

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

研究代表者 小田切孝人 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター・  
センター長

### 研究要旨

本研究期間（H25-27 年度）では、全国地方ブロック代表のコア地方衛生研究所（地衛研）6 機関およびサポート地衛研 5 機関からなるコア・サポート地衛研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（感染研）との連携ネットワークで構築し試行、改定を行ったインフルエンザウイルス PCR 検査の外部精度管理評価試験（External Quality Assessment, EQA）を参加要望のあった全国の地衛研で実施し、年度ごとに試験パネルを改訂しながら 3 回実施した。これにより、PCR 検査の精度が向上し全国規模での検査の「質」が確保され始めている。検査の EQA は平成 28 年度から施行される改正感染症法で義務づけられることから、本研究での EQA は法の施行に先立ったモデルケースとなった。これと並行して各地衛研で検査の手順書や教育訓練記録書等の文書整備も必要となることから、それを支援するためにモデルとなるひな形の文書案を提示した。一方、インフルエンザサーベイランスにおいて病原体自身を確保するための環境と技術を確認し、必要に応じて改善対応を支援するために、2 度にわたりアンケート調査を実施し、ウイルス分離効率の悪い施設に対しては改善策を助言し現地研修を実施した。計算科学の諸技術を用いてウイルスの変化予測、リスク評価の情報をインフルエンザ株サーベイランスと融合し、サーベイランスの強化やワクチン株の検索に有効活用できる基盤の整備に取り組んだ。これは WHO が H28 年度から取り組む計算科学による流行株変異予測技術の確立とワクチン株選定への応用プロジェクトにも有用な情報提供となる。一方、本研究班で取り組んだウイルス遺伝子の大量解析処理に関する研究、薬剤耐性ウイルスの検出系の改良、およびワクチン接種により誘導される抗体価をもとにしたワクチンの有効性の評価に関する研究は、研究予算の削減により本研究班での継続が困難となり、研究期間途中で頓挫せざるを得なかった。国内のインフルエンザ対策を進める上でこれら行政施策に直結した研究への安定した予算措置が今後の課題である。

## A . 研究組織

研究代表者

小田切孝人 国立感染症研究所インフル  
エンザウイルス研究セ  
ンター長

研究分担者

皆川洋子 愛知県衛生研究所所長  
齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学系  
教授 (H25-26 年度)

藤田信之 製品評価技術基盤機構バ  
イオテクノロジーセンタ  
ー次長 (H25 年度)

佐藤裕徳 国立感染症研究所病原  
体ゲノム解析研究センタ  
ー室長

影山努 国立感染症研究所インフ  
エンザウイルス研究セン  
ター第 2 室室長

高下恵美 国立感染症研究所イン  
フエンザウイルス研究セ  
ンター主任研究官 (H25  
年度)

## B . 研究目的

本研究班の第 1 期 (H22-24 年度) では、  
新型インフルエンザ発生の際に、PCR 診断  
検査、株サーベイランスの最前線になる地衛  
研と密な意思疎通と効率的な連携ができる  
ように、コア・サポート地衛研 - 感染研共同  
研究体制を発足させた。全国の地衛研におけ  
る PCR 検査精度の向上と検査の「質」の確  
保を目標に、外部精度管理評価試験  
(External Quality Assessment, EQA) を  
企画し、第 1 段階では、コア・サポート地衛  
研で試行し、全国規模で実施するための問題  
点の把握と改善を行い、第 2 段階にあたる本  
研究期間に、それを全国地衛研で 3 回実施し、  
PCR 検査精度の均てん化と EQA を定期的

に実施するための基盤整備を目標とする。

また、H28 年度に改定感染症法が施行され  
ることから、検査手順書や教育訓練記録書の  
文書整備も必要となるため、ひな形となる基  
本文書を提示して、各地衛研における文書整  
備を支援する。

一方、サーベイランスで収集した検体から  
インフルエンザウイルスを分離し、その性状  
解析とワクチン候補株の検索に資する情報  
発信も重要である。このため地衛研における  
ウイルス分離環境と効率を把握し、改善の必  
要性があればそれを支援する。

インフルエンザ薬剤耐性株に継続的なモニ  
ターと検出系の改良を進める。また、流行株  
の遺伝子情報の大量処理により、流行ウイル  
スの遺伝学的なトレンド把握を支援する。

一方、新型インフルエンザの発生時には、原  
因ウイルスの入手には数ヶ月という長い時間か  
かり、入手を待っていると初動対応の遅れに  
より、流行拡大や健康被害の増大につながる。  
近年では、新型インフルエンザウイルス発生当  
事国は、速やかに遺伝子情報を開示すること  
が紳士協定として履行されていることから、ウ  
イルスが入手できなくても遺伝子情報をもとに  
リスク評価を行うことは可能である。そのため、計算  
科学を用いたウイルスのリスク評価や変化予測  
をより短時間で高い精度で行うことが求められ  
始めている。これは、新型インフルエンザのみ  
ならず、季節性インフルエンザワクチンの検索  
や選定においても、強力な支援ツールとなる。  
このため、H28 年度から WHO は国際連携プロ  
ジェクトを立ち上げ、ワクチン株選定法の改良  
に取り組むことになっている。本研究班の計算  
科学を用いたリスク評価や変化予測の取り組  
みは、これを先取りした対応であり、本研究から  
の成果は WHO から期待されている。

## C . 研究方法

1. 地方衛生研究所全国協議会感染症部会と連携し、コア地衛研(レファレンスセンター)6機関に加え、助言者(サポート地衛研)5機関 計 11 機関からなるコア・サポート地衛研組織を組織し、感染研グループと共同研究体制を構築した。

1-1) 検査精度維持向上:感染症法改正(H28年4月施行)に伴って季節性インフルエンザをはじめとする病原体検査の「質の確保」を図る目的で内部精度管理等に必要な書類のリストを検討し、一部ひな形案等を作成した。

1-2) H1pdm09 インフルエンザの流行がみられた H25 及び H27 年度には 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。

2. 平成 25-27 年度に全国 74 力所の地方衛生研究所に対して、PCR 検査の EQA 実施要項、検査方法等に関するアンケートを配布。EQA 試験パネルサンプルの配布をし、EQA を実施した。

結果記入ファイルを回収して、その成績に基づいて、個別のトラブルシューティングと改善への助言を行った。

3. 全国地衛研を対象に、インフルエンザウイルス分離体制、株サーベイランスの現状、要望に関するアンケート調査を 2 回実施した。

4. オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、薬剤耐性株のスクリーニングを行った。

5. 感染研インフルエンザセンターから提供を受けたウイルス RNA を材料として、NA セグメント(A 型および B 型)、HA2 領域(A 型および B 型)および M セグメント(A 型のみ)の塩基配列を決定し、概ね 3-6 日以内に結果を感染研に報告した。塩基配列の決定は、(1) 全セグメント共通のユニバーサル・プライマーによる逆転写、

(2) セグメントごとのプライマーによる PCR 増幅、(3) 各セグメントにつき 10-16 個のプライマーによるサンガー法シーケンス、(4) Phred/Phrap によるアセンブル、の手順で行った。得られた塩基配列もしくはアミノ酸配列をもとに、近隣結合法および最尤法で分子系統解析を行い、薬剤耐性変異等の出現や変遷について分析を行った。

6. 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、インフルエンザワクチンの接種前後のペア血清を収集した。ワクチン株に対する抗体価の測定は、赤血球凝集抑制試験(HI)法にて定法に従って行った。

(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。

## D. 研究結果

1. 試験外部精度管理(EQA)への協力

全国地衛研で EQA を開始するために、説明書やアンケート内容の事前確認等をコア・サポート地衛研で行った。

2. 全国 74 力所の地方衛生研究所に対して、EQA の実施要項、検査方法等に関するアンケート、結果記入ファイルの配布をした。既に配布済みの H5 および H7 亜型検出用陽性コントロールを利用した H5 および H7 亜型定量的検査を実施した。検査結果を集計して QA 評価を行った。

3. 検査、教育訓練等の手順書などの文書整備を進めるため、書式のひな形を作成し、全国地衛研に参考資料として提示した。

4. 全国 73 力所の地方衛生研究所を対象にして EQA を実施した。このために配布し

た文書は、「全国地衛研外部精度管理 (EQA2015) 実施結果について」、「精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」、「トラブルシューティング時のフローチャート」、「EQA2015 の結果およびアンケートの集計」である。

5 . 72 カ所の地衛研 (46 道府県、26 の政令指定都市・中核市・特別区) に対して、2010/11 シーズンのインフルエンザウイルス分離効率について質問した。70%以上の高い分離率でやれる研究機関が全体の半数 (34 機関 : 全体の 51%) を占めた。しかし、分離効率が 50% を下回った機関が 1 割程度存在していた。これらの機関に対しては、改善の技術支援が必要がある。

6 . 札幌市における耐性ウイルスの検出率は 83%、北海道全体における耐性ウイルスの検出率は 79% であった。現在のところ、耐性ウイルスの検出は札幌市を中心とした地域流行にとどまっており、北海道以外の地域における耐性ウイルスの検出率は 3% であった。

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

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

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

8 . ベンチトップ型の次世代型シーケンサーであるイルミナ社の MiSeq を用いて、全 8 セグメント解析を行うためのプロトコールの検討を行い、4 日間で 20 株程度について、

全セグメントの全長解析が可能な暫定プロトコールを作成した。対費用効果やサーベイランスへの汎用性を検討するため、シーケンスリード長の最適化、二本鎖 cDNA 合成法の改良、宿主由来配列の除去、およびデータ処理パイプラインの構築を行った。

9 . 新型 IFV のリスクを高める二次変異の予測と監視

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

MOE を用いて HA 蛋白質単量体、及び三量体構造を構築し、結合シミュレーションと変異導入解析を組み合わせ、ヒト型感染受容体指向性を増強する適応変異候補 44 種、三量体安定化に寄与する補償変異候補 14 種を特定した。中国で新たに A (H7N9) の感染症例からのウイルスは、HA の可変性ループ等に新たな変異を持っていた。しかし、いずれも我々の予測したリスク変異を持っていないこと、新たな変異は HA 受容体結合部位周辺や多量体形成の境界面近傍には位置していないために受容体指向性変化や三量体安定化への影響は小さいこと、などから、流行のリスクは低いと判断した。その後の継続的な監視により、現時点までに、これら散発的に発生したトリ A (H7N9) 中国株の大規模な流行は起こっておらず、計算科学での予測と実際の流行動態が一致していた。

10 . MD simulation の実施における環境整備

MD simulation の実施のために対象分子とその変異情報を国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第一室から随時入手できる体制を整備した。MD の高速計算を可能とする高性能サーバの確保のために、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と共同研究体制を構築し、当該施設が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。11 .2013/14 シーズンのインフルエンザワクチンの A(H1N1)pdm、A(H3N2)、B に対する血清抗体応答の評価を行った。その結果、ワクチンの免疫原性の評価を行い、成人、高齢者共におおむね良好な結果が得られた。

## E . 考察

改正感染症法の平成 28 年度施行を目指して、PCR 検査 EQA を全国規模で 3 回実施した。これにより、全国的なインフルエンザ PCR 検査の「質」の向上が確保された。インフルエンザウイルス検査の EQA は地衛研組織に定着すると思われるが、担当者の世代交代においても息長くこの体制を維持するためには、今回の法改正が強力な後ろ盾となる。今後、EQA 企画機関と実施機関双方の負担軽減策も模索する必要があり、試験パネル配布や評価成績の集計など外部機関への委託を検討すべきかも知れない。

また、EQA の実施記録や次世代の後継者に技術を継承するためには、記録文書の整備と保管、引継ぎ体制の整備も継続的に進める必要があり、本研究班から提示した書式のひな形を有効活用して、全国一律に整備を進めてもらいたい。

株サーベイランスの根幹は原因ウイルスの分離回収を効率よく実施できる環境整備と担当者の質の向上、教育訓練が不可欠である。PCR 検査精度の整備には遅れたが、これも 2 回にわたるアンケート調査で実態把握と教育訓練の必要な機関を特定し、現地対応で解決へ向けた方策を講じた。大半の地衛研は 50%以上の分離効率を維持しており、諸外国に比べて高いレベルと精度を維持し

ていると思われる。今後は、定期的に感染研と情報交換をしてウイルスの性状変化に適正に対処できる技術の維持に努めたい。

疫学情報とリンクさせた遺伝子配列情報から MD simulation を実施し、ウイルス変化予測およびリスク評価を実施してきたが、より取扱量と分析結果を得るまでの時間短縮のためにスーパーコンピュータを駆使した環境整備に着手した。WHO はワクチン株選定にこのシミュレーション法を本格的に導入することを決め、H28 年度から動き出す。本研究からの成果は、それを先取りしており、WHO および国内のワクチン株選定法の改良に貢献していきたい。

## F . 結論

・コア・サポート地衛研 - 感染研共同研究体制第 2 期の最終年度を迎えて、今後の存続が期待されている。その可否は厚生労働行政に直結する研究への予算配分次第である。

・全国地衛研を対象とした EQA が 3 度実施され、PCR 検査技術の大幅な改善と均てん化が達成された。

・EQA の定着に伴ってそれらに必要な文書整備がすすめられた。

・ウイルス分離・培養環境整備と問題解決のための第 2 回アンケート調査を実施した。要望に応じて、実地研修を実施し、改善への策を講じた。

・MD simulation の実施の高速化への環境整備として、北大との共同研究体制を構築し、WHO ワクチン株選定会議への貢献を視野に準備を進めた。

## G . 研究発表

1. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N,

- Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y.
- Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Jul 10. doi: 10.1038/nature12392. [Epub ahead of print]
2. Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan *Influenza Other Respi Viruses*. (2013) Jun 8. doi: 10.1111/irv.12132
  3. Aina A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults *Hum Vaccin Immunother*. 9(9): Jun 27 (2013)
  4. Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization 's Western Pacific Region. *Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System Vol 4 ( 3)*, (2013) doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009
  5. Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M and Odagiri T Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population *Jpn.J.Infect.Dis*.66: 549-551, 2013
  6. E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in japan, november to december 2013 *Eurosurveillance*, Volume 19, Issue 1, 09 January 2014
  7. 小田切孝人、田代真人 中国でヒトに感染した鳥インフルエンザA(H7N9) ウイルスの性状、検査系の開発およびワクチン開発とその問題点 *ウイルス* 63(2), 233-240 (2013)
  8. Barr IG, Russell C, Besselaar TG, Cox NJ, Daniels RS, Donis R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Schultz-Cherry S, Shu Y, Smith D, Tashiro M, Wang D, Webby R, Xu X, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza

- A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. *Vaccine*. 2014 Aug 20;32(37):4713-25
9. Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92777
  10. Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Mariilda M. Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong, Wenqing Zhang, Rod S. Daniels, Aeron C. Hurt Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013 *Antiviral Research*. 2014, Oct;110:31-41
  11. Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill*. 2014 Jan 9;19(1)
  12. Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis*. 3;14(1):362-, 2014
  13. Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *PNAS* (2015 May) [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112)
  14. 2) 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 May;59(5):2607-17. doi: 10.1128/AAC.04836-14. Epub 2015 Feb 17.
  15. Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in Tmprss2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region. *J Virol*. 2015 May

- 1;89(9):5154-8. doi:  
10.1128/JVI.00124-15. Epub 2015 Feb 11.
16. Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, Daniels RS, Gunasekaran CP, Hurt AC, Kelso A, Klimov A, Lewis NS, Li X, McCauley JW, Odagiri T, Potdar V, Rambaut A, Shu Y, Skepner E, Smith DJ, Suchard MA, Tashiro M, Wang D, Xu X, Lemey P, Russell CA Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift *Nature*. 2015 Jul 9;523(7559):217-20. doi: 10.1038/nature14460
  17. Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan *PLoS One*. 2015 Jun 16;10(6):e0130208. doi: 10.1371/journal.pone.0130208.
  18. 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*. 2016 Jan 21;69(1):83-6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.460
  19. Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Neya S, Hoshino T Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase. *Bioorg Med Chem*. 2015 Sep 1;23(17):5466-75. doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.0
  20. 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. *Emerg Infect Dis*. 2016 Mar;22(3). doi: 10.3201/eid2203.151360
2. 学会発表
    1. 小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、金南希、江島美穂、高下恵美、今井正樹、田代真人、菖蒲川由郷、齋藤玲子 卵馴化によるインフルエンザワクチン株の抗原変異と2012/13シーズンのワクチン効果の評価 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷、2013年6月
    2. 小田切孝人 動物由来インフルエンザウイルス (A/H3N2 variant、A/H7N9) のヒト感染例とワクチン開発 第13回人と動物の共通感染症研究会学術集会 東京、2013年11月
    3. 岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に中国で分離されたA(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家畜に対する病原性の解析 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月
    4. 高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小田切孝人 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつA(H7N9)およびA(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月
    5. 藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第



- 61回日本ウイルス学会 神戸、  
2013年11月
6. 小田切孝人 A(H7N9)インフルエンザと  
ワクチン開発 第55回臨床ウイルス学  
会 札幌、2014年6月
  7. 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。
  8. 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、  
安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛  
史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、  
前中勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義  
裕、田代真人、竹田誠 II型膜貫通型セ  
リンプロテアーゼTMPRSS2はHA開裂部位  
にmono-basicなアミノ酸配列をもつA型  
インフルエンザウイルスに対する肺内  
必須活性化酵素である 第62回日本ウ  
イルス学会学術集会。2014年11月10-12  
日(月-水) 横浜。
  9. 内藤忠相、齋藤峰輝、信澤枝里、小田切  
孝人、田代真人 インフルエンザウイル  
スのゲノム変異導入率を生業するRNAポ  
リメラーゼの機能領域 第62回日本ウ  
イルス学会学術集会。2014年11月10-12  
日(月-水) 横浜。
  10. 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島  
美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝  
人 過去3シーズンに混合流行したB型  
インフルエンザウイルスの遺伝子解析  
第62回日本ウイルス学会学術集会。2014  
年11月10-12日(月-水) 横浜。
  11. 浅沼秀樹、相内章、許斐奈美、佐藤佳代  
子、田代真人、小田切孝人 フェレット  
に対する免疫原性を基盤とした細胞培  
養ワクチン用種株選定法の確立 第62  
回日本ウイルス学会学術集会。2014年11  
月10-12日(月-水) 横浜
  12. A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto,  
Aldise M Natri, Edith F Puruhito, 横  
田(恒次)恭子, 西村 研吾, 影山 努, 高  
原 悠佑, 堀田 博, 清水 一史.  
Comparative analysis for the  
detection of avian influenza H5N1  
virus by using a novel luminescence  
analyzer(POCube) and real-time RT-PCR.  
第62回日本ウイルス学会学術集会。横浜。  
2014年11月
  13. 高山 郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内 美  
名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小  
田切 孝人, 田代 真人, 影山 努. 2014  
年にベトナムでヒト感染が確認された  
高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウ  
イルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイル  
ス学会学術集会。横浜。2014年11月
  14. 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴  
木忠樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、  
高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代  
真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹  
高病原性鳥インフルエンザA(H5N1)ウ  
イルスの経鼻不活化全粒子ワクチンによ  
り誘導されたヒトモノクローナル抗体  
の特異性 第62回日本ウイルス学会学  
術集会。横浜。2014年11月
  15. 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、  
田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田  
毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザ  
ワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗  
体応答の比較 第18回日本ワクチン学  
会学術集会。福岡。2014年12月
  16. 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴  
木忠樹、大原有樹、池田千將、伊藤良、  
泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切  
孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、  
長谷川秀樹 経鼻不活化全粒子インフ  
ルエンザワクチンにより誘導されたヒ  
トモノクローナル抗体の特性解析 第  
18回日本ワクチン学会学術集会。福岡。  
2014年12月
  17. 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、  
幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、  
長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワク  
チンの動態と抗体応答 第18回日本ワ

- クチン学会学術集会. 福岡. 2014年12月
18. 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宣聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対するTLRアゴニストの影響 第18回日本ワクチン学会学術集会. 福岡. 2014年12月
  19. Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第63回日本ウイルス学会 2015年11月 福岡
  20. E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
  21. C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
  22. 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第47回日本小児感染症学会、福島、2015
  23. C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fujisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
  24. E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H Sato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
  25. 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人. 2014/15シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.
  26. Yasushi Suzuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Eri Nobusawa Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
  27. Akira Ainai, Shinji Saito, Tadaki Suzuki, Norihiro Harada, Shin-ichi Tamura, Yoshikazu Yuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruko Takeyama, Hideo Tsukada, Hiroshi Kiyono, Hideki Hasegawa Impact of a nasal mucoadhesive excipient on enhancement of immune responses induced by intranasal vaccination against influenza. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
  28. 相内章、鈴木忠樹、池田千将、寺内芳彦、齊藤慎二、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチン接種直前の鼻腔洗浄が誘導される抗体応答に与える影響 第19回日本ワクチン学会、犬山、2015

29. 島崎典子、原田勇一、落合雅樹、板村繁之、小田切孝人 4価インフルエンザHAワクチンB型2系統HA抗原量を適正に測定するための一元放射免疫拡散試験法の評価及び実施手順の確立 第19回日本ワクチン学会、犬山、2015

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

厚生労働科学研究（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

### 地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究（H25-新興-一般-002）

研究代表者 小田切孝人（感染研インフルエンザウイルス研究センター）  
 研究分担者 皆川 洋子（愛知県衛生研究所、地全協感染症対策部会）  
 影山 努（感染研インフルエンザウイルス研究センター）  
 今井正樹（東大医科研ウイルス感染分野）（H26-27年度）  
 佐藤裕徳（感染研病原体ゲノム解析研究センター）  
 藤田信之（独立行政法人製品評価技術基盤機構）（H25-26年度）  
 齋藤玲子（新潟大学医歯学系国際保健学講座）（H25-26年度）  
 高下恵美（感染研インフルエンザウイルス研究センター）（H25年度）

#### 研究協力者

（コア地衛研： 6地衛研）

岩手県環境保健研究センター：高橋雅輝、齋藤幸一  
 東京都健康安全研究センター：新開敬行、長島直美、林志直  
 大阪府立公衆衛生研究所：森川佐衣子、廣井聡、加瀬哲男  
 山口県環境保健センター：戸田昌一、調恒明（H25）  
 愛媛県立衛生環境研究所：山下育孝（H26から）  
 愛知県衛生研究所：安井善宏  
 福岡県保健環境研究所：芦塚由紀、吉富秀亮、千々和勝巳

（サポート地衛研： 5地衛研）

北海道衛生研究所：駒込理佳、長野秀樹  
 横浜市衛生研究所：川上千春  
 富山県衛生研究所：小淵正次、滝澤剛則  
 堺市衛生研究所：内野清子、三好龍也、田中智之  
 沖縄県衛生環境研究所：喜屋武尚子、仁平稔

第1期  
(H22～24年度)

第2期  
(H25～27年度)

次期  
(H28年度以降)

コア・サポート地衛研 - 感染研  
連携網の構築と共同プロジェクト  
の試行



全国地衛研参加のプロジェクトへ展開

- 新型および季節性インフルのPCR検査EQA体制の構築と試行
- 実施戦略の見直し、改良
- 全国規模での実施への準備

研究開発パート

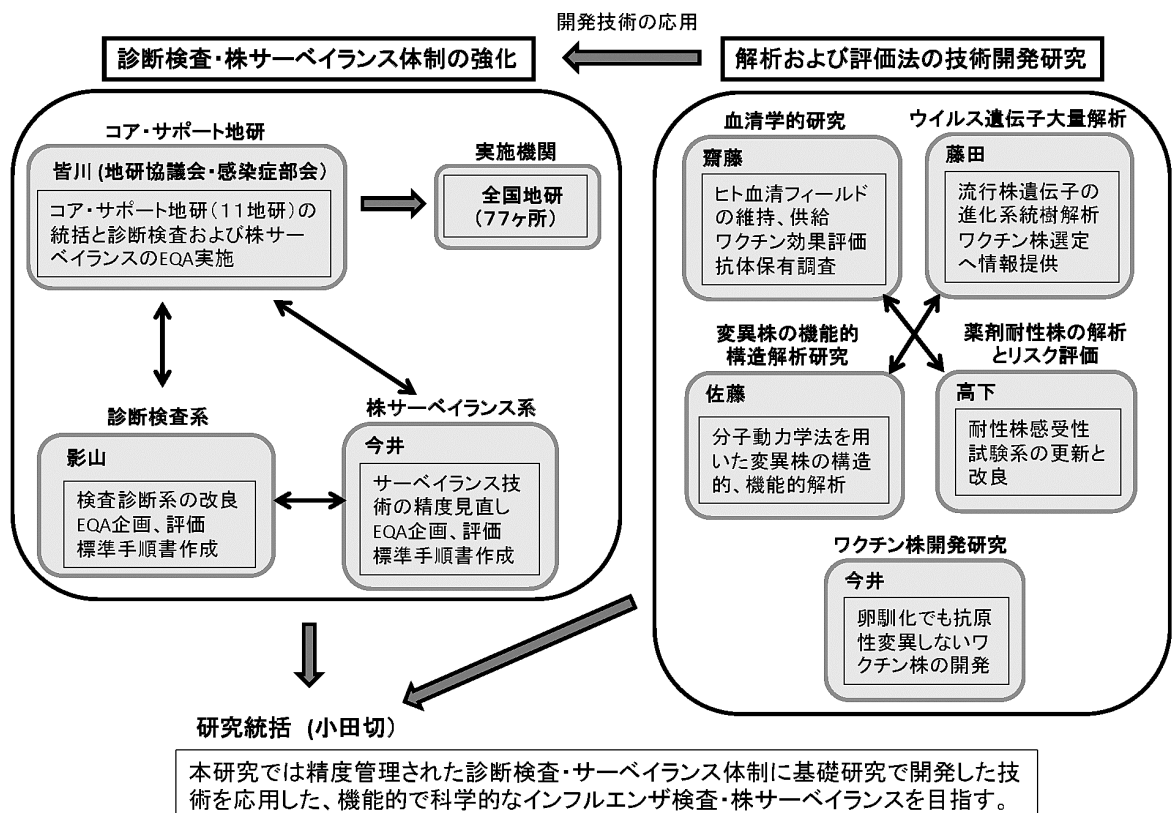
- PCRによる薬剤耐性H1N1pdmの検出系の構築と改良
- 計算科学を応用して、ウイルスリスク評価系の構築、サーベイランスへの応用

- 全国地衛研参加のPCR検査EQAの開始（3回実施）
- PCR検査系の改善
- ウイルス分離・培養技術の強化への取り組み
- 個別対応・現地調査

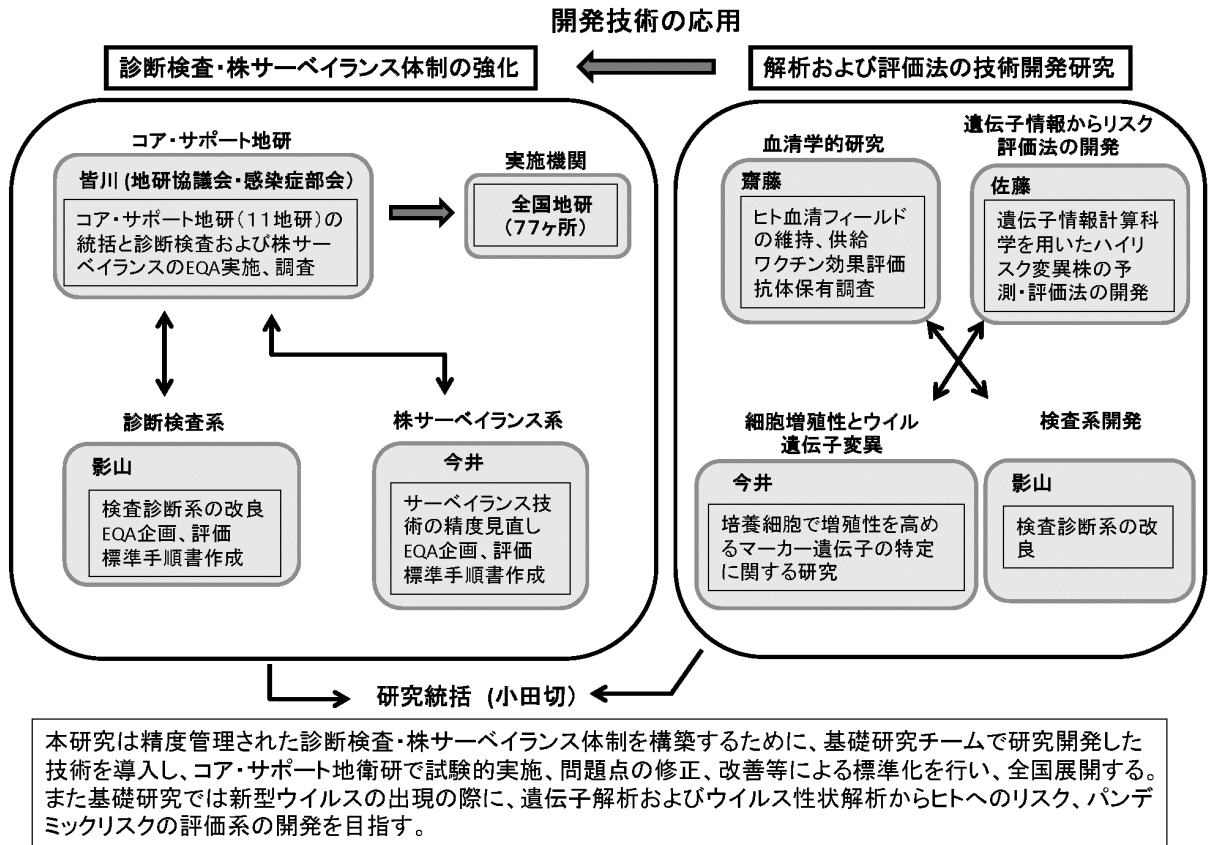
研究開発パート

- 計算科学による薬剤耐性株の流行（2013/14札幌）のリスク評価

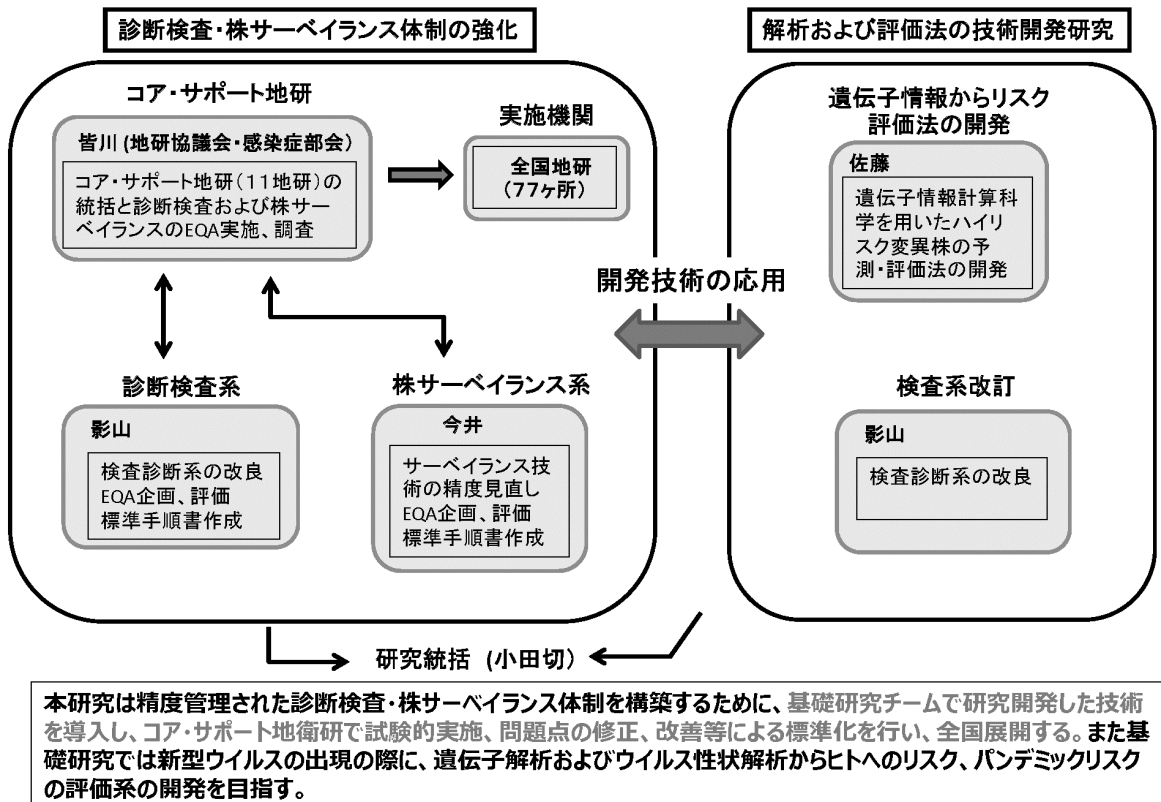
## 研究項目の概要と役割分担および相互関連（H25年度）



## 研究項目の概要と役割分担および相互関連（H26年度）



## 研究項目の概要と役割分担および相互関連（H27年度）



## 本研究プロジェクトの意義と期待される成果

### 背景と意義

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

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

### 期待される成果

#### 1. 全国地衛研でのPCR検査EQAの定期的な実施

- ⇒ 第1回目：問題点の認識と改善への取り組み（H25年度）  
第2回目：正確性、精度の飛躍的改善が実現（H26年度）  
第3回目：安定した精度での検査が可能（H27年度）

#### 2. ウイルス分離・培養技術の改善 ⇒ 原因ウイルスの回収とワクチン開発への貢献

#### 3. 薬剤耐性変異株、H5やH7亜型ヒト分離株の遺伝子情報の構造的、機能的解析基盤構築

- ⇒
- ・ 原因ウイルス入手までの初動対応として、遺伝子情報からのリスク評価、パンデミック評価が可能
  - ・ 注意すべき重要変異のリスト化、検査やサーベイランスでの要注意マーカーとして活用
  - ・ 耐性株の地域流行、拡大リスクの予測

## 地衛研側の対応と成果（H25-27年度）

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

(1-1) サーベイランス体制の維持強化：

平成25年4月：H7N9鳥インフルエンザウイルス検査試薬（リアルタイムRT-PCR法によるH7及びM遺伝子検出）の検出感度確認、4月25日付で全地研にフィードバック。

(1-2) 平成25年11月以降オセルタミビル耐性サーベイランス強化。

(1-3) 平成26年4月に熊本県内において家禽鳥インフルエンザ発生時、同12月宮崎県・山口県における発生時、当該ウイルスH5遺伝子におけるRT-PCR検出感度変異等について感染研に照会、必要な情報を地研間で情報共有。

(1-4) 感染研におけるワクチン株検討に必要な分離ウイルス株・臨床検体の活用が円滑に行われるよう、事務手続きを含む全地研の実態把握・情報提供。

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

(3) 28年4月改正感染症法施行に備えて、各研究機関における内部精度管理等に必要な書式等をコア・サポート地方衛生研究所間で検討。通知等に項目のみ示された必要書式のひな形を作成し、地研ネットワークを通じて提供の予定。

## 第1～3回全国(74ヶ所)地衛研参加のEQAの実施 (H25-27)

- ・EQA実施要項、事前アンケート (参加確認)の配布
- ・73～74カ所の地衛研へパネル検体発送
- ・試験実施、結果報告およびアンケート送付の締切
- ・集計、EQAの解析結果報告

パネル検体	亜型	濃度 (copies/ $\mu$ L)	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%)

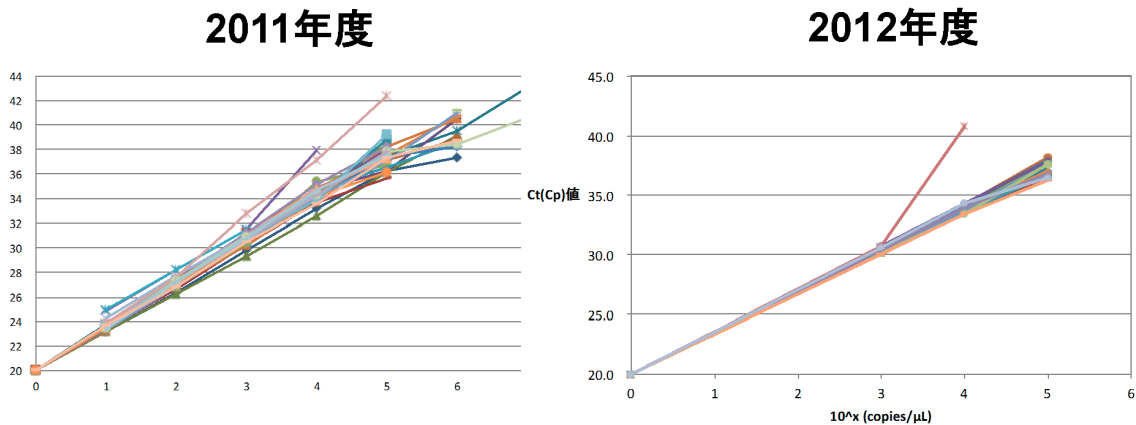
検体	A	B	C	D	E	F
亜型	H1N1pdm09	H7N7	H3N2	H5N2	DW	H5N1
コピー数(/ $\mu$ L)	80	80	8	200	—	80
正解率	100% (73/73)	100% (73/73)	94.5% (69/73)*	100% (73/73)	100% (73/73)	100% (73/73)

\*: A型同定(亜型不明)は100%

3回のEQAの実施でほぼ100%正答率、劇的な精度の改善

参考例

陽性コントロールの増幅曲線 (H5)  
(コアサポート・地衛研成績)



EQA開始当初は、地衛研ごとに精度のばらつきが見られた



回を増すごとに精度の向上、均一化が見られ、検査技術の  
確実な改善が見られた

## ウイルス株サーベイランス体制の強化への取り組み

### 研究の背景

❖ 患者検体からウイルス分離/検出を行う地衛研職員の経験不足や技術力低下が指摘されている。



- 国内で発生・侵入した新型を含むウイルス、薬剤耐性ウイルスの迅速な入手が困難になる。
- 分離株を用いた性状解析・リスク評価が困難になる。



❖ 日本のウイルス流行株・耐性株のサーベイランス体制の機能低下

### 研究の目的

日本のウイルス株サーベイランス体制の強化と改善をする

- 地衛研におけるウイルス分離培養検査体制の現状調査を実施
- 地衛研に対する検査技術の支援を実施

### 研究の成果

- 平成25年度のウイルス分離検査体制のアンケート調査により、ウイルスの分離効率が非常に低いなど、検査体制に問題のある地衛研を特定した。

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

- 平成26年度：平成25年度のアンケート調査結果から分離効率の低かった地衛研を対象にヒアリング調査を実施した。
  - 問題点の把握の完了
    - ✓ 検査担当者が頻繁に交代する。
    - ✓ 担当者が交代する際に引き継ぎ期間が無く、引継ぎが不完全。
  - 検査法の改善策について各地衛研と個別に協議した。

- 平成27年度：全国の地衛研を対象に検査体制についての2回目のアンケート調査を実施した。
  - ウイルス分離効率の改善がみられない地衛研を特定した。
  - 研修の要望があった地衛研を対象に実地研修を行い、現行法の問題点を確認し、改善策を助言した。



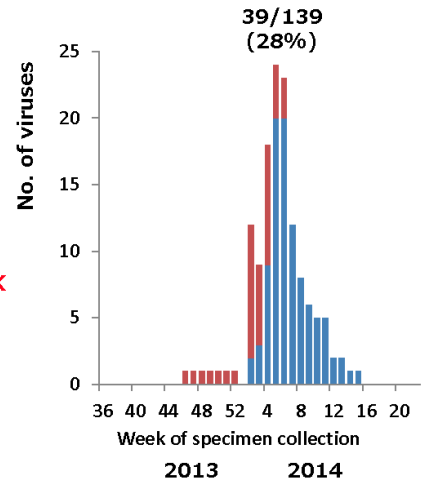
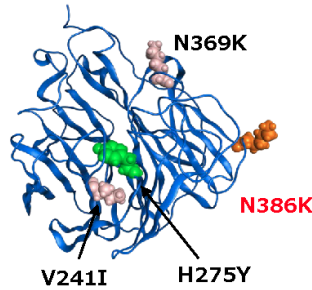
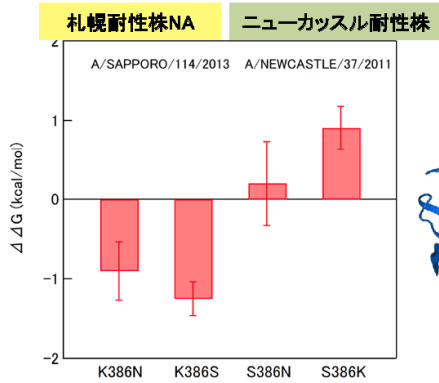
# 変異のリスク予測とサーベイランスによる検証

## (1) 変異ウイルス伝播リスクの予測

札幌 IFV A (H1N1)pdm09薬剤耐性株

NAモデリング→*In silico* 変異導入解析→構造安定性評価

北海道地域での集計



- NA 386K変異に構造安定化の能力は無い
- HAに抗原変異は無い
- 構造生物学的観点からは流行リスクは小

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59:2607-2617, 2015

新たな変異を追加で獲得しない限り、  
大規模な流行拡大はしないと予測

シーズン半ばで消滅した

## (2) 伝播リスクを高める二次変異の予測

中国 トリIFV A(H7N9)

ヒトへの感染性を増強する変異の予測

- (i) ヒト型受容体指向性の昂進
  - ◆HA受容体結合部位周辺：44種類の変異
- (ii) 蛋白質安定化の昂進 (補償変異)
  - ◆HA三量体境界面：14種類の変異

HA trimer model



H7N9 HA (A/Anhui/1/2013)

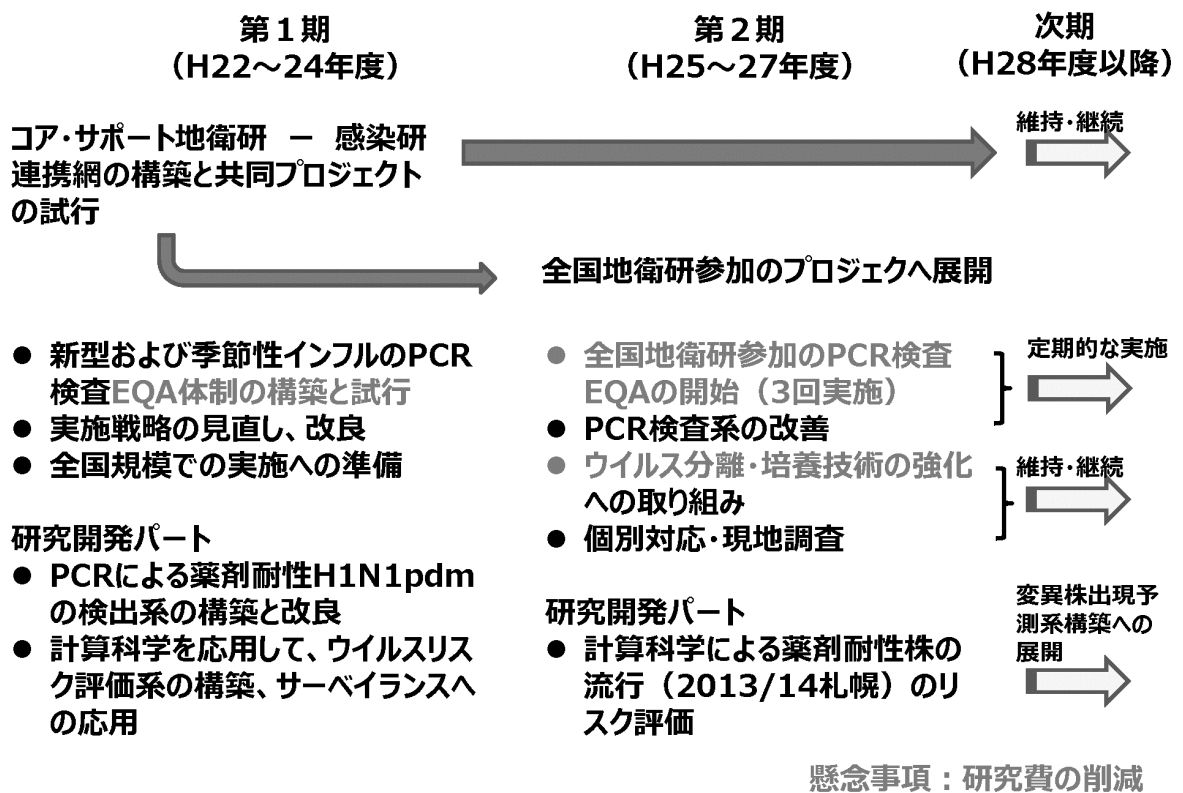
リスク変異の種類と位置を研究代表者に提供  
監視を継続

- ❖ 平成26年1月30日現在、予測した変異をもつA(H7N9)株は報告されていない
- ❖ また、A(H7N9)のヒト-ヒトの大規模拡散も報告されていない
- ❖ 『春節』中・後の監視が重要

- 流行拡大を招くHA二次変異を58種予測
- ❖ヒト型受容体指向性の増強変異44種
- ❖構造安定化に寄与する補償変異候補14種

予測の結論：流行せず  
リスクを増す二次変異は極めて生じにくい  
(トリでは適応度下げる)

3年間の実際のサーベイランス結果と一致



懸念事項：研究費の削減

## 今後に残された課題

1. インフルエンザウイルス（季節性に加えて再興、新型を含む）検査関連情報の迅速かつ正確な伝達を担保するには、コア・サポート地衛研—感染研連携ネットワークでの研究班活動は必要。
2. 平成28年4月に施行される感染症法改正に伴い全国自治体が担当するインフルエンザウイルス病原体情報収集において一定の精度を保つには、地研間（横）及び感染研（縦：外部精度管理の実施等）との連携が不可欠。
3. 全国規模でのPCR検査EQAを定期的に実施すべし。
4. 株サーベイランス技術のテコ入れは必須。改善には個別の研修等の対応が必要。また、定期的にアンケート調査を行なう。
5. インフルエンザウイルス遺伝子計算科学の手法をサーベイランスに取り入れる。変異株出現予測、ウイルス変異予測系を構築する。
6. 研究費予算の減少は、これらの対応を不可能にする。危機管理上でも懸念される。