関の半数(34 機関)を占めた。残りの半数は、50~74%(25 機関:36.8%)、25~49%(2 機関:2.9%)、または 25%未満(7 機関:10.3%)の効率でウイルスを分離していた。50%以上の効率で分離していた機関は前回のアンケート調査より増えており、理由は不明であるが改善が認められた。一方で分離効率が 50%未満の機関の中には、技術的な面も考えられたが、検体の中には簡易キットで使用した綿棒をそのまま輸送培地に入れて持ち込まれるケースや遺伝子検査で陰性のもも少なからずあり、医療機関での採材法の問題点を指摘する声も寄せられた。しかしながら、前回の調査から改善がみられていない地衛研もあり、これらの機関に対しては分離効率改善の手立てを講じる必要がある。

#### (2) 実地研修

今回のアンケート調査において、前回の調査から改善の見られていない地衛研が特定された。これらの機関から研修の要望があった 2 機関において、それぞれの機関で実地研修を行った。

A 機関:3 人でウイルス分離を担当しているとのことであった。現在使われている手法

の説明を受けながら、実際の細胞培養を実施してもらった。手技的には大きな問題点は見られなかったが、細胞そのものの形態や状態が良くなく、それがウイルス分離効率に大きく影響していると考えられた。その際培地の組成を確認したが、冷蔵保存すべき溶液を室温保存していたことが判明した。培養細胞の培地の確認の際に、臨床検体輸送培地についても確認したところ、臨床検体輸送培地については pH が調整されていないことが判明した。これらの不備の原因のひとつには、担当者の引継ぎがうまく行っていないことが挙げられた。改善策を助言することで対応した。A 機関においては、A 機関での実地研修だけでなく、この研修の確認という意味で感染研でも研修を行った。

B 機関：ほぼ1人で担当しているとのことであった。現在使われている手法の説明を受けながら、実際の細胞培養を実施してもらった。細胞の形態や状態が特に悪いという印象ではなかったが、前任者からの引継ぎがうまく行っていないようで、細胞培養のポイント（日々の細胞の観察や定期的な継代など）を理解していないようであった。また、インフルエンザウイルスの CPE についてもよく理解していなかった。これについては、実地研修することが出来なかったため、対応策を助言した。

2 機関ともに共通していたことは、前任者からの引継ぎがうまく行っていなかったこと、また経験者がいなかったことが挙げられる。これらの点は前回のアンケート調査でも多くの機関から寄せられた点である。現在は高い分離効率を維持している地衛研は半数あるが、これらの地衛研においても同じ状況になる可能性がある。そのようになれば、地衛研組織の弱体化が進行し、近

い将来日本の株サーベイランスシステムが機能しなくなる可能性がある。その結果、毎年の流行株から適切なワクチン製造株を選択することが困難になり、さらには、新型ウイルスや薬剤耐性ウイルスの発生や国内侵入を迅速に検知できなくなる事態に直面するかもしれない。実験室担当者の実験室診断に関する知識や技術レベルを向上させ、一定水準に保つには、定期的な講習会・技術研修会の開催が不可欠であり、それを実行するには、国からの強力な支援措置が必要である。

#### D. 結論

第2回目のアンケート調査からも前回調査同様、高い分離効率でウイルス分離が実施されており、また多くの機関で盲継代が実施されるなど、ウイルス分離に対する取り組みがよく分かり、サーベイランスとして機能していると考えられた。一方で、分離効率の改善されていない機関が浮き彫りになり、これらの機関については早急に対応策が必要である。全国的なサーベイランスの状況を把握するために、今回同様、定期的なアンケート調査は不可欠である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. *Jpn J Infect Dis in press*, 2015.

Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Molecular

determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus. *J Virol* 89:11337-11346, 2015

Shoemaker JE, Fukuyama S, Einfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation. *PLoS Pathog* 11:e1004856, 2015.

Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun* 6:6600, 2015.

Ping J, Lopes T.J.S, Nidom CA, Ghedin E, Macken CA, Fitch A, Imai M, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. *Nat Commun* 6:8148, 2015.

Hanson A, Imai M, Hatta M, McBride R, Imai H, Taft A, Zhong G, Watanabe T, Suzuki Y, Neumann G, Paulson JC, Kawaoka Y. Identification of Stabilizing Mutations in an H5 HA Influenza Virus Protein. *J Virol* (in press), 2015.

## 2. 学会発表

なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 添付資料 1 H27 年度アンケート調査票

### **【アンケート調査票の記入方法】**

回答は、該当する番号を○で囲んでください。

調査票は、Faxまたはe-mailにて、下記返送先に平成27年8月31日（月）までにご返送ください。ご不明な点やご質問がありましたら、下記問い合わせ先にご連絡をお願い致します。

またお手数をお掛けいたしますが、ご回答していただいた方のお名前、ご所属、ご職名、電話番号、e-mailアドレスを記入していただけますと幸いに存じます。

### 調査票の返送先：

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第一室

Fax: 042-561-6149

e-mail: sw@nih.go.jp

### 調査票の問い合わせ先：

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第一室

渡邊真治

TEL: 042-561-0771 (代)

e-mail: sw@nih.go.jp

### 回答された方のご連絡先：

お名前

ご所属

ご職名

電話番号

e-mail

添付資料 1 H27 年度アンケート調査票

問 1 遺伝子検査法（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを検出している。

- (1) はい (2) いいえ

問 2 培養細胞を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを分離している。

- (1) はい (2) いいえ

(問 2 で「(2) いいえ」を選択された方は、ここでアンケートは終了です。ご協力ありがとうございました。)

問 3- 1 ウイルス分離をする際、細胞変性効果 (CPE) の有無を確認後、ウイルスの型・亜型同定を行っている。

- (1) はい (2) いいえ

(問 3- 1 で「(2) いいえ」を選択された方は、問 4- 1 へお進みください。)

問 3- 2 ウイルス分離検査でCPEが確認されなかった場合、盲継代を実施している。

- (1) はい (2) いいえ

問 4- 1 分離されたインフルエンザウイルスの亜型/型同定法について、該当する番号に○をお付けください。

- (1) HI試験のみで亜型/型を同定している。  
(2) 遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）のみで亜型/型を同定している。  
(3) 「HI試験」と「遺伝子検査」の両方で亜型/型を同定している。

問 4- 2 問 4- 1 で「1」を選択された方は、次の設問へのご回答をお願い致します。

CPEは確認できるが、培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった場合（4HA/25 $\mu$ l 未満）、どのようにしてウイルスの亜型/型を同定していますか？

問 4- 3 問 4- 1 で「2」を選択された方は、次の設問について、該当する項目に○をお付けください。

- (1) CPEの有無に関わらず、全ての検体の培養上清について遺伝子検査を実施している。  
(2) CPEが確認された検体の培養上清のみを対象に遺伝子検査を実施している。

問 4- 4 問 4- 1 で「3」を選択された方は、次の設問について、該当する項目に○をお付けください。

- (1) 培養上清中の HA 活性が陰性あるいは低かった (4HA/25 $\mu$ l 未満) ことから、HI 試験ができないので、遺伝子検査を行っている。
- (2) 初めに HI 試験で亜型/型を同定し、その後遺伝子検査でも確認している。
- (3) 初めに遺伝子検査で亜型/型を同定し、その後 HI 試験でも確認している。
- (4) その他 (記載をお願い致します。)

問 5- 1 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合 (ウイルス分離数<sup>§</sup>の臨床検体数に対する比率) はどのくらいですか? 2014/15 シーズン (平成 26 年 10 月 1 日から平成 27 年 5 月 31 日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査の結果が確定したもの) における割合について、できる限り正確にお答えください (例: 75%)。ただし、以下の 4 種類の検体は除いて計算してください。  
①インフルエンザ迅速診断で使用された調整液、②うがい液、③抗インフルエンザ薬投与患者の検体④CPE は確認されなかったが、遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体

(<sup>§</sup>ここでいう分離数とは、臨床検体を接種して CPE が確認された培養細胞の上清中に含まれるウイルスが HI 試験/遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体数をいいます。)

問 5- 2 問 5- 1 で割合が 50%未満と回答された方は、次の設問で該当する項目がありましたら○をお付けください。

- (1) 平成25年度から平成27年度の間に検査担当者が交代した。
- (2) ウイルス含量が少ない臨床検体\*が多かった。

\*リアルタイム RT-PCR の Ct 値などを目安に、大まかなウイルス含量を確認した臨床検体

添付資料 1 H27 年度アンケート調査票

- (3) その他、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお書きください。

その他、ウイルス分離に関しまして、ご質問等ございましたら、ご自由にお書きください。

ご協力ありがとうございました。

## 添付資料 2

### 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追跡調査」結果のまとめ

#### アンケートの調査対象・回答率

対象：80の地方衛生研究所（47都道府県、33指定都市・中核市・特別区）

回答機関：77の地方衛生研究所（46都道府県、31指定都市・中核市・特別区）

#### 問 1 遺伝子検査法（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを検出している。

はい：67機関（87%）

いいえ：10機関（13%）

#### 問 2 培養細胞を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを分離している。

はい：68機関（88%）

いいえ：9機関（12%）

#### 問 3- 1 ウイルス分離をする際、細胞変性効果（CPE）の有無を確認後、ウイルスの型・亜型同定を行っている。

ウイルス培養実施 68機関中

はい：66機関（97%）

いいえ：1機関（1.5%）

はい（B型） いいえ（H3亜型）：1機関（1.5%）

#### 問 3- 2 ウイルス分離検査でCPEが確認されなかった場合、盲継代を実施している。

CPE確認実施 66機関中

はい：61機関（92%）

いいえ：5機関（8%）

#### 問 4- 1 分離されたインフルエンザウイルスの亜型/型同定法について、該当する番号に○をお付けください。

ウイルス培養実施 68機関中

(1) HI試験のみ：14機関（20.5%）

(2) 遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）のみ：10機関（15%）

(3) 「HI試験」と「遺伝子検査」の両方：43機関（63%）

（その他）HI試験（B型）HIおよび遺伝子検査（H3亜型）：1機関（1.5%）

#### 問 4- 2 問 4- 1 で「1」（HI試験のみ）を選択した機関 14機関中

## 添付資料 2

CPEは確認できるが、培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった場合（4HA/25 $\mu$ l 未満）、どのようにしてウイルスの亜型/型を同定していますか？

- ✓ 今シーズンは継代を繰り返して（最大6代）CPEが確認できた株は全て8HA以上となったが、継代してもHA活性が低い場合は遺伝子検査で亜型を同定しなければならなくなる場合もありえる。
- ✓ ウイルス分離と同時に臨床検体からの遺伝子検査も実施しており、その際に亜型同定も行っている。
- ✓ 臨床検体のConventional RT-PCRを実施することで型別をしているので、CPEが確認出来たが、HA活性が低い場合は、その上清を用いてもう一度PCRを実施はしていない。その場合、型別はPCRの結果を用い、ウイルス分離は（－）として報告している。
- ✓ CPEが確認できた検体について、接種量を変更しDIについての検証を実施する。CPEが確認できた場合、HA活性を再度確認する。それでも、HA活性が陰性あるいは低かった場合、Real Time PCRにてウイルスの亜型/型を同定している。
- ✓ 殆どの検体が4HA/25 $\mu$ l 以上であり、HI試験が可能であった。場合にもよりますが、万が一、4HA/25 $\mu$ l 未満だった場合、リアルタイムRT-PCRを考慮する。
- ✓ 培養上清を再度培養細胞へ接種することをHA活性があがるまで行う（今のところ継代によりHA価が上昇している）。
- ✓ 臨床検体からリアルタイムRT-PCRを用いて亜型/型を同定している。
- ✓ HA活性が高くなるよう継代を行い（おおよそ2代）、2014/15シーズンについてはCPEが確認されたものはすべてHI試験にて同定できた。
- ✓ 遺伝子検査を併用し同定を行う。
- ✓ ウイルス培養液を希釈して4代まで継代をしている。継代しても活性が上がらない場合は、型別不能とし、NESIDへはダミー入力をしている。
- ✓ 培養上清のリアルタイムRT-PCRを実施。
- ✓ 継代し、再度HAを行う。
- ✓ CPEが確認できた場合、培養上清中のHA活性が低いためにHI試験が実施できなかった事例はなかった。
- ✓ もしHA活性が低い株が分離された場合はリアルタイムRT-PCRで確認する予定である。

問4-3 問4-1で「2」（遺伝子検査のみ）を選択した機関 10機関中

- (1) CPEの有無に関わらず、全ての検体の培養上清：2機関（20%）
- (2) CPEが確認された検体の培養上清のみ：8機関（80%）

問4-4 問4-1で「3」（「HI試験」と「遺伝子検査」の両方）を選択した機関 43機関中

- (1) 培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった（4HA/25 $\mu$ l 未満）ことから、HI試験ができないので、遺伝子検査：21機関
- (2) 初めにHI試験で亜型/型を同定し、その後遺伝子検査：1機関
- (3) 初めに遺伝子検査で亜型/型を同定し、その後HI試験：11機関
- (4) その他：9機関

## 添付資料 2

(3)+(4) : 1機関

その他

- ✓ 流行期は基本的にHI試験のみで亜型/型を確定。HA価が低い場合には、①もう1～2代は継代を続け、それでHA価が上がればHI試験に進む。②HA価が変わらない場合は、培養上清について遺伝子検査を実施し同定する。流行期以外の検体については、培養を行わずに遺伝子検査のみで亜型/型を同定する場合もある。
- ✓ 初めにCPEが確認された検体の培養上清のみを対象に遺伝子検査を実施し、その後各亜型/型から数株を選択してHI試験を実施している。
- ✓ CPEを確認後、HI試験で亜型/型を同定。HA活性が陰性あるいは低かった場合、遺伝子検査を行い同定。
- ✓ 臨床検体を遺伝子検査後、分離培養しています（基本はHI試験で、遺伝子検査は補助的）。
- ✓ CPE(+)の検体については、培養上清のHA $\geq$ 4であればHI試験で亜型/型を同定し、4以下であった場合は、先に行った臨床検体の遺伝子検査の結果をもって分離同定としている（培養上清に対する遺伝子検査は行っていない）。
- ✓ 基本はHI試験にて同定。分離株のHA活性が低い場合、培養上清を継代することでほとんどの株はHA値が確保できる。まれに、継代してもHA活性が低いままの株については、培養上清よりRNAを抽出後、遺伝子検査の実施。
- ✓ 基本はHI試験、HA活性が低い場合は培養上清にて遺伝子検査実施。細胞障害等で培養検査不能の場合も遺伝子検査を実施。
- ✓ インフルエンザシーズン当初は細胞培養と遺伝子検査を併用実施。細胞の状態が良好になれば、培養細胞のみ。インフルエンザ様疾患の検体で培養細胞が陰性の場合、遺伝子検査を実施しウイルスの有無を確認。2014/2015シーズンにはMDCK細胞でCPE陽性；HA価の上昇がなくHI試験が困難な検体が3例認められ、細胞上清を50倍希釈しリアルタイムPCRでウイルスの亜型/型を同定。
- ✓ HI試験に用いるモルモット血球を流行期に月1回購入している。保健所に約1週間で検査結果を求められるので、モルモット血球が無い場合は遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCR）で同定し、後に全てHI試験を実施。

問5-1 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合（ウイルス分離数<sup>3</sup>の臨床検体数に対する比率）はどのくらいですか？2014/15シーズン（平成26年10月1日から平成27年5月31日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査の結果が確定したもの）における割合について、できる限り正確にお答えください（例：75%）。ただし、以下の4種類の検体は除いて計算してください。

①インフルエンザ迅速診断で使用された調整液、②うがい液、③抗インフルエンザ薬投与患者の検体④CPEは確認されなかったが、遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体

（\$ここでいう分離数とは、臨床検体を接種してCPEが確認された培養細胞の上清中に含まれるウイルスがHI試験/遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体数をいいます。）

## 添付資料 2

ウイルス分離実施68機関中、

- 25%未満：7機関（10.3%）
- 25%以上－50%未満：2機関（2.9%）
- 50%以上－75%未満：25機関（36.8%）
- 75%以上：34機関（50.0%）

問5-2 問5-1で割合が50%未満と回答された方は、次の設問で該当する項目がありましたら○をお付けください。

分離率が50%未満と回答した9機関中、

- (1)平成25年度から平成27年度の間検査担当者が交代した。：1機関（11%）
- (2)ウイルス含量が少ない臨床検体\*が多かった。：1機関（11%）
- \*リアルタイムRT-PCRのCt値などを目安に、大まかなウイルス含量を確認した臨床検体
- (3)その他、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお書きください。3機関（33%）
- (1)+(2)：2機関（22%）
- (1)+(3)：1機関（11%）
- 回答なし：1機関（11%）

- ✓ ウイルス分離を試みて培養陰性となった14検体のうち、13検体はリアルタイムRT-PCRにてインフルエンザウイルスが同定された（臨床検体の結果）。その多くはCT値が28～32で検出されたが、ウイルス含有量が多いと考えられるCT値22の検体でもウイルス分離ができていない。ちなみに、うがい液を用いウイルス分離可能であった検体でCT値は28であった。また、昨年度、インフルエンザ病原体定点の変更があったが、ウイルス分離数の割合に大きな違いは認められなかった。よって、検体の採取方法というより、ウイルス含量及び、当所における培養法や培養細胞株等にウイルス分離効率の低い原因があるのではないかと考えている。
- ✓ 過去には、診断名「インフルエンザ」（疑い含む）の患者の元検体（咽頭ぬぐい液）全てについてリアルタイムRT-PCRを実施したが、いずれのシーズンも約半数の検体でインフルエンザ遺伝子が検出されず。2014/2015シーズンについては、元検体のリアルタイムRT-PCRは未実施だが、医療機関における迅速キットの検査結果が陰性であった患者の検体も少なからずあり、過去の結果も勘案すると、ウイルス分離が可能な状態でない検体が多く含まれていた可能性がある。
- ✓ 盲継代を実施していない。
- ✓ 培地組成・培養温度等に問題があり、培養条件が不適切だった。
- ✓ MDCK細胞を変えたため分離率が悪かった。
- ✓ 今年度は、3代継代してもCPEがでないインフルエンザ検体（特にAH3）が多かった。
- ✓ 病院から搬入された咽頭拭い液の検体に、インフルエンザ簡易キットで使用した綿棒をそのまま輸送培地に入れて持ち込まれた検体が多かった。
- ✓ 通常は分離培養によりCPEの有無を確認した後、CPEが確認された症例については培養細胞の上清を用いてHI試験による型別を実施し、HAが低い場合にはリアルタイム

## 添付資料 2

RT-PCR法による型別同定を実施している。しかし、2014/15シーズンではCPEが確認されない症例が多かったため、シーズン途中からは検体からの分離培養と遺伝子検査を同時に実施していた。CPEが確認できた症例のうち、HI試験で同定できた症例を除いては上清からのリアルタイムRT-PCRによる型別同定を実施していないことが、分離率が低かった原因の一つと考えられる。なお、CPEが確認されたがHAがみられなかった症例が多かったことについては、ウイルス分離に使用している細胞において、2014/15シーズンに流行していたAH3型の増殖があまり良くなかった可能性が考えられる。

- ✓ 疾病名がインフルエンザで搬入されたすべての検体について分離検査を実施しているため（インフルエンザウイルスが陰性の検体についても、分離検査を実施している）。

### その他、ウイルス分離に関しまして、ご質問等ございましたら、ご自由にお書きください。

（原文そのまま）

- ✓ H3亜型に関しては、年々MDCK細胞でのウイルス分離では継代を重ねないとHA活性が上昇しにくくなっている印象がありますが、何か良い改善法はないのでしょうか。例えばシアロ糖鎖をコーティングしたラテックス粒子で、より低濃度のウイルスでも凝集反応が観察できるような測定系を構築するなどといったようなものです。
- ✓ HA価低値であったため継代したところ、（培養上清を希釈して使用しても）HA価そのものが消失してしまった検体が数検体あった。
- ✓ 継代してもHA活性が上がらないときの改善方法をご教示下さい。
- ✓ インフルエンザウイルスの盲継代は何代まで実施すればよいのか、また、同様に、CPEは確認できるが、HA活性が低い場合の継代に関してもどのようにしたらよいのか、ご教示頂きたい。
- ✓ 当所では、継代する際に回収した培養液をそのまま接種していますが、やはり凍結融解を行ったほうが分離効率はいいのでしょうか。
- ✓ 分離検査を左右する要因として、ウイルス輸送培地や採取検体種（例えば喀痰は細菌やカビ等コンタミが多く、不適と考えています）、採取時期、輸送までの温度や時間等も考慮すべきです。特に輸送培地は重要で、横浜市衛研はオリジナルの培地を定点、保健所、病院に配布しています。
- ✓ ある地研から分離できないとの相談を受けた時、分離までの保存がマイナス20度だったことがあり、変更したところバリバリ分離できたそうです。
- ✓ 来年度4月からの感染症法改正により、発生動向調査における検査法のSOP作成が必要となるが、当所において、季節性インフルエンザのウイルス分離割合が低いことから、統一した検査法についての研修を実施してほしい。
- ✓ 今後、発生動向調査における精度管理も検討していく中で、国からのMDCK細胞の再分与はあるのか。
- ✓ 使用している培養液の組成や盲継代を何代続けているか等、ウイルス分離効率の高い施設と当所の違いがどこにあるのかを知りたい。そのためにも、培養法における基礎的な研修も行ってほしい。

## 添付資料2

- ✓ ウイルス分離陰性であった検体を遺伝子検査に用いる場合、当所では臨床検体を使用しているが、培養上清を使用した方がよいか。
- ✓ 当センターでは、搬入された臨床検体のすべてについて最初にリアルタイムPCRを行っています。結果、型が確認された検体のうち週3検体を目安にウイルス分離培養を行っています。リアルタイムPCRの結果より、Ct値が早い（20前後から30位まで）検体の中から、型・医療機関に偏りがないように検体を選び、ウイルス分離培養へ進めています。ウイルス分離培養液から、リアルタイムPCRによる型の確認は行っていません。
- ✓ 昨年度、ウイルス分離率が例年よりも低かったため貴所からMDCK細胞を分与していただきましたが、当所の細胞株よりも増殖が悪く、分離率も低い結果となりました。マイコプラズマチェックはされていますか。また、これまでに何種類かMDCK細胞を使用してきましたが、貴所の細胞株は形態学的にみてかなりヘテロな気がします。
- ✓ 臨床検体からウイルス分離を行う場合に、盲継代を続ける妥当な継代数はありますか。
- ✓ A香港型ウイルスをMDCK細胞で分離する場合、CPEが十分認められる分離株（HA価が認められない場合）の継代培養は変異の導入が起こる可能性があるため、不必要と考えられますか。
- ✓ ウイルス分離検査でCPEが確認されない場合、盲継代を実施しますが、一般的に何代ぐらい継代するのでしょうか。
- ✓ 使用培地についてですが、現在マニュアルに掲載されているDMEMはMDCK細胞がうまく培養できなかったので使用していません。イーグル培地にて培養しています。支障なく培養できていますが、今後マニュアルに従ってDMEMに変えていった方がよいのかご教授していただけたらありがたいです。よろしくお願いたします。
- ✓ 全体としてはAH3亜型の分離率が低くなって来ていると感じています。
- ✓ 当所では、感染研マニュアル（インフルエンザ診断マニュアル第3版）とは異なる検査フローで試験を実施しているため、本アンケートの設問が当所の内容にそぐわない。
- ✓ 当センターでは、ウイルス分離にかかる負担を軽減するため、臨床検体全数について、リアルタイムRT-PCRによるインフルエンザウイルス遺伝子検出を実施し、リアルタイムRT-PCR陽性検体のみMDCK細胞に接種している。しかしながら、シーズン中にはインフルエンザ検体が集中して搬入されるので、基本的に全例MDCK細胞に接種し、後にリアルタイムRT-PCR陰性とわかった検体については、CPEが確認されない限り、盲継代は実施していない。今シーズン、リアルタイムRT-PCRでFlu(+)であったが、ウイルス分離陰性の6検体については、MDCK細胞で3継代での陰性であるが、いずれもA/H3亜型であり、臨床検体のリアルタイムRT-PCRでCt値が比較的高い、もしくは、検体の採取日から当センターへの搬入日までに時間が経過している等、検体の条件が比較的悪いものであった。
- ✓ 年度により、MDCK細胞にインフルエンザ検体を接種し培養しても1週間でCPEが出るときもあれば、3代継代してもまったくCPEが出ないのは、どうしてなのかがわかりません。添加するトリプシンの濃度1%に関係しているのか。また、MDCK細胞の性質により、分離率が異なるのか、冷凍保存する場合の細胞凍結方法により、細胞の性質が変わるのか、メジウムの作成に伴うPH等により異なるのか、不明です。

## 遺伝子情報計算科学を基にハイリスク変異株の予測・評価法の開発

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）、伊藤公人（北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門・教授）

### 研究要旨

本年度は、インフルエンザウイルスのリスク予測の精度向上に必要な大規模計算の実施基盤を強化した。北大・人獣共通感染症リサーチセンターとの共同研究を通じて、同センターのスーパーコンピュータを使用して、国立感染症研究所で分子動力学計算を実施し、情報を共有する体制を整えた。この連携基盤を用いて A(H3N2) ウイルスの粒子上の HA タンパク質を近似する糖鎖付加型 HA 三量体分子の分子動力学シミュレーションを実施し、溶液中の動的構造データを 1 万通り収集した。これにより、リスク予測の精度向上に利用可能な情報と技術の基盤強化が着実に進んだ。

### A. 研究目的

2013 年にノーベル化学賞を受賞した分子動力学法 (MD simulation) を用いれば、実験解析では困難な情報を入手できる。例えば、溶液中のタンパク質構造の揺らぎの情報を原子レベルで得ることができる。タンパク質の動的振る舞いは、分子の相互作用と機能発現に重要な働きをすることがわかっている。

MD simulation を取り入れれば、変異によるタンパク質相互作用表面の物性変化をより詳細に解明できる。この情報は、ウイルスの受容体指向性、薬剤感受性、抗原性・抗体感受性等の予測精度向上に役立つ。そこで本年度は、MD simulation の活用基盤を強化した。

### B. 研究方法

HA タンパク質をモデル分子として MD simulation を実施することにより、A. イン

フルエンザ研究センター、B. 人獣共通感染症リサーチセンター、C. 病原体ゲノム解析研究センターの 3 者が連携する疫学・計算科学の統合環境を構築する。

### C. 研究結果

#### (1) 分子疫学情報入手体制整備：

MD simulation の効果的な実施には、対象分子とその変異情報の入手が不可欠である。解析すべき分子・変異の選別を適切に行う為に、国立感染症研究所・インフルエンザ研究センター・第一室との共同研究体制を整えた。これにより、国内と海外の株サーベイランスの最新情報を両研究部門で共有する体制が整った。

#### (2) MD simulation の実施環境整備：

MD simulation の実施には高性能コンピュータの存在が不可欠である。MD の高速計算を可能とする高性能サーバは、高額で容易に購入できない。これまでに病原体ゲノ

ム解析研究センターに整備したサーバは、通常は種々の病原体分子の構造解析研究業務に使用しているため、要事に使用できる保証が無い。この問題を解消するために、スーパーコンピュータとMD simulationの実施環境をもつ北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターのバイオインフォマティクス部門（伊藤教授）との共同研究体制を構築した。これにより、病原体ゲノム解析研究センターにおいて、人獣共通感染症リサーチセンターの所有するスーパーコンピュータを使用してMD simulationを実施し、成果を共有することが可能となった。

### (3) 北大・感染研の連携体制整備：

HA タンパク質をモデル分子として MD simulationを開始することにより、病原体ゲノム解析研究センターをハブとして感染研と北大がつながり、インフルエンザウイルスの疫学・構造科学情報を共有し、インフルエンザ対策を進める体制を整えた。

### (倫理面への配慮)

該当無し。本研究は、計算機を用いた解析であり、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。

### D. 考察

新型ウイルスや未報告の変異ウイルスが海外で発生した場合、ウイルスの迅速入手は不可能である。本研究では、ウイルスの遺伝子情報から抽出できるタンパク質構造情報を利用して、ウイルスのリスク評価を行う方法を考案し、これに必要な計算科学基盤を整備した。当該年度は、特にMD simulationの実施環境の整備に重点をおいた。その結果、病原体ゲノム解析研究センター・インフルエンザ研究センター・北大バイオインフォマティクス部門の3者連携

体制が生まれた。共同でMD simulationを実施し、インフルエンザウイルスの疫学・構造科学情報を共有してインフルエンザ対策を進める体制を整えた。これにより、ウイルスの迅速入手は不可能な状況下でのリスク管理を論理的に進める為の連携・技術基盤が生まれた。

今後は、これまでに病原体ゲノム解析研究センターに整備した種々の *in silico*解析技術（分子モデリング、変異導入解析など）とMDの技術を組み合わせることで、変異株のリスク評価やリスク変異の予測精度向上を図る。

### E. 結論

本研究により、MD simulationの実施環境と連携体制の整備が進んだ。これにより、粒子上のHAタンパク質の動的特性と活性発現、並びに変異に伴う物性・活性変化を解明し、リスクの予測精度を向上するための技術基盤が強化された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013–2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:2607–2017.

#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌：

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015.	Jpn. J. Infect. Dis.	69(1)	83-6	2016
高橋雅輝、岩瀨香織 佐藤直人、五日市恵里、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26年度)インフルエンザ2013/2014シーズン及び2014/2015シーズン	岩手県環境保健研究センター年報	第14号平成26年度(2014)	95-103	2016
芦塚由紀、吉富秀亮、中村麻子、濱崎光宏、堀川和美、世良暢之	福岡県における2014/15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42号	69-73	2016
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(2014年9月~2015年5月)	横浜市衛生研究所報	54	55-62	2016
久場由真仁・喜屋武向子・新垣絵理・高良武俊・加藤峰史・岡野祥	沖縄県における2014/15シーズンのインフルエンザ流行の特徴	沖縄県衛生環境研究所所報	49号	77-80	2016
Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T.	Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014.	Emerging Infectious Diseases.	22(3)	557-559	2016
安井善宏、尾内彩乃、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、土屋啓三、深瀬文昭、有賀みはる、片岡泉、糟谷慶一、片岡博喜	2015/16シーズン初めに保育園集団かぜから分離されたAH1pdm09インフルエンザウイルス-愛知県	病原微生物検出情報	36(11)	224-225	2015
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 cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan.	Antimicrob. Agents. Chemother.	59(5)	2607-17	2015
Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y.	Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies.	Nat. Commun.	6	6600	2015